The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ガスクロマトグラフィー技術を用いたプロファイリングによる生薬の種・産地判別マーカーの実用的評価法の確立
Author(s)	小林, 志寿
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27566
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

工甲 15943

博 士 学 位 論 文

ガスクロマトグラフィー技術を用いた プロファイリングによる生薬の種・産地判別マーカーの 実用的評価法の確立

小 林　志 寿

2012年8月

大阪大学大学院工学研究科

博士学位論文

ガスクロマトグラフィー技術を用いた
プロファイリングによる生薬の種・産地判別マーカーの
実用的評価法の確立

小林　志寿

2012 年 8 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第一章　緒論 1

1-1.　世界の生薬市場 1

1-2.　我が国の生薬市場 2

1-3.　生薬の薬効評価 6

1-4.　我が国の生薬の品質評価 8

1-5.　生薬の官能試験 8

1-6.　生薬における種の判別 10

1-7.　生薬における産地の判別 10

1-8.　センキュウとトウキ 11

1-9.　生薬とメタボロミクス 12

1-10.　メタボロミクス技術の発展 12

1-11.　目的・方法 14

第二章　センキュウの GC/MS プロファイリングによる種と産地の判別マーカー探索 16

2-1.　緒言 16

2-2.　実験方法 17

2-2-1.　サンプル 17

2-2-2.　試薬 19

2-2-3.　サンプル調整 19

2-2-4.　GC-MS 分析条件 20

2-2-5.　多変量解析 20

2-3.　結果と考察 22

2-3-1.　GC-MS データの成分同定 22

2-3-2.　GC-MS データの PCA 25

2-3-3.　GC-MS データの OPLS-DA 28

2-4. 小括 40
第三章 トウキの GC/MS プロファイリングによる種と産地の判別マーカー探索 41
3-1. 緒言 41
3-2. 実験方法 43
3-2-1. サンプル 43
3-2-2. 試薬 44
3-2-3. サンプル調整 44
3-2-4. GC-MS 分析条件 44
3-2-5. 多変量解析 44
3-3. 結果と考察 44
3-3-1. GC-MS データの成分同定 44
3-3-2. GC-MS データの PCA 47
3-3-3. GC-MS データの OPLS-DA 49
3-4. 小括 60

第四章 GC/FID へのトウキの判別マーカーの適用 61
4-1. 緒言 61
4-2. 実験方法 62
4-2-1. GC-FID 分析条件 62
4-3. 結果と考察 62
4-4. 小括 66
第五章 総括 67
謝辞 70
引用文献 71
発表論文 85
Appendix 86

第一章　緒論

1-1.　世界の生薬市場

生薬の世界市場の規模は拡大傾向にある．その規模は2000年では430億 US$ であったが，2008年には830億 US$ へと急速に拡大している[1,2]．世界保健機関，WHO (World Health Organization) による調査[1]では，生薬のレギュレーションや法律の存在を WHO に報告する国家数が増え続けている (Figure 1-1)．世界的に生薬の研究やレギュレーションへの関心が高まっている．

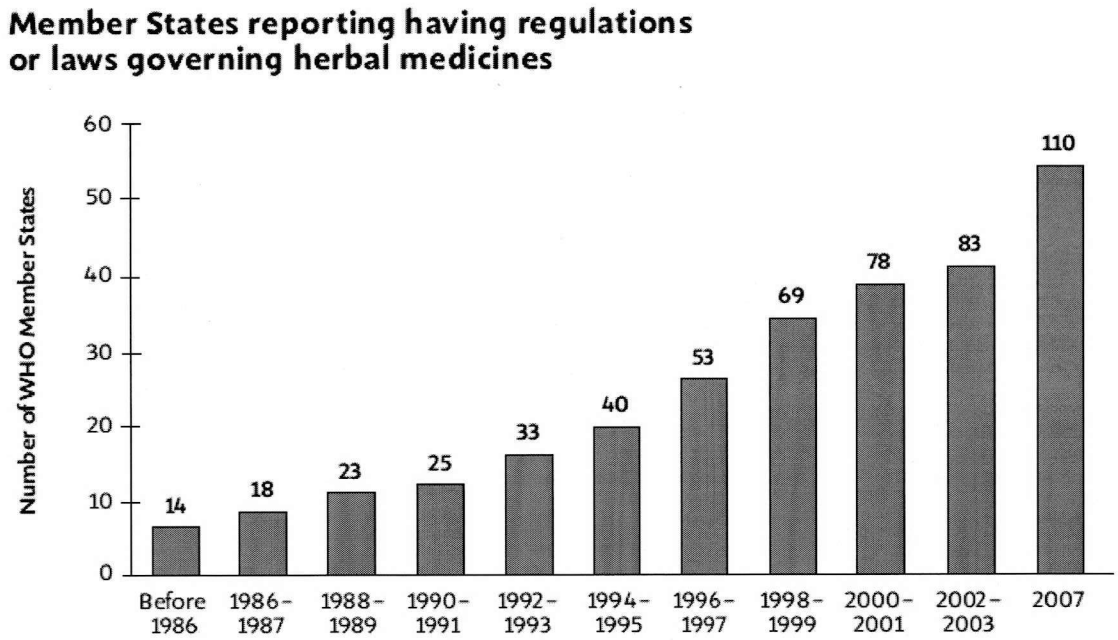


Figure 1-1. WHO へ生薬のレギュレーションや法律の報告を行っている国家数[1]

また，WHO は生薬のための GACP (Good Agricultural and Collection Practices)[3] ＊1 や GMP (Good Manufacturing Practices)[4] ＊2 のガイドラインで生薬の品質評価法を提唱してきた．特に，WHO はガイドラインを作成する上で，中国や日本の薬局方を参考資料としている[4]．その理由として中国や日本の生薬消費量が多いことがある．そこで各国の直近の生薬消費量を示す．

Table 1-1. 各国の生薬消費量

Country	Consumption (US$ billion ; 10 億 US$)	Year	Reference
China	26.00	2009	5
USA	14.80	2007	6
German	1.95	2003	1
Australia	1.86	2003	1
France	1.05	2003	1
Japan	1.00	2006	1

Table 1-1 に示したように，中国は最大の生薬消費国であり，その市場は 2009 年で 260 億 US$ であった[5]．また，その他にもアメリカ，ドイツやフランス，オーストラリアでも生薬消費量が日本よりも多く，生薬が世界中で消費されていることが分かる．生薬の市場拡大とグローバル化が進む中で，より適切な品質評価法が必要である．

1-2. 我が国の生薬市場

当該状況の中で，日本では科学的な品質評価の確立が求められる．その現実的な理由として，日本が少なくとも 80%以上の生薬を中国からの輸入に頼っていること[7]，生薬が保険適用薬として薬局方に記載されていることの 2 点がある．以上の点について詳しく述べる．

1 点目では，日本への中国からの生薬輸入量が多いことから，日本では生薬輸入時の種の判別が必要となる．中国と日本で全く同じ基原の生薬を使用しているのであれば，輸入時の基原の判別は必要がない．しかし，中国と日本では一部で基原の共通する生薬が用いられているが，両国で異なる基原の生薬が使用される場合もある．そのため，生薬の輸入時には使用種以外の混入を防ぐために種の判別が重要である．

2 点目として，日本では，保険適用の為に薬事法で生薬が規制されており，法規に用いる生薬基準が定められている．その状況下で日本薬局方の生薬規定は世界的に見て先進性を持つ. 先進性の例として, 収載生薬の数が多いこと, 有害成分規定において成分数が多いこと, GMP の順守を行ってきたことがあげられる (Table 1-2). まず，生薬の収載数について，消費量が最も多い中国は 471 種と群を抜いているが，日本も 216 種 (第十六改正日本薬局方;

Japanese Pharmacopeia 16th Edition, JP16[8]）とアメリカ，イギリス，EU，インドのような国の薬局方と比べて多い[9]（Table 1-2）．有害成分規制についてはアメリカ，EU，韓国，中国と比較して，最も成分数が多いアメリカの27種についで，日本は21種と比較的，成分数が多い[10]．また GMP については，日本は，1987年より医療用漢方製剤について，1992年より一般用漢方製剤・生薬製剤について遵守してきた（日本漢方生薬製剤協会ホームページ：http://www. nikkankyo.org/kampo/yougo/053.html）．一方，中国は2005年の段階で GMP の準備段階であった[11]．

Table 1-2. 世界の主な薬局方の比較

薬局方の生薬収載での特徴	日本	中国	アメリカ	EU	引用文献
収載生薬数	216	471	37	80	8
検査の必要な有害成分数	21	12	27	11	10
GMP 適応（2005年時点）	有り	準備中	有り	有り	11

生薬評価において日本がアメリカや中国の良い点を取り入れている理由として，生薬の使用法である漢方の歴史が挙げられる．6 世紀に中国より生薬が伝来してから，漢方として日本の伝統医学の歴史が始まった．その後，江戸時代の 18 世紀までの鎖国により漢方は日本独自の医療として発達した．しかし，明治維新によって政府が西洋化を目指したために，漢方の日本医学での地位は西洋医学にとって変わられ，漢方薬は保険適用の医薬品ではなくなった．しかし，1976年に再び漢方薬は保険医療適用となった[12]．以上の歴史から，日本の生薬は西洋薬のみの記載の薬局方に追加された医薬品となった．そのため，JP16の生薬評価は，西洋科学的な手法を取り入れながらも，経験的な評価法が混在した記載となっている．

以上の2点から，日本では輸入生薬が多く，生薬の品質評価の大部分が経験的な評価に依存しているために，より簡便で科学的な生薬の品質評価の確立が求められる．

次に，現在の日本の生薬生産量より，生薬の品質評価の現状と，特に品質評価が求められている生薬について述べる．日本の漢方製剤等（漢方製剤，生薬，その他の医薬品を含む）の生産量は厚生労働省の平成 21 年薬事工業生産動態統計によると，近年増加傾向にある（Figure 1-2）．

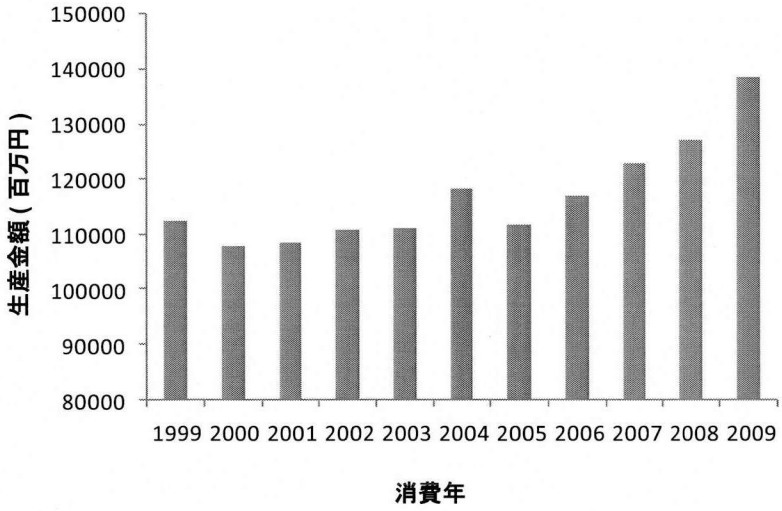


Figure 1-2. 日本の生薬消費量（平成 21 年薬事工業生産動態統計より抜粋）

また，現在の国内生薬生産量は Table 1-3 のようになっている．

Table 1-3. 生薬の国内生産量 [7]

生薬名	生産国			使用量	JP16[8] の
	日本	中国	その他	(kg)	マーカー記載
コウイ	555,718	0	0	555,718	マルトースの確認試験
センキュウ	313,739	59,693	0	373,432	なし
クマザサ葉	240,000	0	0	240,000	なし
トウキ	204,471	376,136	0	580,607	なし
チンピ	133,975	98,068	0	232,043	あり

国内生産量が多く，中国からの輸入品も存在するセンキュウ，トウキについては JP16 において適否を決定するための定量マーカーの記載がない（Table 1-3）．一般的に市場では，生薬の品質評価は JP16 の記載項目に従って，種，産地，重金属試験，生薬中の一部の薬効成分の定量試験や定性的評価を行う確認試験，さらには五感での官能試験によって行われている．しかし，JP16 では生薬によって評価基準が異なり，センキュウやトウキのように定量マーカーが存在しない生薬もある．JP16 で収載されている 216 種の生薬のうち，マーカーが規定されているのは Table 1-4 の 52 種のみである．

Table 1-4. JP16 記載生薬で定量マーカーを持つ生薬

No.	生薬名	定量マーカー	JP16[8] のページ
1	アロエ	バルバロイン	1447
2	アロエ末	バルバロイン	1448
3	ウコン	総クルクミノイド	1452
4	ウコン末	総クルクミノイド	1452
5	ウワウルシ	アルブチン	1454
6	エンゴサク	デヒドロコリダリン	1455
7	エンゴサク末	デヒドロコリダリン	1456
8	オウゴン	バイカリン	1457
9	オウゴン末	バイカリン	1458
10	オウバク	ベルベリン	1459
11	オウバク末	ベルベリン	1460
12	オウレン	ベルベリン	1462
13	オウレン末	ベルベリン	1462
14	カッコン	プエラリン	1467
15	カンゾウ	グリチルリチン酸	1474
16	カンゾウ末	グリチルリチン酸	1475
17	キョウニン	アミグダリン	1480
18	コウジン	ジンセノサイド Rg1, Rb1	1488
19	コウボク	マグノロール	1490
20	コウボク末	マグノロール	1491
21	サイコ	総サポニン	1498
22	サンシシ	ゲニポシド	1508
23	サンシシ末	ゲニポシド	1509
24	サンシュユ	ロガニン	1509
25	シャクヤク	ペオニフロリン	1514
26	シャクヤク末	ペオニフロリン	1515
27	センソ	ブフォステロイド	1533
28	センナ	総センノシド及びセンノシド B	1533
29	センナ末	総センノシド及びセンノシド B	1533
30	センブリ	スウェルチアマリン	1535
31	センブリ末	スウェルチアマリン	1536
32	ソヨウ	ペリルアルデヒド	1538
33	ダイオウ	センノシド A	1539
34	ダイオウ末	センノシド A	1539
35	チョウトウコウ	総アルカロイド	1546

Table 1-4. 続き

No.	生薬名	定量マーカー	JP16[8] のページ
36	チンピ	ヘスペリジン	1550
37	トウガラシ	総カプサイシン	1552
38	トウガラシ末	総カプサイシン	1553
39	トウニン	アミグダリン	1555
40	トウニン末	アミグダリン	1556
41	トコン	総アルカロイド	1558
42	トコン末	総アルカロイド	1558
43	ニンジン	ジンセノジンセノサイド Rg1, Rb1	1561
44	ニンジン末	ジンセノシド Rg1, Rb1	1562
45	ブシ	総アルカロイド	1576
46	ブシ末	総アルカロイド	1577
47	ベラドンナコン	ヒヨスチアミン	1578
48	ボタンピ	ペオノール	1581
49	ボタンピ末	ペオノール	1582
50	ホミカ	ストリキニーネ	1586
51	マオウ	総アルカロイド	1589
52	ロートコン	総アルカロイド	1599

1-3. 生薬の薬効評価

薬局方のように公的な生薬の品質評価書にも全生薬の薬効成分の定量法が記述されていない．その最大の理由は作用している全ての薬効成分が不明であることにつきる．全薬効成分が不明である原因を列挙すると，1つの薬用植物であっても多成分を含むこと，最終製品である漢方薬には複数の生薬を組み合わせて用いるため漢方薬効に重要な役割を持つ成分の特定が難しいこと，マウス等の動物試験で見出した薬効成分が必ずしもヒトにおいて有効とは限らないことの3点が考えられる．

最初に説明するのは，1つの生薬においても多成分が存在するということである．実際に，生薬中の成分同士のシナジー効果が報告されている[13]．員数未知の複数化合物による相乗効果解明には，現存の要素還元科学では不十分である．

また，中医学や漢方医学では生薬は複数組み合わせて使用する．漢方薬では，1つの漢方処方が複数の疾患に用いられること，複数の成分が同じ効能を併せ持つこと[14]，複数成分が

存在することから体内での吸収過程の効率が変化すること[15]が知られている．最終製品の漢方薬の種類によって重要な役割を果たす生薬成分は異なる可能性がある．そのため，ある生薬中の特定成分を多く含むからと言って，その成分を含む漢方薬が有用とは限らない．

3 点目として，多くの薬効成分はマウスやラットの代謝で調査されているが，実際には動物の代謝はヒトの代謝と異なることが知られている．動物実験やヒトの細胞実験のレベルでは成功したことがヒトの臨床試験では成功しないこともある．有名な例として，HIV (Human Immunodeficiency Virus) の治療薬であるジドブジンが知られている．ジドブジンは FDA (U.S. Food and Drug Administration) の承認によりヒトの臨床試験に至った．その時に，動物実験では *in vivo* で代謝されるという報告はなかった．しかしながら，ヒトでは血漿と尿にジドブジン以外の成分ピークが現れた．これは，ジドブジンがグルクロン酸抱合を受けたことが原因であった[16]．他に，ヒトの代謝における生薬成分の活性増強の例として，甘草のグリチルリチン酸がある．グリチルリチン酸は腸内細菌により代謝されて，抗ウィルス，抗菌，消化器官保護作用を持つ 18 β -グリチルレチン酸に変化する．また，生薬に含まれている成分が直接人体に作用しない場合もある．人参に含まれているジンセノサイドには人体への直接的な効能がないことは明らかな事実である[17]．ジンセノサイドはそのまま腸管より吸収できないが，腸管に存在する腸内細菌の代謝を受けたジンセノサイドの残渣が吸収され薬効を発揮すると考えらえている．また，代謝において薬効成分は吸収 (Absorption)，分布 (Distribution)，代謝 (Metabolism)，排出 (Excretion) の制御を受ける．一般的に，複数の薬効成分を組み合わせると，他の薬効成分によって薬物動態的に活性が増強したり，阻害されたりすることが知られている[18]．薬効成分は生体内でその活性が変化するために，ヒトでの臨床試験が必要である．真剣に生薬薬効を解析するためには，ヒトを対象とした薬効試験を徹底的に実施することが必要となる．しかし，生薬や漢方薬のヒトでの臨床試験はコストが高く，現段階ではその再現性にまだまだ向上の余地がある[19]．そのため，現実的にヒトを対象とした試験は倫理面，安全面，コスト面の諸問題から我が国での実施は極めて困難である．

以上，生薬中の全薬効成分が不明であることから，生薬は薬として規定されているが，品

質評価においては食品のようにその生薬が採取された時の外因子（環境要因，産地，天候，加工法など）と内因子（遺伝的要因）が評価されている．

1-4. 我が国の生薬の品質評価

わが国では生薬の品質は JP16[8] によって評価の基準が定められている．しかしながら，JP16 には生薬の品質評価で不十分な点が存在する．JP16 の生薬総則において，生薬は，「医薬品各条の生薬は動植物の薬用とする部分，細胞内容物，分泌物，抽出物又は鉱物などであり，生薬総則及び生薬試験法を適用する生薬は次の通りである」と総称されている．その評価基準は医薬品各条に規定されており，生薬に一貫性を持って共通する評価が行われているわけではない．そのため，生薬ごとに評価の仕方が異なる．生薬の性状の項目にはにおい，味が適否の判定基準となる場合があり，官能試験には経験が重要となる．生薬の評価法は多様性があり経験が必要である．最終的な品質評価には，JP16 の記述のみでは評価者の熟練度が評価を左右する可能性がある．また，現状の市場・学術上の生薬の品質評価では種と産地の判別要因が重視されている．しかし，JP16 には評価の基準として種の違いが記されているが，市場の試験では顕微鏡での形態学的試験とヒトの官能試験しか行われていない．一般的に，生薬研究においては種の判別のために遺伝子解析が盛んに行われている．JP16 にもビャクジュツとソウジュツの遺伝子鑑別法について記載されているが，参考情報としての記載があるにすぎない[8]．JP16 で遺伝子判別が重視されていないのは，遺伝子判別法がまだ市場に普及するほど簡易化・低コスト化されていないこと，手技・再現性に技術的な問題があることが理由として考えられる．そこでより市場に適した生薬の品質評価法を模索するために，生薬における官能試験，種・産地判別の研究の現状について述べる．

1-5. 生薬の官能試験

官能試験は食品の評価で汎用的な方法である．食品の質感，食感，香りや味などの感覚が官能試験で研究されている（Figure 1-3）．官能試験では食品の感覚的・物理的な側面を，機

器分析では食品の化学的・物理的な側面を分析する．例えば，質感や食感については X 線マイクロトモグラフィーや EMG (ElectroMyoGraphy)，FFT (Fast Fourier Transform)，AED (Acoustic Envelope Detector) が用いられる．また，感覚については揮発性成分を多く測定出来る GC/O (Gas Chromatography/Olfactometry) や GC/Mass Spectrometry (GC/MS)，Electric nose が用いられている[20]．

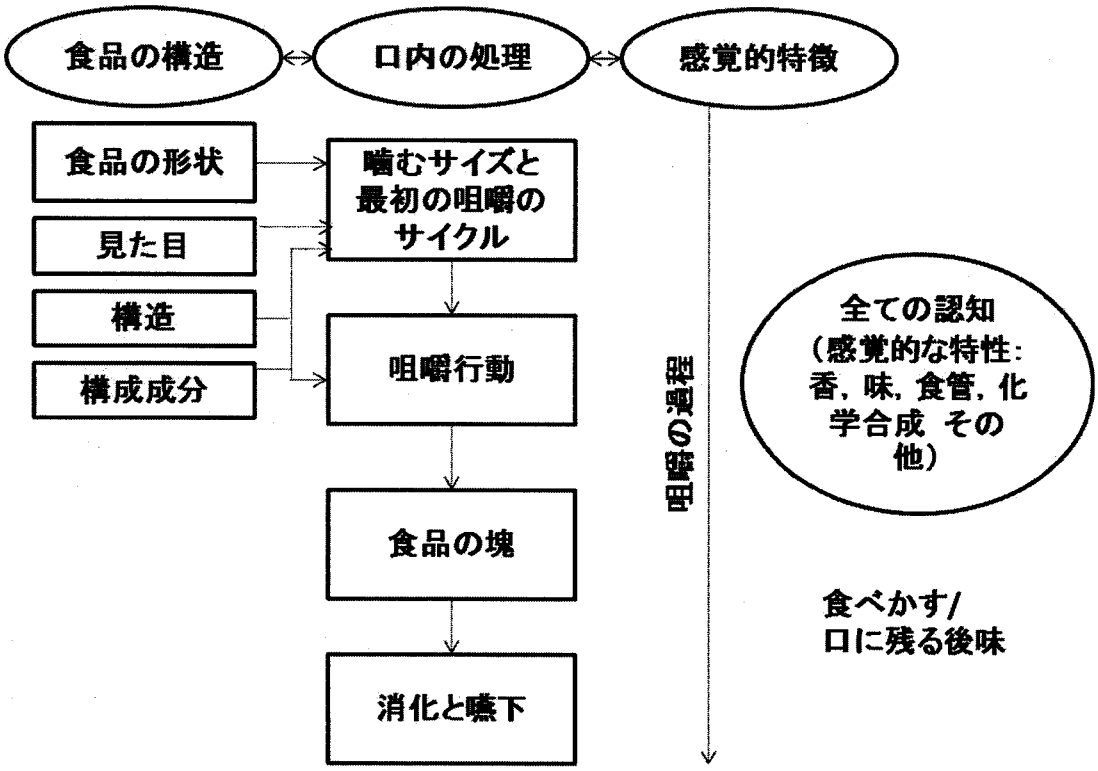


Figure 1-3. 食品の構造，触感，感覚の相互関係の概要[21]

一方，生薬では，味やにおいの感覚的な研究は，種を選別するときの行動[22]や文化的背景の違いによる好みの比較[23]によって行われている．さらに，生薬の感覚研究として，味の数値化によるケイヒでのシンナムアルデヒドと甘みの関連性[24]やニオイセンサーでの生薬の違い[25]が研究されている．しかし，生薬では，食品と比較して感覚に関する研究が進んでいないのが現状である．生薬では JP16 において，におい，味が適否の判定基準となっている．しかしながら，各条は文章のみの感覚表現にとどまり，数値化した再現性のある統一基準には至っていない．

1-6. 生薬における種の判別

生薬において種の判別を行うことは品質管理の上で重要である．種の判別法として，遺伝子解析がある．遺伝子判別のために，ハイブリダイゼーション，PCR (Polymerase Chain Reaction) ，DNA (DeoxyriboNucleic Acid) シークエンスが行われている[26]．生薬においては 1000 種以上のシークエンス情報を集めたデータベースである， MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database) [27] が知られている．学術的には生薬の遺伝子情報が蓄積しているが，少なくとも日本市場の流通の上では官能試験・形態学的試験以外の PCR を用いた遺伝子鑑別は行われていない．これは現状の遺伝子解析法が技術的な問題を抱えていることが主な原因である．そこで生薬の遺伝子解析の利点と欠点について述べたい．利点として，化学成分と違って生薬の遺伝子解析は，植物の成長時間，物理的状態，環境要因，生育地，収穫時期，貯蔵方法などの外的要因に影響を受けないことが挙げられる[28]．一方で，欠点として DNA の量と質に遺伝子の検出が依存するため，乾燥などの加工処理後の生薬ではマーカー検出が困難な場合がある．例えば，温度，pH の影響によって DNA の断片化が起こり，PCR での目的遺伝子の検出が不可能となることもある．そのため，加工の程度にもよるが，短い複製配列の DNA 解析方法が有効であると考えられている．しかしながら，マーカーとして用いる遺伝子の配列がより短い手法である RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) や SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) では定量性が低いことや，コストがかかるといった問題もある[29]．また，二次代謝物が高濃度に存在すると DNA の抽出や PCR の反応に悪影響をもたらすことがある．他にも外的な菌の混入による DNA シークエンスでのマーカー検出への影響が知られている[30]．以上のような点で遺伝子解析には利点があるものの，技術的な問題点があり，実用化にはさらなる技術的発展が必要である．

1-7. 生薬における産地の判別

一方，生薬における産地の判別も品質評価の重要な要因の 1 つ[31,32]として知られている．産地の違いについては一次代謝物，二次代謝物，もしくはその両方で成分変化が報告されて

いる．例えば，一次代謝物と二次代謝物の双方の網羅的な評価を目指した丹参の研究[32]や二次代謝物におけるクロロゲン酸やフラボノイドの含量比較での杜仲の研究[33]が存在する．産地による成分変化が広く知られているにも関わらず，JP16[8]には産地に関する成分基準が存在しない．現状では，生薬の産地は主に官能試験でしか確認されていない．以上のことから，生薬において，種・産地の判別が同時にできる，再現性が高い，簡便な手法を確立すれば，実用化に貢献できると考えた．

1-8. センキュウとトウキ

本研究では生薬における種と産地の実用的な判別法を確立するために，センキュウとトウキを選んだ．その理由として，双方共に国内生産量が多く，定量マーカーが規定されていないことがあげられる．日本での生産量が多い5つの生薬，コウイ，センキュウ，クマザサ葉，トウキ，チンピにおいてもコウイ以外はマーカー成分の記載が JP16[8]に無い（Table 1-3）．また，日本での生産量が多く，中国からの輸入量も多いセンキュウとトウキは，品質評価上のニーズにより，本研究の対象生薬として適すると考えた．

センキュウが日本に伝来してから，そのほとんどの生産は国内で賄われてきた[34]．近年，Table 1-3に示したように中国産の輸入品が市場に現れた．そこで，今後見込まれる需要増のために迅速な品質評価の確立が求められる．センキュウの国内生産量は多いが，センキュウの研究は不足しているためにマーカー探索の手法が必要であると考えた．

従来，トウキの種と産地の判別については甘みによる経験的な官能試験で行われてきた[35]．トウキの評価が常に必要とされたのは，日本では古くから輸入品と国産品が存在した歴史のためである．トウキは8世紀の書物，出雲風土記に記載がある[36]．その後，1709年の大和本草にも，「凡薬ハ中華ノ産ヲ爲佳．然長池ノ当帰大和ノ地黄ハ唐ニマサレリト云」という記述がある．また，山城当帰は大和川芎などとともにシナへ輸出されたという記録（1745年）もある[37]．このように，日本では鎖国中の江戸時代にあっても中国と日本の当帰を比較してきた．また，トウキ研究では既に種と産地の一次代謝物プロファイリングによる評価が行わ

れている[38]が，実用的な結果の使用法には言及されていない．他に，市場での官能評価では甘味が重要視されるため，糖類の品質評価の研究もトウキでは行われている[39]．以上の理由から，トウキの一次代謝物評価は市場ニーズがある．マーカーを探索する生薬として，トウキは最適であると考えた．

本研究では，センキュウの種と産地の簡便なマーカーによる同時評価法を検討した．その後，その手法がトウキについても使用が可能であるかどうかを検討した．さらに，トウキのマーカーについて，既に JP16 に記載されている汎用機での応用を検証することとした．

1-9. 生薬とメタボロミクス

種と産地の機器分析による同時評価を行う上で，多変量成分の同時解析が可能なケモメトリクスの手法を用いた．ケモメトリクスを用いた代謝物分析をメタボロミクス分析と呼ぶ．メタボロミクスと生薬については多くの論文においてその組み合わせが期待されている[40, 41, 42]．その理由として，メタボロミクスが TCM (Traditional Chinese Medicine : 中医学) や漢方医学の思想とマッチする方法論であることが挙げられる．中医学は弁証法的な思想で構成されていて，人の身体を１つのシステムとして観察する．この考え方を理解するためには，成分全体を捉えて，その変化を測定するメタボロミクスの「トップダウン」の戦略が適している．以上の理由より，中医学理論の理解のためにメタボロミクスが期待されている[42]．漢方医学は中医学と基盤を同じくする日本医学であり，同様にメタボロミクスとの相性が良いことが考えられる．また，生薬は中医学や漢方医学で使用される医薬品原料である．その生薬の評価においても，多成分の解析が必要であるために，メタボロミクスの応用が望ましい．

1-10. メタボロミクス技術の発展

メタボロミクスの歴史について述べる．メタボロミクスは分析手法が発展する中で生まれた概念である．1940 年代に UV スペクトロスコピー，1950 年代に NMR (Nuclear Magnetic

Resonance) と MS，1960 年代に GC，1970 年代に HPLC (High Performance Liquid Chromatography) が有機物の同定や評価に使われるようになった[43]．そのような機器の発展に支えられて 1998 年に Fiehn らは metabolome という用語を初めて用いた[44]．その後，2001 年に metabolomics という言葉を Fiehn が定義した[45]．メタボロミクス技術は代謝物を分析して，パターン認識を行い，バイオマーカーの決定や，変異体や薬物投与の生化学的結果の解析が可能である[46]．

本研究では特定の複数成分を分析するメタボリックプロファイリングを行うこととした．その理由として，実用的にマーカーを用いるためには成分が特定されることが必要である．既知の汎用成分からマーカーを決定できれば，公定書への適用が可能である．そこでプロファイリングした同定成分から種・産地への寄与成分を探索することで，より明確なマーカーを探しだせると考えた．

メタボロミクスの分析技術としては NMR，GC，LC，CE (Capillary Electrophoresis) が用いられている[47]．その中で特に GC-MS はその網羅性と再現性の高さよりメタボロミクスに必須の技術である．さらに，複雑なサンプルにおいても高速スキャンでの正確なピーク解析が可能となる TOF (Time-Of-Flight) -MS を用いた．GC-TOF-MS 組み合わせはメタボロミクスにおいて重要な技術である．

生薬の実用的な品質評価を行う上で，GC-MS データの優位な点として (i) 既に JP16[8] で規定のある汎用分析機，GC-FID (GC- Flame Ionization Detector) に容易に移管が可能であること，(ii) GC-MS のデータベースやピーク検出ソフトが充実・普及しているために成分同定に適していること，(iii) データベースの確立している水溶性小分子代謝物の標品は一般に安価であること，以上の 3 点がある．現状では GC-MS での水溶性小分子代謝物分析を用いれば，豊富なデータベースが存在するため，他の機器分析で実現しえない迅速なマーカーの探索が可能となる．一般的に，GC-MS 分析の主要なターゲットとなる一次代謝物が産地要因によって影響を受けるとの報告は多数なされている．今後，臨床試験や薬効研究を行えば，産地のような環境要因の生薬薬効への影響が保証されうると言われている[32]．以上のことから，品質評価の実用化を考える上でも GC を用いた産地の評価は有用である．

GC-MS 分析から得られたスペクトラムデータを解析するソフトウェアとして ChromaTOF (LECO, St. Joseph, MI)や MetAlign[48] や MZmine[49] が存在する．MS データではデコンボリューションやピークピッキングを行う必要がある．前述のソフトは MS データでの未知ピークの取得を可能とする[50]．ChromaToF は GC-EI (Electron Ionization) -TOF-MS と二次元 GC×GC-EI-TOF-MS に特化した LECO 社の商業ソフトウェアである．特徴として，高速スキャン (1-500 scans s^{-1}) に対応して大きなサイズのファイルを作成できる[51]．一方，他の前述のソフトウェアである MetAlign と MZmine はどちらもフリーソフトである．MetAlign の機能は，GC-MS，LC-MS データどちらにも使えること，netCDF ファイル変換が可能であること，データの前処理が可能であること，高・低解像度のデータのアライメントが可能であること，単変量統計のためにファイルを変換できること，多変量解析のためのテーブルを作成できることが特徴である[48]．また，MZmine は netCDF ファイルに対応していて，スペクトラムのフィルタリング，ピーク検出，アライメント，ノーマライゼイション，データの視覚化，データの排出が可能である[49]．

