

氨基酸转化三七花中稀有人参皂苷及提取液对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞活性的影响

邵紫君^{1,2}, 李志满², 于鹏程¹, 陈建波², 李珊珊², 孙印石^{1,2*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130033

2. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

摘要: 目的 通过添加食品级氨基酸将三七 *Panax notoginseng* 花中普通人参皂苷转化为稀有人参皂苷, 并对转化前后提取物的抗炎活性进行比较。方法 应用单因素和正交试验考察了不同氨基酸种类、氨基酸浓度、反应温度、反应时间和液固比对稀有人参皂苷转化的影响, 探讨并分析了转化前后三七花提取物对脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞增殖和抗炎活性的影响。结果 天冬氨酸是最佳催化剂, 在温度为 120 °C、天冬氨酸为 5%、液固比为 30 mL/g 和反应时间为 2 h 时, 4 种稀有人参皂苷总转化含量为 (47.12 ± 0.52) mg/g。转化前后三七花提取物在 1.56~200 µg/mL, 显著抑制了 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的活性 ($P < 0.05$), 显著抑制 NO 和白细胞介素-6 (IL-6) 的释放 ($P < 0.05$)。在质量浓度 ≥ 6.250 µg/mL 时, 转化后三七花提取物显著对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症有更好的抑制作用 ($P < 0.05$), NO 和 IL-6 促炎因子的分泌也显著减少 ($P < 0.05$)。结论 对稀有人参皂苷的转化提供了绿色、安全和高效的转化方法。三七花在转化后对 LPS 诱导的炎症反应有明显的抑制作用, 为三七花的开发利用提供了新思路。

关键词: 三七花; 氨基酸; 转化; 人参皂苷; 稀有人参皂苷; 提取物; 抗炎; 脂多糖; RAW264.7 细胞; 细胞活性; 正交试验; 天冬氨酸; IL-6

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)03-0702-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.012

Amino acid conversion of rare ginsenosides in *Panax notoginseng* flower and its effect on RAW264.7 cell viability induced by lipopolysaccharide

SHAO Zi-jun^{1,2}, LI Zhi-man², YU Peng-cheng¹, CHEN Jian-bo², LI Shan-shan², SUN Yin-shi^{1,2}

1. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130033, China

2. Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

Abstract: Objective In this study, the common ginsenosides in *Panax notoginseng* flower (PNF) were converted into rare ginsenosides by adding food-grade amino acids, and the anti-inflammatory activities of the extracts before and after the transformation were compared. **Methods** Single factor and orthogonal experiments were used to investigate the effects of different amino acid types, amino acid concentration, reaction temperature, reaction time and liquid-solid ratio on the conversion of rare ginsenosides. The effects of PNF extracts before and after research transformation on the proliferation and anti-inflammatory activity of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide (LPS) were analyzed. **Results** Aspartic acid was the best catalyst. When the temperature was 120 °C, aspartic acid was 5%, the liquid-solid ratio was 30 mL/g, and the reaction time was 2 h, the total conversion of four rare ginsenosides was (47.12 ± 0.52) mg/g. The PNF extract before and after transformation significantly inhibited the activity of RAW264.7 cells induced by LPS in the range of 1.56—200 µg/mL ($P < 0.05$), and significantly inhibited the release of NO and IL-6 ($P < 0.05$). When the concentration was greater than 6.250 µg/mL, PNF extract after transformation significantly inhibited LPS-induced inflammation of RAW264.7 cells ($P < 0.05$), and the secretion of NO and IL-6 pro-inflammatory factors was also significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** This article provides a green, safe and efficient transformation method for the

收稿日期: 2020-09-22

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-ISAPS); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610342020018); 吉林省科技发展计划项目 (20190304015YY)

作者简介: 邵紫君 (1995—), 女, 内蒙古根河市人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: shaozijing2017@163.com

*通信作者: 孙印石 (1980—), 男, 内蒙古兴安盟人, 博士, 研究员, 主要从事特种动植物贮藏加工与产品开发。E-mail: sunyinshi2015@163.com

transformation of rare ginsenosides PNF has a significant inhibitory effect on the inflammatory response induced by LPS after transformation, which provides a new idea for the development and utilization of PNF.

