

表 3 シザンドリンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
AUC	薬剤	323	1	323	0.15	7.71
	時期	46	1	46	0.02	7.71
	被験者	38747	5	7749	3.70	6.26
	合計	47482	11	4317		
	残差	8366	4	2092		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
C _{max}	薬剤	38	1	38	0.11	7.71
	時期	117	1	117	0.36	7.71
	被験者	12811	5	2562	7.80	6.26
	合計	14279	11	1298		
	残差	1314	4	328		

表 4 リクイリチゲニンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
AUC	薬剤	25544039	1	25544039	0.77	7.71
	時期	163979417	1	163979417	4.97	7.71
	被験者	61994596	5	12398919	0.38	6.26
	合計	383561243	11	34869204		
	残差	132043191	4	33010798		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
C _{max}	薬剤	4105167	1	4105167	0.80	7.71
	時期	14819216	1	14819216	2.89	7.71
	被験者	18845674	5	3769135	0.73	6.26
	合計	58308748	11	5300795		
	残差	20538691	4	5134673		

表 5 アサリニンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
AUC	薬剤	8913629	1	8913629	5.60	7.71
	時期	12362745	1	12362745	7.76	7.71
	被験者	20869358	5	4173872	2.62	6.26
	合計	48516796	11	4410618		
	残差	6371065	4	1592766		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
C _{max}	薬剤	4720411	1	4720411	3.85	7.71
	時期	1579471	1	1579471	1.29	7.71
	被験者	3197572	5	639514	0.52	6.26
	合計	14397003	11	1308818		
	残差	4899549	4	1224887		

表 6 リクイリチンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
AUC	薬剤	45092047	1	45092047	1.18	7.71
	時期	12093723	1	12093723	0.32	7.71
	被験者	163552961	5	32710592	0.86	6.26
	合計	373527663	11	33957060		
	残差	152788931	4	38197233		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5% 限界値
C _{max}	薬剤	6554041	1	6554041	3.24	7.71
	時期	9592964	1	9592964	4.74	7.71
	被験者	13957281	5	2791456	1.38	6.26
	合計	38194095	11	3472190		
	残差	8089809	4	2022452		

分担研究課題

生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性等に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長

協力研究者 渥美さやか 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

LC/MS 分析データを利用した生薬成分のメタボローム解析に関する研究

研究要旨 国内市場に流通するニンジン及びサイコの熱水抽出エキスについて、LC/MS 分析を利用したメタボローム解析を行った。多変量解析により生干人参と湯通人参の成分比較を行ったところ、OPLS/OPLS-DA による判別分析ではそれぞれの生薬に特徴的なピークを7つずつ検出した。また、サイコにおける PCA による主成分分析の結果、*Bupleurum falcatum* L. 及び *B. chinense* D. C を判別し得る成分を見出した。

研究協力者

川原信夫 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
淵野裕之 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター
高橋 豊 エムエス・ソリューションズ株式会社
袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

様性確認を指向し、生薬の品質管理・評価における成分情報の多変量解析の有用性を検討するため、汎用生薬であるニンジンおよびサイコを対象として LC/MS 分析データを用いたメタボローム解析を行った。

B. 研究方法

材料

本研究に用いたニンジンおよびサイコの熱水抽出エキスは、国内市場に流通する生薬サンプルを2時間加熱還流して凍結乾燥したものを、医薬基盤研究所薬用資源研究センターより譲り受けた。試料の詳細を表1に示す。

A. 研究目的

近年、総人口に占める高齢者の割合が急速に増加し、国民の健康ニーズも多様化する中、代替医療やセルフメディケーションの担い手として漢方医学が注目を集めている。漢方医学で使用される漢方薬は動植物を原料とする生薬から構成されるが、これらは天然由来であるため、基原種や産地、栽培条件、加工・調製法などの違いにより品質に差が生じやすく、品質保証のためには化学薬品とは異なった視点からのアプローチが求められる。他方、近年、高性能な機器分析により得られた膨大なデータの網羅的解析を行うメタボロミクス研究が急速な発展を遂げており、薬用植物や生薬を含め、幅広い分野に活用され始めている¹⁻³⁾。本研究では、メタボローム分析による多

LC/MS 測定

1) ニンジン

凍結乾燥試料を 0.1%酢酸水溶液に溶解して 2 mg/mL に調製し、1 分間超音波処理した後、遠心分離して得た上清を LC/MS 分析に供した。測定条件は以下の通りである。

LC 部 : Shimadzu Prominence UFLC (島津製作所)

➤ カラム Thermo Scientific

Hypersil-GOLD, 2.1 x 100 mm, 1.9 μm

- 移動相 A = 0.1 % 酢酸水溶液、
B = 0.1 % 酢酸／アセトニトリル
- グラジエント B = 5 - 20% (5 min) -
60% (30 min) - 90% (35 min) -
100% (38 min)
- 流速 0.2 mL/min
- 注入量 20 μ L (Pos), 15 μ L (Neg)
- 検出器 PDA

MS 部 : LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific)

- ESIスプレー電圧 4,000 V
- キャピラリー温度 200° C
- スキャン時間範囲 0 - 35 min
- スキャン m/z 範囲 100~2,000
- 質量分解能 30,000
- CID電圧 45V
- プリカーサー m/z 範囲 3.5

ESI ポジティブモードとネガティブモードの比較では、ネガティブモードにおけるピークの絶対強度がポジティブモードの約3倍の値で観測されたことから、解析にはネガティブモードのデータを用いた。

ニンジンに含まれる ginsenoside Rg1 (12.8 min, m/z 799) と ginsenoside Rb1 (18.1 min, m/z 1107) のピークは、標品の保持時間と MS スペクトルとの比較によって同定した。

2) サイコ

凍結乾燥試料を 50%メタノールに溶解して終濃度 1 mg/mL に調製し、1 分間超音波処理した後、遠心分離して得た上清を LC/MS 分析に供した。測定条件は以下の通りである。

LC 部 : Shimadzu Prominence UFLC (島津製作所)

- カラム Thermo Scientific
Hypersil-GOLD, 2.1 x 100 mm, 1.9 μ m
- 移動相 A = 0.1 % 酢酸水溶液、
B = 0.1 % 酢酸／アセトニトリル
- グラジエント B = 5 - 70% (30 min) -
100% (35 min) - 100% (38 min)
- 流速 0.2 mL/min

- 注入量 10 μ L
- 検出器 PDA

MS 部 : LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific)

- ESIスプレー電圧 4,000 V, -3,000 V
- キャピラリー温度 300° C
- スキャン時間範囲 0 - 38 min
- スキャン m/z 範囲 100~2,000
- 質量分解能 30,000
- CID電圧 35V
- プリカーサー m/z 範囲 3.5

ESI ポジティブモードとネガティブモードの比較では、ポジティブモードにおけるピークの絶対強度がネガティブモードの約3倍の値で観測されたことから、解析にはポジティブモードのデータを用いた。

サイコに含まれる saikosaponin a (21.1 min, m/z 781) と saikosaponin d (24.2 min, m/z 781) のピークは、標品の保持時間と MS スペクトルとの比較によって同定した。

ピーク抽出

Sieve 2.0 (ThermoFisher Scientific) を用いてピークの抽出を行った。ピーク抽出条件は以下の通り。

- ターゲット Small Molecule
- ピーク検出アルゴリズム Base Peak Framing
- 実験タイプ Single, A vs B, Trend
- 抽出時間範囲 0 - 35 min (ニンジン)
0 - 38 min (サイコ)
- 抽出 m/z 範囲 100~2,000
- フレームの時間幅 0.5 min
- フレーム m/z 幅 10 ppm
- フレーム最大数 5,000
- ピーク強度閾値 5,000

多変量解析

SIMCA-P⁺ 12 (Umetrics) を用いて主成分分析 (PCA) および判別分析 (OPLS-DA) を行った。解

析の前処理として、フレームデータの標準化にはパレートスケール (Par) を適用した。

C. 結果・考察

ピーク抽出の条件検討

LC/MS 分析データを用いたメタボローム解析は、試料調製、LC/MS 測定、データ処理、多変量解析の手順によって進められるが、これらのステップすべてが誤差を発生する要素を含み、結果に影響する可能性がある。中でも、LC/MS のピークと試料中の成分を紐付けるピーク抽出の作業は、その後の多変量解析の結果に直結するにも関わらず標準化が困難で、未だに標準技術は確立されていない。そこで本研究では、はじめに、ニンジン熱水抽出エキスの LC/MS 分析データを用いて、Sieve 2.0 におけるパラメータの検討を行った。