しかしこのようなソフトウェアはスペクトラムデータが含むノイズの除去のためにユーザーの介入を必要とし，完全に自動化されているわけではない[50, 51]．そこで本研究では種や産地のバイオマーカーを探索するために AIoutput[52] を使用した．AIoutput の機能には，保持時間の変動を補正すること，スペクトラムをピアソン相関で比較すること，SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) によってピークの自動的な推定・同定が可能であること，の 3 点がある．同じ保持時間に検出されて人為的には判別が困難なピークについても，AIoutput であれば同定が比較的容易となるため，より正しい成分情報を得ることが期待できる．

1-11. 目的・方法

本研究では GC メタボロミクス技術を用いて，生薬市場での価格要因である種と産地の，同時かつ簡便な判別法を確立することを目的とした．産業ニーズに貢献するために，薬効評

価ではなく品質評価の面からマーカー探索を目指した．目的達成のために，以下の戦術により検討を行った．生薬サンプルについて，GC-MS 分析より成分プロファイルを得た．さらにマーカーの探索に適した OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis) の S-plot[53] を用いてバイオマーカーの探索を行った．多変量を扱うときには，比較的，計算の簡便な線形判別分析 (LDA ; Linear Discriminant Analysis) や分散分析 (ANOVA ; ANalysis Of VAriance) も用いられる．しかし，LDA や ANOVA にはデータ分析上での問題点がある[54]．たとえば，以上のような解析法では多次元性，多重共線性，ノイズや欠損値が存在すると対応が困難である[55]．そこで，本研究ではより多重共線性の影響を受けにくい多変量回帰である OPLS-DA を用いた．

OPLS-DA は PLS から派生した多変量回帰判別モデルである．PLS は X 行列，Y 行列を設定して関連を探る手法である．PLS-DA はクラス間の分離を最大にするために，大きな変数を扱うメタボロミクスやトランスクリプトミクスのデータ解析に適している[54]．更に，OPLS は OSC-filter (Orthogonal Signal Correction-filter) と PLS を関連させた手法である．OPLS では X 行列を Y 行列と相関が有るものと無いものに分解してモデルを構築する．そのため，PLS-DA と比較して，OPLS-DA では，単一のスコアベクトルで Y 行列に相関するクラスの判別が可能である[56]．本研究では OPLS-DA の潜在変数の 1 つ，ローディングを用いた S-plot によってマーカーを示した．S-plot はマーカーの視覚化ツールであり，マーカーの候補は他の成分と分離して表現できる．S-plot は，X 行列とスコアベクトル間の共分散と相関によって表される．

S-plot により選抜した成分の有効性を明確にするために，その相対強度について *t*-test の有意差を検定した．さらに，群間のプロットの比較に適した箱ひげ図を用いて，二成分マーカーの有効性も検討した．箱ひげ図は，上限，下限を最大値，最小値で示し，中の箱を第 1 四分位点，中央値，第 3 四分位点にて表す統計学のプロットの手法である[57]．有効性を示したマーカーを汎用機である GC-FID に適用することで，本研究が市場での応用も可能である事を示した．

第二章　センキュウの GC/MS プロファイリングによる種と産地の判別マーカー探索

2-1. 緒言

センキュウは，日本や中国で古くから婦人病に用いられて来た．日本と中国では主に薬用センキュウの基原が異なり，日本では *Cnidium officinale* Makino (以下，川芎)，中国では *Ligusticum chuanxiong* Hort. (以下，唐川芎) が各々の国の薬局方に記載されている．川芎の国内推定生産量は 313 t あり [7]，国内消費量のほとんどが国内で生産されている [34]．近年，中国産川芎の日本への輸入量が増加して来た．中国の労働コストが安い為に [58]，川芎 (*C. officinale*) が中国で栽培後，輸入されている．従って，日本市場には，日本産川芎，中国産川芎，唐川芎の 3 種類のセンキュウが存在する可能性がある．生薬の最終製品の安全性と品質は，遺伝要因や環境要因に影響を受けるため [3]，以上の 3 種のセンキュウを判別する必要がある．

川芎と唐川芎の種判別の研究が MSBE (Multiplex Single Base Extension) 分析によって行われている [59]．一般的に，DNA の判別方法は，遺伝子が種に特有であり，サンプルの状態に左右されない為に，生薬の評価に有効である．生育年，物理的状態，環境要因，収穫，保存，加工法は遺伝子の配列にはほとんど影響がない．遺伝的解析を行えば，理論上はどの部位からでも同じ遺伝子を得ることが出来る [60]．しかしながら，MSBE 法は遺伝子の精製，PCR 法，DNA シークエンスのような多数の操作過程を必要とする．一般的に，DNA シークエンスのように，多数の操作を必要とする遺伝学的方法では人為的なミスの可能性がある [61]．また，現状では DNA シークエンスは擬陽性率，偽陰性率がともに高く，実用に耐えうる方法論とは言い難い．

川芎や唐川芎の評価では代謝物による種判別も行われている．センキュウの研究では，HPLC-MS 分析による，リグスチライドやブチリデンフタライドのような非極性のマーカー成分 [62] や揮発成分 [63] の種判別の報告がある．また，センキュウの揮発成分については，GC-MS 分析の報告 [64] もある．しかしながら，川芎の産地判別を目的とした報告は存在しない．センキュウの研究は不足しているため，より幅広い成分を用いた種や産地の実践的な判別法が求

められている.

そこで本研究では，川芎と唐川芎の種と産地の判別のために，簡便なマーカー成分を探索することを目的とした．まず，川芎と唐川芎の一次代謝物の GC/MS プロファイリングを行った．得られたデータについて OPLS-DA モデルを構築した．更に OPLS-DA からマーカー成分に適した S-plot を用いて，センキュウの判別マーカーを探索した．*t*-test により，判別マーカーの統計的有意差を評価した．本手法により，種と産地の判別マーカーがセンキュウの品質評価を簡略化できる可能性を示す.

2-2. 実験方法

2-2-1. サンプル

全てのセンキュウサンプルは栃本天海堂（Osaka, Japan）より入手した（Table. 2-1）. 市場で流通している川芎 17 種類（12 種類日本・北海道産，5 種類中国・四川産），唐川芎 6 種類（中国・四川産）を用いた．サンプルの種の同定は専門家による性状評価と検鏡評価によって行われた．川芎と唐川芎の主産地は北海道 [34] と四川省 [65] であることが知られている．日本市場では日本産，中国産のみの川芎が消費されている [7]．そのため今回は種と産地の判別のために，日本産・中国産川芎と，中国産唐川芎を用いた．サンプルは乾燥後，粉末化したものを使用した.

Table 2-1. 本研究で使用したセンキュウ

No.	Class	Lot number	Collection year	Cultivation area	Species
1	1	C-001-TK090923B	2009	China	*Ligusticum chuanxiong* Hort.
2	1	C-003-090922K	2009	China	*Ligusticum chuanxiong* Hort.
3	1	C-002-090922Q	2009	China	*Ligusticum chuanxiong* Hort.
4	1	C-006-090922C	2009	China	*Ligusticum chuanxiong* Hort.
5	1	C-007-TK090923A	2009	China	*Ligusticum chuanxiong* Hort.
6	1	H-008	2009	China	*Ligusticum chuanxiong* Hort.
7	2	C-004-090922L	2009	China	*Cnidium officinale* Makino
8	2	C-005-090922W	2009	China	*Cnidium officinale* Makino
9	2	0405C006201	2004	China	*Cnidium officinale* Makino
10	2	0905C006202	2009	China	*Cnidium officinale* Makino
11	2	0905C006201	2009	China	*Cnidium officinale* Makino
12	3	H-001-VT-65-1	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino
13	3	H-002	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino
14	3	H-003-VT-71-1	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino
15	3	H-004-VT-74-1	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino
16	3	H-005-090409	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino
17	3	H-006-SHIRAI-1	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino
18	3	0407006202	2004	Japan	*Cnidium officinale* Makino
19	3	0508006201	2005	Japan	*Cnidium officinale* Makino
20	3	0608006201	2006	Japan	*Cnidium officinale* Makino
21	3	0710006201	2007	Japan	*Cnidium officinale* Makino
22	3	0802006201	2008	Japan	*Cnidium officinale* Makino
23	3	0901006201	2009	Japan	*Cnidium officinale* Makino

2-2-2. 試薬

本研究で使用したメタノール，クロロホルム，リビトール，ピリジンは和光純薬（Osaka, Japan）から購入した．Methoxyamine hydrochloride は Sigma-ALDRICH（St. Louis, MO, USA）から，MSTFA（*N*-Methyl-*N*-（trimethylSilyl）TriFluoroAcetamide）は GL science（Tokyo, Japan）から購入した．

2-2-3. サンプル調製

乾燥サンプル 20 mg を 2.0 mL エッペンドルフチューブに量りとった．ジルコニアボールをエッペンドルフチューブ内に加えて，液体窒素中で凍結させた．Ball Mill（Retsch Co., Haan, Germany）を用いて完全に破砕した（20 s^{-1}, 2 min）．メタノール：クロロホルム：超純水（2.5 : 1 : 1）の混合溶液を 1 mL 加えることにより疎水性および親水性代謝物の分液抽出を行った．内部標準物質として，Ribitol 溶液（0.4 mg / mL H_2O）60 μL をこの時に加えた．両溶液を加えた後，ボルテックスによる混合を行った．MM 301 mixer mill にて 5 分間 20 s^{-1} で振盪を行った．さらに，遠心分離（11400 g, 4°C, 3 分間）を行い，上澄み液 800 μL を 1.5 mL チューブに回収した．回収した液に 400 μL の超純水（Millipore, Tokyo, Japan）を加え，同条件で遠心分離を行い，上部の水相 400 μL を新しい 1.5 mL チューブに回収した．回収液を SpeedVac（Thermo Savant, San Jose, CA）にて 2 時間，遠心濃縮した．その後，一晩，凍結乾燥させた．要時調製した Methoxyamine hydroxychloride（10 mg / mL pyridine）50 μL を凍結乾燥したサンプルに加え，再溶解させた．Thermomixer Comfort（Audaux-Eppendorf, Schönenbuch, Switzerland）を用いて 30°C で 90 分間振盪させた．続いて MSTFA を 100 μL 加えて，Thermomixer Comfort を用いて 37°C で 30 分間振盪させた．反応後，1 μL を GC に注入した．

2-2-4. GC-MS 分析条件

GC-MS 分析において，得られた 1 μL のサンプル液を Pegasus III time-of-flight mass spectrometer (LECO, St. Joseph, MI, USA) に Agilent 7683B Autosampler (Agilent, Atlanta, GA, USA) を用いて，スプリット比 1 : 200 で注入した．分離カラムには WCOT fused silica capillary column coated CP-SIL-8 CB Low Bleed/MS polymer (Length 30 m, Internal diameter 0.25 mm, Stationary phase film 0.25 μm; Varian, Lakeforest, CA, USA) を用いた．キャリアガスにはヘリウムガスを 1.0 mL/min の流速で用いた．インジェクション部，トランスファーライン，イオン源の温度はそれぞれ，230°C，250°C，200°C に設定した．GC 昇温条件は 80°C で 2 分間の保持，320°C まで 15°C/min の昇温，320°C で 6 分間の保持にて行った．EI (Electron Ionization) モードでのイオン化により，スキャンスピード 20 scans/sec で 85-500 *m/z* のマスレンジデータを採取した．検出器電圧は 1550 V，EI ソースは 70 eV にて分析を行った．

2-2-5. 多変量解析

MS データは netCDF 形式にて ChromaTOF ver.2.32 (LECO, St. Joseph, MI, USA) より変換を行った．続いて，ピーク検出とアライメントは MetAlign[48] を用いて行った．さらに，ピーク同定は AIoutput[52] にて行った．解析の結果，成分同定をしたデータは同じ成分由来の複数ピークを含んでいた．一般的に，有機酸，アミノ酸，糖は誘導体化により GC-MS で複数のピークが測定されることが知られている [66]．例えば，本研究では Fructose の場合，Fructose_1 と Fructose_2 が存在した．データにはミーンセンターとパレートのフィルタリングを行った．OPLS-DA では SIMCA-P+ Ver.12 (Umetrics, Umea, Sweden) を用いて *X* 行列を GC-MS データ，クラスを種か産地に設定して計算した．

OPLS-DA は OPLS アルゴリズムを基本に構築される．OPLS アルゴリズムは X 行列（分析の実測値）を予測値の重み w を使った式に変換する（式 [1]）．Y 行列（予測したい要因の行列）に直交する潜在変数（Y 行列と相関がない X の変数）については，ローディング行列は P_o，スコア行列は T_o と表される．なお，統計学的な変数はイタリックで示した．参考のために，OPLS-DA については Appendix-2 に詳しい原理の記述を行った．この節では本研究に関わりのある OPLS-DA の S-plot の説明を行う．

$$X = t\,w^{\mathrm{T}} + T_o P^{\mathrm{T}}{}_o + E \qquad [1]$$

t ：OPLS-DA モデルの Y 行列と直行しないスコアベクトル

E ：残差

予測したスコアベクトル t は X 行列の w へ直交する投影行列を表している[67]．S-plot は統計学的に有意なバイオマーカーの同定に役立つ．S-plot で使用される 2 つのベクトルは以下である．

$$\mathrm{Cov}\,(t, X_i) = t^{\mathrm{T}} X_i / N - 1 \qquad [2]$$

$$\mathrm{Corr}\,(t, X_i) = \mathrm{Cov}\,(t, X_i) / s_t s_{Xi} \qquad [3]$$

X_i ：センタリングした X 行列

s ：推定標準偏差

N ：サンプルの数

また，S-plot で X 軸の $\mathrm{Cov}\,(t, X)$；p は寄与度（共分散）を，Y 軸の $\mathrm{Corr}\,(t, X)$；$p\,(corr)$ は信頼度（相関）を表している[53]．

2-3. 結果と考察

2-3-1. GC-MS データの成分同定

トウキの一次代謝物を評価するために，GC-MS 分析によるデータを得た．生データについてデータ処理とピーク同定を行った．その結果，Table 2-2 に示したように 68 種類の成分の同定が可能であった．その内，6 種類の成分，Aconitate，*N,N*-Dimethylarginine，*n*-Methylethanolamine，Psicose，Tagatose，UDP-D-Glucuronate はセンキュウでの同定が初めての成分であった．次にこのプロファイリングデータを多変量解析に供した．

Table 2-2. センキュウサンプルより同定した成分

Peak	Retention time (sec)	Identification	Mass fragment
1	304.79	*n*-Methylethanolamine	116, 147, 130, 204, 219
2	319.69	Alanine	116, 147, 100, 190, 133
3	385.84	Malonic acid	147, 133, 233, 99, 117
4	392.84	Valine	146, 130, 103, 156, 174
5	409.79	Urea	147, 189, 171, 100, 130
6	424.29	2-Aminoethanol	174, 100, 86, 147, 133
7	425.34	Pyrophosphoric acid	299, 133, 211, 314, 193
8	425.49	Glycerol	147, 117, 103, 205, 133
9	439.44	Isoleucine	158, 218, 147, 100, 232
10	444.64	Proline	142, 216, 100, 133, 170
11	446.79	Nicotinic acid	180, 136, 106, 195, 90
12	448.09	Glycine	174, 86, 147, 100, 248
13	452.29	Succinic acid	147, 129, 247, 172, 86
14	458.29	Glyceric acid	147, 189, 133, 103, 117
15	472.64	Fumaric acid	245, 147, 133, 115, 217
16	475.54	Serine	116, 132, 103, 144, 159
17	483.39	Pipecolic acid	156, 147, 230, 147, 133
18	489.64	Threonine	117, 101, 219, 147, 129
19	524.09	Homoserine	218, 128, 103, 147, 230
20	543.54	Malic acid	147, 133, 233, 101, 245
21	546.59	Threitol	147, 217, 103, 117, 205
22	550.79	*meso*-Erythritol	147, 103, 217, 117, 205
23	560.29	Aspartic acid	232, 100, 147, 117, 218
24	566.29	Pyroglutamic acid	156, 147, 230, 258, 133
25	567.99	4-Aminobutyric acid	174, 147, 86, 100, 133
26	608.74	Glutamic acid	246, 128, 147, 156, 100
27	616.74	Phenylalanine	218, 192, 100, 91, 147
28	624.84	Arabinose	103, 217, 147, 133, 160
29	631.69	Ribose	103, 217, 147, 189, 133
30	632.89	Asparagine	116, 132, 147, 100, 231
31	650.49	Arabitol	103, 147, 217, 129, 117
32	666.19	UDP-D-Glucuronic acid	217, 147, 129, 204, 101
33	666.64	Aconitic acid	147, 229, 211, 133, 375
34	673.69	Glutathione Oxidized	129, 147, 217, 103, 189

Table 2-2. 続き

Peak	Retention time (sec)	Identification	Mass fragment
35	679.34	Glutamine	156, 147, 230, 258, 133
36	690.29	Shikimic acid	204, 147, 133, 255, 189
37	695.79	Citric acid	147, 273, 211, 133, 183
38	700.44	*N,N*-Dimethylarginine	157, 142, 256, 100, 115
39	708.59	Psicose	103, 217, 147, 133, 117
40	711.19	Quinic acid	147, 255, 133, 191, 115
41	713.74	Tagatose	103, 217, 147, 133, 117
42	715.84	Fructose	103, 217, 147, 133, 89
43	721.89	Mannose	147, 205, 160, 103, 129
44	724.24	Galactose	147, 205, 103, 129, 217
45	726.99	Glucose	147, 205, 160, 103, 129
46	729.29	Gluconic acid	129, 147, 103, 220, 157
47	739.59	Mannitol	147, 103, 217, 117, 129
48	742.44	Sorbitol	147, 103, 217, 205, 117
49	744.34	Galactitol	147, 103, 217, 117, 205
50	748.94	Pyridoxal	222, 206, 89, 120, 149
51	748.99	Tyrosine	218, 100, 147, 179, 280
52	752.69	Glucaric acid	147, 217, 133, 244, 103
53	755.39	Galacturonic acid	147, 160, 133, 89, 189
54	768.19	Glucono-1,5-lactone	129, 147, 103, 220, 117
55	804.49	Inositol	147, 217, 191, 129, 103
56	808.74	Dopa	218, 100, 179, 147, 267
57	811.29	Ferulic acid	338, 249, 308, 89, 219
58	825.29	Caffeic acid	219, 191, 249, 147, 117
59	855.39	Tryptophan	202, 218, 100, 147, 130
60	929.14	Uridine	147, 217, 169, 103, 245
61	982.19	Sucrose	147, 103, 217, 129, 169
62	988.64	Adenosine	230, 103, 147, 192, 245
63	1012.39	Trehalose	191, 147, 361, 103, 129
64	1016.79	Lactitol	204, 147, 217, 103, 117
65	1018.19	Turanose	147, 103, 217, 205, 117
66	1018.39	1-Methyladenosine	206, 103, 147, 220, 259
67	1042.04	Melibiose	204, 147, 217, 129, 103
68	1195.04	Melezitose	103, 361, 147, 169, 217

2-3-2. GC-MS データの PCA (Principal Component Analysis)

GC-MS 分析により得られたデータ構造を概観するために PCA を行った．第一，第二主成分の寄与率は 53.4%，12.6%となった (Figure 2-1)．Figure 2-1 A のスコアプロットでは唐川芎と川芎が分離した．Figure 2-1 B のローディングプロットでは第一主成分軸で Glucose や Fructose が唐川芎に多く，Melezitose や Citric acid が川芎に多く含まれていた．また，川芎の産地については，第一，二主成分のみではクラスター分離が困難であった．

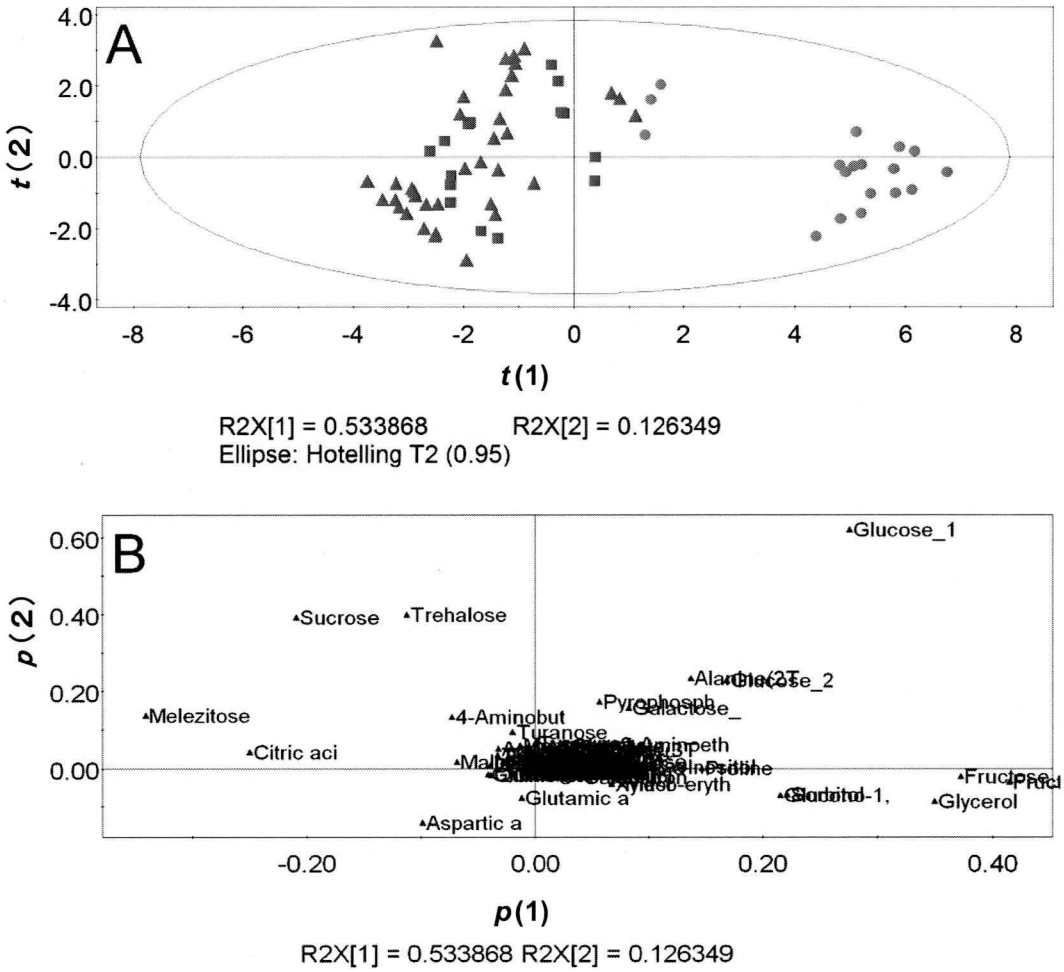


Figure 2-1. センキュウの GC-MS 分析データの PCA : (A) スコアプロット，●: 唐川芎，■: 中国産川芎，▲: 日本産川芎，(B) ローディングプロット

また，サンプルの採取年の影響を調べるために，Figure 2-1 のスコアプロットにサンプルの採取年情報を追加して示した（Figure 2-2）．このスコアプロットより，特に，日本産川芎については，採取年の影響を第一，二主成分軸において捉えることは出来なかった．

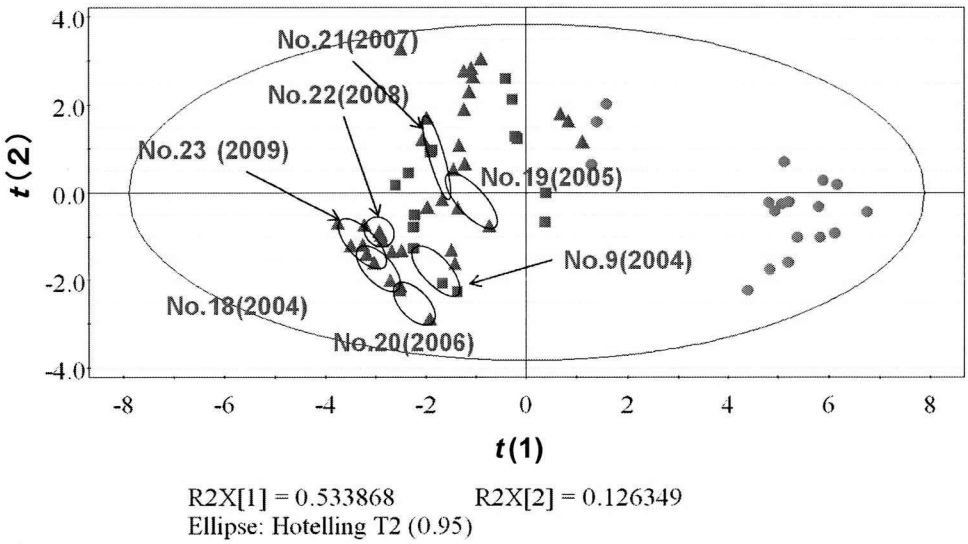


Figure 2-2. センキュウの GC-MS 分析データの PCA: スコアプロット，●：唐川芎，■：中国産川芎，▲：日本産川芎

続いて，第三，四主成分軸についても，同様にスコアプロットとローディングプロットを示した（Figure 2-3）．第三，四主成分の寄与率は 11.1%，5.3%となった．第三主成分軸では川芎の中国産と日本産のクラスター分離が見られた．特に中国産川芎には Sucrose, Alanine, 4-Aminobutyric acid の含量が比較的多いこと，日本産川芎には Glucose や Trehalose の含量が多いことが確認できた．しかしながら，第三，四主成分においても，採取年の影響は捉えることが出来なかった．そのため，今回のセンキュウの GC-MS 分析データは採取年よりも種や産地の要因を大きく反映していた．PCA の結果を受けて，さらに OPLS-DA による判別を行った．

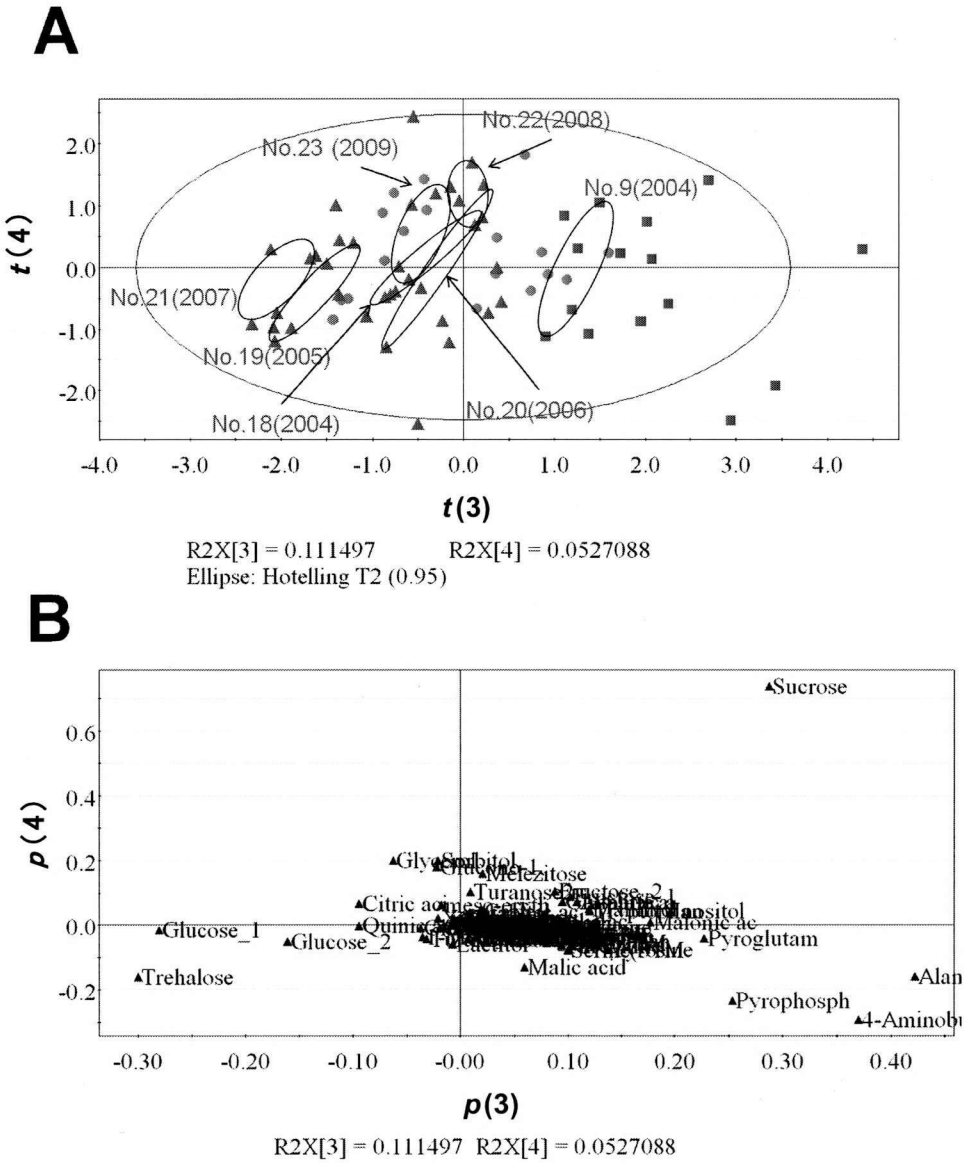


Figure 2-3. センキュウの GC-MS 分析データの PCA : (A) スコアプロット, ●: 唐川芎, ■: 中国産川芎, ▲: 日本産川芎, (B) ローディングプロット

2-3-3. GC-MS データの OPLS-DA

センキュウの種と産地の判別を行うために GC/MS プロファイリングデータを用いて Table 2-1 の Group 分類で OPLS-DA を行った．全てのモデルで GC-MS 分析データについて潜在変数 1 で Q^2 値が 0.9 以上のモデルを作成することができた（Table 2-3）．Q^2 値はクロスバリデーションの予測能と定義されている[53]．Q^2 値>0.5 が良好なモデル，Q^2 値>0.9 が精度の特に良好なモデルと定義されている[55]．よって，本章では特に精度の高い判別モデルを作成できた．

Table 2-3. OPLS-DA モデルの R^2 値と Q^2 値

Group	R^2	Q^2
1, 2 vs 3	0.951	0.934
1 vs 2, 3	0.972	0.965
1 vs 2	0.985	0.975
1 vs 3	0.979	0.966
2 vs 3	0.973	0.952

さらに OPLS-DA モデルのバリデーションを行うために，PLS-DA モデルのバリデーションを行った．バリデーションは既報の辛当帰の手法に従った[68]．並べ替え検定のバリデーション結果を Figure 2-4 に示した．X 軸は実モデルのクラス分け行列とそのモデルで予測した Y 行列の相同性を，Y 軸はそれぞれのモデルでの R^2 値と Q^2 値を示す．実モデルの Y 行列と同じ行列の相同性は 1.0 であるので，全ての結果において，実モデルは右上にプロットされている．Figure 2-4 において，並び替え検定時のそれぞれのモデルのプロットを R^2 値（●），Q^2 値（●）として表わした．実モデルの R^2 値と Q^2 値から，並び替えモデルの R^2 値と Q^2 値のプロットへの回帰線が正の傾きを示したことから，実モデルの R^2 値と Q^2 値よりも並び替えモデルの R^2 値と Q^2 値は低かった．以上のバリデーションにより実モデルの精度と適合性の良さを示した．

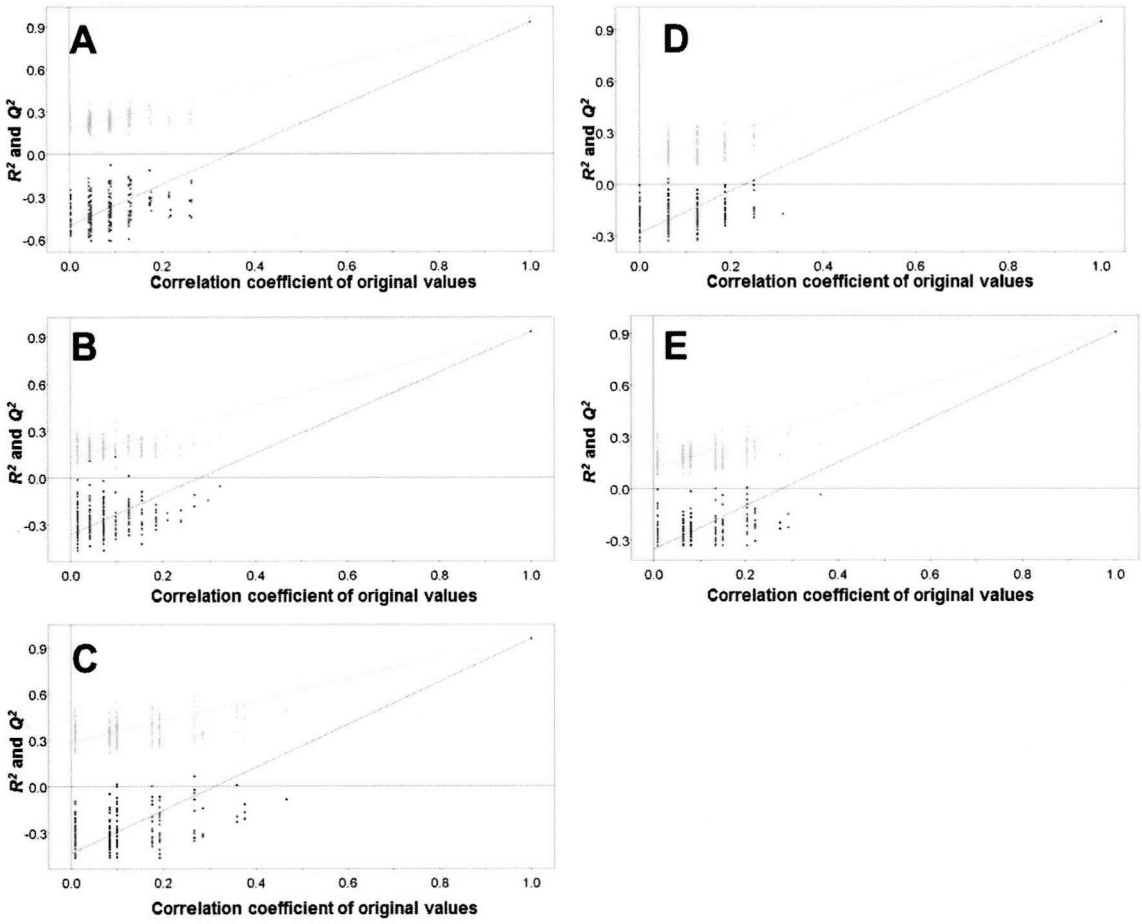


Figure 2-4. GC-MS データの PLS-DA モデルの並び替え検定の結果（並び替え 200 回）：(A) 1, 2 vs 3，(B) 1 vs 2,3，(C) 1 vs 2，(D) 1 vs 3，(E) 2 vs 3. ● : Q^2 値，● : R^2 値を表す．プロットは並び替え検定での結果を表す.