Key words: *Panax notoginseng* flower; amino acids; transformation; ginsenosides; rare ginsenosides; extract; anti-inflammation; lipopolysaccharide; RAW264.7 cells; cell viability; orthogonal test; aspartic acid; IL-6

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属植物, 已有 600 年以上的药用历史, 是我国名贵中药材。由于疗效确切、效果显著, 近些年来三七的应用越来越广泛, 受到不少重视养生、健身人士的追捧。但遗憾的是三七一直未能进入“药食同源”目录, 三七产业发展遭遇了政策瓶颈。《中国药典》规定三七的药用部位为根和根茎^[1], 三七花 (*Panax notoginseng* flower) 作为三七的副产物, 一直未能得到有效的开发与利用。可喜的是在 2016 年云南省卫生和计划生育委员会正式批准三七花可以按照当地特有的食品原料进行管理, 标志着三七花正式进入食品行业^[2]。三七花中含有人参皂苷、维生素、氨基酸等多种营养成分, 其中人参皂苷是三七花中的主要有效成分^[3-6]。根据结构不同, 人参皂苷可分为达玛烷型和齐墩果酸型。其中, 达玛烷型中四环三萜类人参皂苷分为原人参二醇型皂苷 [如人参皂苷 Rb₁、Rb₂、Rc、Rd (Rb₁、Rb₂、Rc、Rd)] 和原人参三醇型皂苷 [如人参皂苷 Re、Rg₁ (Re、Rg₁)]^[7]。此外, 还有一些次级人参皂苷, 它们在原材料中含量很低, 如人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ [20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅] 等这些人参皂苷可以经过一定的加工获得, 它们被称为稀有人参皂苷^[8]。现有研究表明, 稀有人参皂苷对一些疾病有显著的疗效, 如对抑郁症、糖尿病和炎症疾病具有良好的药理作用^[9], 对肝癌、肺癌、胃癌等癌细胞的凋亡有显著的影响^[10]。随着科学研究的深入, 市场对稀有人参皂苷的需求正在增加, 所以探寻一种高效绿色的稀有人参皂苷富集方法至关重要。

稀有人参皂苷可以通过蒸煮^[11]、酸水解^[12]、微生物降解和金属离子催化^[13-15]等手段来进行富集。但这些方法既复杂又耗时, 并对外源添加物的专属性和反应条件要求较高, 容易造成环境污染。据报道, 天冬氨酸可通过降解原人参二醇组总皂苷来获得稀有人参皂苷^[16]。但这种转化技术对原材料要求较高, 转化方法复杂、成本高, 不适用于工业化生产。而三七花中皂苷含量丰富, 位居三七各部位首位^[17-18], 但关于三七花中稀有人参皂苷的转化未见报道。本实验研究了氨基酸种类、氨基酸浓度、反

应温度、反应时间和液固比对三七花中稀有人参皂苷转化的影响。并进一步比较了转化前、后三七花提取物对脂多糖 (LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞抗炎活性的影响, 以期对三七花的开发利用提供新的思路。

1 材料

1.1 材料和试剂

三七花, 购自云南省文山市三七药业批发行, 经吉林农业大学李伟教授鉴定为五加科人参属植物三七 *P. notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥花 (4 年生); RAW264.7 小鼠巨噬细胞, 由中国医学科学院细胞中心提供; 对照品精氨酸 (Arg, 批号 1008J033)、组氨酸 (His, 批号 816L031)、天冬氨酸 (Asp, 批号 1784M052)、谷氨酸 (Glu, 批号 1005L047) 和赖氨酸 (Lys, 批号 2395H145), 北京索莱宝科技有限公司; 对照品人参皂苷 20(S)-Rg₃ (批号 Z15D8X50607)、20(R)-Rg₃ (批号 YA0417YA14)、Rk₁ (批号 P20N6F6254)、Rg₅ (批号 P26N7F25707)、Rg₁ (批号 Z13O8L45576)、Re (批号 H15M6X1)、Rb₁ (批号 Z16J9X52719)、Rb₂ (批号 P25D8F51140)、Rc (批号 Z10J6B1)、Rd (批号 Z13O8L45576)、LPS (批号 S18A9168132), 质量分数均 ≥ 98%, 上海源叶生物科技有限公司; 乙腈和甲醇, 色谱纯, 美国 Fisher 公司; DMEM 培养基、胎牛血清和 PBS, Gibco 公司; CCK-8, 日本同仁有限公司; NO 试剂盒, 碧云天试剂公司; IL-6 ELISA 试剂盒, 爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