1) ピークアライメント

Ref ファイルに TIC で比較的多くのピークが観察された NIB-077 を指定した場合、自動アライメント処理によってクロマトグラムのアライメントは明らかに悪化した (図 1)。このアライメントパターンは鋳型となる Ref ファイルを変更しても同様であったため、アライメントの結果は採用せず、保持時間の補正を行わないままピーク抽出に進むこととした。

2) 実験タイプ

Sieve 2.0 のピーク検出アルゴリズムに Base Peak Framing を指定すると、実験タイプとして① Non-differential Single Class Analysis (Single) ② Two Sample Differential Analysis (A vs B) ③ Control Compare Trend (Trend) ④ Differential Case Study with ROC Analysis (ROC) の 4 種類を選択することができる。このうち Single、A vs B、Trend について、実験タイプの選択がピーク抽出および主成分分析に与える影響を検討した。A vs B では LC/MS データを生干しと湯通しの二群に分け、Trend では生干し、湯通し、紅参、その他の四群を指定した。その結果、いずれの実験タイプを選択した場合でも、抽出されたピークは同一で、全てのサンプルにおいて

ginsenoside Rb₁ および Rg₁ のピークを正しく検出できた。すなわち、Sieve の実験タイプの選択は抽出されるピークに影響しないことが明らかになった。

3) ピーク抽出対象サンプル

モデル試料の中には、情報が乏しいために多変量解析、特に判別分析の対象として使用できないものも存在する。そこで、判別分析を目的とする解析の過程において、ピーク抽出の際に対象とするサンプルを絞った場合と、ピーク抽出は全サンプルを対象として、判別分析の段階でサンプルを絞った場合とで、結果に差が生じるかどうかを検討した。Sieve の Trend タイプにおいて、対象を生干し 4 試料と湯通し 5 試料の 9 試料に限定した場合と、全ての試料を対象として四群でピーク抽出を行った場合とでは、抽出されるピークは明らかに異なっていた (図 2-1)。さらに、SIMCA-P を用いた OPLS/OPLS-DA の S プロットにおいて、ローディング係数 ± 0.5 以上、信頼性 ± 0.75 以上のマーカー候補を探索した結果では、Sieve において 16 試料全てのピーク抽出を行った場合に 20 成分 (同位体ピークを除くと 14 成分) が得られたのに対して、9 試料のみからピーク抽出を行った場合では前 20 成分のうち 14 成分 (同位体ピークを除くと 10 成分) しか得ることができなかった (図 2-2, 表 2a, b)。さらに、モデルの寄与率の比較においても、前者の $R^2 = 0.866$, $Q^2 = 0.864$ に対して、後者は $R^2 = 0.790$, $Q^2 = 0.867$ と、ピーク抽出時のサンプル数が多変量解析のモデルの妥当性に影響を与えていることが明らかになった。以上の結果から、判別分析を目的とした解析でも、ピーク抽出を行う際のサンプル数は多く設定することが、より有益な結果に繋がること が示唆された。

以上まとめると、多変量解析の前処理としてのピーク抽出に際し、①自動アライメントの結果を処理前のクロマトグラムと比較し、Ref ファイルの選択とアライメント結果の採用には慎重な判断が必要であること、②実験タイプの選択は結果を左右しないこと、③解析の目的に関わらずサン

プル数を多く設定すること、が重要であることが明らかになった。

多変量解析による生干人参と湯通人参の成分比較

ニンジンの修治過程における含有成分の変化は白参と紅参を対象とした解析が数多く報告されているが、日本薬局方に“人参”として収載されている生干人参および湯通人参の成分比較を行った例はほとんどない⁴⁻⁷⁾。そこで、本研究ではLC/MSデータを用いた多変量解析により、国内に流通する人参の成分多様性を調査した。

全 16 試料の LC/MS 分析データから前述の条件に従ってピーク抽出を行い 5,000 のピークを得た。PCA による主成分分析では、NIB-56 と NIB-93 が 95%信頼区間から外れたものの、NIB-77, 112, 113, 149, 184 の 5 試料は比較的まとまりのあるクラスターを形成し、試料の情報から、このクラスターに含まれるサンプルは湯通人参あるいは紅参であると推測された(図 3)。しかし、このモデルの寄与率は $R^2 = 0.543$ 、 $Q^2 = 0.30$ であったことから、試料間のばらつきが大きく、クラスターによる属性の予測度は高くはないと考えられた。

一方、OPLS/OPLS-DA による判別分析では、前述の通り、生干人参に特徴的な 7 つのピークと湯通人参に特徴的な 7 つのピークを得ることができた(図 2a, c)。さらに、個別試料における各ピークの比較では、RT 11.2 min, m/z 961.5 と RT 17.2 min, m/z 1269.7 のピークが、生干人参において湯通人参よりも明らかに高いピーク強度を示した(図 4)。精密質量による組成推定から、これらのピークの成分は $C_{48}H_{82}O_{19}$ と $C_{60}H_{102}O_{28}$ と予測され、MS スペクトルからいずれも ginsenoside 類であることが示唆された。さらに、 $C_{48}H_{82}O_{19}$ は 3 つ、 $C_{60}H_{102}O_{28}$ は 5 つの糖を含む化合物と推定され、湯通人参では加熱によって糖鎖が脱離し構造変化が生じた可能性が示唆された。

紅参と人参の成分比較では、加熱処理による malonyl ginsenoside 類の脱マロニル化や糖鎖の脱離、異性化が生じ、紅参特有の ginsenoside 類

が生成されることが報告されている⁵⁾が、今回、生干人参と湯通人参でも同様に、糖鎖の脱離による ginsenoside 類の構造変化が生じる可能性が示唆された。

サイコの基原種による成分比較

第 16 改正日本薬局方には、生薬柴胡の基原種として *Bupleurum falcatum* Linné が規定されているが、厳密には、*B. falcatum* L. に加えて *B. chinense* D.C と *B. scorzonerifolium* Willd. も分類学的には同一とみなされ収載種として認められている⁸⁾。そこで、国内に流通する柴胡の成分多様性を調査し、基原種による成分の違いを観察した。

全 10 試料の LC/MS 分析データを用いてピーク抽出を行った。Ref ファイルには NIB-190 を指定して自動アライメントを行い、A vs B の実験タイプの下、5,000 のピークを得た。PCA による主成分分析では、比較的寄与率の高いモデルが得られ ($R^2 = 0.700$ 、 $Q^2 = 0.537$)、NIB-17 が外れた以外は、NIB-122, 123, 191, 220 の *B. falcatum* グループと NIB-18, 80, 121, 153, 190 の *B. chinense* グループに大別することができた(図 5)。さらに OPLS/OPLS-DA による判別分析では、*B. falcatum* に特徴的な 13 のピークと *B. chinense* に特徴的な 20 のピークを得ることができた(図 6, 表 3)。これらのピークの個別試料における比較では、RT 19.0 min, m/z 207.1 のピークが *B. chinense* において *B. falcatum* の 30 倍以上のピーク強度を示した(図 7)。精密質量による組成推定から、このピークの成分は $C_{11}H_{10}O_4$ と予測され、MS スペクトルからクロモンあるいはクマリン骨格を有する化合物と推定された。なお、クロモン類である eugenin は *B. scorzonerifolium* から⁹⁾、クマリン scoparone は *B. frutescens* から単離報告があり¹⁰⁾、*B. falcatum* と近縁変種、あるいは近縁異種を判別するマーカー化合物として利用できる可能性が高い。