さらなるバリデーションのために，サンプルを，モデルを作るためのトレーニングセットと，モデルに後から当てはめるテストセットに分けた．テストセットとして，それぞれの Group から 1 つか 2 つのサンプルをランダムに取り除いた．OPLS-DA モデルは 3 回構築を行った．その結果の R^2 値と Q^2 値を Table 2-4 に示した．すべての R^2 値と Q^2 値が 0.85 を超える精度でモデルを構築することができた．

Table 2-4. 並び替え検定の R^2 値と Q^2 値

Group	n	R^2	Q^2
1, 2 vs 3	1	0.970	0.948
	2	0.968	0.954
	3	0.971	0.955
1 vs 2, 3	1	0.967	0.942
	2	0.980	0.974
	3	0.967	0.951
1 vs 2	1	0.960	0.948
	2	0.991	0.982
	3	0.960	0.940
1 vs 3	1	0.975	0.958
	2	0.984	0.976
	3	0.971	0.957
2 vs 3	1	0.966	0.929
	2	0.968	0.952
	3	0.932	0.863

さらに，Y 値の予測について，Y 行列のクラス予測のカットオフ値を 0.5 と設定したところ，Figure 2-5 に示すようにほとんどのサンプルにおいて適切なクラス分けが見られた．モデルの R^2 値, Q^2 値の評価，モデル内バリデーション（並べ替え検定），モデル外バリデーション（テストセットとトレーニングセット）を行った結果，得られたモデルは寄与成分を探索でき得る精度を持つと考えた．

以上の精度のモデルについて S-plot による成分の選別を行った．成分を限定するために $|p(corr)| > 0.5$ [69, 70] を閾値とした．本研究ではさらに分散の大きなマーカーを絞り込むために $|p| > 0.2$ を閾値とした．その結果が Table 2-5 である．

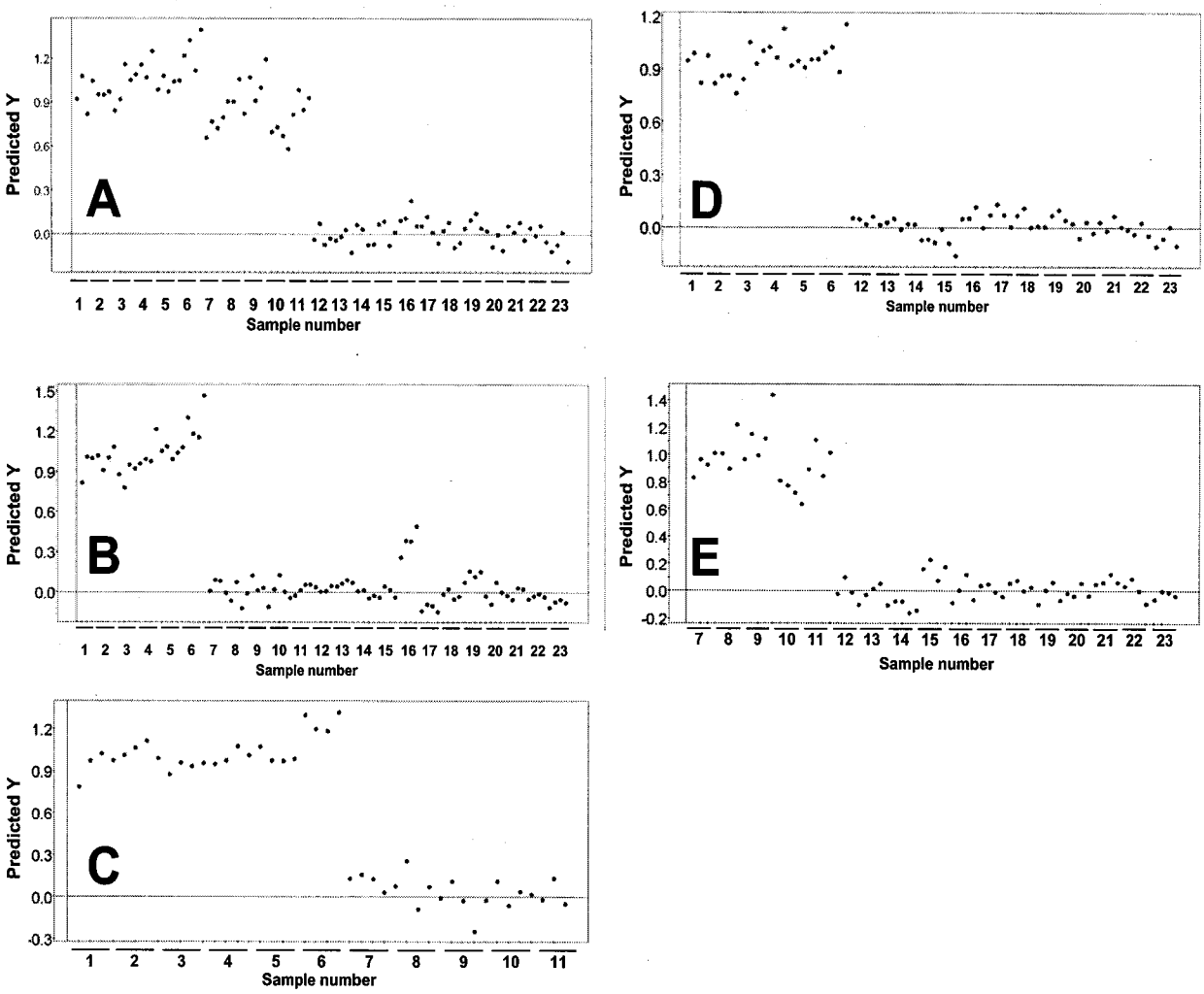


Figure 2-5. GC-MS データの PLS-DA モデルのテストセットよるバリデーション：
(A) 1, 2 vs 3, (B) 1 vs 2, 3, (C) 1 vs 2, (D) 1 vs 3, (E) 2 vs 3

Table 2-5. S-plot で選んだ成分

Group	Compound	p	$p\,(corr)$
1, 2 vs 3	Alanine	0.289	0.724
	Glycerol	0.292	0.536
	Citric acid	-0.299	-0.720
	Fructose_1	0.334	0.605
	Fructose_2	0.369	0.605
	Inositol	0.222	0.835
	Trehalose	-0.245	-0.626
	Melezitose	-0.342	-0.649
1 vs 2, 3	Glycerol	0.353	0.851
	Citric acid	-0.247	-0.781
	Fructose_1	0.360	0.856
	Fructose_2	0.404	0.868
	Glucose_1	0.244	0.522
	Sorbitol	0.224	0.858
	Glucono-1,5-lactone	0.220	0.867
	Melezitose	-0.378	-0.941
1 vs 2	Glycerol	0.324	0.775
	Citric acid	-0.210	-0.815
	Fructose_1	0.334	0.837
	Fructose_2	0.377	0.851
	Glucose_1	0.332	0.804
	Sorbitol	0.207	0.782
	Sucrose	-0.236	-0.583
	Melezitose	-0.359	-0.962
1 vs 3	Glycerol	0.338	0.840
	Citric acid	-0.257	-0.833
	Fructose_1	0.362	0.890
	Fructose_2	0.403	0.894
	Glucose_1	0.224	0.516
	Sorbitol	0.217	0.852
	Glucono-1,5-lactone	0.212	0.857
	Melezitose	-0.365	-0.940

※ $|p| > 0.2$, $|p\,(corr)| > 0.5$

Table 2-5. 続き

Group	Compound	*p*	*p* (*corr*)
2 vs 3	Alanine	0.445	0.728
	Pyrophosphate	0.268	0.632
	Pyroglutamic acid	0.265	0.866
	4-Aminobutyric acid	0.282	0.556
	Quinic acid	-0.204	-0.527
	Inositol	0.299	0.811

見出した成分について相対強度の最大値，最小値，標準偏差を Group ごとに示した (Table 2-6) .

Table 2-6. Group ごとの GC-MS 分析の相対強度の最大値，最小値，標準偏差，それぞれの成分の *t*-test の *P* 値

Compound	Max	Min	SD	Max	Min	SD	*P*
1, 2 vs 3	1, 2			3			
Alanine	4.29	1.68	0.60	2.68	0.84	0.50	2.50×10^{-11}
Glycerol	6.46	0.28	1.73	1.35	0.15	0.31	3.85×10^{-06}
Citric acid	2.78	0.55	0.66	3.73	1.39	0.56	1.09×10^{-10}
Fructose_1	5.77	0.89	1.57	3.08	0.52	0.65	8.10×10^{-08}
Fructose_2	6.85	1.06	1.93	3.53	0.56	0.75	5.84×10^{-08}
Inositol	1.95	1.14	0.18	1.39	0.50	0.19	1.09×10^{-19}
Trehalose	1.14	0.00	0.33	2.63	0.22	0.74	1.69×10^{-08}
Melezitose	4.02	0.14	1.37	4.46	2.20	0.57	5.53×10^{-09}
1 vs 2, 3	1			2, 3			
Glycerol	6.46	1.14	1.45	1.35	0.15	0.27	1.19×10^{-12}
Citric acid	1.77	0.55	0.38	3.73	1.39	0.58	4.07×10^{-15}
Fructose_1	5.77	2.20	1.02	3.08	0.52	0.68	9.79×10^{-19}
Fructose_2	6.85	2.44	1.22	3.53	0.56	0.77	5.53×10^{-19}
Glucose_1	6.31	3.68	0.62	6.72	0.80	1.77	1.15×10^{-03}
Sorbitol	2.16	0.07	0.58	0.22	0.02	0.05	6.10×10^{-15}
Glucono-1,5-lactone	2.00	0.10	0.53	0.23	0.02	0.05	4.78×10^{-15}
Melezitose	0.83	0.14	0.21	4.46	2.07	0.58	1.01×10^{-12}

Table 2-6. 続き

Compound	Max	Min	SD	Max	Min	SD	*P*
1 vs 2	1			2			
Glycerol	6.46	1.14	1.45	0.82	0.28	0.16	1.81×10^{-04}
Citric acid	1.77	0.55	0.38	2.78	1.52	0.42	1.29×10^{-07}
Fructose_1	5.77	2.20	1.02	2.89	0.89	0.70	$4.60\times10\text{-}^{08}$
Fructose_2	6.85	2.44	1.22	3.28	1.06	0.77	6.70×10^{-08}
Glucose_1	6.31	3.68	0.62	4.88	0.80	1.38	1.57×10^{-03}
Sorbitol	2.16	0.07	0.58	0.15	0.03	0.04	2.64×10^{-05}
Sucrose	6.86	2.19	1.30	8.68	4.23	1.33	2.03×10^{-03}
Melezitose	0.83	0.14	0.21	4.02	2.07	0.57	5.13×10^{-04}
1 vs 3	1			3			
Glycerol	6.46	1.14	1.45	1.35	0.15	0.31	2.46×10^{-10}
Citric acid	1.77	0.55	0.38	3.73	1.39	0.56	6.93×10^{-15}
Fructose_1	5.77	2.20	1.02	3.08	0.52	0.65	1.28×10^{-15}
Fructose_2	6.85	2.44	1.22	3.53	0.56	0.75	8.52×10^{-16}
Glucose_1	6.31	3.68	0.62	6.72	1.02	1.86	3.76×10^{-03}
Sorbitol	2.16	0.07	0.58	0.22	0.02	0.05	7.50×10^{-12}
Glucono-1,5-lactone	2.00	0.10	0.53	0.19	0.02	0.05	3.83×10^{-12}
Melezitose	0.83	0.14	0.21	4.46	2.20	0.57	1.34×10^{-14}
2 vs 3	2			3			
Alanine	4.29	1.81	0.67	2.68	0.84	0.50	5.51×10^{-09}
Pyrophosphate	2.11	0.93	0.37	1.67	0.50	0.27	3.23×10^{-06}
Pyroglutamic acid	0.82	0.31	0.15	0.30	0.09	0.06	7.38×10^{-17}
4-Aminobutyric acid	3.03	1.04	0.61	2.06	0.66	0.36	2.00×10^{-05}
Quinic acid	1.03	0.42	0.16	1.56	0.61	0.31	1.82×10^{-04}
Inositol	1.58	1.20	0.11	1.39	0.5	0.19	1.07×10^{-12}

Group ごとの GC-MS 分析の相対強度の違いを評価するために *t*-test による検定を行った. その結果, 全ての選抜成分で 1%の有意水準での有意差が見られた (Table 2-6). S-plot で選抜した成分は判別マーカーとなりうることを示した. しかしながら, 実用的な判別マーカーとして使用する場合, 群間の相対強度の重なりがないことが重要であると考えられる.

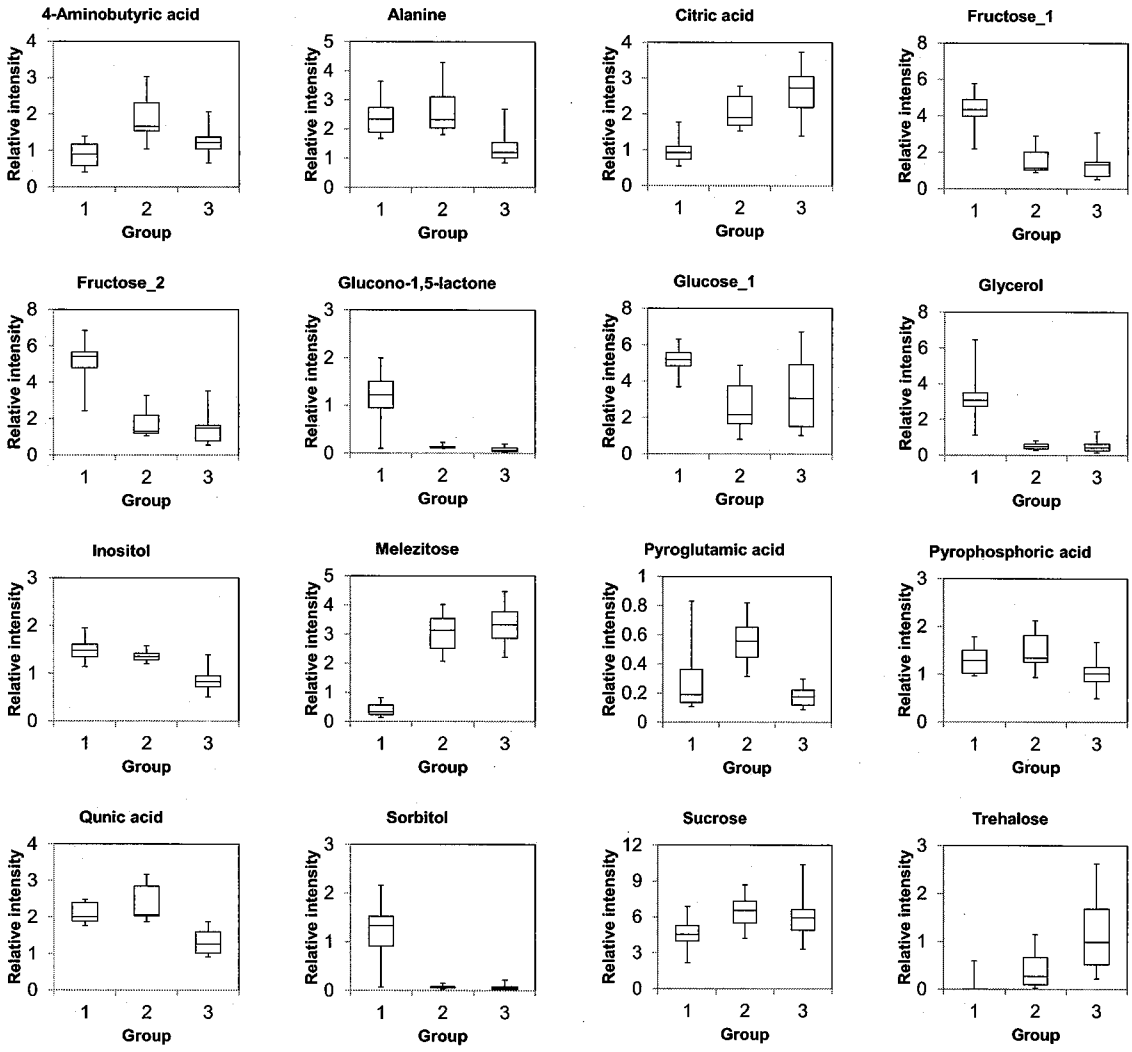


Figure 2-6. 全てのセンキュウサンプルの Group ごとの相対強度の箱ひげ図 (1 : 唐川芎, 2 : 中国産川芎, 3 : 日本産川芎)

そこで S-plot で選抜した成分についてその相対強度の存在範囲を比較した（Table 2-6, Figure 2-6）．その結果，Melezitose では，唐川芎（Group 1）と中国産・日本産川芎（Group 2, 3）の違いを相対強度差 1.24 で判別できた（Table 2-6）．さらに，Pyroglutamic acid では，日本産と中国産の川芎を 0.01 の相対強度比差で判別できた（Table 2-6）．しかしながら，実践的な使用にはこの相対強度比差は小さすぎると考えた．そこで，S-plot で p と $p(corr)$ の値から正と負の両極端のマーカーについて，二成分の比をとることで，より判別差を大きくできると推定した．Table 2-5 で選び出したマーカーの中から最適な正負のマーカーの組み合わせを検討した．種の判別については，Fructose と Melezitose の組み合わせが，産地の判別については Inositol と Quinic acid の組み合わせが最適であった．それぞれ，一成分と二成分比での相対強度差は，種の判別については 1.24 から 1.82，産地の判別については 0.01 から 0.35 と，どちらの判別においても二成分比での改善が可能であった（Figure 2-7）．

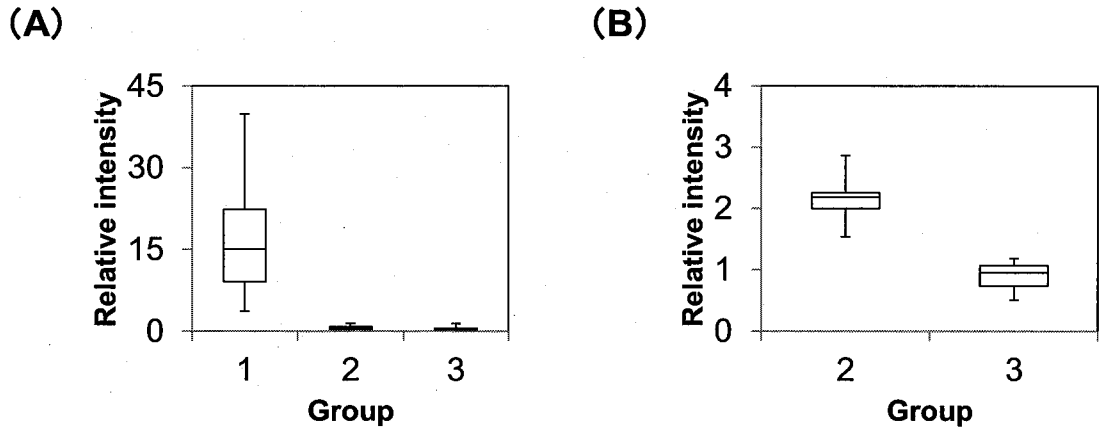


Figure 2-7. GC-MS 分析の相対強度によるマーカー成分の箱ひげ図（A）Fructose/Melezitose, (B) Inositol/Quinic acid

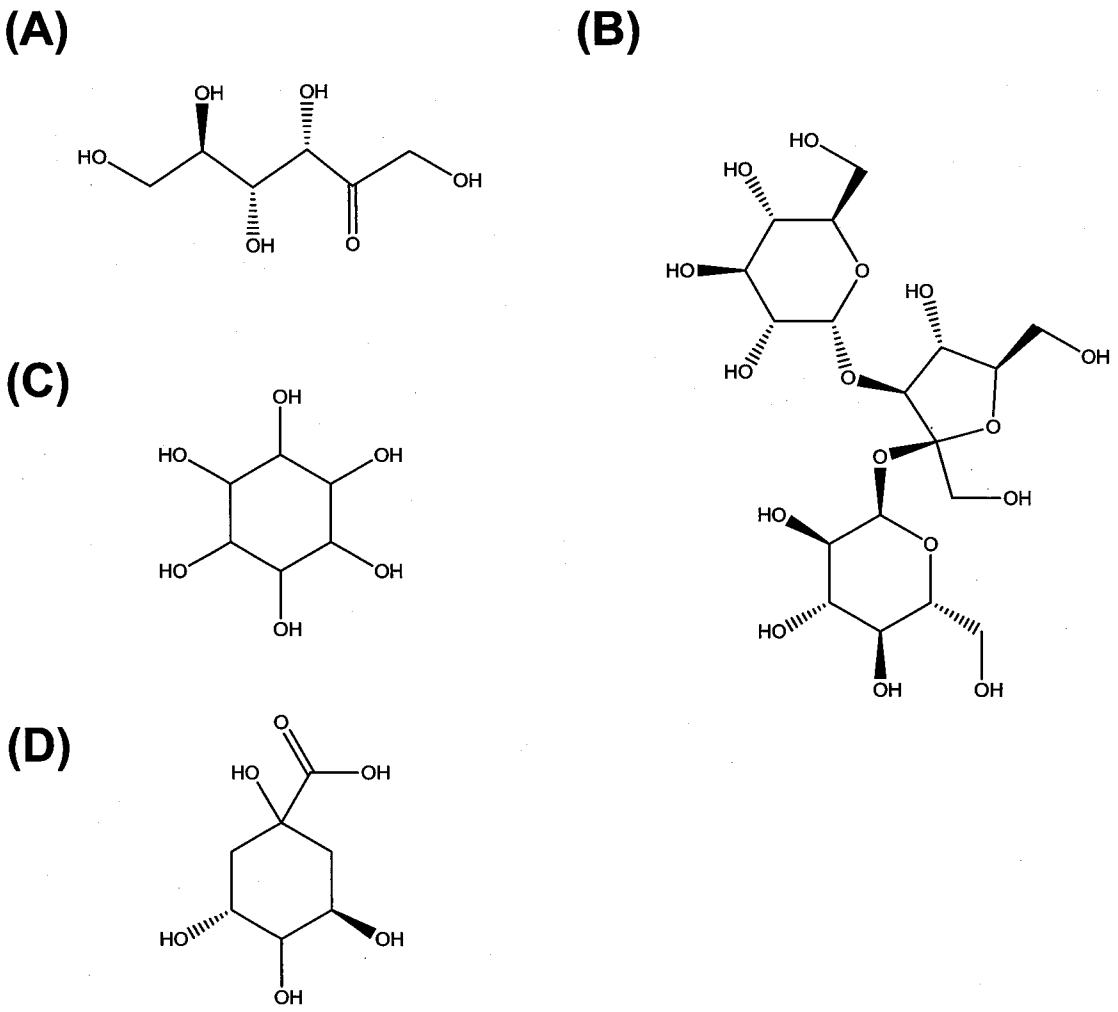


Figure 2-8. マーカー成分の化学構造：(A) D-Fructose, (B) Melezitose, (C) Inositol, (D) Quinic acid

今回，見出したマーカー成分の生合成経路と薬理作用について述べる．

まず，D-Fructose (Figure 2-8 (A)) についてである．Fructose は Sucrose の構成成分であり，糖の中で最も甘みが強く，単独で果物や蜂蜜に含まれる．高等植物での Fructose の生合成は炭素源の主な輸送形態である Sucrose から Sus (Sucrose synthase) と INV (Invertase) によって合成される．Sus は主にデンプンや Cellulose の合成やエネルギー産生に，INV は植物体の成長に関わっている [71]．長期間の臨床試験による体重増加への Fructose の影響の評価が行われたものの，Fructose の過剰摂取は食物の過剰摂取と変わらな

いと考えられた[72]．他に，ヒトの消化器官の状態による Fructose の吸収量の変化も知られている．人体での Fructose の吸収は， Fructose を単糖として，もしくは Sucrose から分解されて，腸上皮細胞に存在するトランスポーターである GLUT-5，GLUT-2 から行われる．GLUT-2 は Glucose，Fructose，Galactose によって活性化される．また GLUT-5 は内腔に存在するアミノ酸と Fructose もしくは Scurose の存在によって活性化される．しかしながら，その Fructose 吸収の調節機構についてはまだよく知られていない[73]．

次に Melezitose (Figure 2-8 (B)) について述べる．Melezitose は *O*-α-D-Glucopyranosyl-(1-3) -β-D-fructofuranosyl-*α*-D-glucopyranoside と命名された三糖である[74]．1833年に発見されてから，多くの樹液，蜂蜜，アブラムシの甘露から発見されている．樹木の葉にも Melezitose が含まれているものの，その濃度は低く，アブラムシの体内に Fructose から Melezitose を産生する酵素が含まれていると考えられている[75]．Melezitoseについての研究報告はまだまだ少なく，植物体内での生合成の詳細な反応経路については既報をほとんど見つけることができなかった．ヒトでの研究では， Sucrose > D-Fructose >Melezitose > Maltose > D-Glucose = Raffinose = Sobritol という順で甘みが感じられたという報告がある[76]．ヒト体内では排泄物中のビフィズス菌が発酵を行うときに Melezitose が用いられることから，ヒトの腸内の菌叢へ Melezitose が影響力を持つと考えられている[77]．

さらに Inositol (Figure 2-8 (C)) について述べる．Inositol は動物，植物，微生物に存在する成分である．植物体内では Inositol 合成は，D-Glucose から D-Glucose-6-phosphate への生成，D-Glucose-6-phosphate から *myo*-Inositol-1-phosphate の環化，リン酸基の分離という3つの過程で行われる．他に，イノシトールリン酸化合物は哺乳類の細胞シグナルネットワークにおいて，タンパク質翻訳，糖の恒常性，脂質生成，好中球の機能，アポトーシスなどの重要な役割を担っている[78]．Inositol の臨床効果としては，Inositol の異性体である D-*chiro*-Inositol が多嚢胞性卵巣症候群の痩せ型女性の血清中アンドロゲン濃度を減らし，血圧や高トリグリセリド血症を改善することが知られている[79]．他にも，D-*chiro*-Inositol がパ

ニック症候群の重症度と発作の頻度を減少させたり[80]，強迫性障害を改善したとの報告がある[81].

最後に Quinic acid (Figure 2-8 (D)) について述べる．Quinic acid は D-Glucose の中から産生される．Quinic acid はシキミ酸経路の中間体ではないが，関連成分である[82]．シキミ酸は Glucose からペントースリン酸経路や解糖系での酸化によって D-Erythrose-4-phosphate や PEP (PhosphoEnolyPyruvate) を経て産生される．シキミ酸はその後，トリプトファン，チロシン，フェニルアラニン，イソプレノイド，キノン，*p*-Aminobenzoic acid 等の生合成に使用される[83]．さらに，シキミ酸は成長促進因子であったり，タミフルの合成開始成分としても知られている[84].

本章では同定した GC/MS プロファイルから OPLS-DA の S-plot を用いてセンキュウの種や産地の判別マーカーを探した．その結果，種と産地について，それぞれ統計学的に有意な成分の探索が可能であった．さらに種と産地については S-plot の正負の成分の比を示すことで二成分による完全な判別が可能となった．このような手法は生薬に限らず，要因を判別する時に有用である．すでに，トウキでは，一次代謝物のプロファイリングが種と産地の判別へ有効であることが示されている[38,85]. その研究と比較してマーカーの精度を統計的に議論している点が本研究は優れている．さらに，タンジン[32]，辛当帰[68]においても一次代謝物の有用性が産地判別において報告されている．それらの研究と比較して，本研究では，産地と種の判別を同時に行っていること，箱ひげ図により成分範囲を示して成分の閾値の設定の可能性を示したことが優位点である．特に，川芎については，JP16[8]に成分マーカーの記載は存在しない．そのため，本研究での一次代謝物を用いた品質評価の手法は，従来研究と比較して有用であると考えられる．本研究の様に，単一もしくは二成分のみの判別であれば，再現性がよく，簡便な手法として公的な基準となる可能性があると考えた．今後，生薬の使用が世界に広がるなかで，本研究の重要性が増すことが期待される．

2-4. 小括

同定した68成分の GC/MS プロファイリングよりセンキュウの種と産地の判別を目指した．GC-MS 分析データの PCA からは種と産地，それぞれの要因による成分への影響を確認することができた．種や産地の判別のために 2 群比較の OPLS-DA モデルを構築した．S-plot によって判別寄与成分を選抜した．それぞれのマーカー成分の相対強度について *t*-test で有意差を検定した．マーカー成分について 1%有意水準で有意差が見られた．箱ひげ図においても，単一成分による種と産地の判別は可能であった．さらに S-plot で正と負を示した二成分の相対強度の比をとることで判別の改善を行った．その結果，唐川芎と川芎の判別には Fructose/Melezitose の比が，川芎の中国産と日本産の判別には Inositol/Quinic acid の比が有効であった．官能試験や遺伝子鑑別においても判別困難なセンキュウでは，本方法を用いれば，種や産地の判別を再現性良く，簡便に行えることを示した．

第三章　トウキの GC/MS プロファイリングによる種と産地の判別マーカー探索

3-1. 緒言

トウキの根（*Angelicae Radix*）は日本や中国で定型的な治療が難しい婦人病に用いられてきた生薬である．薬用として一般的なトウキにはいくつかの種類がある．例えば，大和当帰（*Angelica acutiloba*）と北海当帰（*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino）は日本市場で流通している主なトウキである．一方で中国薬局方では唐当帰（*A. sinensis*）を薬用として記載している．日本国内では，主に大和当帰が昔から栽培されてきた．しかし最近，日本のトウキの自給率が44%と不十分であるため[35]，中国産の大和当帰が流通している．そこで日本の市場には日本産・中国産大和当帰，北海当帰，唐当帰が存在する可能性がある．日本市場では，北海当帰や中国産の大和当帰より日本産の大和当帰が高額で評価されている[86]．以上の理由から生薬産業においてトウキの種と産地の判別は重要な問題である．

遺伝学的な分析は代謝物分析と同様にトウキの種判別のために行われている．大和当帰，北海当帰，唐当帰の判別は 5S-rRNA のスペーサー領域[87]やプラスチドゲノムの DNA シークエンスでの報告がある[88]．遺伝子は外部要因から配列に変動を受けない分子である[28]．しかし，現状では，遺伝学的手法で品質評価を行うためには技術的な問題が存在する．例えば，ターゲット以外の DNA が PCR によって増幅されること[60]や，比較的簡便な RAPD（Random Amplification of Polymorphic DNA）法では再現性が低いこと[89]が報告されている．

代謝物分析については，主に唐当帰と大和当帰について，リグスチライドやブチリデンフタライドのような非極性成分のマーカー成分[90,91]や揮発成分[92]の比較が行われている．また，大和当帰と北海当帰について，薬効評価と共にリグスチライドやキサントトキシンの成分量が比較されている[86]．以上のような成分分析は主に薬効成分の評価に重きを置いて行われている．しかし，市場ではトウキの品質評価は五感による見た目，香り，味のような官能試験によるところが大きい．そこで，トウキの市場品の品質評価のためには薬効成分の評価のみでは不十分であると考えられる．官能試験の味覚に影響を与える成分の多くは一次代謝物で

ある．特に，トウキの品質評価では 1783 年から甘みが重要であるとされてきた [35]．さらに，糖はトウキの加工法評価のための重要な指標成分である [39]．以上のことから，トウキの品質評価では，一次代謝物分析は産業上，必要な手法であると考えられる．

トウキ中の成分をより多く評価するために，メタボロミクスの手法でもトウキ評価が行われている．メタボローム分析では大和当帰と北海当帰の判別が NMR[85]，GC-MS[38]，UPLC (UltraPerformance LC) –MS[93]，pyrolyzer-GC-MS[94] によって行われている．しかしながら，そのような研究は定性評価にとどまり，特定の判別マーカー成分の統計学的な有意差についてまでは言及していない．NMR と UPLC-MS を用いた，統計学的なマーカー評価を行った報告としては，辛当帰での韓国の 3 つの産地の判別が存在する [68]．この研究では，統計学的なマーカー評価は行われているが，産地評価のみであり，種の判別は行われていない．世界市場でのトウキの品質評価のために，種と産地の同時評価，統計学的な有意差検定，より定量的な評価手法を行うことが必要である．

そこで第三章では，トウキの種と産地判別のために実践的な手法の確立を目指した．まず，トウキの GC/MS プロファイリングを行った．その後，多変量解析の OPLS-DA モデルを構築して，トウキの種と産地のマーカーを探索した．続いて，トウキのマーカーについての *t*-test による有意差を示した．本章では GC メタボロミクス技術がトウキの種と産地の判別において実践的な方法の確立に有効であることを示す．

3-2. 実験方法

3-2-1. サンプル

全てのトウキサンプルは栃本天海堂（Osaka, Japan）より入手した．市場で流通している大和当帰 13 種類（7 種類は日本産，6 種類は中国市場品），北海当帰 3 種類，唐当帰 5 種類を用いた．サンプルの詳細は Table 3-1 に示した．サンプルの種の同定は専門家による性状評価と検鏡評価によって行われた．奈良県，北海道[35]，甘粛省[95]はそれぞれ大和当帰，北海当帰，唐当帰の主生産地として知られている．サンプルは粉末にして，50 mL プラスチックチューブで遮光して-30°C にて保存した．

Table 3-1. 本研究で使用したトウキサンプル

Population number	Group number	Collection year	Cultivation region	Species
1	1	2008	Nara, Japan	*A. acutiloba*
2	1	2008	Nara, Japan	*A. acutiloba*
3	1	2008	Nara, Japan	*A. acutiloba*
4	1	2007	Nara, Japan	*A. acutiloba*
5	1	2006	Nara, Japan	*A. acutiloba*
6	1	2005	Nara, Japan	*A. acutiloba*
7	1	2007	Tokushima, Japan	*A. acutiloba*
8	2	2008	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
9	2	2007	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
10	2	2005	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
11	2	2004	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
12	2	2004	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
13	2	2004	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
14	3	2007	Hokkaido, Japan	*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
15	3	2007	Hokkaido, Japan	*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
16	3	2006	Hokkaido, Japan	*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
17	4	1995	Gansu, China	*A. sinensis*
18	4	2008	Gansu, China	*A. sinensis*
19	4	2008	Gansu, China	*A. sinensis*
20	4	2008	Gansu, China	*A. sinensis*
21	4	2008	Gansu, China	*A. sinensis*

3-2-2. 試薬

2-2-2 に準ずる.