BioTek Epoch2 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪, PDA 检测器, 英国 Waters 公司; EX125D2H 电子天平, 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; GZX-9140 MBE 数显鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; C₁₈ Sep-Pak®SPE 液相色谱柱, 爱尔兰赛分科技公司; Milli-Q Advantage A1 超纯水机, 美国密理博公司; 0.22 μm 有机系针头式过滤器, 天津市津腾实验设备有限公司; LDZM-40KCS-II 立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏净安泰空气技术有限公司; CO₂ 培养箱, 赛

默飞世尔科技(中国)有限公司; 7A07015 显微镜, 奥林巴斯(中国)有限公司; TGL-16G 医用离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Alpha 1-4LD plus 冻干机, 德国 Christ 公司。

2 方法与结果

2.1 原材料处理

取三七花 60 °C 烘干、粉碎过 60 目不锈钢筛网获得原药材粉末, 放于阴凉干燥处, 备用。

2.2 人参皂苷的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 准确称取 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 各 5 mg 于 5 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容; 配制成混合对照品母液。准确吸取 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mL 于 5 mL 量瓶中, 定容, -20 °C 条件下储存。

2.2.2 供试品溶液的制备 取各反应后的上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 收集滤液, 作为供试品溶液, 待上机分析。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为水-乙腈, 梯度洗脱程序: 0~5.8 min, 13%~22%乙腈; 5.8~18.75 min, 22%~38%乙腈; 18.75~22.05 min, 38%~40%乙腈; 22.05~23.55 min, 40%~45%乙腈; 23.55~24.25 min, 45%~58%乙腈; 24.25~30.00 min, 58%~62%乙腈; 30.00~30.75 min, 62%~80%乙腈; 30.75~37.75 min, 80%~100%乙腈; 37.75~40 min, 0%~87%水; 柱温 35 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 3 μL; 检测波长 203 nm。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品储备液, 按“2.2.3”项下色谱条件进行测定, 以色谱峰峰面积为纵坐标 (Y)、对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程、相关系数 (R²) 和线性范围分别为 20(S)-Rg₃ $Y=3.31 \times 10^6 X - 2.18 \times 10^4$, $R^2=0.999\ 4$, 线性范围 20.2~323.2 μg/mL; 20(R)-Rg₃ $Y=2.26 \times 10^6 X - 1.30 \times 10^4$, $R^2=0.999\ 4$, 线性范围 20.6~329.6 μg/mL; Rk₁ $Y=4.72 \times 10^6 X - 114$, $R^2=0.999\ 3$, 线性范围 20.8~332.8 μg/mL; Rg₅ $Y=8.66 \times 10^6 X - 4.82 \times 10^4$, $R^2=0.999\ 3$, 线性范围 20.6~329.6 μg/mL。

2.2.5 精密度试验 精密吸取同一质量浓度的混合对照品溶液 3 μL, 按“2.2.3”项下色谱条件进行分析, 连续进样 9 次, 测定 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 峰面积的 RSD 分别为 1.88%、2.33%、

1.67%、2.67%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 精密吸取同一转化后三七花提取液样品 6 份, 精密吸取 6 份供试品溶液 3 μL, 按“2.2.3”项下色谱条件进行分析, 测定 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 的峰面积, 通过回归方程计算转化后三七花样品中 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 的含量及 RSD。结果表明 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 质量浓度的 RSD 分别为 1.64%、1.33%、2.68%、1.44%, 表明本实验重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 精密吸取转化后三七花提取液样品 3 μL, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 按“2.2.3”项下色谱条件进行分析, 测定 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 峰面积的 RSD 值分别为 2.68%、1.73%、2.47%、2.39%。

2.2.8 加样回收率试验 精密吸取转化后三七花提取液样品 6 份, 加入适量的 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 对照品, 按照“2.2.2”项下方法操作, 按“2.2.3”项下色谱条件进行分析, 测定得到 4 种人参皂苷的平均加样回收率分别为 99.74%、99.83%、98.35%、99.64%, RSD 分别为 3.25%、2.87%、2.31%、3.89%, 表明加样回收率良好。