D. 結論

多変量解析の前処理として、Sieve 2.0 を用いた LC/MS データからのピーク抽出において注意すべきポイントを明確にするとともに、条件の至適化を行った。国内市場に流通する人参および柴胡の熱水抽出エキスの LC/MS 分析データを用いて多変量解析を行った結果、生干人参と湯通人参、*B. falcatum* と *B. chinense* を判別するためのマーカー化合物となり得る成分を見出すことができた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G.: Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13, 263-269 (2012).
- 2) Jumhawan, U., Putri, S.P., Yusianto, Marwani, E., Bamba, T., Fukusaki, E.: Selection of discriminant markers for authentication of Asian palm civet coffee (Kopi Luwak): a metabolomics approach. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 7994-8001 (2013).
- 3) 大根谷章浩, 瀧野裕之, 高橋豊, 合田幸広, 川原信夫: ショウキョウ国内市場品の一酸化窒素賛成抑制活性と LC/MS メタボローム解析, *生薬学雑誌*, 67, 1-6 (2013).
- 4) Kitagawa, I., Yoshikawa, M., Yoshihara, M., Hayashi, T., Taniyama, T.: Chemical studies of crude drugs (1). Constituents of Ginseng radix rubra. *Yakugaku Zasshi*, 103, 612-622 (1983).
- 5) Kitagawa, I., Taniyama, T., Shibuya, H., Noda, T., Yoshikawa, M.: Chemical studies on crude drug processing. V. On the constituents of ginseng radix rubra (2): Comparison of the constituents of white ginseng and red ginseng prepared from the same Panax ginseng root, *Yakugaku Zasshi*, 107, 495-505 (1987).
- 6) Lee, S.A., Jo, H.K., Im, B.O., Kim, S., Whang, W.K., Ko, S.K.: Changes in the Contents of Prosapogenin in the Red Ginseng (*Panax ginseng*) Depending on Steaming Batches. *J. Ginseng Res.*, 36, 102-106 (2012).
- 7) Yue, H., Ma, L., Pi, Z., Chen, H., Wang, Y., Hu, B., Liu, S.: Fast screening of authentic ginseng products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Planta Med.*, 79, 169-174 (2013).
- 8) 第 16 改正日本薬局方: 日本薬局方収載生薬の学名表記について, 厚生労働省, pp. 2056
- 9) Chang, W.L., Chiu, L.W., Lai, J.H., Lin, H.C.: Immunosuppressive flavones and lignans from *Bupleurum scorzonerifolium*. *Phytochemistry*, 64, 1375-1379 (2003).
- 10) Pistelli, L., Bertoli, A., Bilia, A.R., Morelli, I.: Minor constituents from *Bupleurum fruticosum* roots. *Phytochemistry*, 41, 1579-1582 (1996).

表1-1 ニンジン市場流通品モデル試料

ID	産地	状態	入手年	基原植物	備考
NIB-011	中国吉林省	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	生干
NIB-012	中国吉林省	原形	2008年	<i>Panax ginseng</i>	湯通
NIB-040	中国吉林省	原形	2007年	<i>Panax ginseng</i>	5-6年根
NIB-056	中国吉林省	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	
NIB-061	中国吉林省	刻み	2009年	<i>Panax ginseng</i>	湯通
NIB-067	中国吉林省	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品
NIB-076	中国吉林省	刻み	2009年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品・生干し（主に使用）
NIB-077	中国吉林省	刻み	2009年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品・湯通し
NIB-093	中国遼寧省	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	
NIB-112	中国吉林省	原形	2010年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品・湯通し人參
NIB-113	中国吉林省	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品・紅參
NIB-114	中国吉林省	刻み	2007年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品・生干（主に使用）
NIB-149	中国吉林省	原形	2008年	<i>Panax ginseng</i>	
NIB-170	中国吉林省	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	栽培品（主に使用）
NIB-183	中国吉林省	原形	2010年	<i>Panax ginseng</i>	生干人參
NIB-184	福島県	原形	2009年	<i>Panax ginseng</i>	湯通人參

表1-2 サイコ市場流通品モデル試料

ID	産地	状態	入手年	基原植物	備考
NIB-017	日本茨城県	原形	2010年	<i>Bupleurum falcatum</i>	
NIB-018	中国遼寧省	原形	2010年	<i>Bupleurum chinense</i>	中国栽培品
NIB-080	中国湖北省	刻み	2007年	<i>Bupleurum chinense</i>	栽培品（主に使用）
NIB-121	中国河北省	刻み	2007年	<i>Bupleurum chinense</i>	野生品・津柴胡（主に使用）
NIB-122	中国四川省	刻み	2010年	<i>Bupleurum falcatum</i>	栽培品・中国で栽培した三島柴胡
NIB-123	中国茨城県	原形	2010年	<i>Bupleurum falcatum</i>	栽培品・三島柴胡
NIB-153	中国甘肅省	刻み	2008年	<i>Bupleurum chinense</i>	野生品
NIB-190	中国河北省	原形	2010年	<i>Bupleurum chinense</i> <i>Bupleurum scorzonerifolium</i>	天津柴胡
NIB-191	中国四川省	原形	2010年	<i>Bupleurum falcatum</i>	ミシマサイコ・2年生
NIB-220	中国四川省	原形	2010年	<i>Bupleurum falcatum</i>	

表 2a-1 16 試料から抽出したピークを用いた判別分析により得られた生干人参に特徴的なピークの強度比較

ID	Peak ID	7	23	12	33	213	93	119	174	204	796	1507	1069	3888
	RT (min)	20.57	20.57	26.16	26.16	26.16	11.23	17.2	17.2	12.21	19.56	19.56	26.42	26.42
	m/z	945.543	946.5461	793.4379	794.4412	795.4441	961.5375	1269.65	634.321	961.5374	955.4902	956.4935	793.4376	794.4407
NIB-01	生干	2.24E+04	1.20E+04	3.29E+04	1.50E+04	4.00E+03	5.16E+03	3.67E+03	3.45E+03	4.39E+03	1.65E+04	8.84E+03	5.67E+03	2.66E+03
NIB-07	生干し (主に使用)	3.02E+04	1.63E+04	4.57E+04	2.03E+04	5.71E+03	3.23E+03	2.27E+03	1.87E+03	2.74E+03	2.97E+04	1.64E+04	1.98E+04	8.56E+03
NIB-11	生干 (主に使用)	4.57E+04	2.44E+04	5.90E+04	2.68E+04	7.48E+03	6.11E+03	5.95E+03	4.56E+03	6.08E+03	2.74E+04	1.46E+04	1.35E+04	5.96E+03
NIB-18	生干人参	4.80E+04	2.50E+04	7.99E+04	3.66E+04	9.73E+03	7.27E+03	7.59E+03	5.97E+03	6.15E+03	3.16E+04	1.69E+04	2.20E+04	9.95E+03
NIB-01	湯通	2.60E+04	1.37E+04	1.65E+04	7.53E+03	2.05E+03	5.03E+02	2.23E+02	2.03E+02	1.12E+03	1.74E+04	9.24E+03	2.56E+03	1.07E+03
NIB-06	湯通し	1.12E+04	6.17E+03	1.04E+04	4.67E+03	1.28E+03	6.78E+02	1.41E+02	1.68E+02	7.75E+02	1.18E+04	6.34E+03	2.69E+03	1.18E+03
NIB-07	湯通し	1.49E+04	7.98E+03	6.36E+03	2.87E+03	6.82E+02	6.10E+01	3.30E+01	0	2.16E+02	5.44E+03	2.87E+03	1.10E+03	4.35E+02
NIB-11	湯通し	1.66E+04	8.80E+03	8.02E+03	3.67E+03	8.83E+02	3.56E+02	0	0	6.34E+02	1.52E+04	7.97E+03	2.19E+03	9.54E+02
NIB-18	湯通人参	1.36E+04	6.88E+03	4.67E+03	2.02E+03	5.21E+02	3.76E+02	8.10E+01	3.00E+01	4.81E+02	9.05E+03	4.98E+03	2.31E+03	9.61E+02
NIB-04		4.14E+04	2.20E+04	2.83E+04	1.28E+04	3.61E+03	6.11E+03	4.07E+03	3.39E+03	5.24E+03	3.23E+04	1.79E+04	1.08E+04	4.86E+03
NIB-05		5.25E+04	2.84E+04	6.84E+04	3.21E+04	8.67E+03	1.30E+04	1.13E+04	9.34E+03	8.73E+03	5.30E+04	2.89E+04	2.47E+04	1.16E+04
NIB-06		2.50E+04	1.38E+04	1.96E+04	9.43E+03	2.57E+03	5.42E+03	2.58E+03	1.94E+03	1.02E+04	6.44E+04	3.49E+04	1.76E+04	8.39E+03
NIB-09		8.40E+04	4.50E+04	6.82E+04	3.12E+04	8.61E+03	1.14E+04	1.05E+04	8.06E+03	7.87E+03	2.02E+04	1.11E+04	1.74E+04	7.73E+03
NIB-11		2.21E+04	1.18E+04	3.23E+04	1.47E+04	3.86E+03	8.79E+02	8.43E+02	7.04E+02	1.09E+03	3.36E+04	1.78E+04	9.78E+03	4.34E+03
NIB-14		1.74E+04	9.43E+03	2.17E+04	9.90E+03	2.60E+03	4.35E+03	4.45E+03	3.87E+03	4.93E+03	4.63E+03	2.45E+03	2.96E+03	1.32E+03
NIB-17		3.34E+04	1.74E+04	3.24E+04	1.52E+04	4.04E+03	7.54E+03	7.04E+03	5.60E+03	7.31E+03	1.75E+04	9.32E+03	3.15E+03	1.58E+03