3-2-3. サンプル調製

2-2-3 に準ずる.

3-2-4. GC-MS 分析条件

2-2-4 に準ずる. ただし, スプリット比のみ 1 : 25 にて行った.

3-2-5. 多変量解析

2-2-5 に準ずる.

3-3. 結果と考察

3-3-1. GC-MS 分析データの成分同定

トウキの一次代謝物を GC-MS 分析によって同定した. まず GC-MS によって得られた生データについて MetAlign [48] (http://www.met align.nl) でピークを検出後, ピーク同定ソフト AIoutput[52] により成分同定を行った. 同定の結果, Table 3-2 に示したように 76 種類の成分同定が可能であった. 以前の報告の同定結果 22 種類 [38] に比べて, AIoutput を用いることでより多くの成分の同定が可能であった.

Table 3-2. トウキサンプルより同定した成分

Peak	Retention time (sec)	Identification	Mass fragment
1	289.7	Lactic acid	147, 117, 191, 133, 88
2	301.5	Glycolic acid	147, 177, 133, 205, 161
3	319.9	Alanine	174, 86, 147, 248, 100
4	324.6	*n*-Butylamine	174, 128, 100, 202, 114
5	335.0	Hydroxybutyric acid	131, 147, 205, 190, 115
6	339.0	Oxalic acid	147, 190, 133, 219, 175
7	358.3	3-Hydroxybutyric acid	147, 131, 205, 190, 233
8	365.6	2-Aminobutyric acid	130, 147, 100, 204, 114
9	386.2	Malonic acid	147, 133, 233, 99, 117
10	393.2	Valine	146, 130, 103, 156, 174
11	411.6	Urea	147, 189, 171, 100, 130
12	419.7	Serine	116, 132, 103, 144, 159
13	420.9	Oxamic acid	147, 116, 190, 100, 218
14	424.7	2-Aminoethanol	174, 100, 86, 147, 133
15	425.7	Glycerol	147, 117, 103, 205, 133
16	425.8	Phosphoric acid	299, 133, 211, 314, 191
17	426.9	Leucine	158, 102, 147, 232, 130
18	435.4	Ethylmalonic acid	147, 217, 133, 99, 261
19	440.1	Isoleucine	158, 218, 147, 100, 232
20	441.7	Threonine	117, 101, 219, 147, 129
21	445.3	Proline	117, 101, 219, 147, 129
22	448.6	Glycine	174, 86, 147, 100, 133
23	452.8	Succinic anhydride	147, 247, 129, 172, 116
24	458.8	Glyceric acid	147, 189, 133, 103, 117
25	467.1	Uracil	99, 147, 241, 255, 113
26	473.1	Fumaric acid	245, 147, 133, 115, 217
27	483.8	Pipecolic acid	156, 147, 230, 147, 133
28	503.9	Glutaric anhydride	147, 158, 129, 97, 261
29	515.8	β-Alanine	174, 86, 147, 248, 100
30	524.7	Homoserine	218, 128, 103, 147, 202
31	525.0	Maleamic acid	147, 154, 244, 228, 169

Table 3-2. 続き

Peak	Retention time (sec)	Identification	Mass fragment
32	537.0	Citramalic acid	147, 247, 115, 133, 85
33	544.5	Malic acid	147, 133, 233, 101, 245
34	547.3	Threitol	147, 217, 103, 117, 205
35	561.0	Aspartic acid	232, 100, 147, 117, 218
36	564.1	Methionine	176, 128, 147, 100, 219
37	564.7	*trans*-4-Hydroxy-L-proline	140, 230, 147, 133, 86
38	566.9	Pyroglutamic acid	156, 147, 230, 258, 133
39	568.7	4-Aminobutyric acid	174, 147, 86, 100, 133
40	577.4	Threonic acid	147, 117, 292, 103, 220
41	589.0	2-Isopropylmalic acid	147, 275, 133, 115, 231
42	609.5	Glutamic acid	246, 128, 147, 156, 100
43	614.7	Tartaric acid	147, 230, 143, 219, 102
44	617.4	Phenylalanine	218, 192, 100, 91, 147
45	622.2	Xylose	103, 217, 147, 89, 133
46	625.6	Arabinose	103, 217, 147, 133, 160
47	633.6	Asparagine	116, 132, 147, 100, 231
48	641.6	Xylitol	103, 217, 147, 129, 205
49	647.4	Phthalic acid	147, 119, 105, 135, 221
50	651.2	Arabitol	103, 147, 217, 129, 117
51	651.3	Rhamnose	117, 160, 148, 133, 89
52	666.1	Putrescine	174, 100, 130, 214, 146
53	667.4	Aconitic acid	147, 229, 211, 133, 375
54	670.9	Xylonic acid	147, 103, 217, 292, 117
55	680.1	Glutamine	156, 147, 230, 258, 133
56	691.2	Shikimic acid	204, 147, 133, 255, 189
57	696.6	Citric acid	147, 273, 211, 133, 183
58	698.0	Ornithine	142, 174, 86, 100, 200
59	701.5	Citrulline	157, 142, 256, 100, 115
60	709.9	Psicose	103, 217, 147, 133, 117
61	712.0	Quinic acid	147, 255, 133, 191, 115
62	716.8	Fructose	103, 217, 147, 133, 89

Table 3-2.　　続き

Peak	Retention time (sec)	Identification	Mass fragment
63	722.8	Mannose	147, 205, 160, 103, 129
64	726.4	Adenine	264, 192, 279, 99, 165
65	727.7	Glucose	147, 205, 160, 103, 129
66	736.4	Glucosamine	203, 147, 131, 217, 117
67	741.3	Lysine	156, 174, 128, 100, 230
68	742.9	Galactosamine	159, 147, 205, 103, 129
69	743.2	Histidine	154, 254, 100, 218, 166
70	743.3	Sorbitol	147, 103, 217, 205, 117
71	749.8	Tyrosine	218, 100, 147, 179, 280
72	769.0	Gluconic acid	129, 147, 103, 220, 157
73	774.5	Glucarate	147, 217, 133, 103, 244
74	805.5	Inositol	147, 217, 191, 129, 103
75	898.8	2'-Deoxyuridine	103, 171, 117, 145, 261
76	930.1	Uridine	147, 217, 169, 103, 245

3-3-2. GC-MS 分析データの PCA

GC-MS 分析データの構造を概観するために PCA を行った．第一，第二主成分の寄与率は，38.5%，35.2%となった．Figure 3-1 A のスコアプロットでは唐当帰とそれ以外のトウキのクラスターが分離した. Figure 3-1 B のローディングプロットでは第一主成分軸で Glucose や Fructose の分離への大きな寄与が見られた．トウキでは唐当帰の分離にこのような単糖が重要であることが示唆された．さらに，ローディングプロットとスコアプロットを比較すると，第二主成分軸を見ると Proline が分離へ大きく寄与していた．このことから大和当帰と北海当帰・唐当帰の分離に Proline の寄与が示唆された. Proline は植物種によって変化する代謝物であることが既に知られており [96]，トウキにおいても有用なマーカーであると考えられる. さらに詳しく種や産地の分離の寄与成分について調べる為に OPLS-DA による判別を行うこととした.

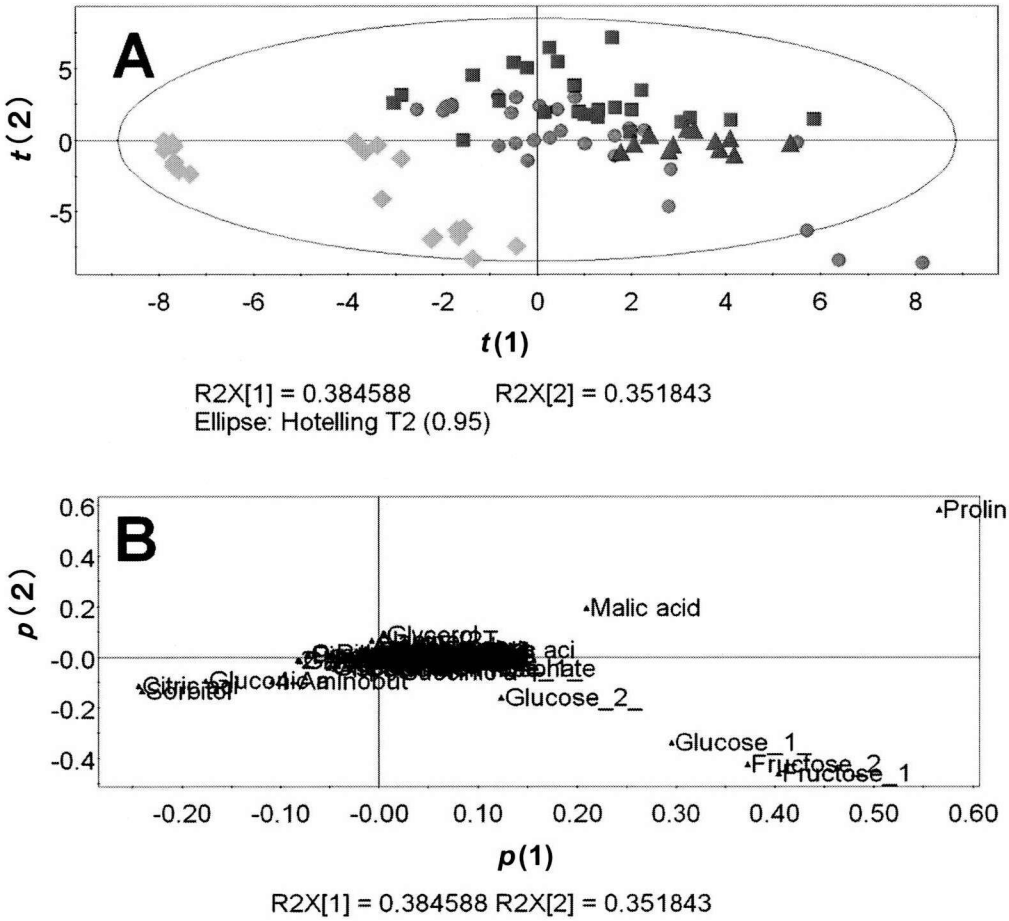


Figure 3-1. GC-MS 分析データの PCA : (A) スコアプロット, ● : 日本産大和当帰 (Group 1), ■ : 中国産大和当帰 (Group 2), ▲ : 北海当帰 (Group 3), ◆ : 唐当帰 (Group 4). (B) ローディングプロット

3-3-3. GC-MS 分析データの OPLS-DA

トウキの種と産地の判別成分の検討を行うために GC/MS プロファイリングデータを用いて Table 3-1 のグループ分けの OPLS-DA を行った．RAPD 法の報告[97,98]より，種の相同性の違いは，唐当帰と大和もしくは北海当帰間の違いが大和・北海当帰間の違いよりも大きく，大和当帰と北海当帰がより近縁種であることが分かっている．種の判別のために，まず唐当帰と大和・北海当帰を判別した．その後，大和当帰と北海当帰の判別を行った．見出した成分について，Table 3-1 の Group に基づいて二群比較を行った．Q^2 値>0.5 が良好なモデル，Q^2 値>0.9 が精度の特に良好なモデルという定義[55]により，本章では Q^2 値が 0.85 以上の精度の良いモデルを作成することができた (Table 3-3).

Table 3-3. OPLS-DA モデルの R^2 値と Q^2 値

Group	R^2	Q^2
4 vs 1, 2, 3	0.954	0.939
4 vs 1, 2	0.983	0.966
4 vs 3	0.983	0.979
3 vs 1, 2	0.930	0.876
1 vs 2	0.972	0.926

また，OPLS-DA モデルのバリデーションのために，PLS-DA モデルのバリデーションを行った．バリデーションは既報の辛当帰の手法に従った[68]．並べ替え検定において，全バリデーションモデルの R^2 値と Q^2 値が実モデルよりも低かったことから，実モデルの精度と適合性の良さを示した (Figure 3-2).

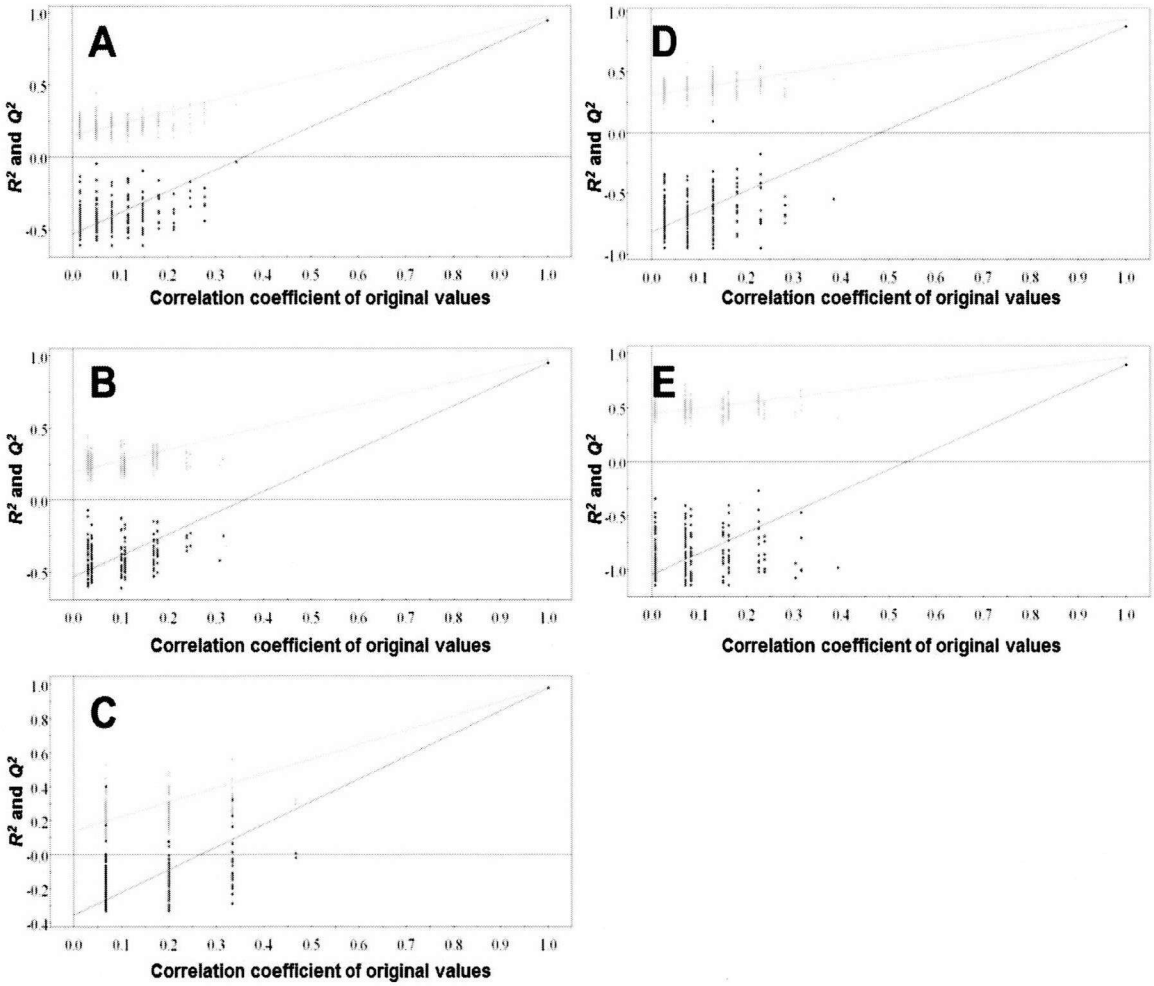


Figure 3-2. GC-MS データの PLS-DA モデルの並び替え検定の結果（並び替え 200 回）

:(A) 1, 2 vs 3, (B) 1 vs 2, 3, (C) 1 vs 2, (D) 1 vs 3, (E) 2 vs 3. ● : Q^2 値, ● : R^2 値とした.

さらにサンプルを，モデルを構築するためのトレーニングセットと，モデルに後から当てはめるテストセットに分けることで，バリデーションを行った．テストセットとして，それぞれの Group から 1 つか 2 つのサンプルをランダムに取り除いた．OPLS-DA モデルは 3 回構築を行った．その結果の R^2 値と Q^2 値を Table 3-4 に示した．すべてのモデルの R^2 値と Q^2 値が 0.85 を超える精度でモデルを構築することができた．

Table 3-4. 並び替え検定の R^2 値と Q^2 値

Group	n	R^2	Q^2
4 vs 3, 2, 1	1	0.974	0.964
	2	0.877	0.833
	3	0.984	0.972
4 vs 2, 1	1	0.986	0.976
	2	0.976	0.969
	3	0.981	0.974
4 vs 3	1	0.992	0.986
	2	0.995	0.990
	3	0.989	0.987
3 vs 2, 1	1	0.971	0.935
	2	0.986	0.917
	3	0.962	0.888
2 vs 1	1	0.977	0.932
	2	0.962	0.912
	3	0.970	0.923

クラス予測 Y 値のカットオフ値を 0.5 と設定したところ，Figure 3-3 に示すようにほとんどのサンプルにおいて適切なクラス分けが見られた．

以上，モデルの R^2 値と Q^2 値の評価，モデル内バリデーション（並べ替え検定），モデル外バリデーション（テストセットとトレーニングセット）を行った結果，得られたモデルは寄与成分を探索でき得る精度を持つと考えた．

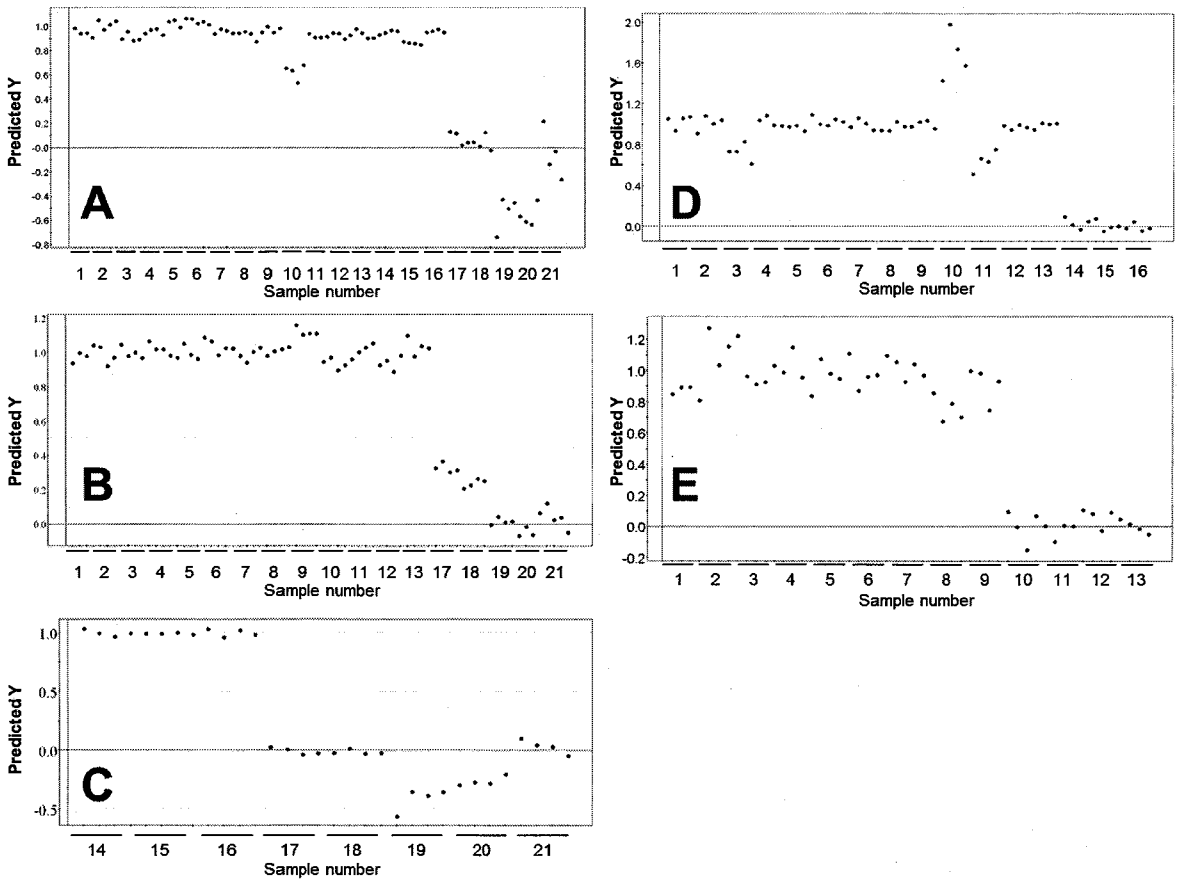


Figure 3-3. GC-MS データの PLS-DA モデルでのテストセットによるバリデーション

:(A) 4 vs 3, 2, 1, (B) 4 vs 2, 1, (C) 4 vs 3, (D) 3 vs 2, 1, (E) 2 vs 1

以上の精度のモデルについて S-plot による成分の選別を行った．成分を限定するために $|p(corr)| > 0.5$[69, 70] を閾値とした. 本研究では分散の大きなマーカーを絞り込むために $|p| > 0.2$ を閾値とした．その結果を Table 3-5 に示した.

Table 3-5. S-plot で選んだ成分

Group	Compound	p	p ($corr$)
4 vs 1, 2, 3	Proline	0.767	0.861
	Malic acid	0.247	0.565
	Citric acid	-0.278	-0.835
	Sorbitol	-0.320	-0.939
	Gluconic acid	-0.236	-0.883
4 vs 1, 2	Proline	0.764	0.842
	Malic acid	0.275	0.608
	Citric acid	-0.265	-0.793
	Sorbitol	-0.320	-0.912
	Gluconic acid	-0.238	-0.858
4 vs 3	Proline	0.713	0.978
	Malic acid	0.228	0.730
	Citric acid	-0.257	-0.831
	Glucose_1	0.244	0.589
	Sorbitol	-0.250	-0.833
3 vs 1, 2	4-Aminobutyric acid	-0.266	-0.639
	Citric acid	-0.222	-0.533
	Glucose_1	0.529	0.547
	Glucose_2	0.236	0.516
1 vs 2	Proline	0.655	0.564

※ $|p| > 0.2$, $|p(corr)| > 0.5$

寄与成分の中で Proline では他の成分に比べて $|p|$ や $|p(corr)|$ の大きさが際立っていた．見出した成分について，相対強度の最大値，最小値，標準偏差を Group ごとに示した (Table 3-6). さらに Group 間の相対強度の比較について *t*-test を行った．その結果，全ての選抜成分で対応する群間において有意差が見られた．

Table 3-6. GC-MS 分析の相対強度の最大値，最小値，標準偏差，それぞれの成分の *t*-test の *P* 値

Compound	Max	Min	SD	Max	Min	SD	*P*
4 vs 1, 2, 3	4			1, 2, 3			
Proline	7.35	0.75	2.18	30.27	30.27	8.75	1.45×10^{-31}
Malic acid	6.52	2.46	1.31	12.09	3.92	1.65	3.36×10^{-09}
Citric acid	6.10	2.14	1.13	2.71	0.68	0.49	5.29×10^{-08}
Sorbitol	4.29	1.40	1.07	0.34	0.05	0.05	2.49×10^{-09}
Gluconic acid	3.03	0.21	0.75	1.21	0.13	0.20	5.45×10^{-08}
4 vs 1, 2	4			1, 2			
Proline	7.35	0.75	2.18	30.27	8.75	5.24	1.19×10^{-27}
Malic acid	6.52	2.46	1.31	12.09	3.92	1.81	3.46×10^{-08}
Citric acid	6.10	2.14	1.13	2.71	0.68	0.46	1.37×10^{-07}
Sorbitol	4.29	1.40	1.07	0.34	0.05	0.05	2.54×10^{-09}
Gluconic acid	3.03	0.21	0.75	1.21	0.13	0.21	4.05×10^{-08}
4 vs 3	4			3			
Proline	7.35	0.75	2.18	30.27	8.75	4.89	1.52×10^{-18}
Malic acid	6.52	2.46	1.31	7.72	5.68	0.65	1.43×10^{-07}
Citric acid	6.10	2.14	1.13	1.16	0.97	0.06	2.09×10^{-09}
Glucose_1	8.50	1.08	2.92	8.22	6.31	0.55	5.31×10^{-05}
Sorbitol	4.29	1.40	1.07	0.34	0.05	0.06	2.28×10^{-09}
3 vs 1, 2	3			1, 2			
4-Aminobutyric acid	0.38	0.22	0.05	2.80	0.33	0.42	1.10×10^{-18}
Citric acid	1.16	0.97	0.06	2.71	0.68	0.46	3.00×10^{-14}
Glucose_1	8.22	6.31	0.55	11.56	1.28	2.50	2.57×10^{-13}
Glucose_2	1.66	1.24	0.13	2.74	0.23	0.57	7.85×10^{-12}
Glucose_1 /4-Aminobutyric acid	32.61	18.63	4.97	12.59	0.59	2.95	3.00×10^{-09}
1 vs 2	1			2			
Proline	25.25	10.01	3.73	30.27	8.75	5.06	1.86×10^{-05}

※ *P* value of *t*-test

以上のことから，S-plot で選抜した成分は判別マーカーとなりうることを示した．しかしながら，実用的な判別マーカーとして使用する場合，群間で相対強度の差があることが重要であると考えた．そこで群間の相対強度について箱ひげ図による図示を行った．まず，唐当帰とそれ以外のトウキの選抜成分の比較を，内標の Ribitol のピーク高さを 1 とした相対強度について箱ひげ図で Figure 3-4 に示した．

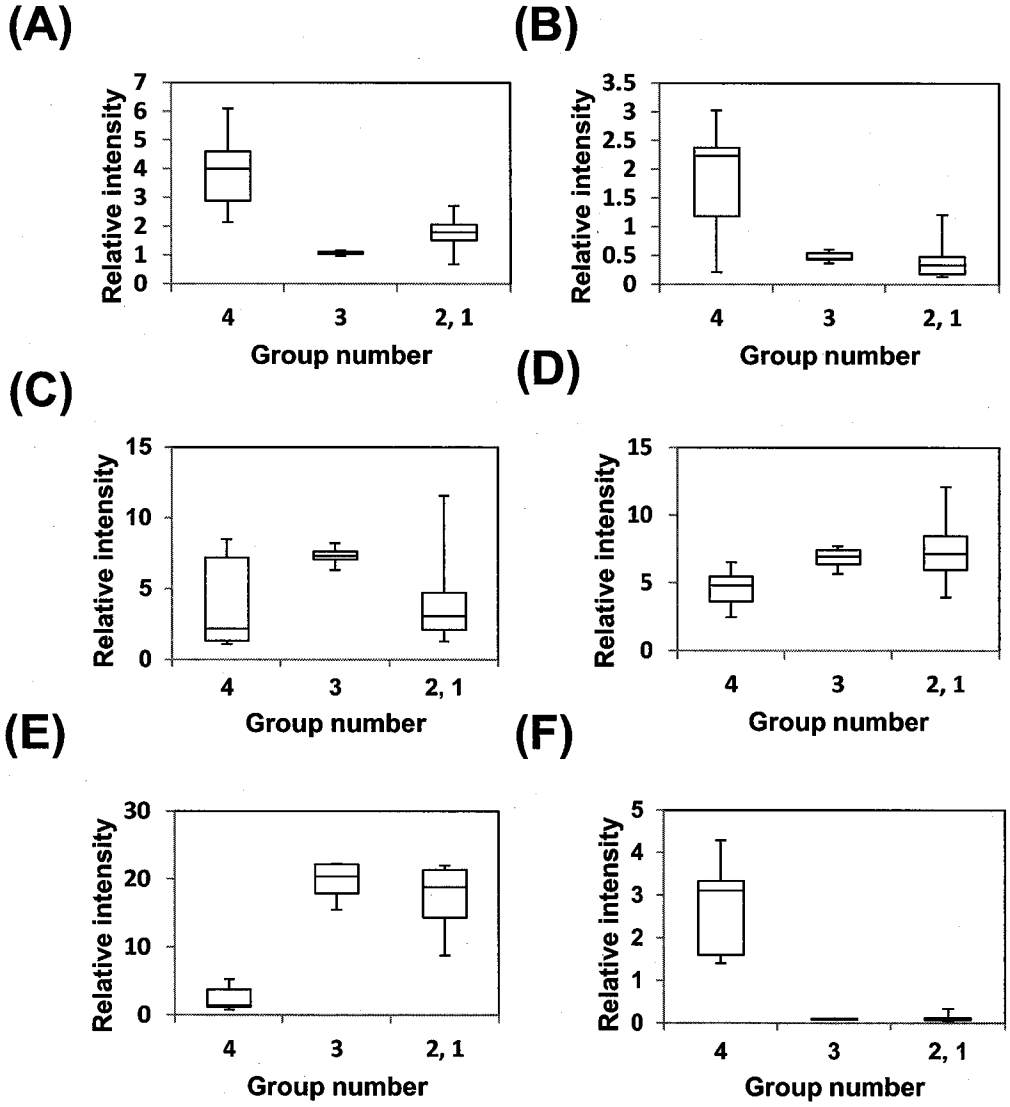


Figure 3-4. GC-MS 分析の相対強度を用いた Group 4，3，2，1 の箱ひげ図 :(A) Citric acid, (B) Glucronic acid, (C) Glucose, (D) Malic acid, (E) Proline, (F) Sorbitol

その結果，単一の成分で最も正確に判別が可能であったのは Sorbitol だった．この結果は Sorbitol の $|p(corr)|$ が他の成分より 1 に近いことと一致していた．さらに大和当帰と北海当帰の単一成分での判別の結果を Figure 3-5 C に示した．4-Aminobutyric acid と Glucose はそれぞれ群間の成分範囲が重なり，単一の成分だけでは大和当帰と北海当帰の判別が困難であると考えられた．そこで S-plot で正に位置した Glucose と負に位置した 4-Aminobutyric acid について，その相対強度の比を示した．Glucose と 4-Aminobutyric acid の相対強度の比をとると，箱ひげ図で Group 間の相対強度の重なりは Figure 3-5 C のように広がった．

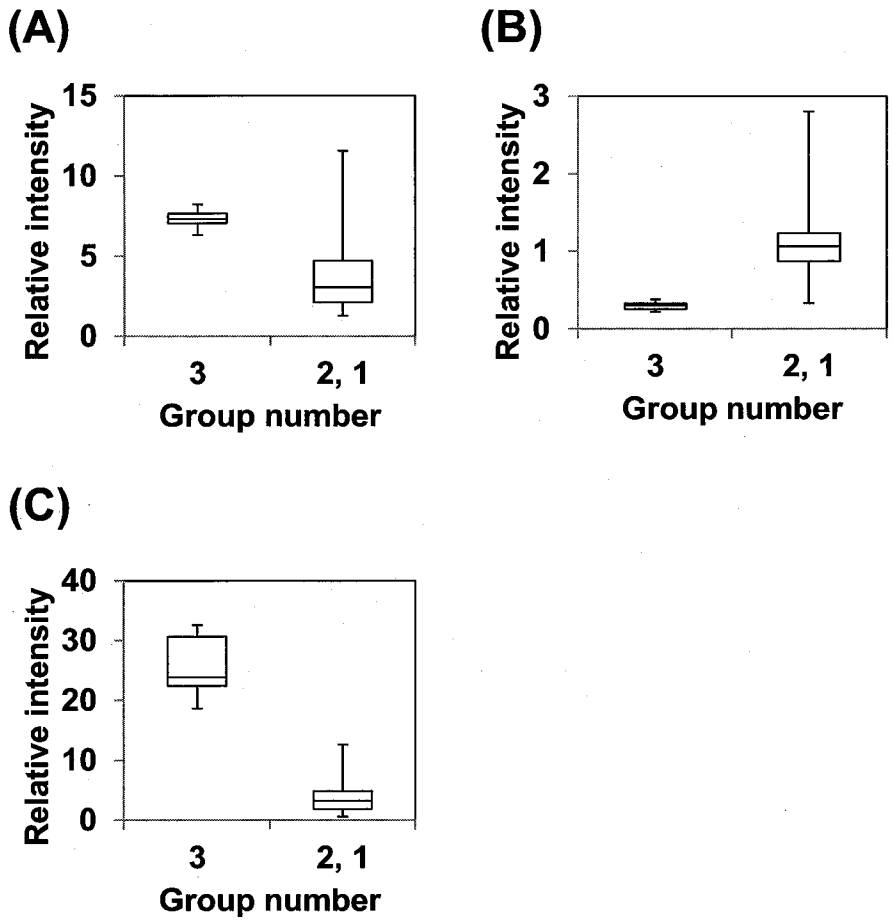


Figure 3-5. GC-MS 分析の相対強度を用いた Group 3 と Group 1，2 の箱ひげ図：(A) Glucose，(B) 4-Aminobutyric acid，(C) Glucose/4-Aminobutyric acid