2.3 数据处理

用 GraphPad Prism 5 软件分析数据, 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验和单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著性差异具有统计学意义。

2.4 氨基酸种类对稀有人参皂苷转化含量的影响

选择 5 种氨基酸分别与三七花粉末进行反应。反应条件参考文献报道^[19], 即氨基酸浓度为 5%, 反应时间为 1 h, 液固比为 20 mL/g, 反应温度为 120 °C。使用 UPLC 测定 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 的含量, 所有样品重复 3 次。2 种酸性氨基酸和 3 种碱性氨基酸对 4 种稀有人参皂苷转化的影响如表 1 所示, Asp、Glu、His、Lys 和 Arg 对稀有人参皂苷的转化含量依次减弱, 其中, 酸性氨基酸对稀有人参皂苷群的转化含量显著高于碱性氨基酸 ($P < 0.05$)。Asp 和 Glu 对 4 种稀有人参皂苷的总转化含量分别为 (28.90±0.45) mg/g 和 (27.56±0.48) mg/g。这与夏娟^[15]的研究结果一致。与孙成鹏等^[13]报道的柠檬酸转化稀有人参皂苷转化含量相比, 可提高 1.28 倍, 因此最终选定 Asp 作为最佳催化剂。

2.5 反应条件优化

考察了反应温度 (80、90、100、110、120 °C)、Asp 浓度 (1%、3%、5%、10%、20%)、液固比 (10、

表 1 不同氨基酸种类对稀有人参皂苷转化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of different amino acids on conversion of rare ginsenosides ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

氨基酸	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rg ₃	Rk ₁	Rg ₅	总量
His	1.68±0.12	1.35±0.11	2.80±0.06	0.54±0.02	6.37±0.08 ^c
Lys	1.06±0.04	0.70±0.04	1.49±0.15	0.22±0.04	3.47±0.07 ^d
Glu	10.40±0.77	3.87±0.33	6.12±0.42	7.17±0.47	27.56±0.48 ^b
Asp	10.71±0.77	3.34±0.32	6.27±0.45	8.58±0.26	28.90±0.45 ^a
Arg	0.95±0.09	0.67±0.07	1.40±0.04	0.20±0.02	3.22±0.08 ^d

上标含相同字母表示无显著性差异, 否则表示有显著性差异 ($P < 0.05$)

The superscript containing the same letter means that there is no significant difference, otherwise it means that there is a significant difference ($P < 0.05$)

20、30、40、50 mL/g) 和反应时间 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h) 对稀有人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 转化含量的影响。根据上述单因素试验的结果, 设计了 4 因素 3 水平的正交试验对提取工艺进一步优化, 所有样品重复 3 次。

2.5.1 反应温度对稀有人参皂苷转化含量的影响 研究表明, 鲜人参加工为红参的过程中, 稀有人参皂苷的含量会明显增加, 表明温度是影响稀有人参皂苷形成的重要因素。本实验研究结果 (表 2) 表明, 随着温度的升高, 4 种稀有人参皂苷的转化含

量呈现逐渐升高又下降的趋势。在 110 °C 时, 4 种稀有人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 的转化含量最高, 分别为 (11.08±0.88)、(3.63±0.60)、(6.63±0.52)、(8.06±0.38) mg/g, 与其他组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。因此, 最终选定 110 °C 作为最优的反应温度。

2.5.2 Asp 浓度对稀有人参皂苷转化含量的影响 本实验研究结果表明 (表 3), 随氨基酸浓度的增加 (1%~5%), 稀有人参皂苷的转化含量随 Asp 浓度增加而增加。在 5% 时稀有人参皂苷的转化含量达

表 2 不同温度对稀有人参皂苷转化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of different temperatures on transformation of rare ginsenosides ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/°C	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rg ₃	Rk ₁	Rg ₅	总量
80	0.46±0.02	0.36±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	1.29±0.01 ^e
90	1.12±0.20	1.12±0.06	0.72±0.04	0.77±0.04	3.73±0.08 ^d
100	2.60±0.07	2.27±0.05	1.41±0.16	2.17±0.01	8.50±0.70 ^c
110	11.08±0.88	3.63±0.60	6.63±0.52	8.06±0.38	29.41±0.59 ^a
120	5.95±3.20	2.72±0.53	3.50±1.94	4.16±2.27	16.33±2.08 ^b

