

三七根中所含三醇型皂甙之降解研究

理昱博¹ 陳玉舜¹ 理筱龍²

¹弘光科技大學食品科技系(所)

²陸軍軍官學校化學系

摘要

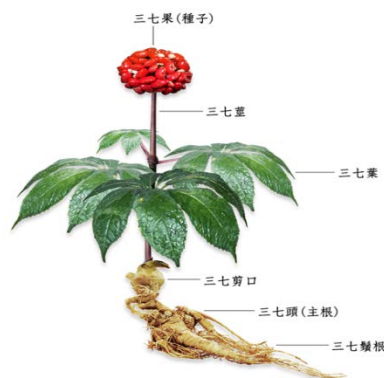
本研究是以富含三醇型皂甙 protopanaxatriol 的三七根為原料，運用青黴菌為工程菌，在適當的條件下，對三七根粉進行發酵降解，並以高效液相層析儀 HPLC 對三七根中的三醇型皂甙於發酵前後的變化進行分析研究，結果發現三七根中所含的皂甙 Re 及 Rg1、Rg2 經青黴菌降解後，確實可以轉化為三醇型皂甙 F1 及 Rh1。

Keywords: 三醇型皂甙、青黴菌、三七、高效液相層析儀。

壹、前言

三七，其譯名為 Sanqi，學名為 *Panax pseudo-ginseng*, *notoginseng*，屬五加科植物，別名金不換、田三七、田漆、蔘三七、血蔘、人蔘三七等，是中國特有品種，三七全株外型如圖一所示，原產於雲南和廣西與越南交界的南亞熱帶山地，喜於常綠闊葉林下陰生之草本植物，因其為雲南白藥的主要成分而聲名遠播，三七全株各部含有豐富的化學成分，諸如皂苷類、多糖類、聚炔醇類及黃酮類等成分，自古在醫藥上即載有多種用途，例如李時珍在【本草綱目】中記載三七【甘微苦，溫，無毒。止血，散血，定痛。金刃箭傷，跌撲杖瘡，血出不止者，嚼爛塗，或為末摻之，其血即止。亦主吐血，衄血，下血，血痢，崩中，經水不止，產後惡血不下，血運，血痛，赤目，癰腫，虎咬，蛇商諸病】，近年來更於三七根中富含的三醇型皂甙(如圖二所示)發現各有許多功效，例如 Liu YW, Zhu X 等人⁽¹⁾發現原人蔘三醇皂甙 Re 可減緩由糖尿病所造成的認知功能缺陷，Quan Hy, Yuan HD 等人⁽²⁾發現人蔘皂甙 Re 可透過

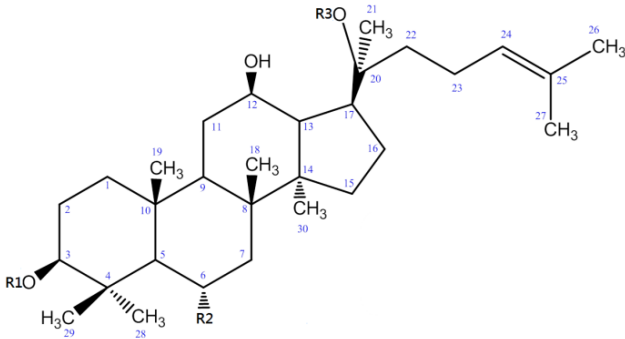
活化 AMPK 蛋白激酶來改善高血糖和高血脂症狀，Li P, Tang M 等人⁽³⁾發現人蔘皂甙



圖一：三七各部位之介紹

Re 可改善小鼠對鴉片類藥物所引起的痛覺過敏症狀，Zhang ZG, Niu XY 等人⁽⁴⁾發現人蔘皂甙 Rg1 可減輕微塵 PM2.5 對人類肺臟上皮細胞 A549 所造成的細胞損傷，Pan C, Huo Y 等人⁽⁵⁾發現三七中的人蔘皂甙 Rb1 和 Rg1 可調節血壓，抑制高血壓發生，Liu Y, Li X 等人⁽⁶⁾發現人蔘皂甙 Rg1 能改善老年痴呆症狀，並且促進學習和記憶的能力，Wang Y, Kan H 等人⁽⁷⁾發現人蔘皂甙 Rg1 能透過降低活性氧化指數 ROS，減少額葉皮層及海馬