表 2a-2 16 試料から抽出したピークを用いた判別分析により得られた湯通人参に特徴的なピークの強度比較

ID	Peak ID	36	43	99	101	387	513	722
	RT (min)	2.63	2.42	2.74	1.57	2.94	2.73	3.02
	m/z	191.019	288.9863	323.0977	497.2099	305.0871	550.1074	403.0557
NIB-011	生干	1.47E+04	3.36E+03	4.78E+02	8.69E+02	4.18E+02	1.66E+03	5.59E+02
NIB-076	生干し (主に使用)	1.96E+04	6.83E+03	1.28E+03	6.80E+02	7.59E+02	1.77E+03	6.17E+02
NIB-114	生干 (主に使用)	1.75E+04	3.27E+03	1.19E+03	5.75E+02	8.63E+02	8.71E+02	5.03E+02
NIB-183	生干人参	1.97E+04	3.72E+03	0	1.94E+02	7.10E+01	1.90E+02	4.60E+01
NIB-012	湯通	3.29E+04	7.95E+03	9.77E+03	9.39E+03	7.08E+03	4.54E+03	3.41E+03
NIB-061	湯通し	3.58E+04	1.38E+04	9.45E+03	9.71E+03	6.95E+03	5.38E+03	3.33E+03
NIB-077	湯通し	2.77E+04	8.00E+03	5.18E+03	7.40E+03	5.75E+03	9.88E+03	4.41E+03
NIB-112	湯通し	2.27E+04	1.00E+04	1.91E+03	5.43E+03	3.35E+03	4.54E+03	3.53E+03
NIB-184	湯通人参	3.37E+04	9.98E+03	6.22E+03	3.08E+03	5.17E+03	9.77E+03	4.26E+03
NIB-040		2.43E+04	7.77E+03	6.71E+02	5.35E+02	5.75E+02	3.61E+02	5.78E+02
NIB-056		2.27E+04	9.63E+03	1.74E+02	4.81E+02	4.33E+02	6.16E+02	3.87E+02
NIB-067		1.75E+04	2.73E+03	2.04E+02	8.17E+02	4.41E+02	1.94E+03	8.71E+02
NIB-093		1.02E+04	2.82E+03	1.96E+02	4.37E+02	2.09E+02	4.45E+02	3.98E+02
NIB-113		2.75E+04	9.12E+03	1.69E+04	7.12E+03	7.86E+03	1.00E+03	2.64E+03
NIB-149		1.58E+04	3.73E+03	7.17E+02	1.36E+03	1.53E+03	8.39E+02	8.97E+02
NIB-170		1.09E+04	2.61E+03	2.24E+02	5.93E+02	5.20E+02	8.44E+02	5.98E+02

表 2b 9 試料から抽出したピークを用いた判別分析により得られた生干人参に特徴的なピーク（上段）と湯通人参に特徴的なピーク（下段）の強度比較

ID	Peak ID	5	23	142	9	32	105	111	930	4585
	RT (min)	26.16	26.16	26.16	20.58	20.58	17.21	11.28	26.41	26.41
	m/z	793.4379	794.4412	795.4441	945.5429	946.546	1269.649	961.538	793.437	794.4398
NIB-011	生干	3.29E+04	1.50E+04	4.00E+03	2.24E+04	1.20E+04	3.67E+03	5.12E+03	1.32E+04	6.00E+03
NIB-076	生干し（主に使用）	4.57E+04	2.03E+04	5.71E+03	3.03E+04	1.63E+04	2.27E+03	3.10E+03	1.98E+04	8.56E+03
NIB-114	生干（主に使用）	5.90E+04	2.68E+04	7.48E+03	4.57E+04	2.44E+04	5.95E+03	5.98E+03	2.94E+04	1.32E+04
NIB-183	生干人参	7.99E+04	3.66E+04	9.73E+03	4.80E+04	2.50E+04	7.59E+03	7.09E+03	2.20E+04	9.95E+03
NIB-012	湯通	1.65E+04	7.53E+03	2.05E+03	2.60E+04	1.37E+04	2.23E+02	4.46E+02	6.19E+03	2.70E+03
NIB-061	湯通し	1.04E+04	4.67E+03	1.28E+03	1.12E+04	6.17E+03	1.41E+02	6.78E+02	2.69E+03	1.18E+03
NIB-077	湯通し	6.36E+03	2.87E+03	6.82E+02	1.49E+04	7.98E+03	3.30E+01	6.10E+01	2.60E+03	1.17E+03
NIB-112	湯通し	8.02E+03	3.67E+03	8.83E+02	1.66E+04	8.80E+03	0	3.27E+02	2.19E+03	9.54E+02
NIB-184	湯通人参	4.67E+03	2.02E+03	5.21E+02	1.36E+04	6.88E+03	8.10E+01	3.24E+02	2.95E+03	1.23E+03
ID	Peak ID	25	63	313	393	526				
	RT (min)	2.63	1.57	2.92	2.73	3.02				
	m/z	191.019	497.2099	305.0869	550.1074	403.0557				
NIB-011	生干	1.47E+04	8.69E+02	4.18E+02	1.66E+03	5.59E+02				
NIB-076	生干し（主に使用）	1.96E+04	6.80E+02	7.59E+02	1.77E+03	6.17E+02				
NIB-114	生干（主に使用）	1.75E+04	5.75E+02	8.63E+02	8.71E+02	5.03E+02				
NIB-183	生干人参	1.97E+04	1.94E+02	7.10E+01	1.90E+02	4.60E+01				
NIB-012	湯通	3.29E+04	9.39E+03	5.47E+03	4.54E+03	3.41E+03				
NIB-061	湯通し	3.58E+04	9.71E+03	6.95E+03	5.38E+03	3.33E+03				
NIB-077	湯通し	2.77E+04	7.40E+03	5.51E+03	9.88E+03	4.41E+03				
NIB-112	湯通し	2.27E+04	5.43E+03	3.35E+03	4.54E+03	3.53E+03				
NIB-184	湯通人参	3.37E+04	3.08E+03	5.17E+03	9.77E+03	4.26E+03				

表3-1 判別分析により得られた*B. falcatum*に特徴的なピークの強度比較

ID	Peak ID	1	36	20	24	260	26	27	29	43	118	194	213	230
	RT (min)	1.73	1.73	9.01	5.55	5.55	1.67	1.73	3.13	2.96	2.55	7.39	5.55	2.06
	<i>m/z</i>	175.118	176.121	355.129	205.097	206.100	213.074	349.230	268.104	132.101	175.023	217.097	188.070	133.060
		9	9	5	5	6	6	4	6	9	8	4	8	9
NIB-0 17	<i>B. falcatum</i>	4.27E+0 7	2.78E+0 6	2.63E+0 6	4.18E+0 6	5.01E+0 5	1.74E+0 6	9.88E+0 5	5.45E+0 6	4.92E+0 6	1.75E+0 6	1.92E+0 6	5.93E+0 5	1.12E+0 6
NIB-1 22	<i>B. falcatum</i>	4.70E+0 7	2.98E+0 6	3.11E+0 6	8.91E+0 6	1.07E+0 6	2.30E+0 6	2.14E+0 6	4.42E+0 6	4.18E+0 6	2.49E+0 6	3.69E+0 6	1.34E+0 6	2.11E+0 6
NIB-1 23	<i>B. falcatum</i>	4.45E+0 7	2.81E+0 6	4.49E+0 6	1.13E+0 7	1.34E+0 6	2.58E+0 6	1.85E+0 6	4.95E+0 6	4.38E+0 6	2.67E+0 6	2.87E+0 6	1.70E+0 6	1.79E+0 6
NIB-1 91	<i>B. falcatum</i>	5.44E+0 7	3.54E+0 6	3.52E+0 6	1.47E+0 7	1.77E+0 6	2.50E+0 6	2.65E+0 6	4.14E+0 6	3.65E+0 6	2.17E+0 6	2.04E+0 6	2.25E+0 6	6.24E+0 5
NIB-2 20	<i>B. falcatum</i>	3.27E+0 7	2.06E+0 6	4.67E+0 6	8.40E+0 6	1.01E+0 6	2.11E+0 6	9.33E+0 5	2.09E+0 6	3.82E+0 6	1.67E+0 6	3.23E+0 6	1.26E+0 6	1.32E+0 6
NIB-0 18	<i>B. chinense</i>	2.89E+0 7	1.78E+0 6	1.65E+0 6	5.72E+0 6	6.86E+0 5	2.04E+0 6	8.27E+0 5	2.51E+0 6	2.07E+0 6	1.78E+0 6	1.06E+0 6	8.57E+0 5	7.04E+0 5
NIB-0 80	<i>B. chinense</i>	8.55E+0 6	4.78E+0 5	2.44E+0 6	2.40E+0 6	2.82E+0 5	7.33E+0 5	4.89E+0 4	2.01E+0 6	3.28E+0 6	1.05E+0 6	9.42E+0 5	3.32E+0 5	4.06E+0 5
NIB-1 21	<i>B. chinense</i>	8.07E+0 6	4.54E+0 5	2.88E+0 5	1.41E+0 6	1.54E+0 5	7.44E+0 5	5.12E+0 4	1.69E+0 6	2.24E+0 6	1.31E+0 6	3.49E+0 5	1.92E+0 5	3.16E+0 5
NIB-1 53	<i>B. chinense</i>	1.37E+0 7	8.23E+0 5	1.63E+0 6	1.72E+0 6	1.96E+0 5	1.16E+0 6	1.28E+0 5	2.92E+0 6	2.13E+0 6	1.28E+0 6	1.56E+0 6	2.38E+0 5	7.34E+0 5
NIB-1 90	<i>B. scorzoniferifolium</i>	1.05E+0 7	6.07E+0 5	3.56E+0 5	1.47E+0 6	1.67E+0 5	8.11E+0 5	7.81E+0 4	1.75E+0 6	2.23E+0 6	8.11E+0 5	7.16E+0 5	2.01E+0 5	2.98E+0 5