上标含不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)

The superscript containing the different letter means that there is a significant difference ($P < 0.05$)

表 3 不同 Asp 浓度对稀有人参皂苷转化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of different Asp addition on conversion of rare ginsenosides ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ASP 浓度/%	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rg ₃	Rk ₁	Rg ₅	总量
1	6.39±0.11	4.00±0.06	3.83±0.09	4.09±0.19	18.31±0.11 ^e
3	11.08±0.88	3.63±0.60	6.62±0.52	8.06±0.38	29.41±0.59 ^c
5	15.49±1.15	3.77±0.57	9.51±0.98	11.17±0.52	39.95±0.80 ^a
10	12.61±0.64	2.32±0.01	7.78±0.29	7.78±0.29	30.49±0.31 ^b
20	8.53±0.24	1.47±0.50	5.51±0.70	6.75±0.26	22.27±0.16 ^d

上标含不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)

The superscript containing the different letter means that there is a significant difference ($P < 0.05$)

到最高, 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 分别为 (15.49±1.15)、(3.77±0.57)、(9.51±0.98)、(11.17±0.52) mg/g, 并与其他组比较有显著性差异 ($P<0.05$)。当氨基酸浓度超过 5% 时, 稀有人参皂苷的转化含量逐渐减少。因此, 最终选定 Asp 最适宜的浓度为 5%。

2.5.3 液固比对稀有人参皂苷转化含量的影响 液固比对稀有人参皂苷群转化的影响如表 4 所示, 随着液固比的增加, 稀有人参皂苷的转化含量呈现先增加后降低的趋势, 在 20 mL/g 时转化含量达到最高, 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 分别为

(15.48±1.15)、(3.77±0.57)、(9.51±0.98)、(11.17±0.52) mg/g, 且显著高于其他组的转化含量 ($P<0.05$)。最终选定最适宜的液固比为 20 mL/g。

2.5.4 反应时间对稀有人参皂苷转化含量的影响 反应时间对稀有人参皂苷的影响如表 5 所示。稀有人参皂苷的含量随反应时间的增加而逐渐增加。当反应 2.0 h 时, 4 种稀有人参皂苷的转化含量达到最高, 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 分别为 (15.49±0.64)、(3.77±0.57)、(9.51±0.98)、(11.17±0.52) mg/g, 且显著高于其他组 ($P<0.05$)。当反应时间超过 2.0 h 后, 稀有人参皂苷的总量没

表 4 不同液固比对稀有人参皂苷转化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of different liquid-solid ratios on transformation of rare ginsenosides ($\bar{x} \pm s, n=3$)

液固比/(mL·g ⁻¹)	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rg ₃	Rk ₁	Rg ₅	总量
10	10.43±0.09	3.26±0.15	6.87±0.19	9.36±0.14	29.92±0.14 ^e
20	15.48±1.15	3.77±0.57	9.51±0.98	11.17±0.52	39.94±0.80 ^a
30	14.93±0.38	3.85±0.26	8.45±0.02	10.80±0.20	38.04±0.22 ^b
40	14.36±0.58	3.94±0.08	8.22±0.15	10.54±0.23	37.06±0.25 ^c
50	14.08±0.51	2.88±0.15	7.75±0.15	10.47±0.13	35.18±0.23 ^d

上标含不同字母表示有显著性差异 ($P<0.05$)

The superscript containing the different letter means that there is a significant difference ($P<0.05$)

表 5 不同反应时间对稀有人参皂苷转化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of different time on conversion of rare ginsenosides ($\bar{x} \pm s, n=3$)