トウキにおいて S-plot で選抜した正負の二成分の比をとることでより確実な判別が可能となった．さらに大和当帰の産地の判別については，マーカーによる群間の相対強度の差を広げるために，S-plot で選んだ二成分の組み合わせを検討した (Table 3-5)．しかしながら，どの場合においても，有意差はあったものの箱ひげ図で群間の相対強度範囲が重ならないように二成分で判別を行うことはできなかった．

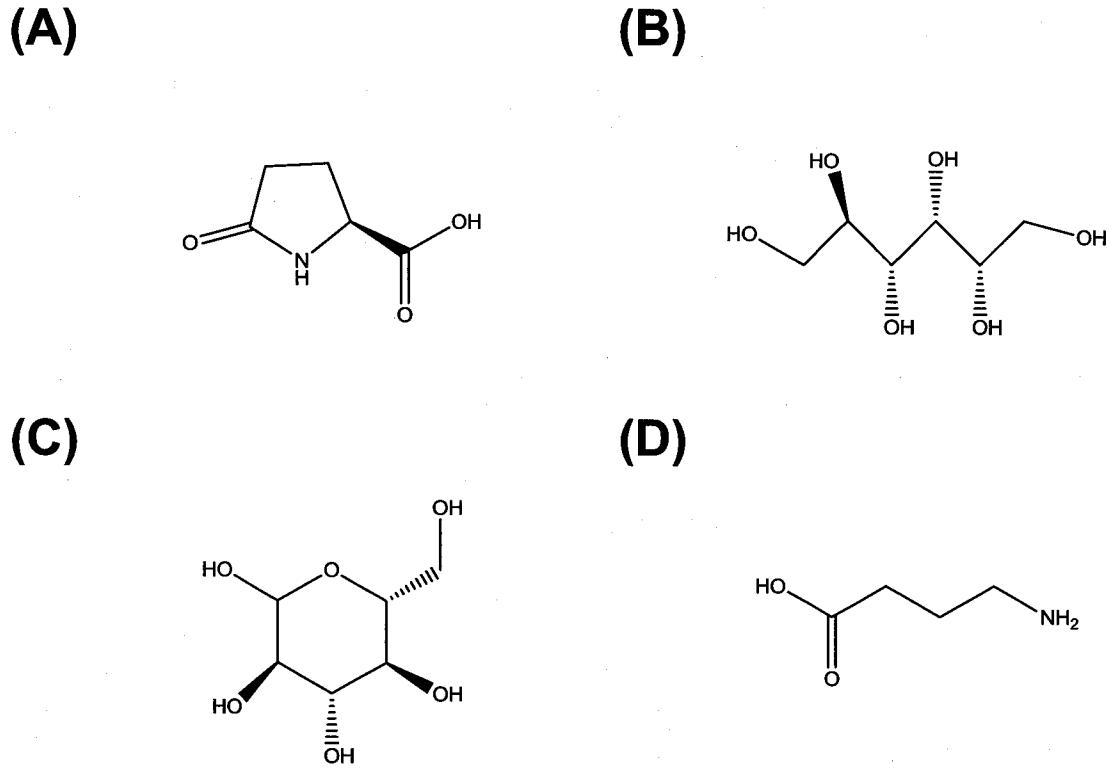


Figure 3-6. マーカー成分の化学構造 : (A) Pyroglutamic acid, (B) Sorbitol, (C) D-Glucose, (D) 4-Aminobutyric acid

トウキの判別マーカー成分の生合成経路と薬理作用について説明する．

まず，Pyroglutamic acid (Figure 3-6 (A)) についてである．Pyroglutamic acid は Glutamic acid, Proline の前駆体として知られている [99]．Pyroglutamic acid については化学合成の面から非対称合成の重要な成分として，1982 年から 20 年間，指数関数的に研究報告が増えてきた [100]. Pyroglutamic acid は哺乳動物の脳, 眼, 血漿, 脳髄液の中に存在する. また, Pyroglutamic

acid は甲状腺刺激ホルモン (TRH ; Thyrotropin-Releasing Hormone) のようなペプチドの末端成分でもあり，甲状腺ホルモンの代謝で重要な役割を果たす．中心神経系では Pyroglutamic acid の体系的な投与による高齢ラットの学習能力の向上が報告されている[101].

次に Sorbitol (Figure 3-6 (B)) についてである．Sorbitol のような還元糖のポリオールでは，高等植物における生合成後の全身への輸送方法は，Sucrose や他のヘキソースと比較して，ほとんど解明されていない[102]．しかしながら，Mannitol や Sorbitol は合成されてから Sucrose とほとんど同じように全身へ輸送されると考えられている．Sorbitol はリンゴや桃のようなバラ科の植物に共通して含まれていることが知られている．光合成によって生じた Glucose-6-phosphate が NADPH と反応して Sorbitol-6-phosphate と NADP が生じ，さらにリン酸基が脱離して Sorbitol が生じる[103]．Sorbitol は Xylitol と比較すると劣るものの，虫歯を防止する作用が知られている[104]．他に，Sorbitol の過剰摂取は下腹部痛や下痢を引き起こすことも知られている[105].

また，D-Glucose (Figure 3-6 (C)) は光合成によって植物が合成するエネルギー源である．糖のシグナルは劇的な過程であり，代謝フラックスや糖濃度は成長過程，日動変動，生物学的・非生物学的ストレスによっても変化する[106]．Glucose は人体内では脳と赤血球の主な栄養源である．肝臓と腎臓だけが循環系に Glucose を放出することができる．その肝臓と腎臓の関係は相互的であり，血糖値の恒常性を保つと考えられている[107].

最後に GABA ; 4-Aminobutyric acid (Figure 3-6 (D)) について述べる．(注 ：本段落のみ 4-Aminobutyric acid を GABA と表記する) 植物では GABA については，GABA shunt が知られているが，GABA shunt の機能的な役割はよく知られていない．細胞液で Glutamate から GABA と CO_2 が産生される．GABA はミトコンドリアへ輸送され，Succinic semialdehyde へと合成される．Succinic semialdehyde は Succinate か GABA に変換されて，TCA 回路と関わる GABA の回路が構成されている[108]．一般的に GABA は植物細胞では濃度が低いものの，熱や寒冷条件，機能的刺激や低酸素，植物刺激によって何倍にも濃度

が増えることが知られている[109]．生体内においては GABA は哺乳類の中央神経系の主要な抑制神経因子として知られている[110]．その一方，GABA は血液脳関門を通過しないことが報告されている[111]．近年，GABA は，ヒトの自律神経系に働いて，副交感神経を刺激してリラックス効果をもたらすことが報告されている．また，GABA を含むチョコレートがストレス状態から通常状態への復帰に役立つことも報告されている．このように GABA は心理的なストレスを減らす効果を持つ[112]．

以上，同定した GC/MS プロファイルから OPLS-DA の S-plot を用いて，種について Proline，Citric acid，Sorbitol，D-Glucose，4-Aminobutyric acid を，産地について Proline を判別マーカーとした．その結果，種と産地の各判別マーカー全てにおいて，群間の *t*-test では有意水準 1%以上での有意差を示した．さらに，種判別については S-plot より見出した単一成分や二成分によって判別が可能であった．以上の手法は生薬に限らず，品質評価や植物の変動要因を判別する時に有用であると考えられる．

3-4. 小括

同定した 76 成分の GC/MS プロファイリングよりトウキの種と産地の判別を目指した. GC/MS データの PCA ではスコアプロットで唐当帰と大和・北海当帰のクラスター分離が見られた. ローディングプロットより分離に寄与する成分が示唆された. さらに OPLS-DA によって種や産地の判別モデルを構築した. S-plot によって判別寄与成分を選抜した. それぞれの成分の相対強度について *t*-test で有意差を検定した. どの成分についても有意水準 1%で有意差が見られた. さらに単一成分での実践的な判別のために, 群間の成分範囲を箱ひげ図にて比較した. その結果, 唐当帰とその他のトウキは Sorbitol で判別が可能であった. さらに北海当帰と大和当帰については単一の成分での箱ひげ図における完全な判別は困難だった. そこで S-plot で正と負を示した二成分の相対強度の比をとることで二成分による完全な判別が可能であった. 将来的に, 今回選抜したマーカーによって種の判別を TLC や他の簡便な測定法に置換することができれば, 現在よりも迅速で手間の掛からない市場評価が可能となるだろう.

第四章　トウキの GC/MS マーカーの GC/FID への適用

4-1. 緒言

第三章において GC-MS 分析によるトウキの種と産地判別のための同時，かつ統計学的に有意差がある手法を確立した．さらに，再現性があり，簡便で，低コストな分析手法であれば，産業上の品質評価にすぐに応用できる．生薬の市場での品質評価において GC-MS よりも低コストで汎用的な機器として GC-FID が使用されている．それは，すでに生薬業界に限らず多くの分野の品質評価で GC-FID が導入されていること，JP16[8] にも記載があることから明白である．実際の薬局方中では GC-FID は残留溶媒試験法，異物としての農薬（BHC, DDT など）の純度試験，スコポラミン，D-カンフルなどの定量に用いられている．生薬においても農薬の純度試験は規定されており[8]，市場での生薬の品質評価で農薬試験が行われている．具体的なサンプル量と分析時間の面について，現在の JP16 での定量法と本研究での分析法を比較して述べる．JP16 では，定量試験として HPLC での定量が主流である．比較対象としてアロエのバルバロインの分析例を取り上げる．サンプル量には，アロエ 0.1 g を調製して，抽出には，標品の準備とともに 24 時間，分析サンプルの準備に必要である．また，保持時間が約 12 分ということで 1 分析に 30 分の分析時間があれば十分である．本研究ではサンプル量は 20 mg 必要であり，抽出・サンプル調製には同様に，24 時間あれば十分である．また，保持時間は Table 3-2 より 4-Aminobutyric acid (568.7 sec)，Glucose (727.7 sec)，Sorbitol (743.3 sec) と全て 15 分以内であり，1 分析に 30 分見れば十分である．以上のことから第三章での GC-MS によるマーカー成分の分析は JP16 の定量法と比較して量的・時間的に同等と考えられる．そのため，GC-FID でマーカー分析が可能であれば十分に実用的な方法であると考えた．本章では，第三章で見出したトウキの種判別

マーカーについて GC-FID による判別の再現実験を行うことを目的とした.

4-2. 実験方法

4-2-1. GC-FID 分析条件

GC-MS 分析の為に，1 μL のサンプル液を GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) に Agilent AOC-20s autosampler と AOC-20i autoinjector を用いて，スプリット比 1 : 25 で注入した. カラムは GC-MS 条件に準ずる. キャリアガスのヘリウムの流速は線速度 45 cm/s にて行った. インジェクション部，検出部の温度はそれぞれ，230°C，320°C に設定した. GC 昇温条件は 80°C で 2 分間の保持，その後 320°C まで 15°C/min の昇温，さらに 320°C で 6 分間の保持にて行った.

4-3. 結果と考察

GC-MS と GC-FID の分析結果の比較を行うためにクロマトグラムを示した (Figure 4-1, 4-2). GC-MS と GC-FID を比較して，類似したクロマトグラムを得ることができた.

GC-MS 分析での種判別マーカーの GC-FID 相対強度について， Figure 4-3 (箱ひげ図) と Table 4-1 に示した. GC-FID 分析データは GC-MS 分析データの結果と同様に，唐当帰と大和・北海当帰の判別で Sorbitol が, 大和当帰と北海当帰の判別で Glucose, 4-Aminobutyric acid が *t*-test において有意差を示した. しかしながら，箱ひげ図においては，Glucose と 4-Aminobutyric acid は単一成分では相対強度の重なりが生じた. さらに，二成分比 Glucose/4-Aminobutyric acid とすることで相対強度の重なりがなくなり，判別の差が拡大した (Figure 4-3).

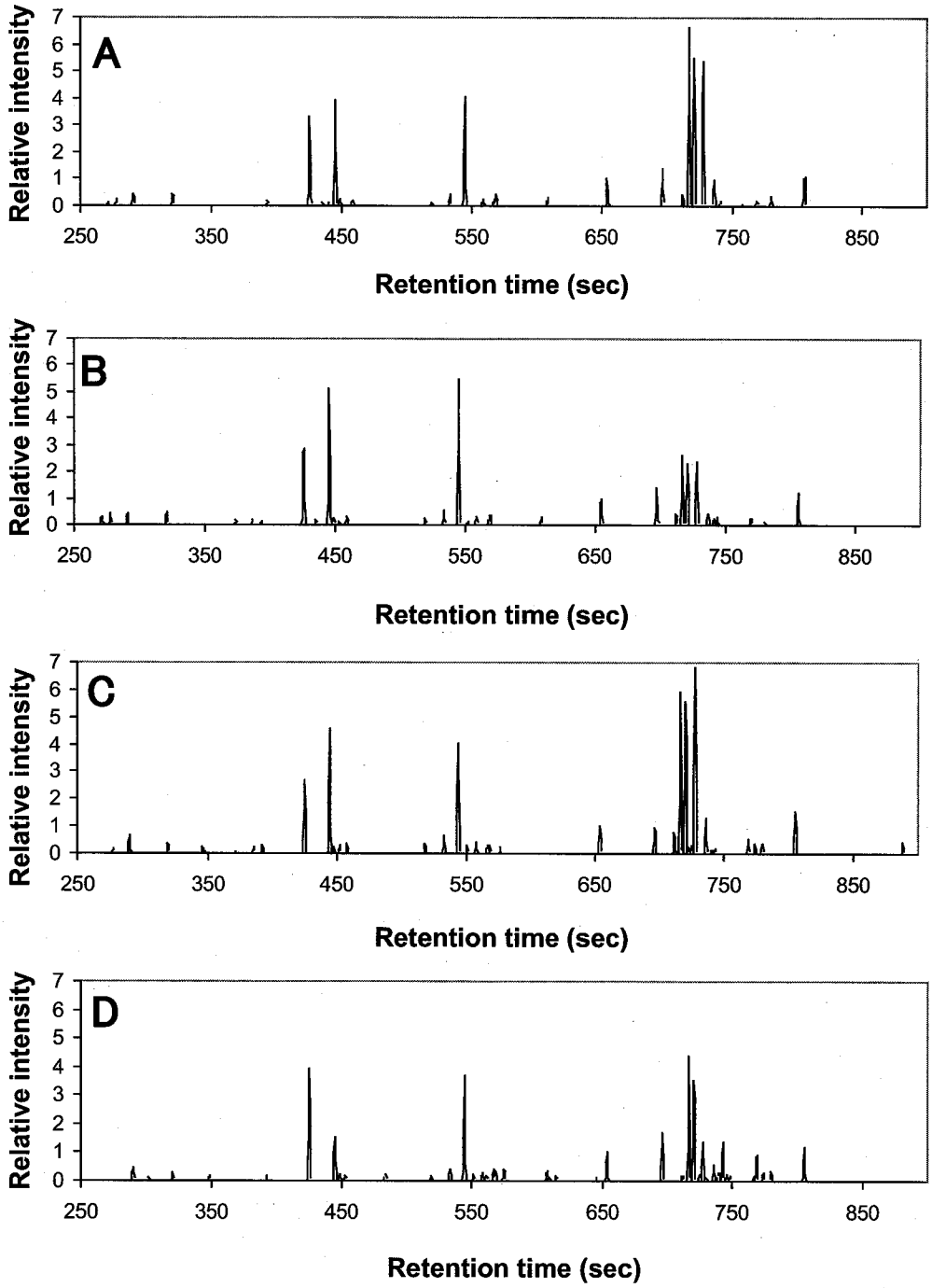


Figure 4-1. GC-MS 分析での代表的なクロマトグラム：(A) No.1 (日本産大和当帰), (B) No.8 (中国産大和当帰), (C) No.14 (北海当帰), (D) No.17 (唐当帰). 番号は Table 3-1 の Population number に従った.

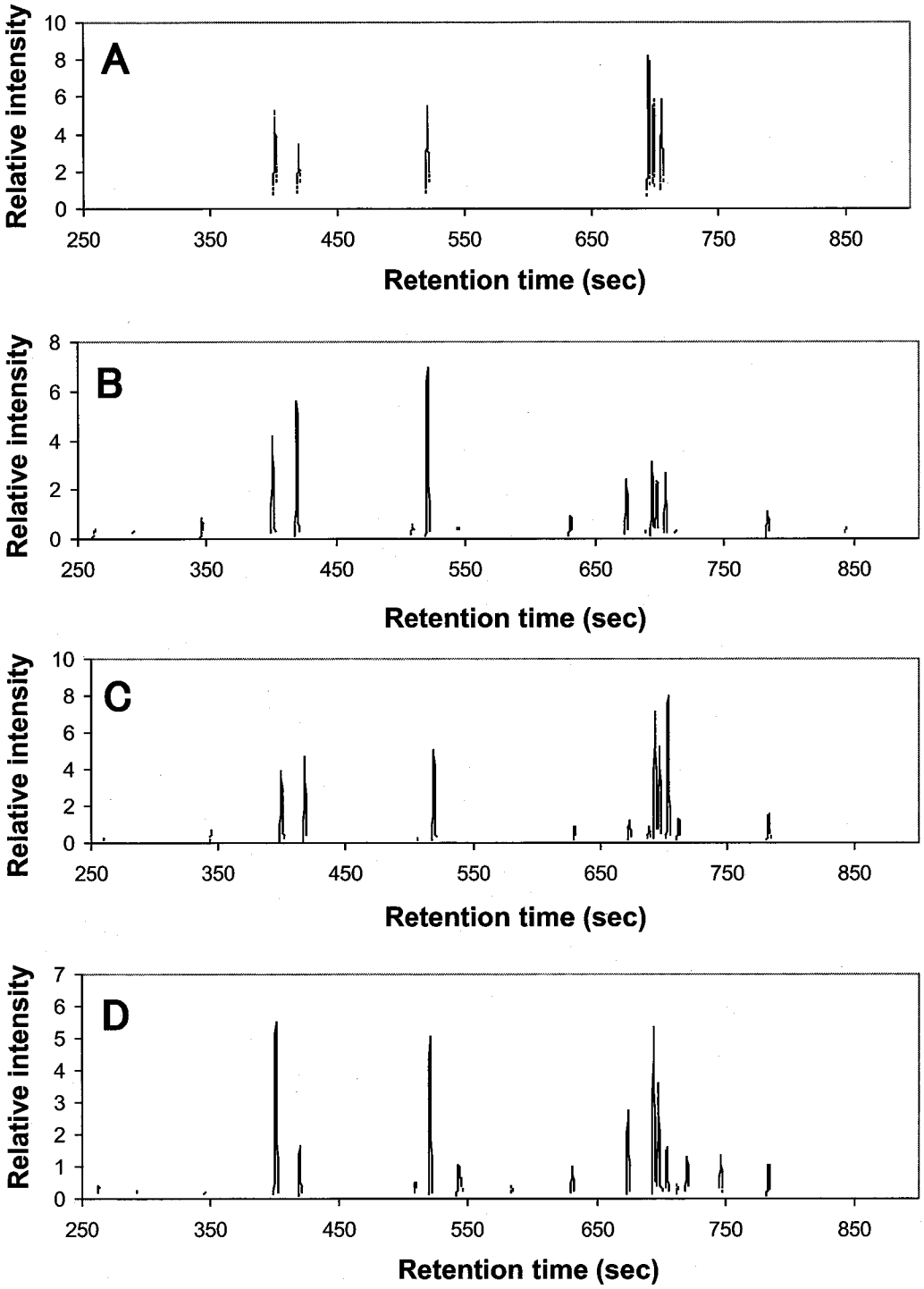


Figure 4-2. GC-FID 分析での代表的なクロマトグラム：(A) No.1 (日本産大和当帰), (B) No.8 (中国産大和当帰), (C) No.14 (北海当帰), (D) No.17 (唐当帰). 番号は Table 3-1 の Populaton number に従った.

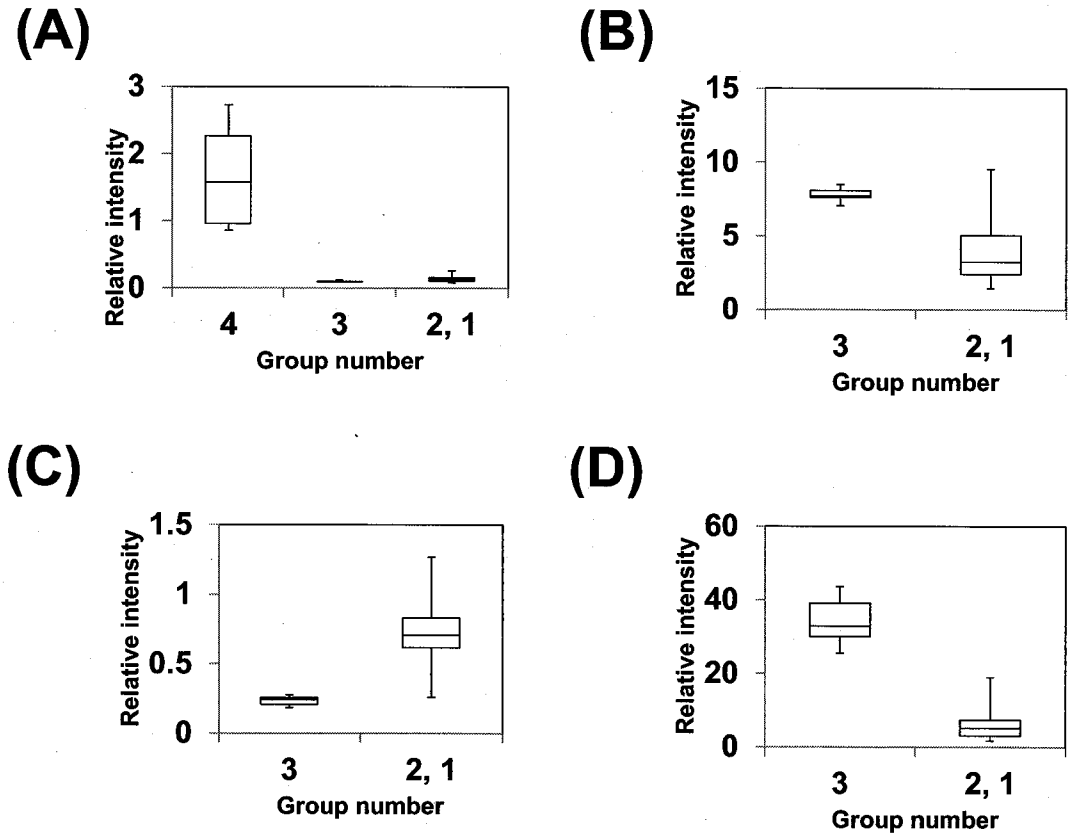


Figure 4-3. GC-MS 分析データより選抜した成分について，GC-FID の相対強度にて表した箱ひげ図（A）Sorbitol，（B）Glucose，（C）4-Aminobutyric acid，（D）Glucose/4-Aminobutyric acid

Table 4-1. GC-FID の相対強度の最大値, 最小値, 標準偏差, それぞれの成分の *t*-test の *P* 値

Compound	Max	Min	SD	Max	Min	SD	*P*
4 vs 1, 2, 3	4			1, 2, 3			
Sorbitol	2.73	0.86	0.71	0.26	0.08	0.04	9.46×10^{-07}
3 vs 1, 2	3			1, 2			
Glucose_1	8.48	7.05	0.42	9.55	1.44	1.95	1.99×10^{-15}
4-Aminobutyric acid	0.28	0.19	0.03	1.27	0.26	0.21	3.19×10^{-17}
Glucose_1/ 4-Aminobutyric acid	43.63	25.55	5.98	18.93	1.70	4.09	2.45×10^{-21}

4-4. 小括

以上，第三章と第四章をまとめる．第三章にて GC-MS 分析データよりトウキの種判別マーカーの探索を多変量解析で行った．*t*-test と箱ひげ図よりそのマーカーの有用性を示した．第四章にて GC-FID 分析でもトウキの種判別マーカーが *t*-test と箱ひげ図で有用であることを示した．以上のような GC-MS 分析でマーカーを探索する方法と GC-FID でのマーカー分析の再現法は，他の生薬・食品への応用も可能である．市場の品質評価において，本手法は，再現性のある機器を用いていること，HPLC のターゲット定量法のようにカラムや分析手法の変更を行う必要がなく利便性が高いこと，ルーチン分析には質量分析機が必要でなく低コストであることの 3 点を満たすことから有用であると考えられる．

第五章　総括

本研究では生薬の種と産地の判別マーカー成分を探索した．生薬の種と産地を評価する手法として，他の生薬でもメタボロミクス技術が用いられている．その中で，プロファイリング研究は多いが，バイオマーカーの精度を示している研究はまだ少ない．また，生薬では二次代謝物の研究が薬効に重点を置いて進められているために，一次代謝物を品質評価と関連付けている研究も少ない．それは生薬を「薬」としてとらえ，「食物，農作物」でもある点への品質評価の関心が低かったこと，技術的に網羅的な代謝物を評価することが難しかったことが原因であると考えられる．メタボロミクス技術は網羅的な代謝物評価に適した方法論であるといえるが，現場では使用が困難な場合も考えられる．以上のことの具体例として，二次代謝物分析とメタボロミクス技術を現場で用いる際の問題点について述べる．

生薬の二次代謝物の評価は特定の薬効でしか評価しえないし，その含量が微量であるため標品の入手が困難な場合がある．生薬の各条規格では，便宜上，その時点で市販されている，あるいは市販可能な試薬についての規格を試薬・試液の項で定め，その物質を分析用標品として，生薬の市場成分の定量法と定量規格を規定している．しかし，天然由来の有機化合物は化学合成が困難であり，多くの場合，天然素材より単離生成したものに試薬会社独自の方法により純度の値付けがなされ，市販試薬あるいは標準品として流通している．これらは，原料，抽出方法，単離精製工程の差異により，共存する不純物組成やロット間の絶対純度の変動が化学合成された化合物に比べて大きいと予想される．これが結果として科学的根拠に基づいた生薬類の規格設定のボトルネックになっている[113]．

一方，メタボロミクス技術を現場の品質評価にて行う問題点として，毎回，生データから複雑なデータ処理を行い，多変量解析の解釈を行うことが困難であることがあげられる．データ処理や多変量解析には膨大な時間，コスト，解析者の技量を必要とする．データ処理の過程においても，フィルタリングや閾値の設定の違いによって選抜成分が異なる可能

性がある．そのために，本研究のようにマーカー選抜のためには再現性のある明確な基準を設ける必要がある．

今回の研究では，一次代謝物よりトウキの種と産地のマーカーを評価できた．さらに，市場での品質評価のために汎用的な分析機器 GC-FID でのトウキの評価も達成した．以上のことから，本研究は特に市場での品質評価を確立するためのメタボロミクス応用研究として価値があると考えた．

本方法は非常に簡便であるが，生薬は天然物であるがゆえに成分変動が起こるため，単一の成分だけに着目することには危険性が伴う．少なくとも本実験のサンプル数において本方法は研究室規模では有用であった．しかし，本手法が流通過程での大量サンプルの評価にどの程度，有用であるかという点については，実際に市場での時間的，量的にスケールを増やした評価が求められる．緒言に示したように JP16[8] の定量法と比較して，時間的，サンプル量的には十分に対応可能であることを述べた．しかしながら，本研究の品質評価基準としての適用については，国際的な WHO などの機関や海外諸国との連携，国家レベルでの厚生労働省や国立医薬品食品衛生研究所，生薬企業の組織である日本漢方生薬製剤会，企業と研究機関，大学を含めた生薬学会などの協力が必要である．

マーカーの実用性について言えることとして，本研究では 5 年程度の採取年の幅があるサンプルにて統計的有意差のあるマーカーを決定することが可能であった．一方，薬局方は近年，5 年ごとに更新されている傾向がある．薬局方の公示では，第十四局が平成 13 年，第十五局が平成 18 年，第十六局が平成 23 年に公示された（厚生労働省ホームページ：http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/yakkyoku/ ）．そこで，産地や種の判別マーカーを決定後，薬局方の更新の際にマーカーの確認を行えば，5 年間ぐらいの時間差であればマーカーの変動をモニタリングできることが予測される．少なくとも，センキュウとトウキにおいては，栽培年数が一定であり，比較的，採取産地も安定しているために本方法が有効であった．一般的に，生薬の研究は生薬が天然物であり，生育環境，種，加工法，保存法

など，他のファクターによって多成分が変化するため，品質評価の適切な手法の確立が困難であるとされている．本方法のように再現性がよく，簡便な手法が確立できれば，今後，生薬の流通量が増加しても世界中で品質が保証された生薬の使用が期待できる．

謝辞

本研究を遂行するにあたり，研究室主宰として終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科・福崎英一郎教授に謹んで感謝の意を表します.

本論文作成にあたり有益なご指導，ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科・村中俊哉教授，大阪大学生物工学国際交流センター・藤山和仁教授に心から厚く感謝申し上げます.

本論文作成に際し，ご助言を賜りました大阪大学大学院工学研究科・馬場健史准教授に深く感謝申し上げます.

本論文作成に際し，最後まで懇切丁寧なアドバイスを賜りました小野比佐好助教に深く感謝申し上げます.

本研究に用いた生薬材料を提供して頂き，生薬についての知識をご指導頂きました株式会社栃本天海堂・姜東孝様，山本豊様に厚く御礼申し上げます.

本研究を行うに際し，多大なる協力を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻・高橋政友氏，長澤早紀氏，三村奈津紀氏，武野 Kanokwan 博士，吉田亮博士，Danang Waruyo 氏および生物資源工学領域の諸先輩方，学生諸氏，事務の方々に感謝の意を表します.

最後に，これまで常に支え続けてくれた家族，友人無くして本研究は成し得なかったことを付記致します.

引用文献

1. Robinson MM, Zhang X. The World medicines situation 2011-Traditional medicines : Global situation , issues and challenges. Geneva, Switzerland, World Health Organization. 2011.

2. World Health Organization. Report of the inter-regional workshop on intellectual property rights in the context of traditional medicine. Bangkok, Thailand, 2000 : 6-8.

3. World Health Organization. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, Switzerland, World Health Organization. 2003.

4. World Health Organization. WHO guidelines on good manufacturing practices (GMP) for herbal medicines. Geneva, Switzerland, World Health Organization. 2007.

5. Eisenberg DM, Harris ESJ, Littlefield BA, *et al.* Developing a library of authenticated Traditional Chinese Medicinal (TCM) plants for systematic biological evaluation - Rationale, methods and preliminary results from a Sino-American collaboration. *Fitoterapia.* 2011 ; 82 (1) : 17-33.

6. Nahin RL, Barnes PM, Stussman BJ, *et al.* Costs of complementary and alternative medicine (CAM) and frequency of visits to CAM practitioners: United States, 2007. *Natl Health Stat Report.* 2009 ; (18) : 1-14.

7. Japan KAMPO medicines manufacturers association committee on KAMPO medicines. Investigative reports for usage of raw material. 2011 ; 1-23. (In Japanese)

8. The Ministry Of Health Labour And Welfare Ministerial Notification. The Japanese pharmacopoeia sixteenth edition. 2011 ; (285) : 1 - 2190. (In Japanese)

9. Mandal S. Quality, safety, and efficacy of herbal products through regulatory harmonization. *Drug Inf J.* 2011 ; 45 (1) : 45-53.

10. Xue J, Liu D, Chen S, *et al.* Overview on external contamination sources in traditional Chinese medicines. *World Science and Technology.* 2008 ; 10 (1) : 91-96.

11. Dobos GJ, Tan L, Cohen MH, *et al.* Are national quality standards for traditional Chinese herbal medicine sufficient? : Current governmental regulations for traditional Chinese herbal medicine in certain Western countries and China as the Eastern origin country. *Complementary Thers Med.* 2005 ; 13 (3) : 183-190.

12. Fuyuno I. Will the sun set on Kampo? *Nature.* 2011 ; 480 : S96.

13. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine.* 2009 ; 16 (2-3) : 97-110.

14. Guo L, Cho SY, Kang SS, *et al.* Orthogonal array design for optimizing extraction efficiency of active constituents from Jakyak-Gamcho Decoction, the complex formula of herbal medicines, Paeoniae Radix and Glycyrrhizae Radix. *J Ethnopharmacol.* 2007 ; 113 (2) : 306-311.

15. Takayama K, Matsui E, Kobayashi T, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination and metabolic study of sennoside a in daiokanzoto by mouse intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull.* 2011 ; 59 (9) : 1106-1109.

16. Collins JM. Inter-species differences in drug properties. *Chem Biol Interact.* 2001 ; 134 (3) : 237-242.

17. Crow JM. Microbiome: That healthy gut feeling. *Nature.* 2011 ; 480 (7378) : S88-89

18. Jia J, Zhu F, Ma X, *et al.* Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 ; 8 (2) : 111-128.

19. Jiang M, Yang J, Zhang C, *et al.* Clinical studies with Traditional Chinese Medicine in the past decade and future research and development systematic reviews. *Planta Med.* 2010 ; 2048-2064.