表 3-2 判別分析により得られた *B. chinense* に特徴的なピークの強度比較

ID	Peak ID	3	51	8	10	13	16	17	31	33	38
	RT (min)	1.56	1.56	1.56	1.7	1.56	1.86	1.76	1.7	1.56	1.86
	m/z	219.018	220.021	158.9965	136.9401	279.039	153.0758	191.0314	234.9174	200.0233	135.0652
NIB-017	<i>B. falcatum</i>	2.98E+05	1.32E+04	9.50E+04	2.80E+06	2.82E+04	1.64E+06	5.40E+04	5.57E+05	3.01E+05	5.42E+05
NIB-122	<i>B. falcatum</i>	5.26E+06	2.74E+05	1.57E+06	2.12E+06	8.74E+05	3.86E+06	5.20E+05	3.53E+05	4.21E+05	1.91E+06
NIB-123	<i>B. falcatum</i>	1.09E+07	5.84E+05	3.54E+06	2.66E+06	1.77E+06	3.55E+06	6.63E+05	4.55E+05	1.00E+06	1.80E+06
NIB-191	<i>B. falcatum</i>	1.00E+07	5.64E+05	3.31E+06	1.97E+06	1.62E+06	3.76E+06	5.05E+05	2.87E+05	9.97E+05	1.97E+06
NIB-220	<i>B. falcatum</i>	4.84E+06	2.47E+05	1.53E+06	3.42E+06	6.90E+05	5.84E+06	1.11E+06	7.41E+05	4.49E+05	2.93E+06
NIB-018	<i>B. chinense</i>	2.43E+07	1.49E+06	8.12E+06	3.53E+06	4.33E+06	8.47E+06	1.88E+06	8.31E+05	2.48E+06	4.21E+06
NIB-080	<i>B. chinense</i>	3.74E+07	2.37E+06	1.28E+07	5.24E+06	6.81E+06	8.24E+06	2.85E+06	1.43E+06	3.87E+06	3.95E+06
NIB-121	<i>B. chinense</i>	2.99E+07	1.89E+06	1.03E+07	5.84E+06	5.29E+06	9.37E+06	2.75E+06	1.86E+06	3.19E+06	4.75E+06
NIB-153	<i>B. chinense</i>	2.18E+07	1.35E+06	7.49E+06	5.18E+06	3.76E+06	6.91E+06	2.47E+06	1.41E+06	2.31E+06	3.24E+06
NIB-190	<i>B. chinense</i> <i>B. scorzoniferifolium</i>	3.37E+07	2.11E+06	1.15E+07	4.44E+06	6.13E+06	7.76E+06	1.92E+06	1.21E+06	3.51E+06	3.91E+06

ID	Peak ID	42	67	69	95	106	137	241	1652	1968
	RT (min)	1.75	18.98	1.56	1.56	1.56	2.14	2.14	1.23	1.59
	m/z	219.0266	207.0654	177.007	260.0446	237.0284	153.0758	135.0652	219.0179	153.0755
NIB-017	<i>B. falcatum</i>	5.70E+04	4.11E+03	4.91E+03	7.51E+04	3.34E+03	2.29E+06	8.02E+05	1.27E+05	4.89E+05
NIB-122	<i>B. falcatum</i>	2.32E+05	1.66E+04	2.19E+05	1.54E+05	1.35E+05	2.55E+06	1.37E+06	4.45E+05	1.14E+06
NIB-123	<i>B. falcatum</i>	3.38E+05	4.36E+02	5.08E+05	3.50E+05	3.08E+05	2.41E+06	1.25E+06	6.51E+05	1.27E+06
NIB-191	<i>B. falcatum</i>	2.81E+05	8.68E+03	4.98E+05	3.21E+05	2.76E+05	2.12E+06	1.20E+06	7.52E+05	1.52E+06

NIB-220	<i>B. falcatum</i>	3.64E+05	1.41E+04	2.45E+05	1.60E+05	1.27E+05	2.80E+06	1.53E+06	4.20E+05	1.85E+06
NIB-018	<i>B. chinense</i>	6.12E+05	8.30E+05	1.23E+06	8.33E+05	7.59E+05	4.30E+06	2.29E+06	1.58E+06	2.82E+06
NIB-080	<i>B. chinense</i>	1.43E+06	6.03E+05	2.00E+06	1.39E+06	1.24E+06	4.72E+06	2.46E+06	2.47E+06	2.90E+06
NIB-121	<i>B. chinense</i>	1.52E+06	6.45E+05	1.57E+06	1.11E+06	9.83E+05	5.58E+06	3.04E+06	1.72E+06	3.26E+06
NIB-153	<i>B. chinense</i>	1.09E+06	7.17E+05	1.18E+06	7.86E+05	6.77E+05	4.49E+06	2.26E+06	1.29E+06	2.23E+06
NIB-190	<i>B. chinense</i>	1.20E+06	2.11E+06	1.81E+06	1.32E+06	1.12E+06	3.32E+06	1.78E+06	2.01E+06	2.95E+06
	<i>B. scorzonerifolium</i>									

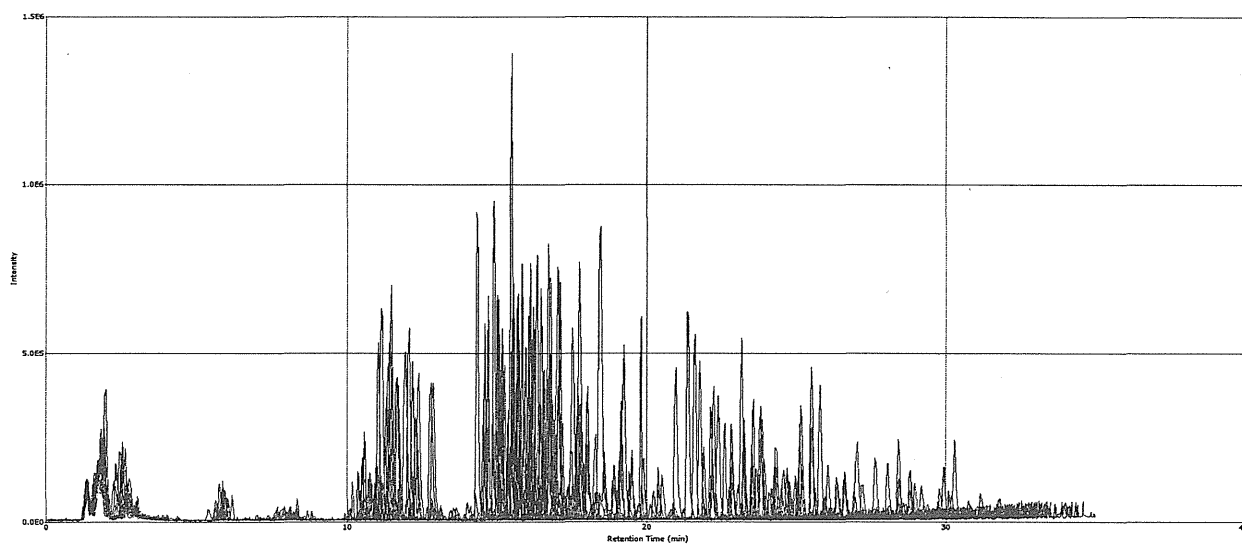
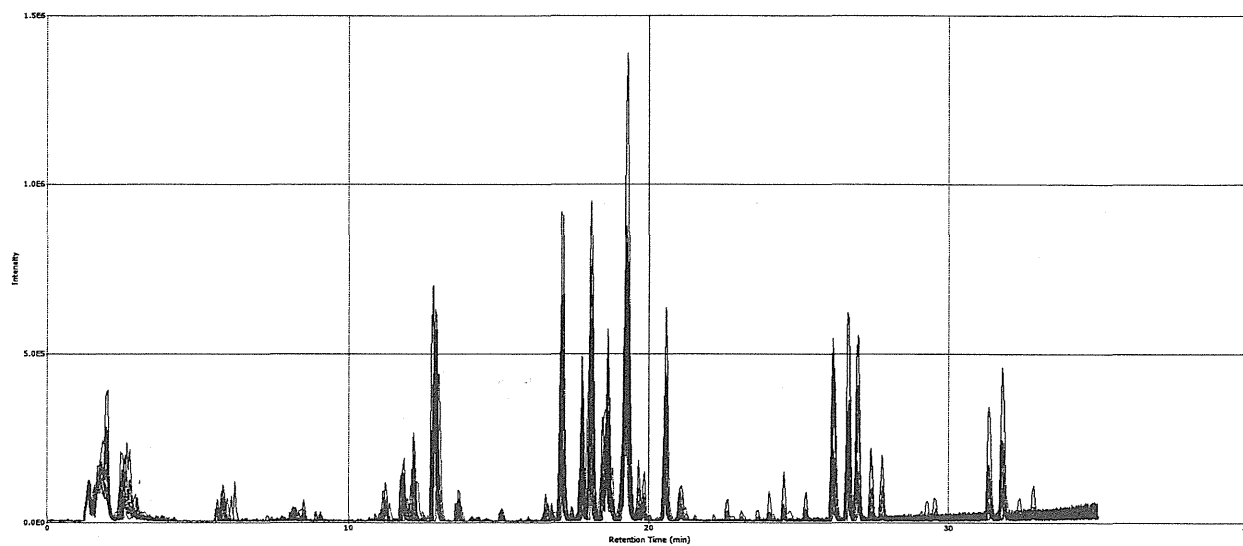