反应时间/h	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	20(S)-Rg ₃	20(R)-Rg ₃	Rk ₁	Rg ₅	总量
0.5	6.43±0.11	4.05±0.16	3.95±0.18	4.25±0.21	18.53±0.25 ^e
1.0	12.10±0.78	3.83±0.72	6.75±0.58	8.08±0.39	30.02±0.31 ^c
1.5	10.43±1.15	3.25±0.15	6.88±0.20	9.36±0.14	29.92±0.14 ^d
2.0	15.49±0.64	3.77±0.57	9.51±0.98	11.17±0.52	39.95±0.80 ^a
2.5	14.93±0.24	3.85±0.26	8.45±0.02	10.80±0.20	38.04±0.22 ^a
3.0	14.36±0.56	3.94±0.08	8.22±0.15	10.54±0.23	37.06±0.25 ^b

上标含相同字母表示无显著性差异, 则表示有显著性差异 ($P<0.05$)

The superscript containing the same letter means that there is no significant difference, otherwise it means that there is a significant difference ($P<0.05$)

有继续增长。这可能是因为随着反应时间的增加, 底物被不断消耗, 并且有效成分在达到最大值后有效碰撞减少, 含量变化趋于平坦。考虑未来规模化生产, 低能耗高产率的原则, 最终选定 2.0 h 为最佳反应时间。

2.5.5 正交试验结果 由于多个因素对稀有人参皂苷的转化都存在一定的影响, 优化提取工艺是稀有人参皂苷转化的重要步骤。通过前期单因素试验结果, 以反应温度(A)、Asp 浓度(B)、液固比(C)、

反应时间(D)为考察因素, 每个因素设置 3 个水平, 进行采用 L₉(3⁴)正交试验, 正交试验设计与结果见表 6, 方差分析见表 7。由表 6 可见, 对稀有人参皂苷转化总转化含量的影响因素大小排列为 A>C>D>B, 最佳转化条件是 A₃B₂C₃D₂。由方差分析可知, 温度对转化含量影响显著, Asp 浓度、液固比、时间对转化含量影响不显著。因此最佳的转化条件是温度为 120 °C、Asp 浓度为 5%、液固比为 30 mL/g 和反应时间为 2.0 h。

表 6 三七花中稀有人参皂苷转化 L₉(3⁴)正交试验结果
Table 6 L₉(3⁴) orthogonal test results of conversion of rare ginsenosides from PNF

试验号	A/℃	B/%	C/(mL·g ⁻¹)	D/h	稀有人参皂苷 总量/(mg·g ⁻¹)
1	100 (1)	3 (1)	10 (1)	2.0 (1)	8.39
2	100 (1)	5 (2)	20 (2)	2.5 (2)	12.70
3	100 (1)	10 (3)	30 (3)	3.0 (3)	17.58
4	110 (2)	3 (1)	20 (2)	3.0 (3)	30.47
5	110 (2)	5 (2)	30 (3)	2.0 (1)	39.41
6	110 (2)	10 (3)	10 (1)	2.5 (2)	39.15
7	120 (3)	3 (1)	30 (3)	2.5 (2)	46.84
8	120 (3)	5 (2)	10 (1)	3.0 (3)	43.10
9	120 (3)	10 (3)	20 (2)	2.0 (1)	33.97
K ₁	38.67	85.70	90.64	81.77	
K ₂	109.03	95.21	77.14	98.69	
K ₃	123.91	90.70	103.83	91.15	
R	85.24	9.51	26.69	16.92	

表 7 正交试验方差分析
Table 7 ANOVA of orthogonal test

误差来源	平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 381.978 0	2	91.602 5	P<0.05
B (误差)	15.086 7	2	1.000 0	
C	118.731 4	2	7.869 9	
D	47.902 5	2	3.175 1	

2.6 结果验证

按照正交试验筛选出的最优条件 A₃B₂C₃D₂ 进行验证, 重复 5 次, 结果显示, 转化后 4 种稀有人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 的转化含量分别为 (17.80±0.43)、(5.40±0.64)、(10.62±0.68)、(13.10±0.22) mg/g, 平均的总转化含量为 (47.12±0.52) mg/g, 表明本实验确定的稀有人参皂苷的转化方法稳定且转化效率高。三七花皂苷转化前后对比图如图 1 所示。

2.7 转化前后三七花提取物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞活力的影响

据现有文献报道, 三七花对耳廓炎症、渗出性炎症以及小鼠或大鼠踝关节肿胀、足肿胀等均有抑制作用^[19-21]。并能显著抗 5-羟色胺、组胺及缓激肽所致大鼠皮肤毛细血管通透性增加, 还可减少炎症渗出物中的 PGE 含量^[22-23]。说明三七花具有良好的消肿抗炎功效。而稀有人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-