迴神經元受到的氧化損傷，進而改善長期慢性壓力造成的學習與記憶障礙，Li XJ, Hou JC 等人⁽⁸⁾發現人蔘皂甙 Rg1 能保護海馬迴神



二醇型	R1	R2	R3
Rb1	-glc(2-1)glc	-H	-glc(6-1)glc
Rb2	-glc(2-1)glc		-glc(6-1)arap
Rb3	-glc(2-1)glc		-glc(6-1)xyl
Rc	-glc(2-1)glc		-glc(6-1)araf
(M10) Rd	-glc(2-1)glc		-glc
Rg3	-glc(2-1)glc		-H
Rh2	-glc		-H
(M9)Gp-XXV	-glc		-glc(6-1)glc
M7	-glc		-glc(6-1)araf
M6	-glc		-glc(6-1)arap
M13 (Gp-LXXV)	-H		-glc(6-1)glc
M5 (F2)	-glc		-glc
M3 (Mc)	-H		-glc(6-1)araf
M2 (CY)	-H		-glc(6-1)arap
M1 (CK)	-H		-glc
PPD (M12)	-H		-H

三醇型	R1	R2	R3
Re	-H	-O-glc(2-1)rha	-glc
Rg1		-O-glc	-glc
Rg2		-O-glc(2-1)rha	-H
Rh1(M8)		-O-glc	-H
F1(M11)		-O-H	-glc
PPT(M4)		-O-H	-H
R1		-O-glc-xyl	-glc

PS. glc-葡萄糖, rha-鼠禮糖, xyl-木糖
 arap-阿拉伯吡喃糖, araf-阿拉伯呋喃糖
 圖二：三七所含之各種二、三醇型皂甙

經元及腦部微血管內皮細胞，避免腦缺血狀態下受到損傷，Jang HJ, Han IH 等人⁽⁹⁾發現人蔘皂甙 Re 可以透過加熱轉化為其它人蔘皂甙 Rg2、Rg6、F4 型式，對胃癌細胞的抗癌作用有更好的效果，Yuan HD, Kim DY 等人⁽¹⁰⁾發現人蔘皂甙 Rg2 可藉由調控由 AMPK 誘導的 GSK3β 磷酸化和 SHP 基因表達來抑制肝醣生成；當攝取三七根粉時三醇型皂甙 Re、Rg1、Rg2、Rf 經過胃腸道並不會被胃酸及膽汁所解，而是進入小腸後才開始會被腸內菌所分泌的降解酶所分解，目前已發現可降解出 Rh1、F1 及 PPT 三種分子量較小的三醇型皂甙(如圖四所示)，目前發現這些三醇型皂甙有特殊的生物活性，而逐漸受到科學界的重視，例如 Zheng H, Jeong Y 等人⁽¹¹⁾發現人蔘皂甙 Rh1 可以藉由調控體內免疫球蛋白 IgE 及免疫發炎因子 IL-6 的表達來改善異位性皮膚炎的發炎反應，Li J, Du J 等人⁽¹²⁾發現人蔘皂甙 Rh1 可以增強腎上腺皮質荷爾蒙 DEX 的抗發炎反應，並且避免用藥後所造成高血糖副作用的發生；由於降解後產出的稀有小分子三醇型皂甙其生物活性日益受到重視，實驗需求量漸大，為求能科學化量產，於是本研究嘗試以青黴菌為工程菌(如圖三所示)，模擬腸內菌於腸內對皂甙的降解機制，實驗以富含 Re、Rg1、Rg2、Rf 三醇型皂甙的三七根粉為原料，再於適度之溫度、濕度及時間等條件，以固態醱酵方式進行降解研究，並以高效液相層析儀 HPLC 對三七根中的三醇型皂甙於發酵前後的變化進行分析研究，希望能建立有效生產 Rh1、F1 等小分子三醇型皂甙的新方法。

貳、實驗部分

(1)A.設備及材料

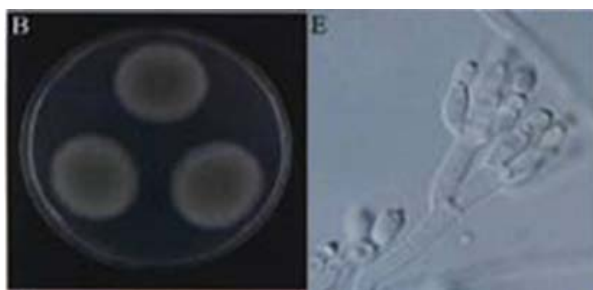
- a. 效液相層析儀(美國安捷倫 1100 型)
- b. 分離管柱 RP-18(美國安捷倫 4.6mm x 250mm, 5 μ m)