図 1 人参試料の TIC クロマトグラムの自動アライメント
上段：アライメント前
下段：アライメント後

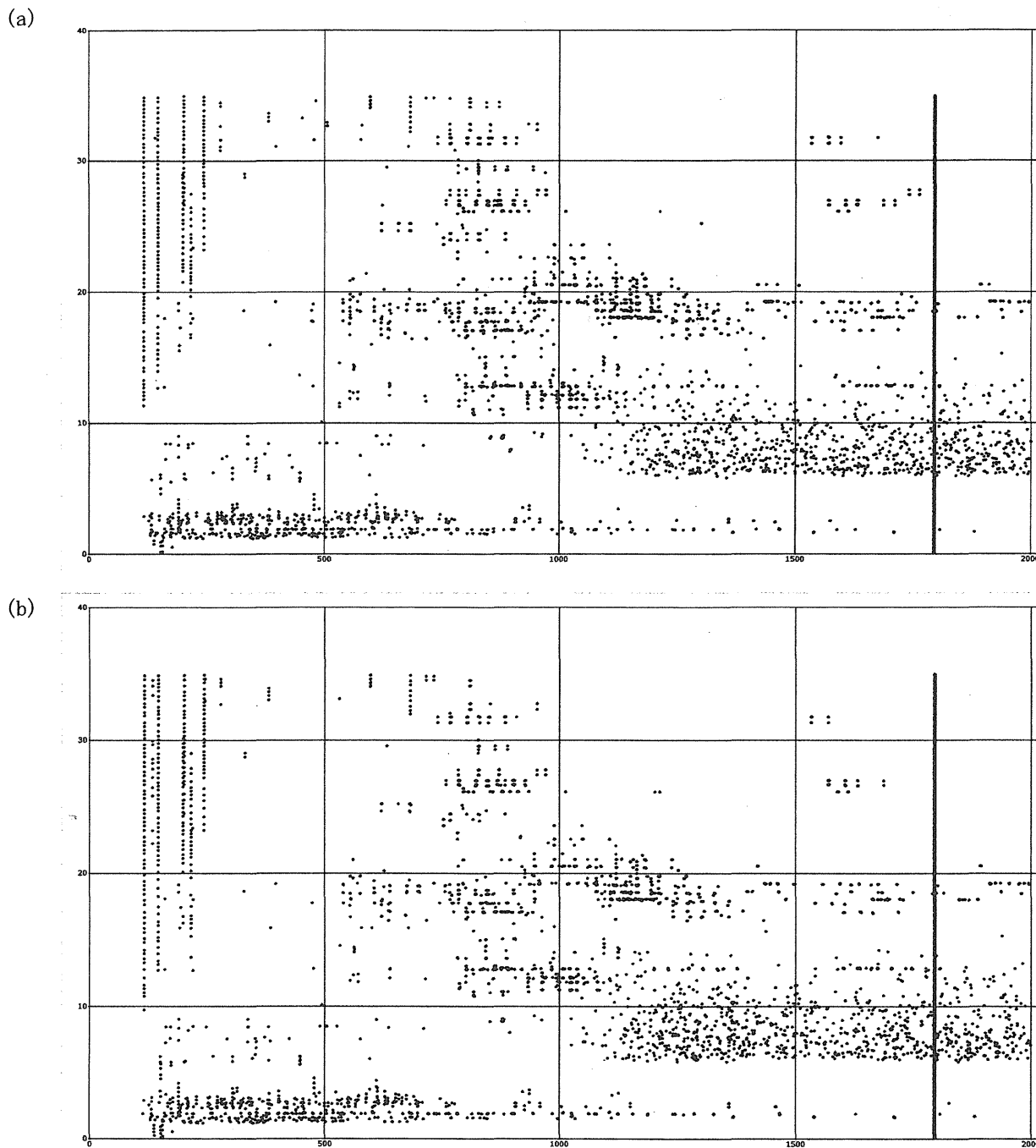


図 2-1 人参の LC/MS 分析データから抽出されたピークの散布図

縦軸にピークの保持時間、横軸に m/z を取り、各ピークを一つの点で示した。

上段：16 試料からピーク抽出を行った場合

下段：9 試料からピーク抽出を行った場合

図 2-2 人参 LC/MS 分析データを用いた判別分析 (次頁)