20. Ross CF. Sensory science at the human–machine interface. *Trends in Food Science and Technology.* 2009 ; 20 (2) : 63-72.

21. Foster KD, Grigor JMV, Cheong JN, *et al.* The role of oral processing in dynamic sensory perception. *J Food Sci.* 2011 ; 76 (2) : R49-61.

22. Molares S, Ladio A. Chemosensory perception and medicinal plants for digestive ailments in a mapuche community in NW patagonia, argentina. *J Ethnopharmacol.* 2009 ; 123 (3) : 397-406.

23. Pieroni A, Torry B. Does the taste matter? Taste and medicinal perceptions associated with five selected herbal drugs among three ethnic groups in west Yorkshire, northern England. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2007 ; 3 (1) : 21.

24. Yokomi N, Ito M. Influence of composition upon the variety of tastes in Cinnamomi Cortex. *J Nat Med.* 2009 ; 63 (3) : 261-266.

25. Mikage M, Tanabe M, Shinmura H, *et al.* Evaluation of crude drug by means of odor sensor. *J Nat Med.* 2005 ; 59 (2) : 63-69.

26. Joshi K, Chavan P, Warude D, *et al.* Molecular markers in herbal drug technology. *Current Science.* 2004 ; 87 (2) : 159–165.

27. Lou S-K, Wong K-L, Li M, *et al.* An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database). *BMC Genomics.* 2010 ; 11 : 402.

28. Heubl G. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Med.* 2010 ; 76 (17) : 1963-1974.

29. Kiran U, Khan S, Mirza KJ, *et al.* SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia.* 2010 ; 81 (8) : 969-976.

30. Li S, Han Q, Qiao C, *et al.* Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chin Med.* 2008 ; 3 : 7.

31. Xie PS, Leung AY. Understanding the traditional aspect of Chinese medicine in order to achieve meaningful quality control of Chinese materia medica. *J Chromatogr A.* 2009 ; 1216 (11) : 1933-1940.

32. Dai H, Xiao C, Liu H, *et al.* Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabonomic variations for three phenotypic cultivars of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge. *J Proteome Res.* 2010 ; 9 (3) : 1565-1578.

33. Dong J, Ma X, Wei Q, *et al.* Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of Eucommia ulmoides. *Industrial Crops and Products.* 2011 ; 34 (3) : 1607-1614.

34. Shibata Y, Aoyagi M, Anetai M, *et al.* Preparation and chemical evaluation of *Cnidii Rhizoma* (Part Ⅲ) effect of blanching conditions on contents of ferulic acid and adenosine. *Rep Hokkaido Inst Pub Health.* 2002 ; 52 : 81-82. (In Japanese)

35. Fukuda K, Murata K, Matsuda H. History and The present of cultivation and production of Angelica Root, Yamato-Toki, in Japan. *Yakushigaku Zasshi*. 2009 ; 44 (1) : 10-17.

36. Carlqvist A. A natural treasury : Plants and animals in Izumo fudoki. *Japan Review*. 2007 ; 19 : 77-105.

37. Hikino H. Toki-kou (thinking for *Angelicae Radix*). *Yakugau Kenkyu*. 2001 ; 29 (11) : 43-62.

38. Tianniam S, Tarachiwin L, Bamba T, *et al*. Metabolic profiling of *Angelica acutiloba* roots utilizing gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for quality assessment based on cultivation area and cultivar via multivariate pattern recognition. *J Biosci Bioeng*. 2008 ; 105 (6) : 655–659.

39. Anetai M, Aoyagi M, Hayashi T, *et al*. Preparation and chemical evaluation of *Angelicae Radix* Produced in Hokkaido (Part Ⅲ). *Rep Hokkaido Inst Pub Health*. 2000 ; 50 : 6-10. (In Japanese)

40. Heinrich M. Ethnopharmacy and natural product research—Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. *Phytochemistry Letters*. 2008 ; 1 (1) : 1-5.

41. Li P, Qi LW, Liu EH, *et al*. Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2008 ; 27 (1) : 66-77.

42. Zhang A, Sun H, Wang Z, *et al*. Metabolomics: towards understanding traditional Chinese medicine. *Planta Med*. 2010 ;76 (17) : 2026-2035.

43. Wishart DS. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis*. 2011 ; 3 (15) : 1769.

44. Ryan D, Robards K. Metabolomics : The greatest omics of them all ? *Anal Chem*. 2006 ; 78 (23) : 7954-7958.

45. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics*. 2001 ; 2 (3) : 155-168.

46. Weckwerth W, Morgenthal K. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today*. 2005 ; 10 (22) : 1551–1558.

47. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev*. 2007 ; 26 (1) : 51-78.

48. Lommen A. MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal Chem*. 2009 ; 81 (8) : 3079-3086.

49. Katajamaa M, Miettinen J, Oresic M. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*. 2006 ; 22 (5) : 634-636.

50. Styczynski MP, Moxley JF, Tong LV, *et al*. Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and biomarker discovery. *Anal Chem*. 2007 ; 79 (3) : 966-973.

51. Luedemann A, Strassburg K, Erban A, *et al*. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*. 2008 ; 24 (5) : 732-737.

52. Tsugawa H, Tsujimoto Y, Arita M, *et al*. GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *BMC Bioinformatics*. 2011 ; 12 (1) : 131.

53. Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, *et al.* Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Anal Chem.* 2008 ; 80 (1) : 115-122.

54. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 2001 ; 58 (2) : 109-130.

55. Eriksson L, E Johansson, N Kettaneh-Wold, *et al. Multi- and Megavariate Data Analysis.* Umea, Sweden, Umetrics AB. 2006 ; 425.

56. Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, *et al.* OPLS discriminant analysis : combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemom.* 2006 ; 20 : 341-351.

57. Simpson Jr. RJ, Johnson TA, Amara IA. The box-plot: An exploratory analysis graph for biomedical publications. *Am Heart J.* 1988 ; 116 (6, Part 1) : 1663-1665.

58. Chervenak M. China : moving towards innovation in pharma. *Drug Discov Today.* 2005 ; 10 (17) : 1127-1130.

59. Zhu S, Fushimi H, Han G, *et al.* Molecular identification of "Chuanxiong" by nucleotide sequence and multiplex single base extension analysis on chloroplast trnK gene. *Biol Pharm Bull.* 2007 ; 30 (3) : 527–531.

60. Yip PY, Chau CF, Mak CY, *et al.* DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chin Med.* 2007 ; 2 : 9.

61. Sanchez JJ, Endicott P. Developing multiplexed SNP assays with special reference to degraded DNA templates. *Nat Protoc.* 2006 ; 1 (3) : 1370-1378.

62. Yi T, Leung K, Lu G, *et al.* Comparative analysis of Ligusticum chuanxiong and related umbelliferous medicinal plants by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Planta Med.* 2007 ; 73 (4) : 392.

63. Lu GH, Chan K, Liang YZ, *et al.* Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese Angelica from related umbelliferae herbs. *J Chromatogr A.* 2005 ; 1073 (1-2) : 383-392.

64. Jeong JB, Ju SY, Park JH, *et al.* Antioxidant activity in essential oils of *Cnidium officinale* makino and *Ligusticum chuanxiong* Hort and their inhibitory effects on DNA damage and apoptosis induced by ultraviolet B in mammalian cell. *Cancer Epidemiol.* 2009 ; 33 (1) : 41-46.

65. Shanghai Scientii and technical publishers. *Dictionar of Traditional Chinese Medicine.* Shogakukan (Tokyo, Japan). 1985 ; 1494.

66. Xu F, Zou L, Ong CN, *et al.* Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2010 ; 29 (3) : 269-280.

67. Rantalainen M, Cloarec O, Ebbels TM, *et al.* Piecewise multivariate modelling of sequential metabolic profiling data. *BMC Bioinformatics.* 2008 ; 9 : 105.

68. Kim EJ, Kwon J, Park SH, *et al.* Metabolite profiling of *Angelica gigas* from different geographical origins using 1H NMR and UPLC-MS analyses. *J Agric Food Chem.* 2011 ; 59 (16) : 8806-8815.

69. Sieber M, Hoffmann D, Adler M, *et al.* Comparative analysis of novel noninvasive renal biomarkers and metabonomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity. *Toxicol Sci.* 2009 ; 109 (2) : 336-349.

70. Llorach R, Garrido I, Urpi-Sarda M, *et al.* Metabolomics study of human urinary metabolome modifications after intake of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) Skin Polyphenols research articles. *J Proteome Res.* 2010 ; 9 (11) : 5859-5867.

71. Ruan YL, Jin Y, Yang YJ, *et al.* Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Mol Plant.* 2010 ; 3 (6) : 942-955.

72. Dolan LC, Potter SM, Burdock GA. Evidence-based review on the effect of normal dietary consumption of fructose on blood lipids and body weight of overweight and obese individuals. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010 ; 50 (10) : 889-918.

73. Latulippe ME, Skoog SM. Fructose malabsorption and intolerance: effects of fructose with and without simultaneous glucose ingestion. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011 ; 51 (7) : 583-592.

74. Füzfai Z, Boldizsár I, Molnár-Perl I. Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl–oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008 ; 1177 (1) : 183-189.

75. Bacon JS, Dickinson B. The origin of melezitose: a biochemical relationship between the lime tree (*Tilia* spp.) and an aphis (*Eucallipterus tiliae* L.). *Biocheml J.* 1957 ; 66 (2) : 289-97.

76. Tinti JM, Nofre C. Responses of the ant Lasius niger to various compounds perceived as sweet in humans: a structure-activity relationship study. *Chem Senses.* 2001 ; 26 (3) : 231-7.

77. Srůtková D, Spanova A, Spano M, *et al.* Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *J Microbiol Methods.* 2011 ; 87 (1) : 10-16.

78. Loewus FA, Murthy PPN. *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*. 2000 ; 150 (1) : 1-19.

79. Iuorno MJ, Jakubowicz DJ, Baillargeon JP, *et al*. Effects of D-*chiro*-inositol in lean women with the polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract*. 2002 ; 8 (6) : 417-423

80. Benjamin J, Levine J, Fux M. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of inositol treatment for panic disorder. *Am J Psychiatry*. 1995 ; 152 (7) : 1084-1086.

81. Fux M, Levine J, Aviv A, *et al*. Inositol treatment of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*. 1996 ; 153 (9) : 1219-1221.

82. Barco A, Benetti S, Risi CD, *et al*. D- (−)-Quinic acid: a chiron store for natural product synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1997 ; 8 (21) : 3515-3545.

83. Ganem B. From glucose to aromatics: recent developments in natural products of the shikimic acid pathway. *Tetrahedron*. 1978 ; 34 (23) : 3353-3383.

84. Besset CJ, Lonnecker AT, Streff JM, *et al*. Polycarbonates from the polyhydroxy natural product quinic acid. *Biomacromolecules*. 2011 ; 12 (7) : 2512-2517.

85. Tarachiwin L, Katoh A, Ute K, *et al*. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by 1H NMR-based metabolic fingerprinting. *J Pharm Biomed Anal*. 2008 ; 48 (1) : 42-48.

86. Katoh A, Ninomiya Y. Relationship between content of pharmacological components and grade of Japanese *Angelica radixes*. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 130 (1) : 35-42.

87. Zhao KJ, Dong TT, Tu PF, *et al*. Molecular Genetic and Chemical Assessment of Radix *Angelica* (Danggui) in China. *J Agric Food Chem*. 2003 ; 51 (9) : 2576-2583.

88. Hosokawa K, Hishida A, Nakamura I, *et al.* The sequences of the spacer region between the atpF and atpA genes in the plastid genome allows discrimination among three varieties of medicinal Angelica. *Planta Med.* 2006 ; 72 (6) : 570-571.

89. Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, *et al.* Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding.* 1997 ; 3 : 381-390.

90. Piao XL, Park JH, Cui J, *et al.* Development of gas chromatographic/mass spectrometry-pattern recognition method for the quality control of Korean Angelica. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 ; 44 (5) : 1163-1167.

91. Yi T, Leung KS, Lu GH, *et al.* Comparative analysis of Ligusticum chuanxiong and related umbelliferous medicinal plants by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Planta Med.* 2007 ; 73 : 392-398.

92. Cho SK, Abd El-Aty AM, Choi JH, *et al.* Optimized conditions for the extraction of secondary volatile metabolites in Angelica roots by accelerated solvent extraction. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 ; 44 (5) : 1154-1158.

93. Tianniam S, Bamba T, Fukusaki E. Non-targeted metabolite fingerprinting of oriental folk medicine Angelica acutiloba roots by ultra performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2009 ; 32 (13) : 2233-2244.

94. Tianniam S, Bamba T, Fukusaki E. Pyrolysis GC-MS-based metabolite fingerprinting for quality evaluation of commercial Angelica acutiloba roots. *J. Biosci. Bioeng.* 2010 ; 109 (1) : 89-93.

95. Lin H, Zhuang Q, Fu H. Habitat niche-fitness and radix yield prediction models for *Angelica sinensis* cultivated in the Alpine area of the southeastern region of Gansu province, China (crop physiology and ecology). *Plant Production Science*. 2008 ; 11 (1) : 42-58.

96. Verbruggen N, Hermans C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*. 2008 ; 35 (4) : 753-759.

97. Watanabe A, Araki S, Kobari S, *et al*. In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants. *Plant Cell Rep*. 1998 ; 18 (3) : 187–192.

98. Murata J, Oki H, Kakutani K, *et al*. Identification of DNA polymorphisms in *Angelica acutiloba*. *Plant Biotechnology*. 2008 ; 25 (2) : 157–163.

99. Merewitz EB, Du H, Yu W, *et al*. Elevated cytokinin content in ipt transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. *J Exp Bot*. 2012 ; 63 (3) : 1315-28.

100. Panday SK, Prasad J, Dikshit DK. Pyroglutamic acid: a unique chiral synthon. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2009 ; 20 (14) : 1581-1632.

101. Oono S, Kurimoto T, Nakazawa T, *et al*. Pyroglutamic acid promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Curr Eye Res*. 2009 ; 34 (7) : 598-605.

102. Noiraud N, Maurousset L, Lemoine R. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001 ; 39 (9) : 717-728.

103. Loescher WH. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol. Plantarum.* 1987 ; 70 : 553-557.

104. Milgrom P, Ly KA, Tut OK, *et al.* Xylitol pediatric topical oral syrup to prevent dental caries. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009 ; 163 (7) : 601-607.

105. Islam MS, Sakaguchi E. Sorbitol-based osmotic diarrhea: possible causes and mechanism of prevention investigated in rats. *World J Gastroenterol.* 2006 ; 12 (47) : 7635-7641.

106. Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mecanism. *Annu Rv Plant Biol.* 2006 ; 57 : 675-09

107. Mitrakou A. Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 ; 93, Supplement 1 (0) : S66-S72.

108. Fait A, Fromm H, Walter D, *et al.* Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci.* 2008 ; 13 (1) : 14-19.

109. Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 1999 ; 4 (11) : 446-452.

110. Chebib M, Johnston GA. The 'ABC ' of GABA receptors : a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999 ; 26 : 937-940.

111. Kuriyama K, Sze PY. Blood-brain barrier to H3-γ-aminobutyric acid in normal and amino oxyacetic acid-treated animals. *Neuropharmacology.* 1971 ; 10 (1) : 103-108.

112. Yoto A, Murao S, Motoki M, *et al.* Oral intake of γ-aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental tasks. *Amino Acids.* 2011.

113. Sugimoto N. How to determine the absolute purities of target organic compounds-development of quantitative NMR (qNMR). *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2011 ; 137 : 232-236.

発表論文

本学位論文に関与する論文

1) **Shizu Kobayashi,** Saki Nagasawa, Yutaka Yamamoto, Kang Donghyo, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki. Metabolic profiling and identification of the genetic varieties and agricultural origin of *Cnidium officinale* and *Ligusticum chuanxiong*. *J Biosci Bioeng.* in press.

2) **Shizu Kobayashi,** Sastia Prama Putri, Yutaka Yamamoto, Kang Donghyo, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki. GC-MS based metabolic profiling for the identification of discrimination markers of *Angelicae Radix* and its application to GC-FID system. *J Biosci Bioeng.* in press.

その他の論文

1) Takahashi K, Azuma Y, **Kobayashi S,** Azuma J, Takahashi K, Schaffer S, Hattori M, Namaba T, Tool from traditional medicines is useful for health-medication: Bezoar Bovis and taurine. *Adv Exp Med Biol.* 2009 ; 643 : 95-103

Appendix-1.　GACP と GMP

*1 : WHO guidelines on GACP (good agricultural and collection practices) for medicinal plants (WHO guidelines on GACP for medicinal plants. Geneva, Switzerland, World Health Organization. 2003)

WHO の GACP は 105 カ国を超える国から，専門家と国際的な権威の協力を得て編成された薬用植物の採取と栽培に関する技術的ガイドラインである．以下にその説明を引用する．

「品質管理は薬用植物製品に安全性と効能について直接的な影響を与える．品質評価において GACP は最初の第一歩に過ぎない．更にこの品質評価は安全性と効能と共に，薬用植物の天然資源としての安定使用にも重要な役割を果たす．今までに，EU と中国や日本のような一部の国のみが薬用植物の GACP において地域的，国際的なガイドラインを確立してきた.」と GACP については述べられている．国際的な生薬の品質評価における日本の評価体制は重要であると考えられている．

*2 : WHO guidelines on GMP (good manufacturing practices) for herbal medicines (World Health Organization. WHO guidelines on GMP for herbal medicines. Geneva, Switzerland, World Health Organization. 2007)

上記の WHO の GMP では，生薬の GMP について「最終薬草製品，特に薬草の混合製品のための品質評価法は化学薬品よりも複雑である．最終薬草製品は生薬の品質にも影響を受ける．そこで，薬草製品を含む薬物の品質を確認するために品質評価が製造過程において重要な過程である． GMP は品質評価において最も大事なツールである」と述べられている．

また参考の為に， GMP について厚生労働省の文書 (http://kensaku.mhlw.go.jp/search?q=cache:vM9RFUgf6DEJ:www.mhlw.go.jp/shingi/2009/03/dl/s

0330-12c_0113.pdf+GMP%81%40&client=mhlw_frontend_J&proxystylesheet=mhlw_frontend_J&output=xml_no_dtd&ie=Shift_JIS&site=mhlw_collection&access=p&oe=UTF-8) より日本での GMP 確立の経緯を抜粋する.

「現在，日本では医薬品製造業者に対し GMP (Good Manufacturing Practice) を遵守することが求められている．これは原材料の入庫から，製品の製造・加工，出荷に至るまでのすべての過程で，製品が適切かつ安全に作られ，一定の品質が保証されるように，事業者が遵守する必要のある基準のことである．GMP は 1962 (S 87) 年にアメリカが「連邦食品・医薬品・化粧品法」内に「薬品の製造規範 (GMP) に関する事項」として制定したのが始まりである．その後，WHO (世界保健機関) がアメリカの GMP を基に WHO-GMP を作成し，1969 (S 44) 年に加盟国に対して医薬品貿易において GMP に基づく証明制度を採用・実施するよう勧告した．日本はこの勧告を受け，1976 (S 51) 年より「医薬品の製造および品質管理に関する基準」に基づく行政指導を開始し，その後，1980 (S 55) 年に厚生省令として公布，1994 (H 6) 年には省令改正により医薬品製造の許可要件となり，さらに 2005 (H 17) 年には製造販売の承認要件となった.」

Appendix-2.　OPLS-DA の原理

OPLS-DA について，一般的な実験科学での使用法について述べたあと，行列式からその原理の詳細について述べる．

一般的に，ケモメトリクスのツールとして PCA，PLS，OPLS が重要である．そのような多変量解析の手法は複雑な化学的，生物学的データをモデル化・分析・解釈に効果的で堅牢な手法である．PCA モデルの結果は，データ中の傾向，判別，経時変化を見るのに用いられる．例えば，本研究での二次元クラスターではセンキュウやトウキの産地，種に由来する種類別の視覚化が可能であった．しかし，時に科学での論点とは無関係な機器由来のドリフトや，人為的な実験上のずれが PCA モデルの寄与に大きく影響することがある．このような場合，PLS，OPLS のように，研究対象に焦点の合った情報が得られる手法が必要である．PLS，OPLS という回帰の手法によって，対象の構成情報である X 行列と，外部のサンプル情報のデータテーブルである Y 行列の情報をモデル化できる（ Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, *et al*. *Anal Chem*. 2008;80 (1):115-122.).

次に，PLS，OPLS という順番で原理を説明していく．OPLS-DA は PLS から派生した多変量回帰モデルであり，PLS と比べてクラス分けが第一潜在変数に見られるように回転して軸が構成されている．まず PLS は X 行列と Y 行列からいくつかの潜在変数を使って回帰を行うモデルである．以下に PLS の潜在変数，計算式の詳細を述べる（ Johan Trygg and Svante Wold *J. Chemometrics* 2002; 16 119-128).

$$w = X^{\mathrm{T}} y / (y^{\mathrm{T}} y) \qquad [1]$$

$$w = w / \| w \| \qquad [2]$$

$$t = X w \qquad [3]$$

$$c = Y^{\mathrm{T}} t / (t^{\mathrm{T}} t) \qquad [4]$$

$$p = X^{\mathrm{T}} t / (t^{\mathrm{T}} t) \qquad [5]$$

$E = X - t p^{T}$ [6]

$F = Y - t c$ [7]

w ：重みベクトル

c ：Y 行列のローディングベクトル

p ：ローディングベクトル

t ：スコアベクトル

E ：X 行列の残渣

F ：Y 行列の残渣

以上の式で PLS は構成される．しかしながら，PLS は Y 行列に無相関な X 行列の値も含めてモデルを構成しているために，オーバーフィッティングをする可能性が高くなる．そこで X 行列から Y 行列に無相関な X 行列をモデル構築の際に取り除くモデルが OPLS である．OPLS と PLS との違いを表す式を以下に示す（Wiklund S, Johansson E, Sjostrom L, *et al. Anal Chem.* 2008;80 (1):115-122.）.

$w_o = p - w / \| p - w \|$ [7]

$t_o = X w_o$ [8]

$p_o = X^{T} t_o / (t_o^{T} t_o)$ [9]

$X_{new} = X - t_o p_o$ [10]

Return to step 1 and use $X = X_{new}$

w_o ：Y 行列と直行して（Orthogonal）無相関な X 行列の重みベクトル

t_o ：Y 行列と無相関な X 行列のスコアベクトル

p_o　　: Y 行列と無相関な X 行列のローディングベクトル

以上の式より OPLS では PLS と比較して Y 行列と無相関な (直行している) X 行列を除いたモデルを構成していることが，特に [10] 式よりわかる．また，式を構成する潜在変数である，スコアベクトルやローディングベクトルを用いて，スコアプロット，ローディングプロット，S-plot などが表される．一般的に，以上のようなプロットはモデルでの寄与成分の探索に用いられる．2-2-5 の [1] 式に OPLS の構成式を表した．OPLS モデルは Y 行列に相関がある部分とそうでない部分を含む．それ故に，OPLS モデルから要因への寄与成分を探すことも，無相関の新しい要因でのサンプル分離の評価とその寄与成分を検討することも可能である．本研究では，種と産地について余分な情報を取り除いて寄与の大きい成分のみを抽出するために，OPLS-DA を用いた．

Appendix-3.　トウキの追加サンプルの検定結果

A-3-1.　緒言

バリデーションの一環として，本研究で用いた大和当帰と北海当帰のサンプルのマーカーの結果を用いて，追加サンプルの，中国から日本へ輸入された薬用当帰との比較を行った．この薬用当帰には日本で薬用として認可されている大和当帰と北海当帰が含まれている可能性がある．実際の市場での使用方法の参考のために，マーカー使用の一例として示す．

A-3-2.　実験方法

A-3-2-1.　サンプル

全てのトウキサンプルは栃本天海堂（ Osaka, Japan ）より入手した．また，大和当帰 13 種類（ 7 種類日本産，6 種類は中国市場品 ），北海当帰 3 種類については第三章と同じサンプルを用いた（ Table A-3-1 ）．さらに，大和当帰と北海当帰の両方を含む可能性がある中国より輸入された薬用当帰（ No. 22-29 の 8 種類) を追加サンプルとした．

Table A-3-1. 本研究で使用したトウキサンプル

Population number	Group number	Collection year	Cultivation region	Species
1	1	2008	Nara, Japan	*A. acutiloba*
2	1	2008	Nara, Japan	*A. acutiloba*
3	1	2008	Nara, Japan	*A. acutiloba*
4	1	2007	Nara, Japan	*A. acutiloba*
5	1	2006	Nara, Japan	*A. acutiloba*
6	1	2005	Nara, Japan	*A. acutiloba*
7	1	2007	Tokushima, Japan	*A. acutiloba*
8	2	2008	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
9	2	2007	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
10	2	2005	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
11	2	2004	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
12	2	2004	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
13	2	2004	Zhejiang, China	*A. acutiloba*
14	3	2007	Hokkaido, Japan	*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
15	3	2007	Hokkaido, Japan	*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
16	3	2006	Hokkaido, Japan	*A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
22	5	2008	Sichuan, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
23	5	2008	Sichuan, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
24	5	2008	Sichuan, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
25	5	2008	Sichuan, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
26	5	2008	Sichuan, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
27	5	2008	Zhejiang, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
28	5	2008	Zhejiang, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino
29	5	2008	Shaanxi, China	*A. acutiloba* and *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino

A-3-2-2. 試薬

3-2-2 に準ずる.

A-3-2-3. サンプル調製

3-2-3 に準ずる.

A-3-2-4. GC-MS 分析条件

3-2-4 に準ずる.

A-3-3. 結果と考察

三章で大和当帰と北海当帰のマーカーとして見出した Glucose/4-Aminobutyric acid の比について箱ひげ図を示した (Figure A-3-1). 箱ひげ図より中国からの輸入品 (Group 5) が, 北海当帰 (Group 3) よりも, 大和当帰 (Group 1, 2) に近い相対強度範囲を示した. さらに *t*-test の結果についても示した (Table A-3-2).

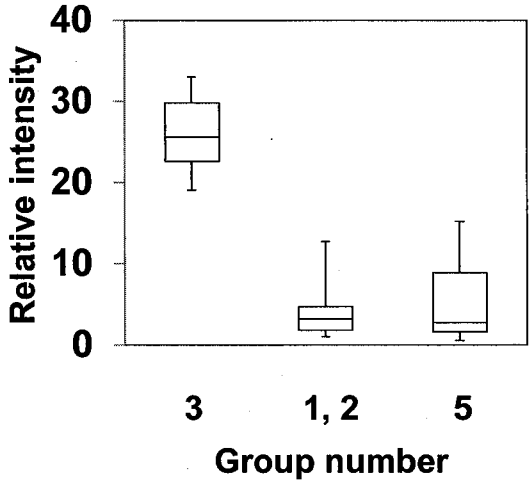


Figure A-3-1. GC-MS 分析の相対強度を用いた Group 5, 3, 2, 1 の箱ひげ図 : Glucose/4-Aminobutyric acid

Table A-3-2. GC-MS 分析の相対強度の最大値，最小値，標準偏差，それぞれの成分の *t*-test の *P* 値

Compound	Group	Max	Min	SD	Group	Max	Min	SD	*P*
Glucose/4-Aminobutyric acid	3	32.98	19.03	4.92	1, 2, 5	15.19	0.54	3.88	2.06×10^{-23}
Glucose/4-Aminobutyric acid	3	32.98	19.03	4.92	5	15.19	0.54	5.01	1.01×10^{-11}

Table A-3-2 より，*t-test* では北海当帰（Group 3）と大和当帰と中国輸入品（Group 1，2，5）の比較，北海当帰（Group 3）と中国輸入品（Group 5）の比較のどちらの *P* 値も 10^{-10} 以下の非常に小さい値を示した．よって中国輸入品（Group 5）は本研究で見出したマーカーにおいては北海当帰よりも大和当帰に近いことを示した．本博士論文の成果について，以上のような使用方法を市場で提案できると考えている．

Appendix-4.　本論文で登場した成分の構造式

・第一章より Table 1-4 (JP16 記載生薬で定量マーカーを持つ生薬) の成分とその構造式

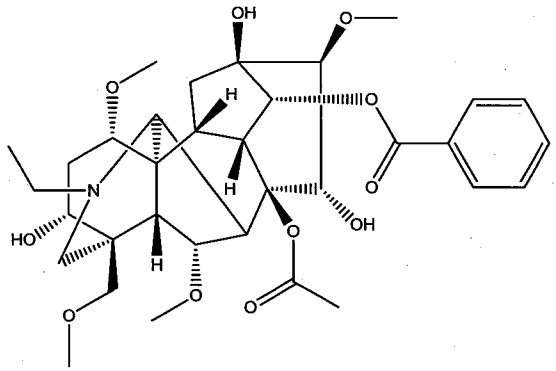
No.	定量マーカー	English
1	**アルカロイド**	**Alkaloids**
1_1	アコニチン	Aconitine
1_2	セファエリン	Cephaeline
1_3	エメチン	Emetine
1_4	エフェドリン	Ephedrine
1_5	ヒルスチン	Hirsutine
1_6	ヒヨスチアミン	Hyoscyamine
1_7	ヒバコニチン	Hypaconitine
1_8	ジエサコニチン	Jesaconitine
1_9	メサコニチン	Mesaconitine
1_10	ブソイドエフェドリン	Pseudoephedrine
1_11	リンコフィリン	Rhynchophylline
1_12	スコポラミン	Scopolamine
2	アミグダリン	Amygdalin
3	アルブチン	Arbutin
4	バイカリン	Baicalin
5	バルバロイン	Barbaloin
6	ベルベリン	Berberine
7	**ブフォステロイド**	**Bufosteroid**
7_1	ブファリン	Bufalin
7_2	シノブファギン	Cinobufagin
7_3	レジフォゲニン	Resibufogenin
8	**カプサイシン**	**Capsaicins**
8_1	カプサイシン	Capsaicin
8_2	ジヒドロカプサイシン	Dihydrocapsaicin

第一章より Table 1-4 の成分の続き

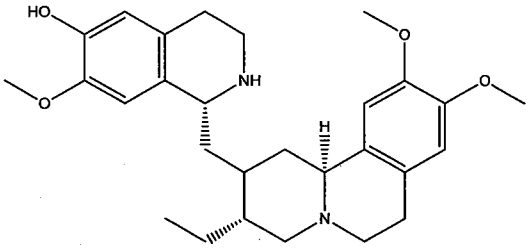
No.	定量マーカー	English
9	**クルクミノイド**	**Curcuminoids**
9_1	ビスデメトキシクルクミン	Bisdemethoxycurcumin
9_2	クルクミン	Curcumin
9_3	デメトキシクルクミン	Demethoxycurcumin
10	デヒドロコリダリン	Dehydrocorydaline
11	ゲニポシド	Geniposide
12	**ジンセノサイド**	**Ginsenoisides**
12_1	ジンセノサイド Rb1	Ginsenoiside Rb1
12_2	ジンセノサイド Rg1	Ginsenoiside Rg1
13	グリチルリチン酸	Glycyrrhizinate
14	ヘスペリジン	Hesperidin
15	ヒヨスチアミン	Hyoscyamine
16	ロガニン	Loganin
17	マグノロール	Magnolol
18	ペオニフロリン	Paeoniflorin
19	ペオノール	Paeonol
20	ペリルアルデヒド	Perillaldehyde
21	プエラリン	Puerarin
22	**サポニン**	**Saponins**
22_1	サイコサポニン A	Saikosaponin A
22_2	サイコサポニン B2	Saikosaponin B2
22_3	サイコサポニン D	Saikosaponin D
23	**センノシド**	**Sennosides**
23_1	センノシド A	Sennoside A
23_2	センノシド B	Sennoside B
24	ストリキニーネ	Strychnine
25	スウェルチアマリン	Swertiamarin