B.藥品

- a. 三七根粉、三醇型皂甙 Re、Rg₁、Rg₂、F₁、Rh₁、PPT 標準品(美國 LKT)
- b. 甲醇、氘甲烷、水(美國 Aldrich, HPLC 級)
- c. 瓊膠、葡萄糖、蛋白質、麥芽提取物(美國 BD)

(2). 實驗方法及步驟

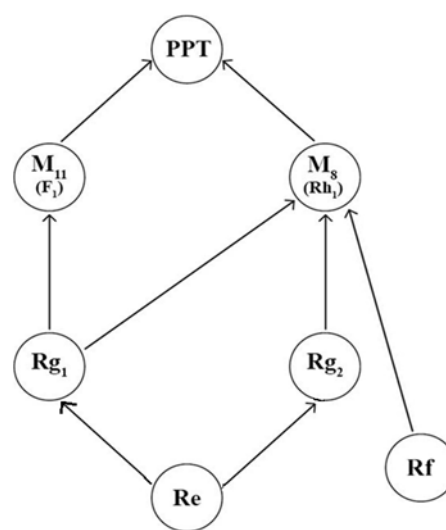
本研究所用之青黴菌源自 Lee Yu-Chieh⁽¹³⁾ 降解三七原料產出具有抗癌效用人蔘皂甙 20-O- β -D-吡喃葡萄糖基原人蔘二醇之工程菌(如圖三所示), 醱酵的方法是將三七根磨粉後加入適量之麥麩及水, 充分混合後以高溫、高壓滅菌, 待冷卻後, 於無菌操作台內置入淺盤並植入青黴菌菌種, 於適度之溫度、溼度及時間下進行醱酵, 待醱酵完成後, 將醱酵產物取出, 經超音波萃取、過濾及減壓濃縮後, 將產物製備成 1000PPM 之溶液, 經 0.25 μ m 過濾膜過濾後, 再以高效液相層析儀 HPLC 進行檢測, 並與醱酵前三七粉圖譜及各三醇型皂甙標準品圖譜作比對, 觀察三七根粉中所含之各三醇型皂甙經青黴菌醱酵降解前後之變化, 以作為產業化生產小分子三醇型皂甙之參考數據。



圖三：青黴菌顯微放大圖

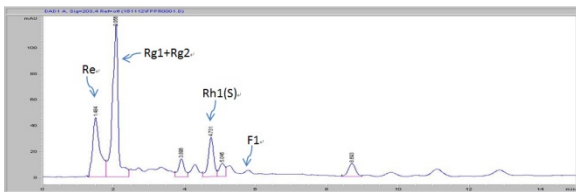
參、結果與討論

Lee Yu-Chieh⁽¹³⁾ 研究作法循 Hideo Hasegawa 等人^(14,15) 之研究發現, 即腸內菌酶可將二醇型皂甙 Rb₁ 降解為人蔘皂甙 Rd, 人蔘皂甙 Rd 可再降解為人蔘皂甙 F₂, 人蔘皂甙 F₂ 可再降解為人蔘皂甙 M₁, Lee Yu-Chieh 等人研究貢獻是以體外發酵模式, 將富含二醇型皂甙 Rb₁ 的三七料源, 以青黴菌為工程菌進行固態醱酵研究, 經實驗後發現青黴菌能有效將三七料源中之二醇型皂甙 Rb₁ 降解為人蔘皂甙 M₁, 其降解路徑與 Hideo Hasegawa 等人發現的二醇型皂甙於腸內菌降解路徑相符, 人蔘二醇型皂甙及人蔘三醇型皂甙均屬於達瑪烷型(Dammarane)之皂甙, 其結構上之差異為各種人蔘二醇皂甙於皂甙主結構 C₃ 及 C₂₀ 位上的末端可鍵結葡萄糖或氫 H 元素, 而 C₆ 位上僅鍵結 H, 各種人蔘三醇皂甙則於皂甙主結構 C₆ 及 C₂₀ 位上的末端可鍵結葡萄糖或 H, 而 C₃ 位上僅鍵結 H, Lee Yu-Chieh 等人以青黴菌為為工程菌, 對二醇型皂甙進行固態醱酵, 成功的將皂甙結構 C₃ 及 C₂₀ 位上的糖基作了不同降解, 本研究以同樣的青黴菌為為工程菌, 對三醇型皂甙進行固態醱酵, 由圖四所示, 人蔘皂甙 Re 於 C₆ 位上的糖