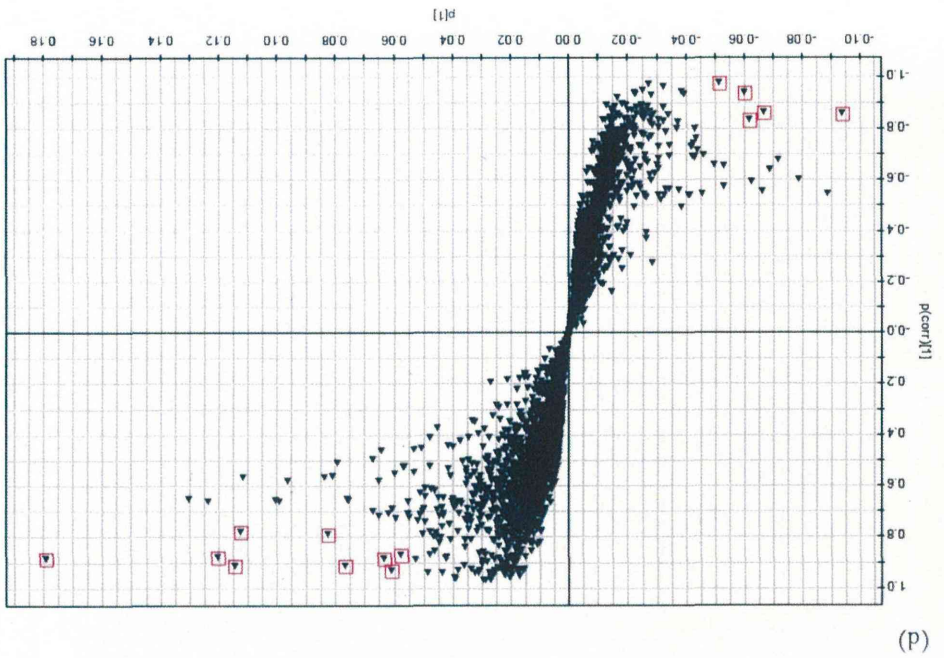
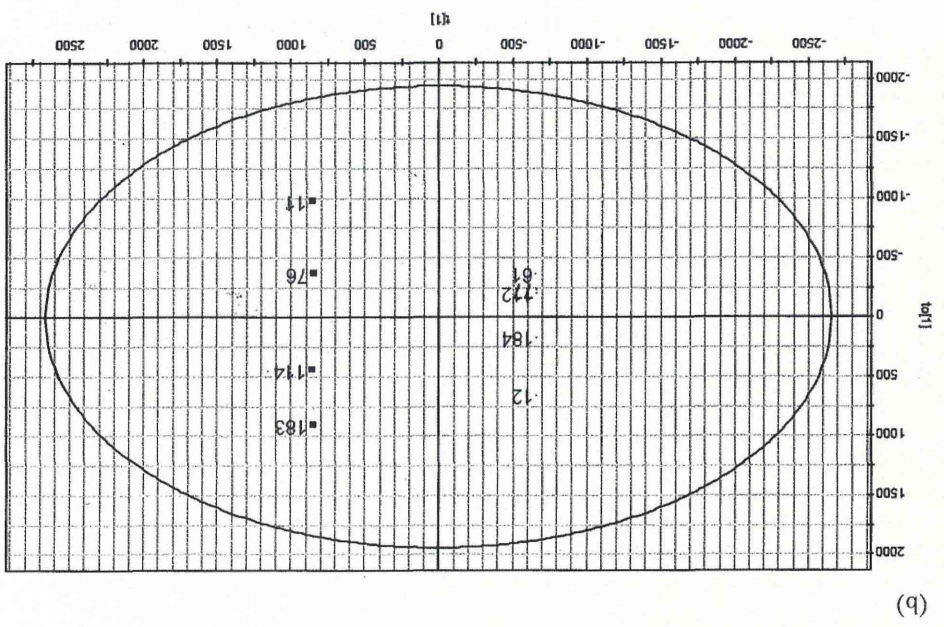
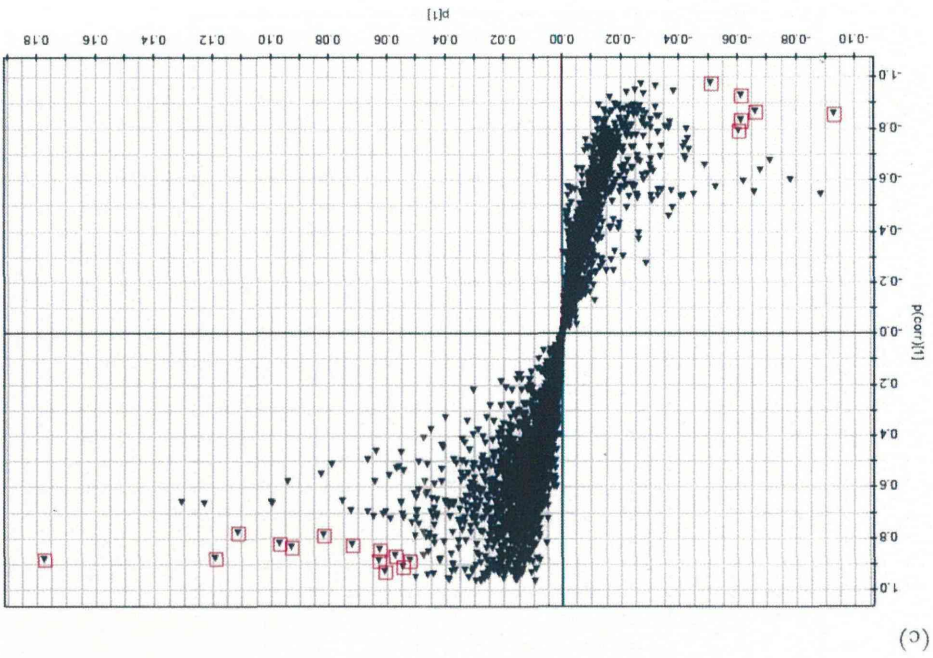
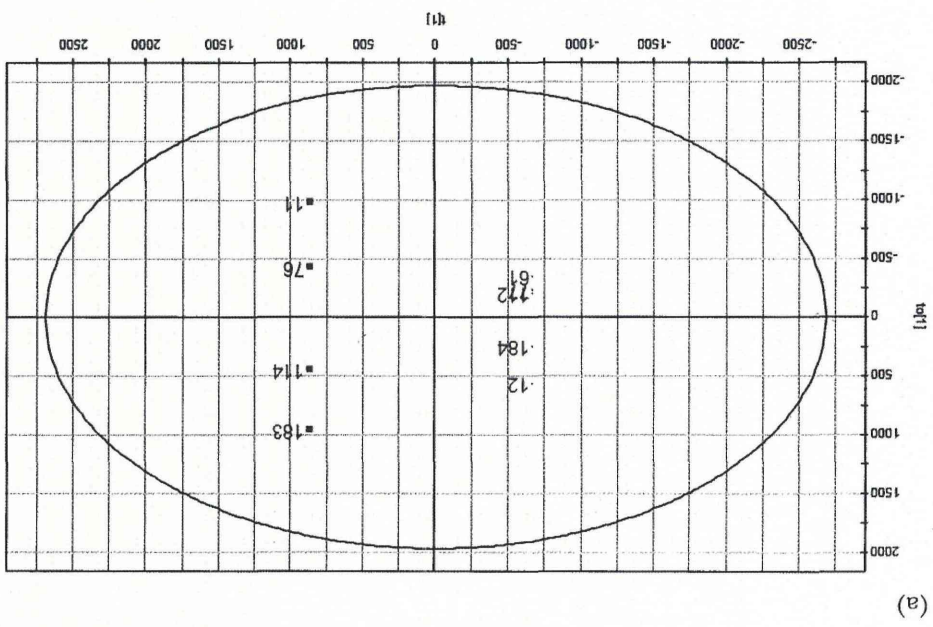
生干人参 (■) 湯通人参 (○)