No.1 アルカロイド

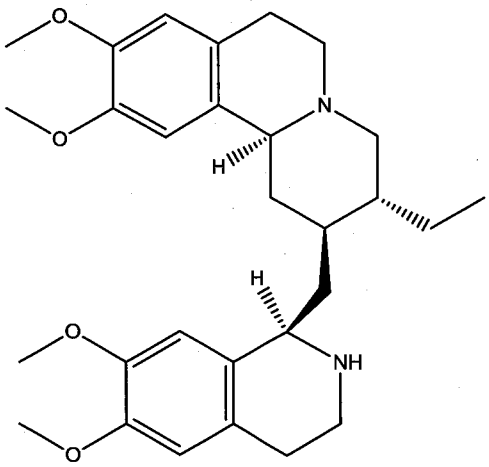
1_1　　アコニチン



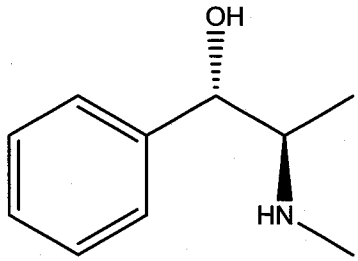
1_2　　セファエリン



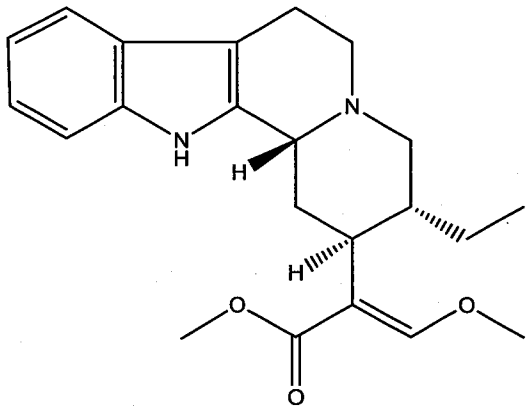
1_3　　エメチン



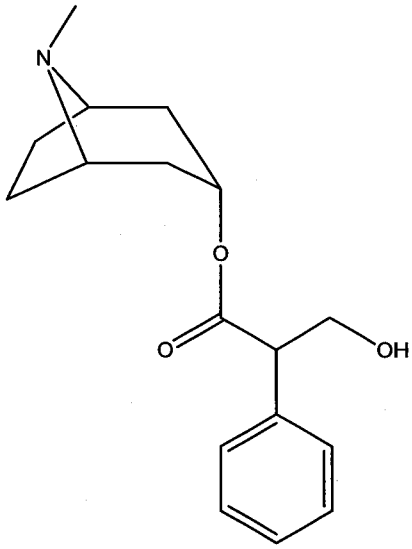
1_4　　エフェドリン



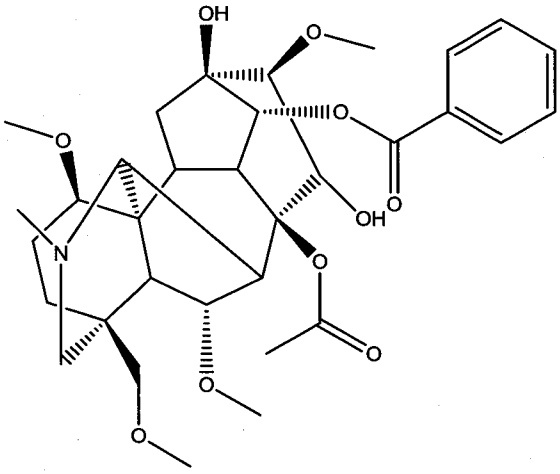
1_5　　ヒルスチン



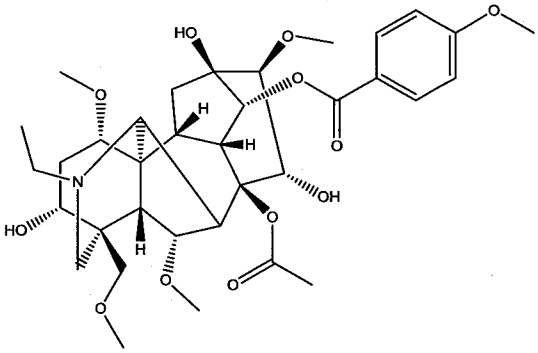
1_6　　ヒヨスチアミン



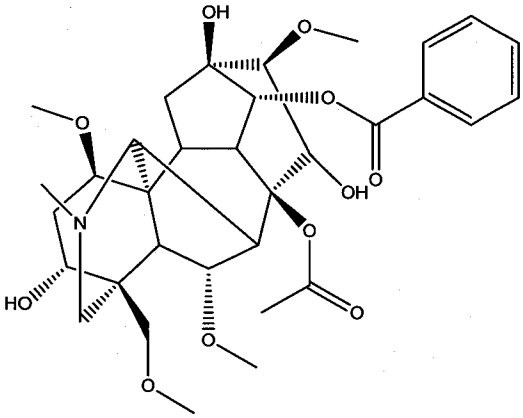
1_7　　ヒバコニチン



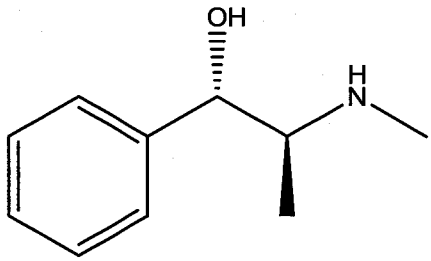
1_8　　ジエサコニチン



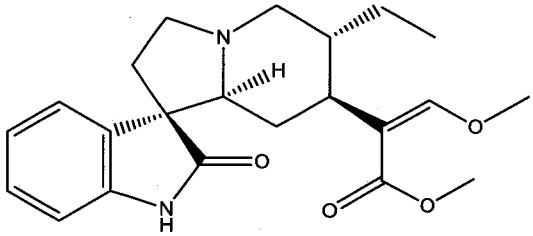
1_9　　メサコニチン



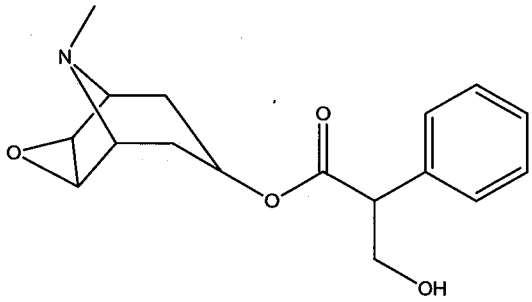
1_10　　ブソイドエフェドリン



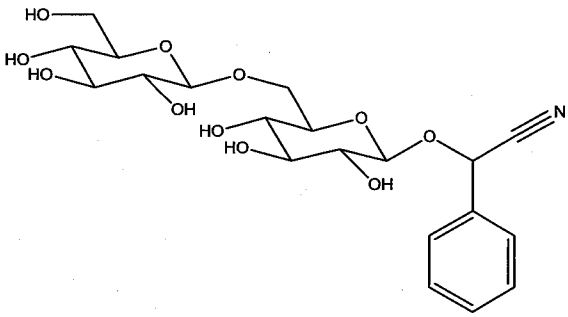
1_11　　リンコフィリン



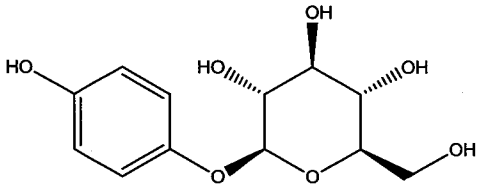
1_12　　スコポラミン



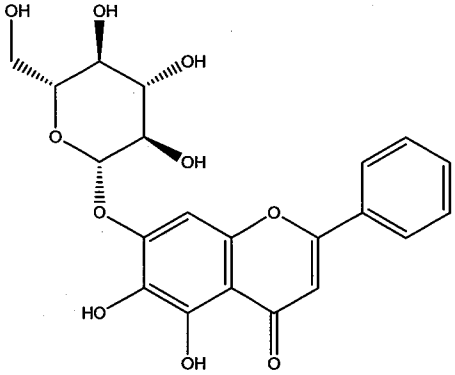
No. 2 アミグダリン



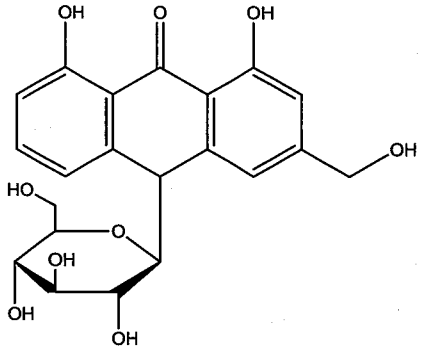
No. 3 アルブチン



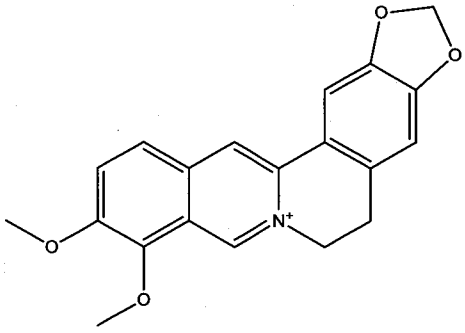
No. 4 バイカリン



No. 5 バルバロイン

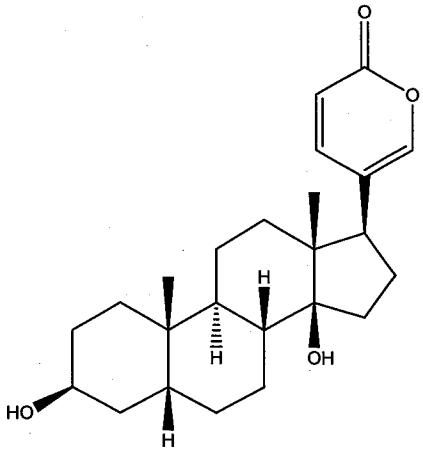


No. 6 ベルベリン

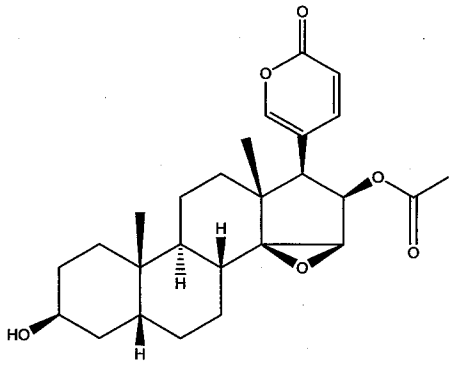


No.7 ブフォステロイド

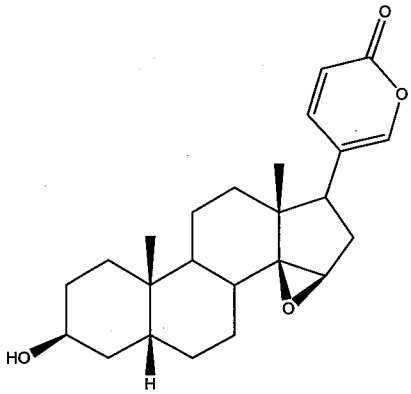
7_1　　ブファリン



7_2　　シノブファギン

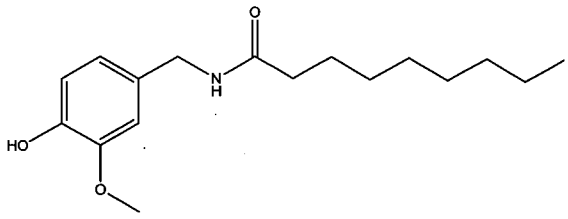


7_3　　レジフォゲニン

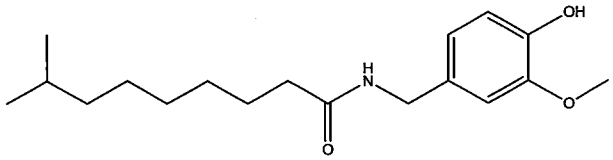


No. 8 カプサイシン

8_1　　カプサイシン

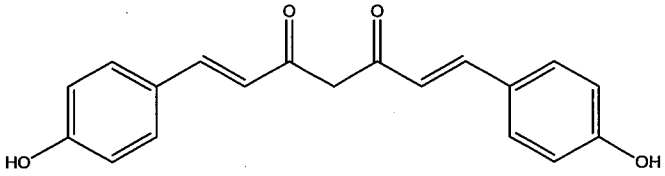


8_2　　ジヒドロカプサイシン

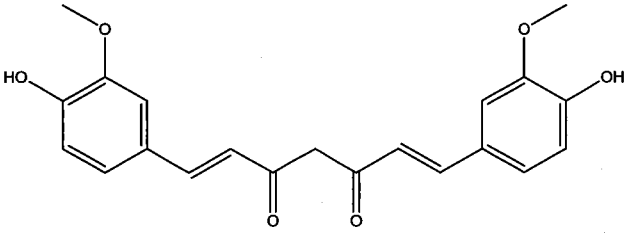


No. 9 クルクミノイド

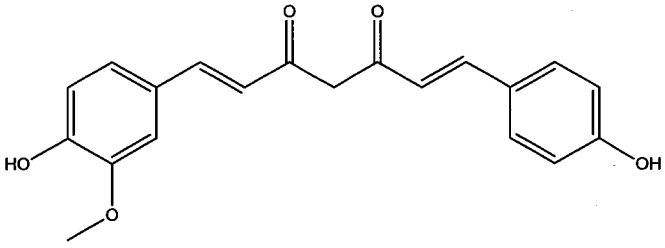
9_1　　ビスデメトキシクルクミン



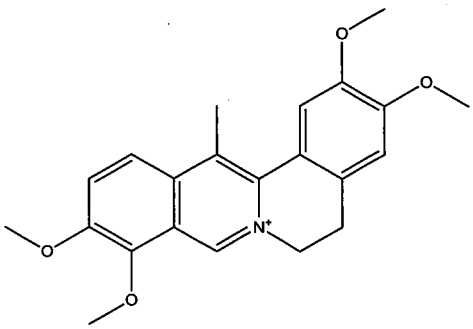
9_2　　クルクミン



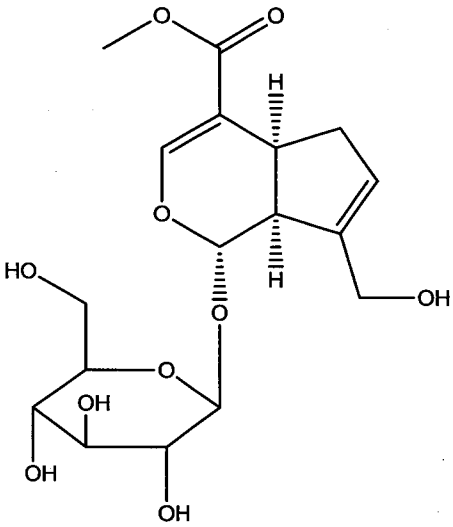
9_3　　デメトキシクルクミン



No. 10 デヒドロコリダリン

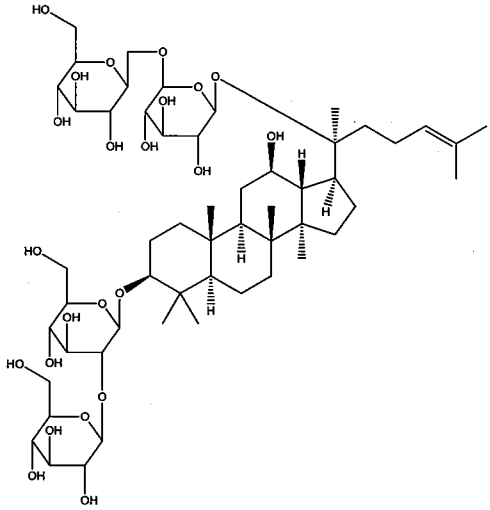


No. 11 ゲニポシド

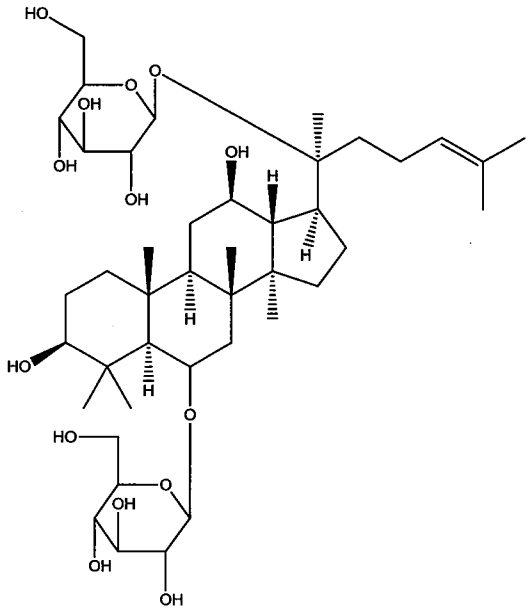


No. 12 ジンセノサイド

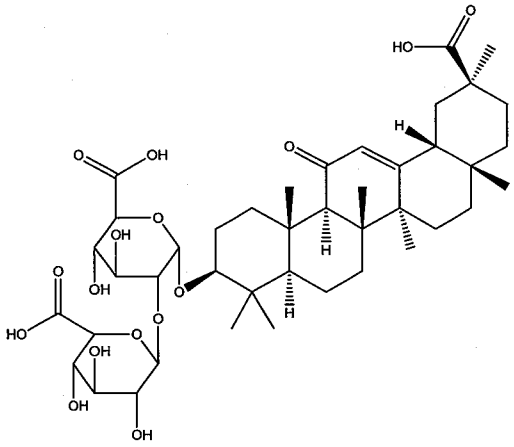
12_1　　ジンセノサイド Rb1



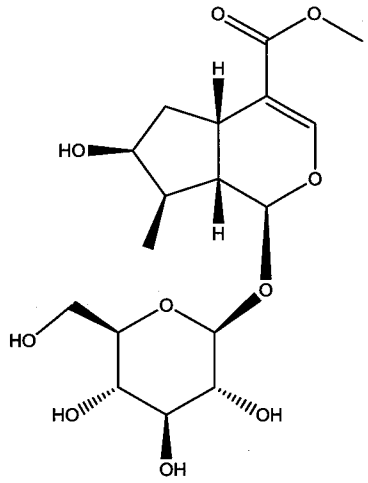
12_2　　ジンセノサイド Rg1



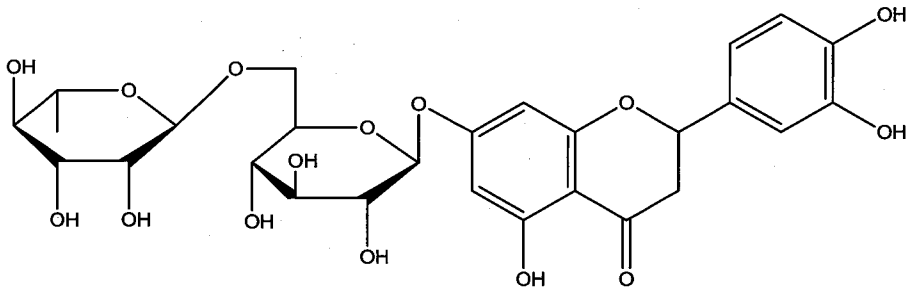
No. 13 グリチルリチン酸



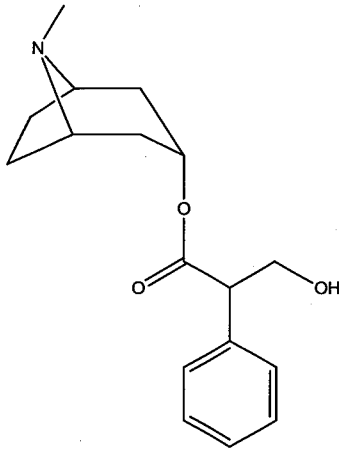
No. 16 ロガニン



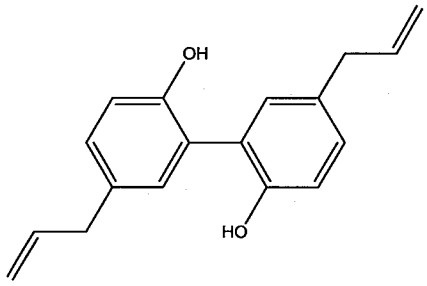
No. 14 ヘスペリジン



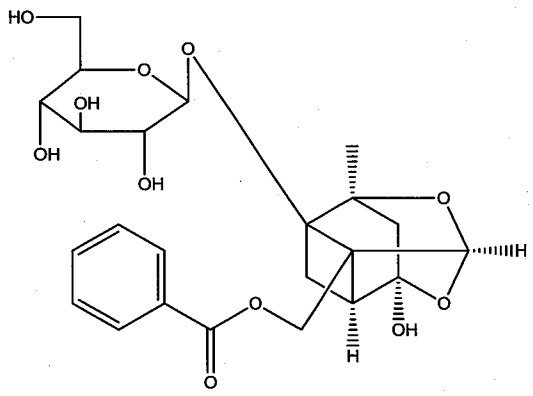
No. 15 ヒヨスチアミン



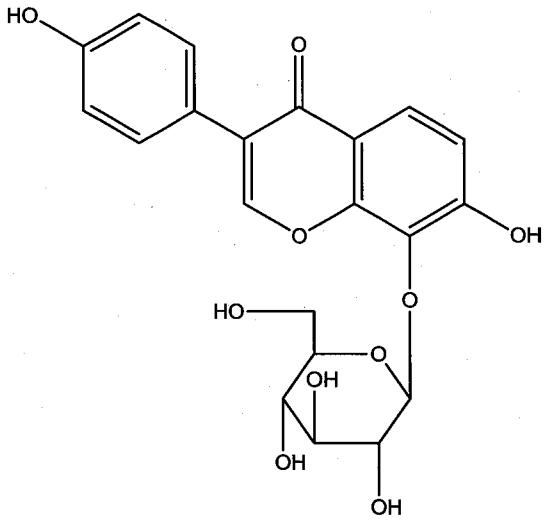
No. 17 マグノロール



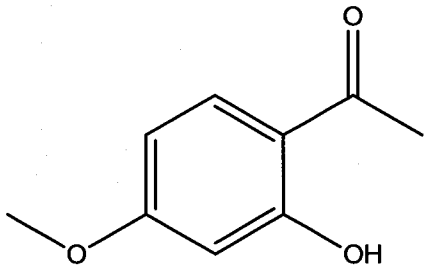
No. 18 ペオニフロリン



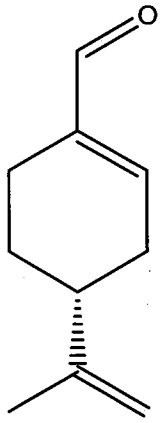
No. 21 プエラリン



No. 19 ペオノール

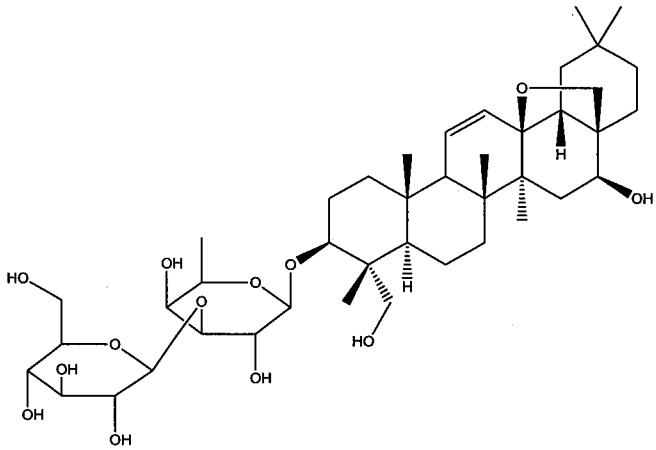


No. 20 ペリルアルデヒド

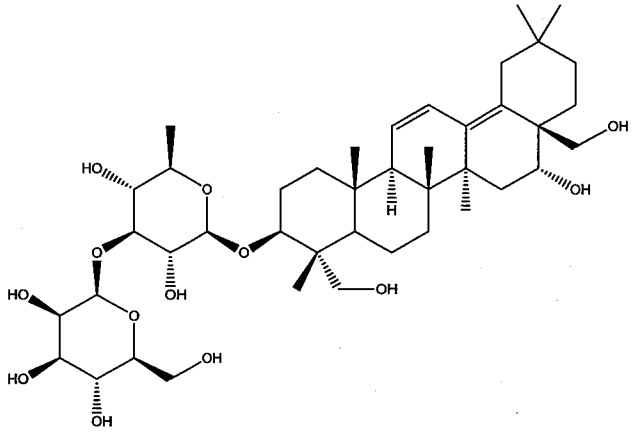


No. 22 サポニン

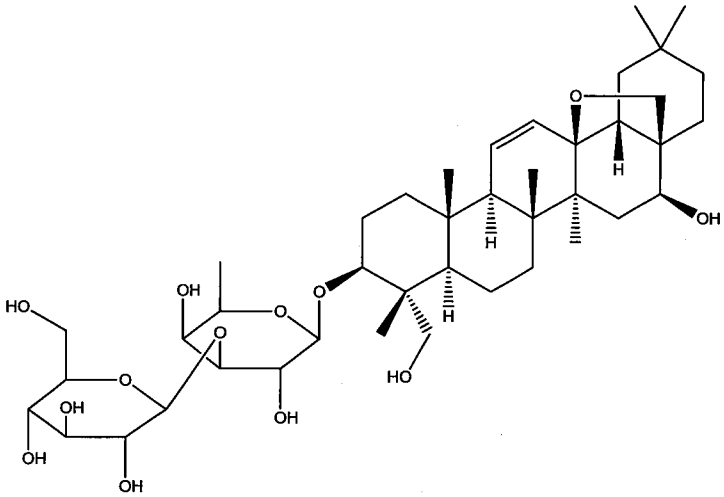
22_1　サイコサポニン A



22_2　サイコサポニン B2



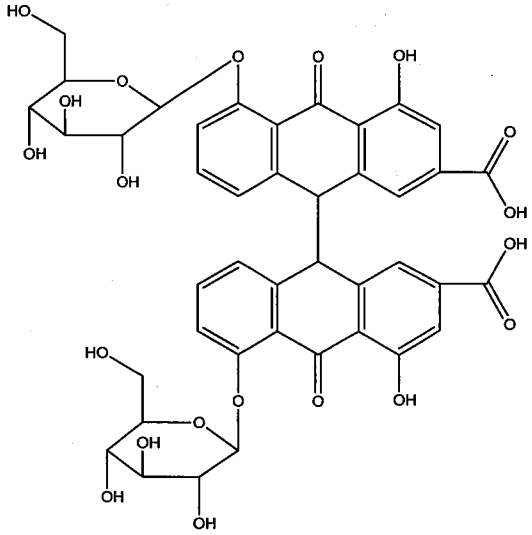
22_3　サイコサポニン D



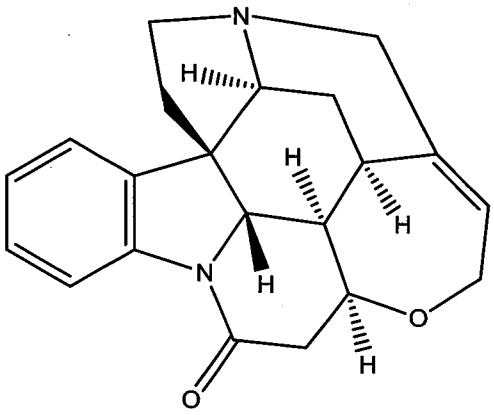
No. 23 センノシド

23_1 センノシド A, 23_2 センノシド B

(センノシド B は 10, 10'位の立体異性体)

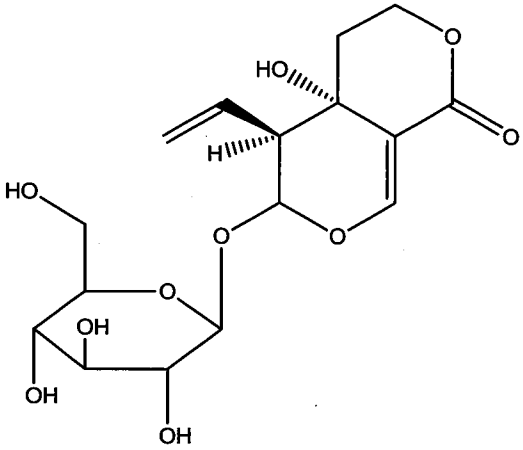


No. 24 ストリキニーネ



HCl

No. 25 スウェルチアマリン



・第二章より Table 2-2.（センキュウサンプルより同定した成分），第三章より Table 3-2.（トウキサンプルより同定した成分）の成分とその構造式

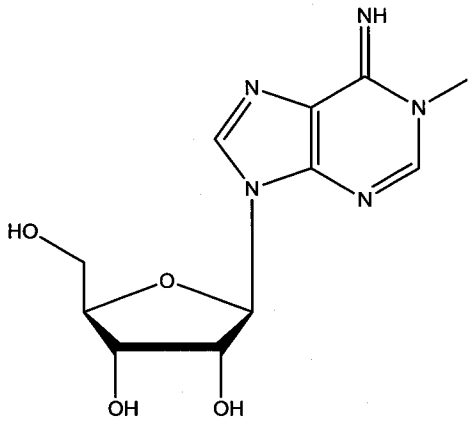
Peak	Identification
1	1-Methyladenosine
2	2-Aminobutyric acid
3	2-Aminoethanol
4	2'-Deoxyuridine
5	2-Isopropylmalic acid
6	3-Hydroxybutyric acid
7	4-Aminobutyric acid
8	Aconitic acid
9	Adenine
10	Adenosine
11	Alanine
12	Arabinose
13	Arabitol
14	Asparagine
15	Aspartic acid
16	β-Alanine
17	Caffeic acid
18	Citramalic acid
19	Citric acid
20	Citrulline
21	Dopa
22	Ethylmalonic acid
23	Ferulic acid
24	Fructose
25	Fumaric acid
26	Galactitol
27	Galactosamine
28	Galactose
29	Galacturonic acid
30	Glucarate
31	Glucaric acid
32	Gluconic acid
33	Glucono-1,5-lactone
34	Glucosamine
35	Glucose
36	Glutamic acid
37	Glutamine
38	Glutaric anhydride
39	Glutathione Oxidized
40	Glyceric acid
41	Glycerol
42	Glycine
43	Glycolic acid
44	Histidine
45	Homoserine
46	Hydroxybutyric acid
47	Inositol
48	Isoleucine
49	Lactic acid
50	Lactitol
51	Leucine
52	Lysine
53	Maleamic acid
54	Malic acid
55	Malonic acid
56	Mannitol
57	Mannose
58	Melezitose
59	Melibiose
60	*meso*-Erythritol

第二章と第三章の成分の続き

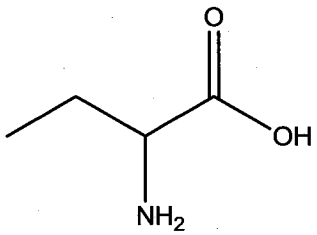
Peak	Identification
61	Methionine
62	*N,N*-Dimethylarginine
63	*n*-Butylamine
64	Nicotinic acid
65	*n*-Methylethanolamine
66	Ornithine
67	Oxalic acid
68	Oxamic acid
69	Phenylalanine
70	Phosphoric acid
71	Phthalic acid
72	Pipecolic acid
73	Proline
74	Psicose
75	Putrescine
76	Pyridoxal
77	Pyroglutamic acid
78	Pyrophosphoric acid
79	Quinic acid
80	Rhamnose
81	Ribose
82	Serine
83	Shikimic acid
84	Sorbitol
85	Succinic acid
86	Succinic anhydride
87	Sucrose
88	Tagatose
89	Tartaric acid
90	Threitol

Peak	Identification
91	Threonic acid
92	Threonine
93	*trans*-4-Hydroxy-L-proline
94	Trehalose
95	Tryptophan
96	Turanose
97	Tyrosine
98	UDP-D-Glucuronic acid
99	Uracil
100	Urea
101	Uridine
102	Valine
103	Xylitol
104	Xylonic acid
105	Xylose