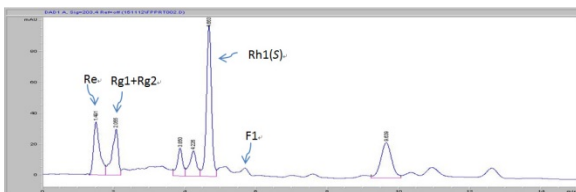


圖四：三醇型皂甙降解路徑圖

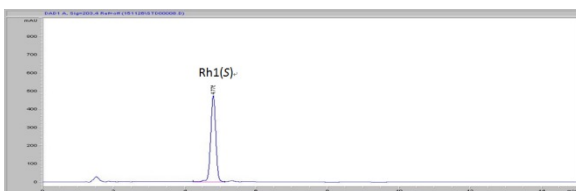
基-O-glc(2-1)rha 若降解掉鼠李糖(rha)即成為人蔘皂甙 Rg1，人蔘皂甙 Re 於 C20 位上的糖基-O-glc 若降解掉葡萄糖(glc)即成為人蔘皂甙 Rg2，人蔘皂甙 Rf 於 C6 位上的糖基-O-glc(2-1)-glc 若降解掉葡萄糖(-glc)即成為人蔘皂甙 Rh1，人蔘皂甙 Rg1 若降解掉於 C20 位上的葡萄糖糖基-glc 即成為人蔘皂甙 Rh1，若降解掉於 C6 位上的葡萄糖糖基-glc 即成為人蔘皂甙 F1，人蔘皂甙 Rg2 若降解掉於 C6 位上的葡萄糖糖基-glc 即成為人蔘皂甙 Rh1，當人蔘皂甙 Rh1 再降解掉於 C6 位上的唯一葡萄糖糖基-glc 即成為人蔘皂甙 PPT，同樣的若人蔘皂甙 F1 再降解掉於 C20 位上的唯一葡萄糖糖基-glc 亦會變成為人蔘皂甙 PPT，此降解路徑可介由圖五的 HPLC 圖譜加以佐證，由圖五-A.發酵前三七根粉



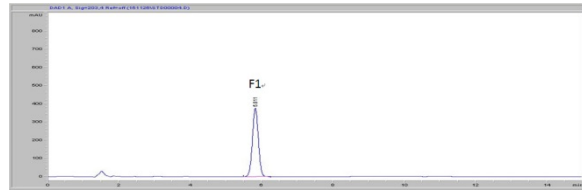
圖五-A：發酵前三七根粉



圖五-B：發酵後三七根粉



圖五-C：人蔘皂甙 RH1(S) 標準品



圖五-D：人蔘皂甙 F1 標準品

HPLC 圖譜可知三七根中的三醇型人蔘皂甙 Re, Rg1, Rg2 含量很高，圖五-B.發酵後三七根粉 HPLC 圖譜顯示經發酵後人蔘皂甙 Re, Rg1, Rg2 大量降解為稀有三醇型皂甙 Rh1(S) 與 F1，兩者含量皆明顯提高，比對圖五-C.人蔘皂甙 RH1(S) 標準品及圖五-D.人蔘皂甙 F1 標準品 HPLC 圖譜可知其中 Rh1(S) 含量更是明顯增加，可能是因為人蔘皂甙 Rh1 可由人蔘皂甙 Rg1、人蔘皂甙 Rg2 及人蔘皂甙 Rf 三個路徑降解得到，而人蔘皂甙 F1 僅能由人蔘皂甙 Rg1 一個路徑降解得到，故青黴菌酶解後所得到的人蔘皂甙 Rh1 量要多於人蔘皂甙 F1。

結論：

經此實驗可知深具藥用活性的達瑪烷型之二醇型皂甙及三醇型皂甙，均可以青黴菌為工程菌進行固態發酵，將大分子之人蔘皂甙降解為小分子稀有皂甙，且不論其糖甙鍵是位於 C3、C6 或 C20 位置上，此研究相信可為商業化生產三醇型稀有皂甙 Rh1 提供一個新思路。

參考文獻：

- [1] Liu YW, Zhu X etc "Ginsenoside Re attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats." *Pharmacol Biochem Behav.*2012 Mar,101(1):93-98.
- [2] Quan Hy, Yuan HD etc "Ginsenoside Re lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice." *Int J Mol Med.*2012 Jan:29(1):73-80.