(a) : 16 試料からピーク抽出を行った場合の OPLS/OPLS-DA スコアプロット

(b) : 9 試料からピーク抽出を行った場合の OPLS/OPLS-DA スコアプロット

(c) : 16 試料からピーク抽出を行った場合の S プロット

(d) : 9 試料からピーク抽出を行った場合の S プロット



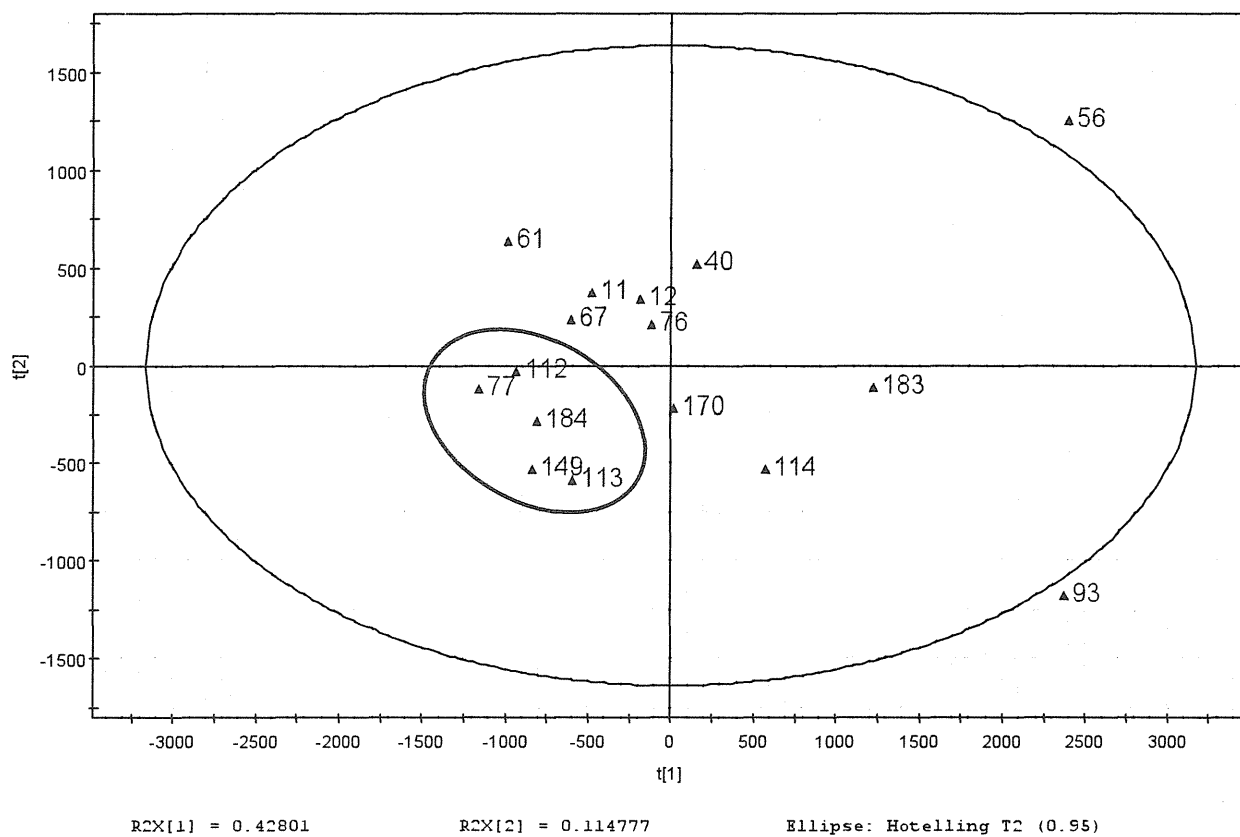


図 3 人參 LC/MS 分析データを用いた主成分分析

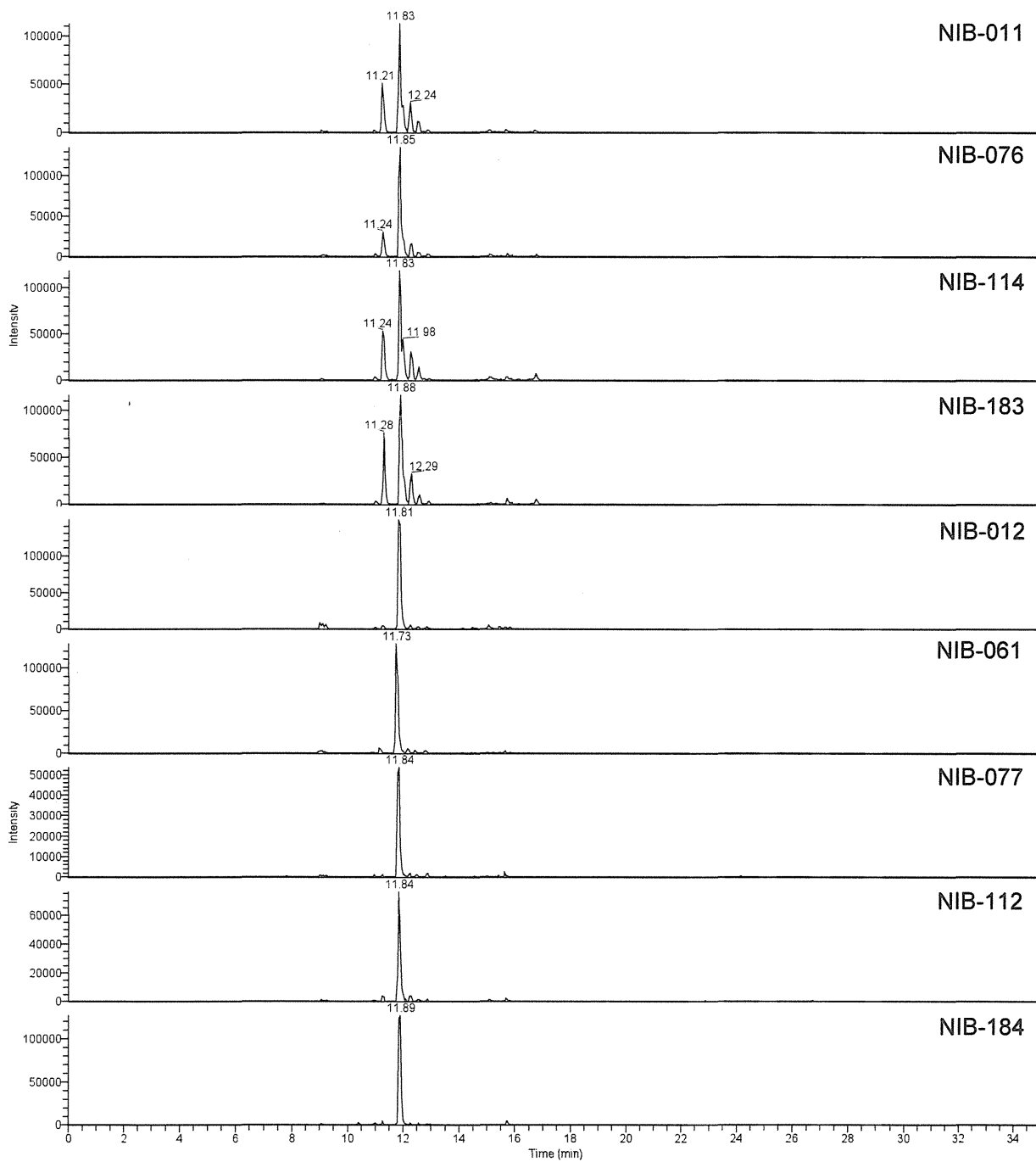


図 4-1 生干人参に特徴的なピーク (RT 11.2 min, m/z 961.5)

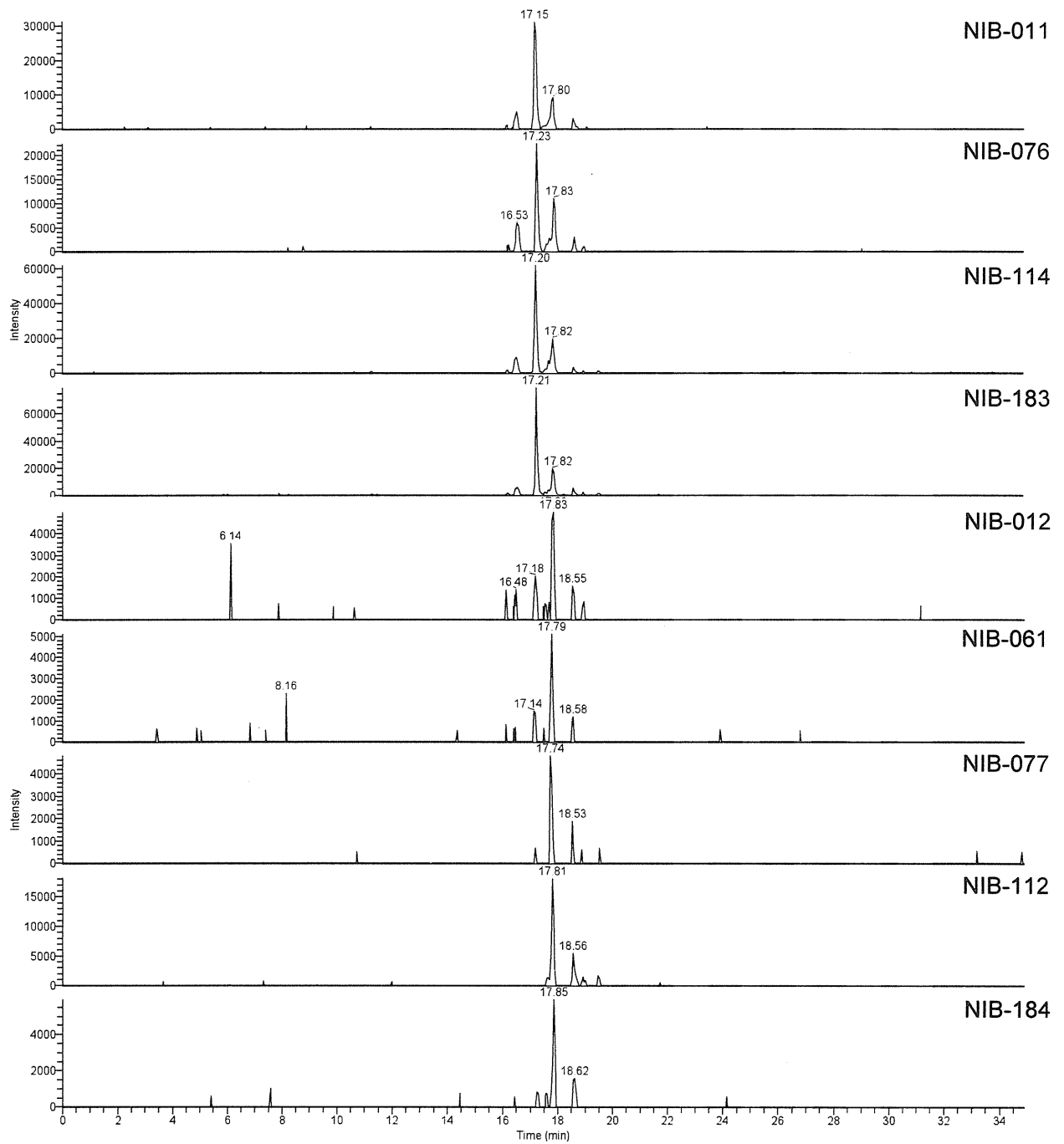


図 4-2 生干人参に特徴的なピーク (RT 17.2 min, m/z 1269.7)