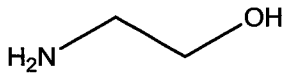
1 1-Methyladenosine



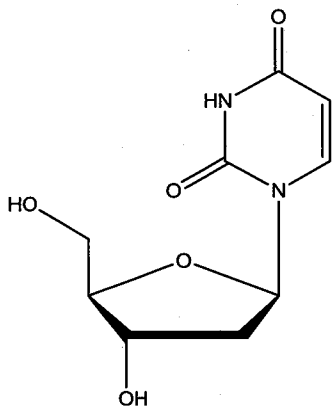
2 2-Aminobutyric acid



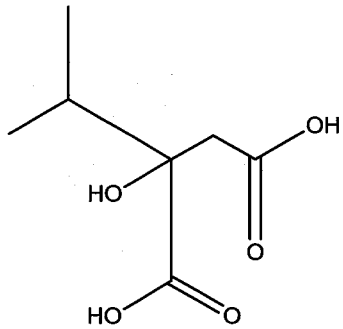
3 2-Aminoethanol



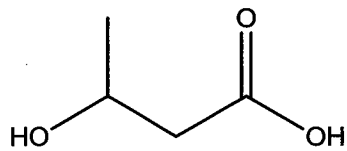
4 2'-Deoxyuridine



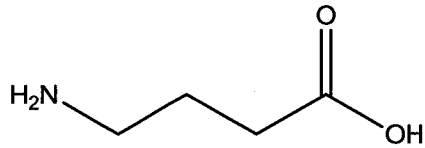
5 2-Isopropylmalic acid



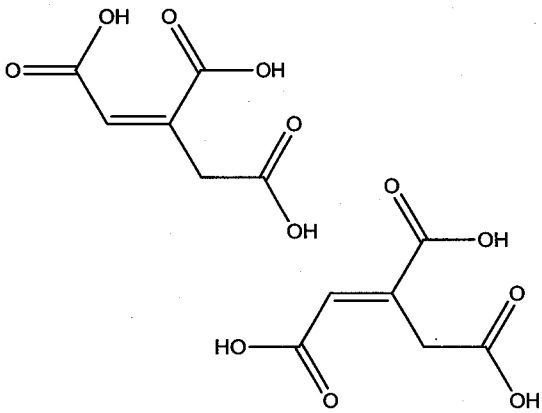
6 3-Hydroxybutyric acid



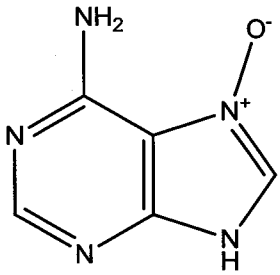
7 4-Aminobutyric acid



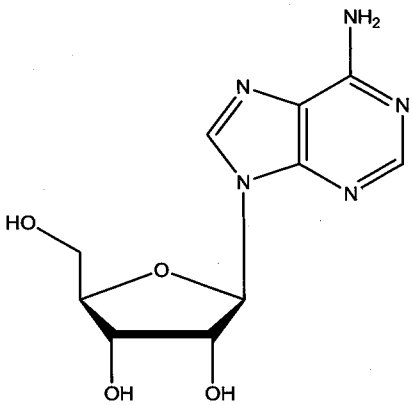
8 Aconitic acid



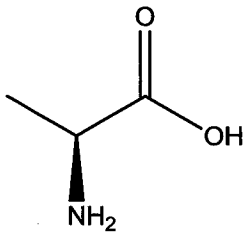
9 Adenine



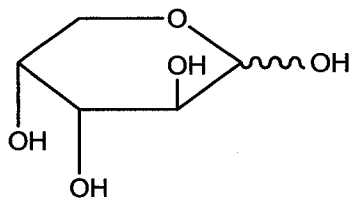
10 Adenosine



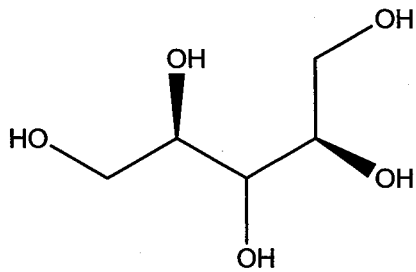
11 Alanine



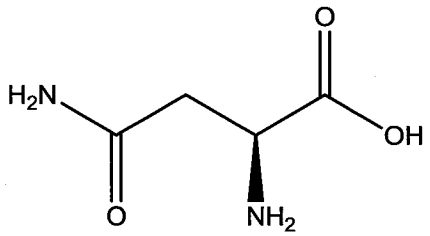
12 Arabinose



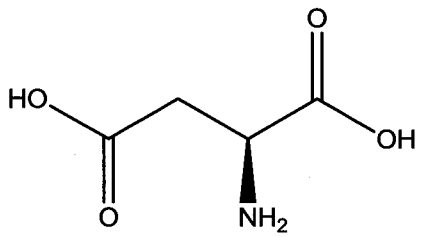
13 Arabitol



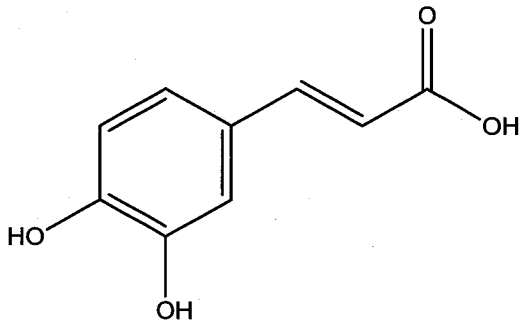
14 Asparagine



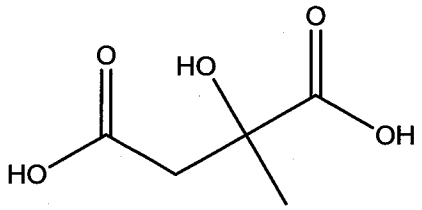
15 Aspartic acid



17 Caffeic acid

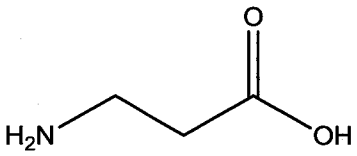


18 Citramalic acid

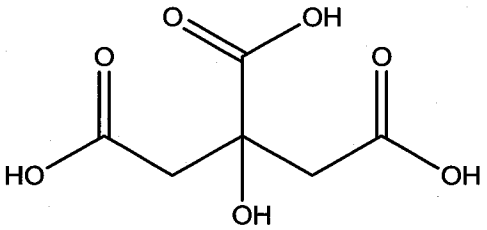


19 Citric acid

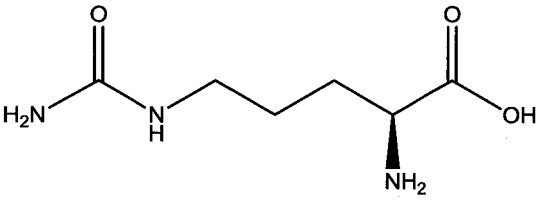
16 β-Alanine



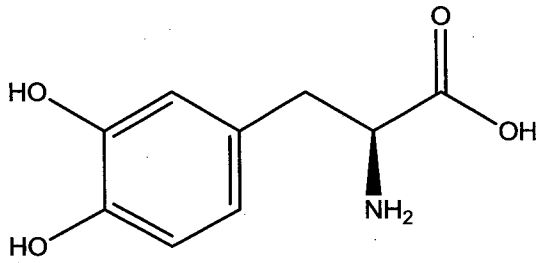
H_2O



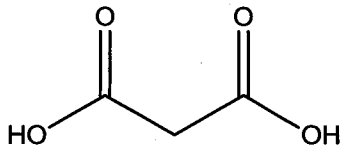
20 Citrulline



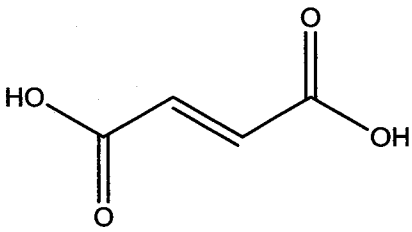
21 Dopa



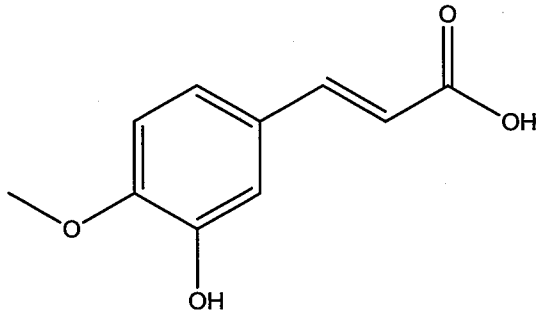
22 Ethylmalonic acid



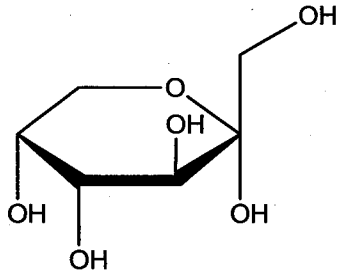
23 Ferulic acid



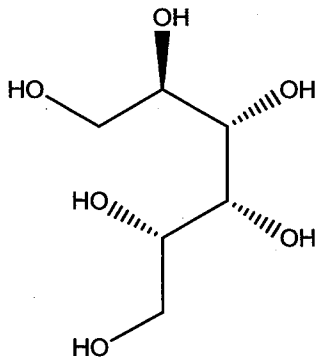
26 Galactitol



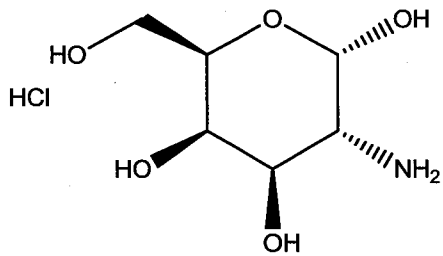
24 Fructose



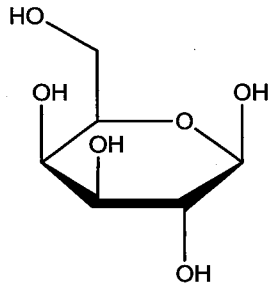
25 Fumaric acid



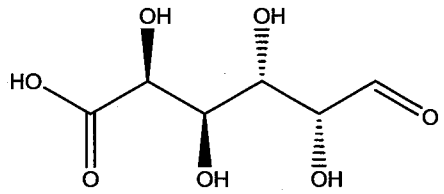
27 Galactosamine



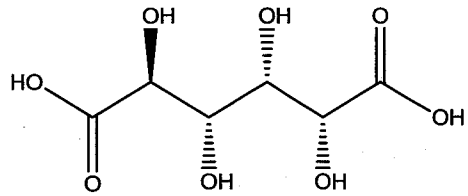
28 Galactose



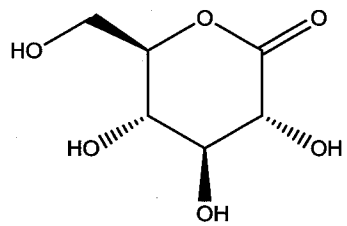
29 Galacturonic acid



30 Glucarate

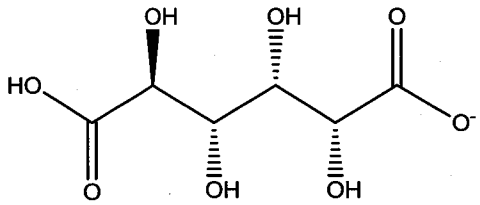


33 Glucono-1,5-lactone

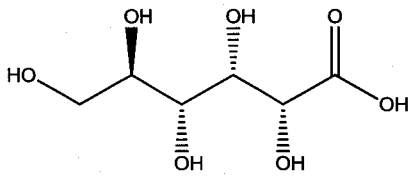


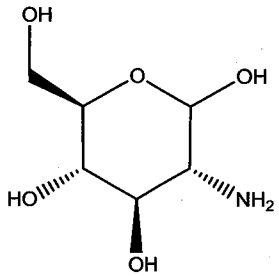
34 Glucosamine

31 Glucaric acid

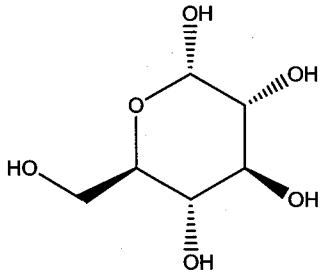


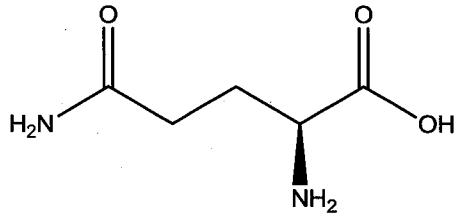
32 Gluconic acid



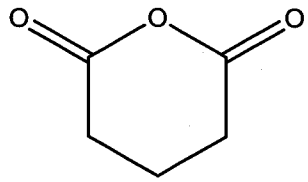


35 Glucose

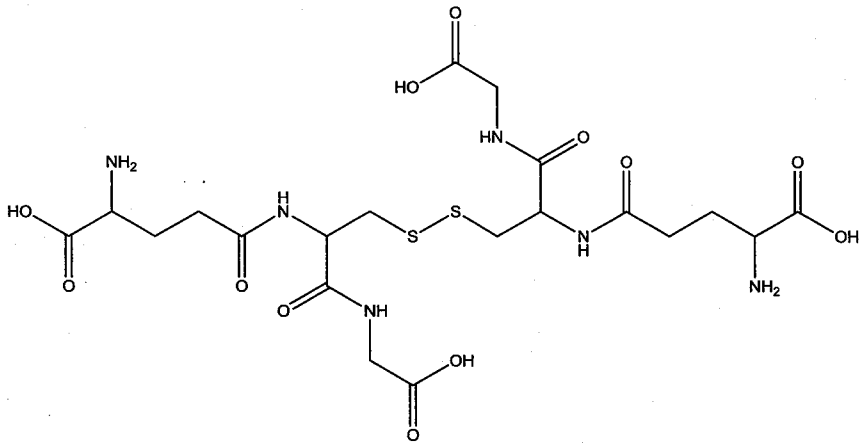




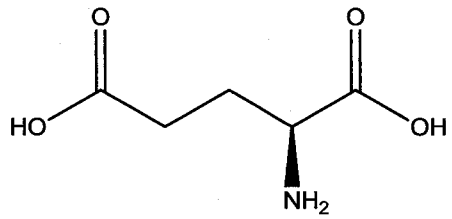
38 Glutaric anhydride



39 Glutathione Oxidized

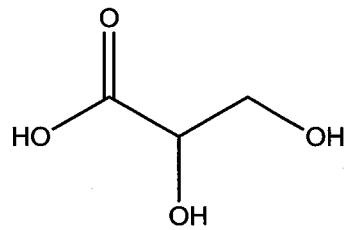


36 Glutamic acid

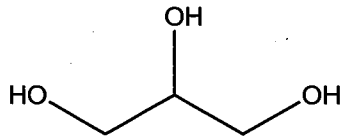


37 Glutamine

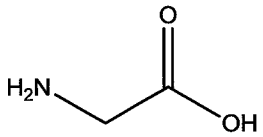
40 Glyceric acid



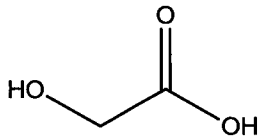
41 Glycerol



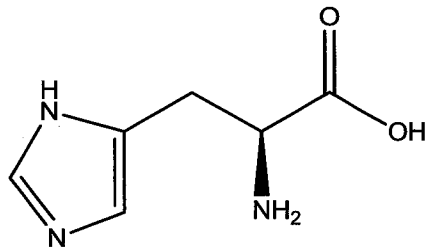
42 Glycine



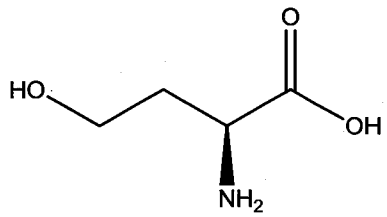
43 Glycolic acid



44 Histidine

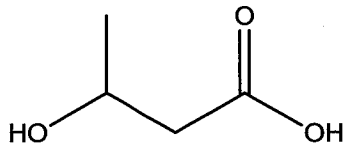


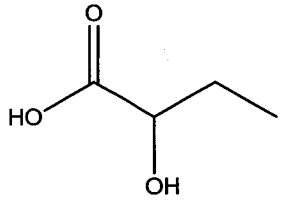
45 Homoserine



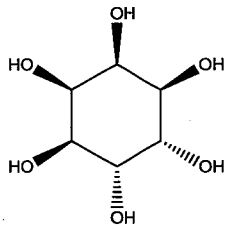
46 Hydroxybutyric acid

49 Lactic acid

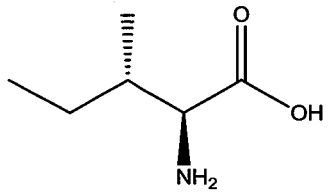


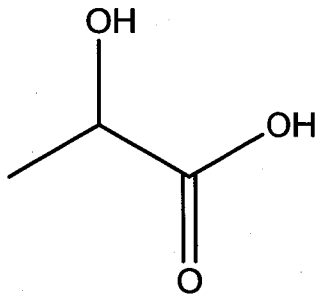


47 Inositol

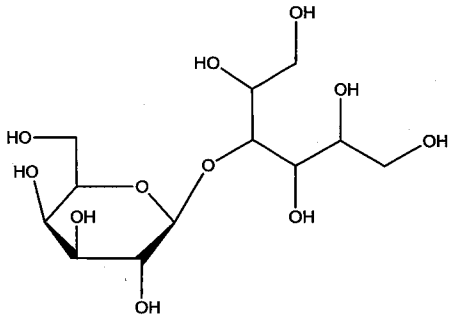


48 Isoleucine

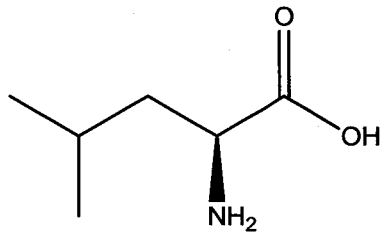




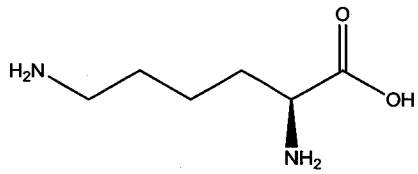
50 Lactitol



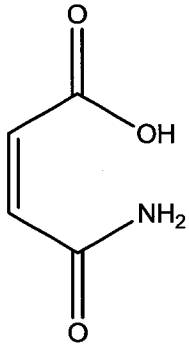
51 Leucine



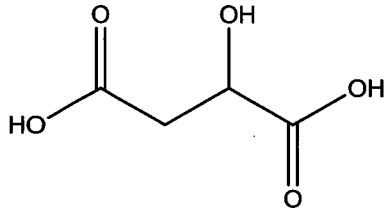
52 Lysine



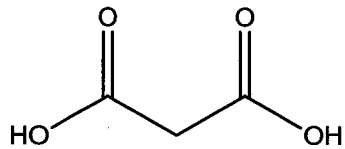
53 Maleamic acid



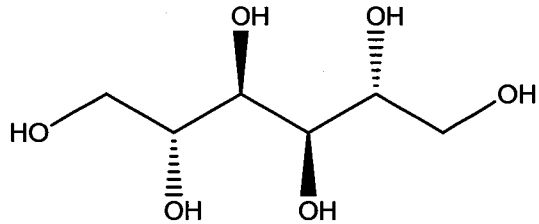
54 Malic acid



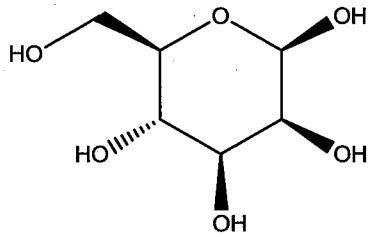
55 Malonic acid



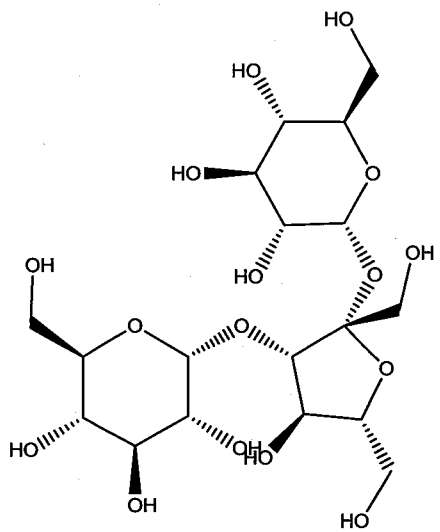
56 Mannitol



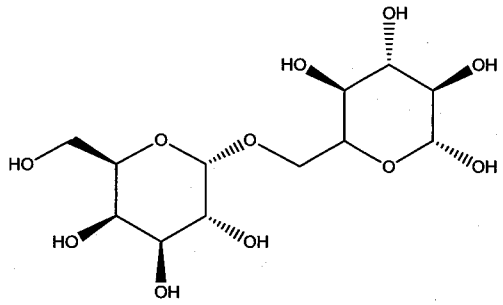
57 Mannose



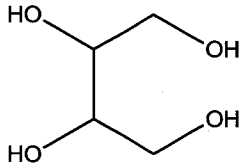
58 Melezitose



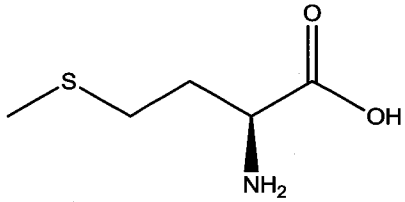
59 Melibiose



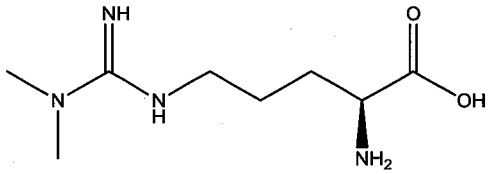
60 *meso*-Erythritol



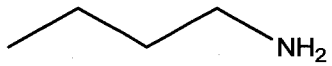
61 Methionine



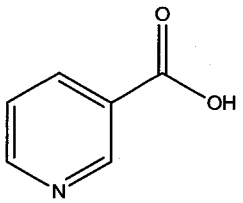
62 *N,N*-Dimethylarginine



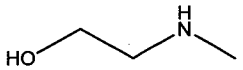
63 *n*-Butylamine



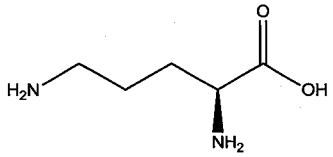
64 Nicotinic acid



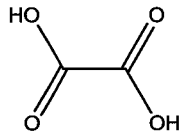
65 *n*-Methylethanolamine



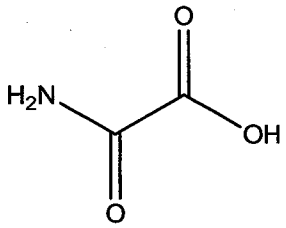
66 Ornithine



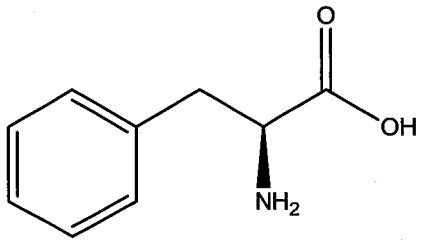
67 Oxalic acid



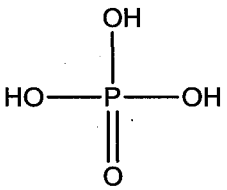
68 Oxamic acid



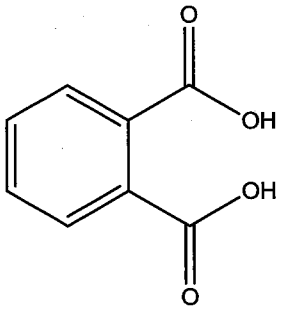
69 Phenylalanine



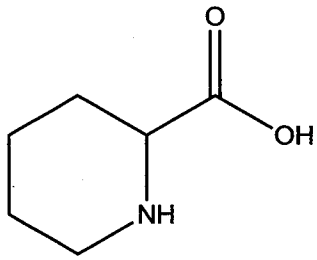
70 Phosphoric acid



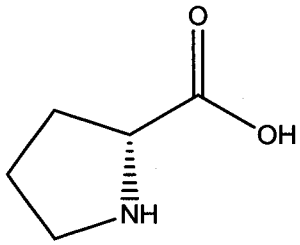
71 Phthalic acid



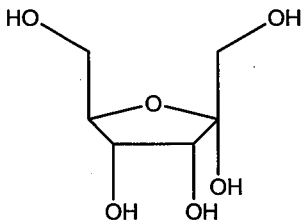
72 Pipecolic acid



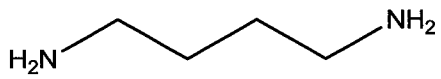
73 Proline



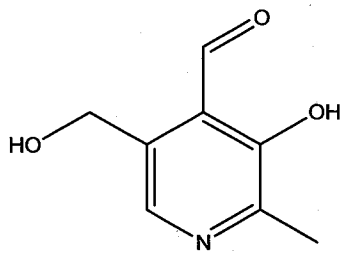
74 Psicose



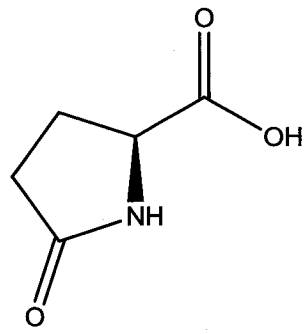
75 Putrescine



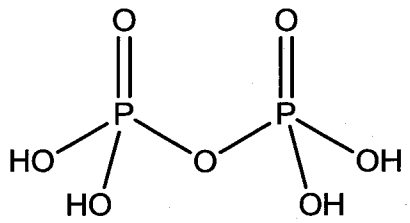
76 Pyridoxal



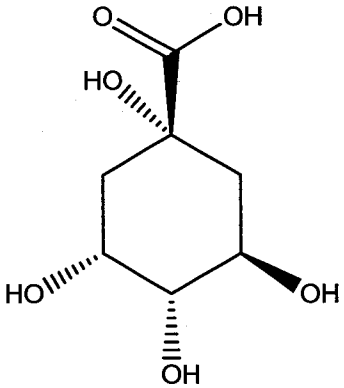
77 Pyroglutamic acid



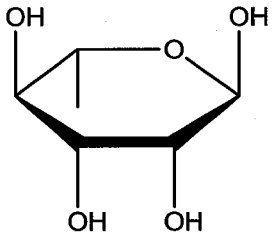
78 Pyrophosphoric acid



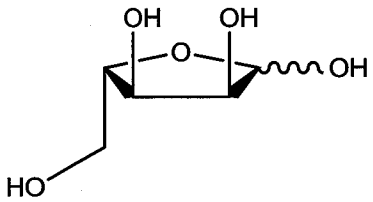
79 Quinic acid



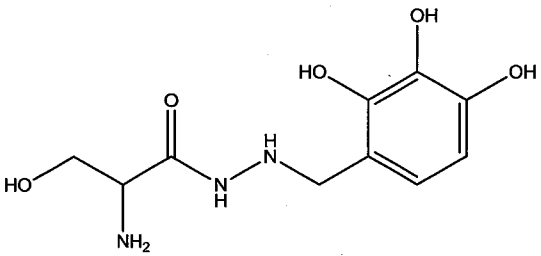
80 Rhamnose



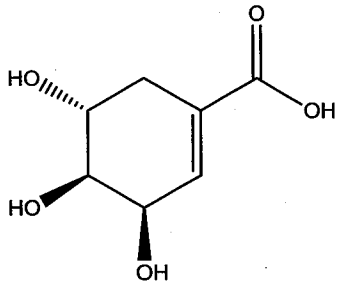
81 Ribose



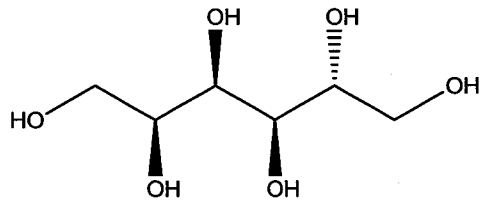
82 Serine



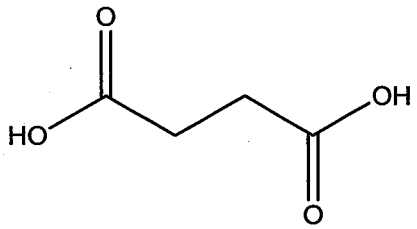
83 Shikimic acid



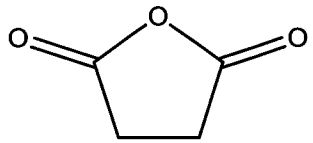
84 Sorbitol



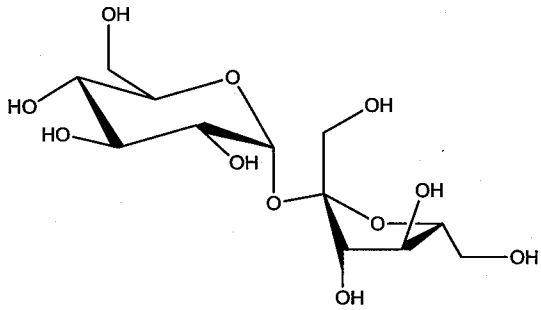
85 Succinic acid



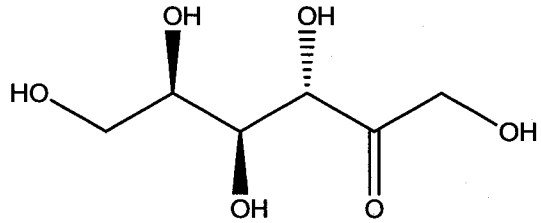
86 Succinic anhydride



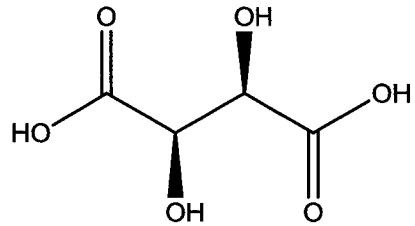
87 Sucrose



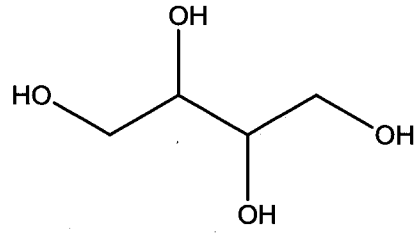
88 Tagatose



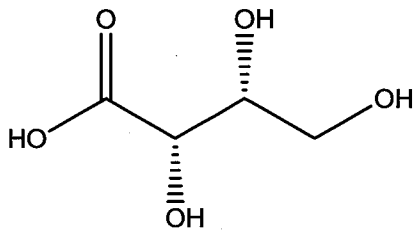
89 Tartaric acid



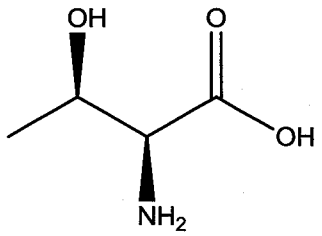
90 Threitol



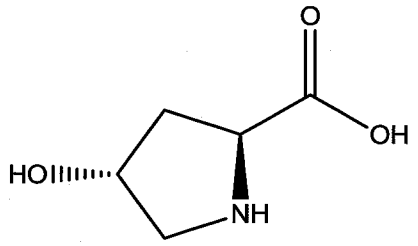
91 Threonic acid



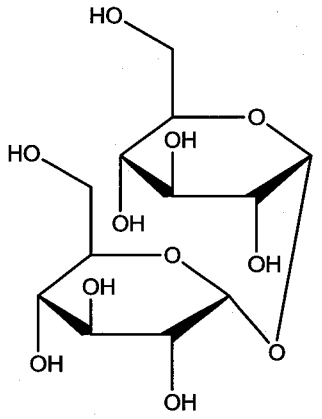
92 Threonine



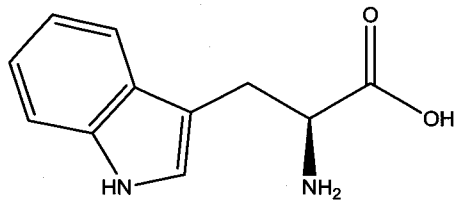
93 *trans*-4-Hydroxy-L-proline



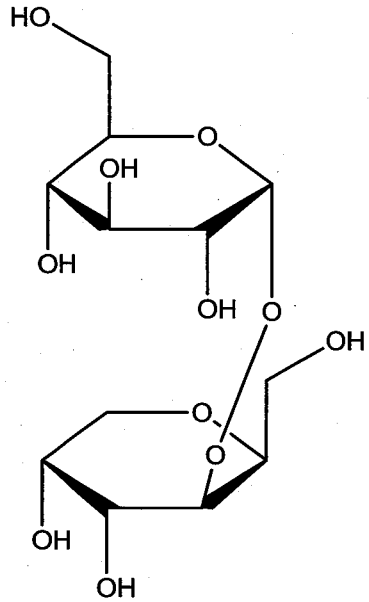
94 Trehalose



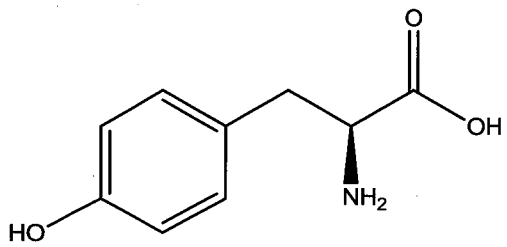
95 Tryptophan



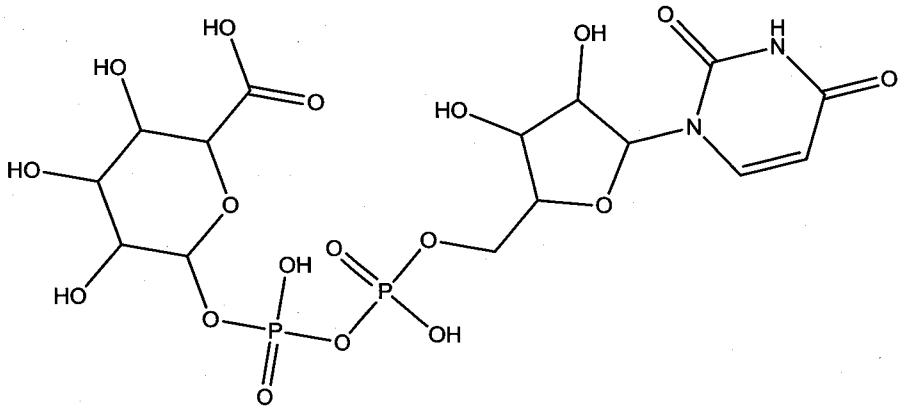
96 Turanose



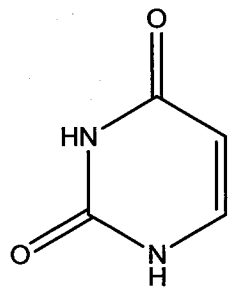
97 Tyrosine



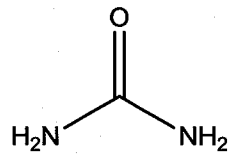
98 UDP-D-Glucuronic acid



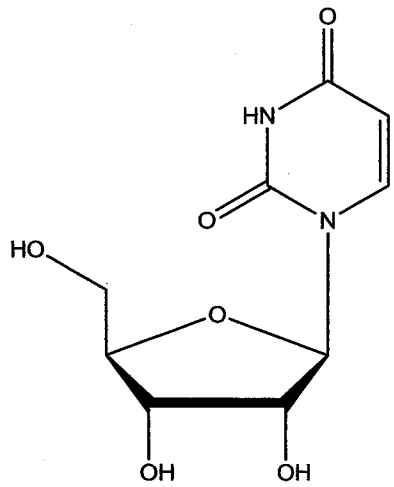
99 Uracil



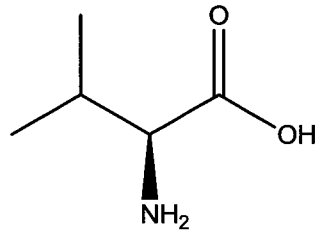
100 Urea



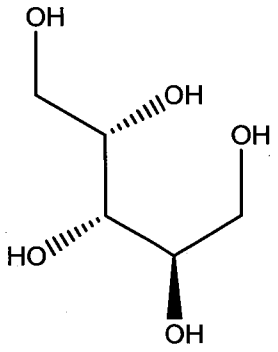
101 Uridine



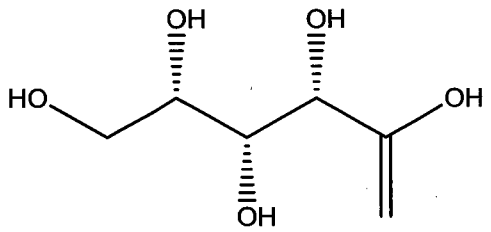
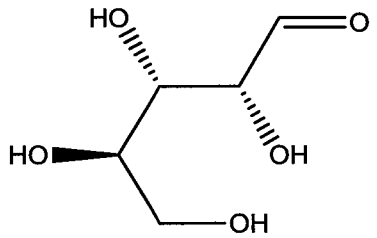
102 Valine



103 Xylitol



104 Xylonic acid



105 Xylose