- [3] Li P, Tang M etc ` Effects of ginsenosides on opioid-induced hyperalgesia in mice. ` Neuroreport.2014 Jul 9;25(10):749-752.
- [4.]Zhang ZG, Niu XY etc `Ginsenoside Rg1 reduces toxicity of fine particulate matter on human alveolar epithelial cells: a preliminary observation. ` Mol Med Rep. 2014 Mar;9(3):989-992.
- [5] Pan C, Huo Y etc `Panax notoginseng and its components decreased hypertension via stimulation of endothelial-dependent vessel dilatation. ` Vascul Pharmacol.2012 Mar-Apr;56(3-4):150-8.
- [6] Liu Y, Li X etc ` Progress of research on effects of ginsenoside Rg1 in promoting capability of learning and memory. ` Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.2006 Oct;26(10):956-60.
- [7] Wang Y, Kan H etc `Protective effects of ginsenoside Rg1 on chronic restraint stress induced learning and memory impairments in male mice.` Pharmacol Biochem Behav. 2014 May;120:73-81.
- [8] Li XJ, Hou JC etc ` Neuroprotective effects of TongLuoJiuNao in neurons exposed to oxygen and glucose deprivation. ` J Ethnopharmacol. 2012 Jun 14;141(3) :927-33.
- [9] Jang HJ, Han IH etc `Anticarcinogenic effects of products of heat-processed ginsenoside Re, a major constituent of ginseng berry, on human gastric cancer cells. ` J Agric Food Chem. 2014 Apr 2;62(13):2830-6.
- [10] Yuan HD, Kim DY etc` Ginsenoside Rg2 induces orphan nuclear receptor SHP gene expression and inactivates GSK3 β via AMP-activated protein kinase to inhibit hepatic glucose production in HepG2 cells. ` Chem Biol Interact.2012 Jan 5;195(1):35-42.
- [11] Zheng H, Jeong Y etc ` Oral administration of ginsenoside Rh1 ingibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions induced by oxazolone in hairless mice. ` Int Immunopharmacol.2011 Apr;11(4):511-8.
- [12] Li J, Du J etc ` Ginsenoside Rh1 potentiates dexamethasone's anti-inflammatory effects for chronic inflammatory disease by reversing dexamethasone-induced resistance. ` Arthritis Res Ther.2014 May 1;16(3):R106.
- [13] Lee Yu-Chieh, Hsu Hsiu-Ling etc ` Method for preparing 20-O-Beta-D-Glucopyranosyl -20(S) – Protopanaxadiol by Fermentation using Penicillium chrysogenum on SANQI` WHAMPOA - An Interdisciplinary Journal 54(2008) 1-5.
- [14]Hideo Hasegawa , Jong-Hwan Sung and Yoshimi Benno. ` Role of human intestinal Prevotella oris in hydrolyzing ginseng saponins ` .Planta. Med. 1997, 63(5): 436-440.
- [15]Hideo Hasegawa , Jong-Hwan Sung , Satoshi Matsumiya , Masamori Uchiyama. `Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria` .Planta. Med. 1996, 62(5): 453-457.

The Study on the Degradation of protopanaxatriol ginsenoside contained in roots of SANQI

Lee Yu-Po¹, Chen Yuh-Shuen¹, Lee Sheau-Long²

¹Department of Food Science and Technology, Hungkuang University.

²Department of Chemistry, R.O.C Military Academy.

Abstract

In this study, *Penicillium* was used as the engineering bacteria, and *Panax notoginseng* root powder was fermented and degrading under appropriate conditions. In this paper, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was developed for the determination of protopanaxatriol ginsenoside, the changes of protopanaxatriol in *Panax notoginseng* root were studied before and after fermentation. It was found that the ginsenoside Re and Rg1 and Rg2 contained in *Panax notoginseng* root could be transformed into protopanaxatriol ginsenoside F1 and Rh1.

Keywords: protopanaxatriol ginsenoside、*Penicillium chrysogenum*、Sanqi、HPLC。