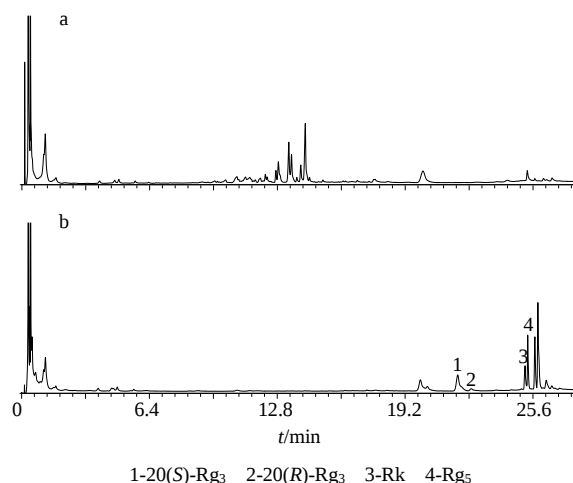


图 1 三七花转化前 (a)、后 (b) 人参皂苷 UPLC 对比图
Fig. 1 UPLC comparison of PNF before (a) and after (b) ginsenoside transformation

Rg₃、Rk₁、Rg₅ 对于炎症反应也有显著抑制^[24-25]。因此, 对比转化前后三七花提取物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞的炎症反应。

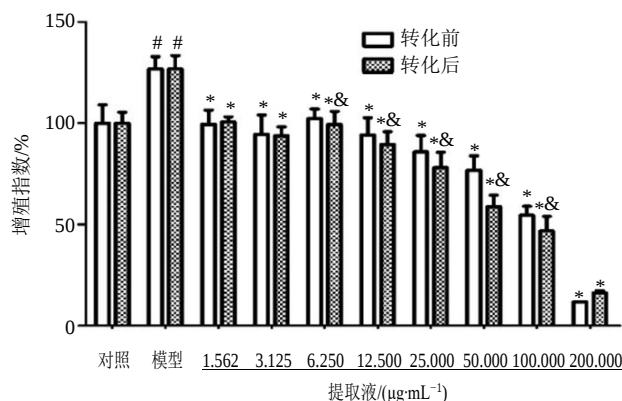
RAW264.7 小鼠巨噬细胞用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清, 链霉素和青霉素总含量为 1% 的双抗) 培养传代, 培养箱设置条件为 37 ℃、5% CO₂。将 RAW264.7 细胞以 2×10⁴/孔的密度接种于 96 孔板上, 培养 24 h 后进行分组处理, 正常组: 不做任何处理, 正常培养 12 h, 炎症模型组: 1 μg/mL LPS 持续刺激细胞 12 h, 转化前后三七花提取液处理组: 1 μg/mL LPS 和提取液 (1.562、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000 μg/mL) 共同处理细胞 12 h。12 h 后每孔加入 10 μL CCK-8, 孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 计算增殖指数。

$$\text{增殖指数} = A_{\text{处理}} / A_{\text{对照}}$$

由图 2 可知, 与对照组相比, LPS 显著促进巨噬细胞的增殖 (P<0.05), 与 LPS 组相比, 转化后三七花提取物在质量浓度为 1.56~200 μg/mL, 对 LPS 诱导的 RAW264.7 的增殖具有显著抑制作用 (P<0.05)。在质量浓度 ≥6.250 μg/mL 时, 与三七花提取物相比, 转化后三七花提取物更能显著抑制 LPS 引起 RAW264.7 细胞的增殖 (P<0.05)。

2.8 转化前后三七花提取物对 RAW264.7 细胞 NO 分泌的影响

NO 在炎症反应过程中大量表达, 是炎症发病机制中的重要信使^[26]。RAW264.7 细胞以 8×10⁴/孔的密度接种于 96 孔板, 培养 24 h, 1 μg/mL LPS 刺



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$; 与转化前比较: & $P < 0.05$; 下同

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group; & $P < 0.05$ vs before transformation; same as below

图2 三七花提取物转化前后对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of PNF extract on phagocytic activity of RAW264.7 cells stimulated by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

激细胞 2 h, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和提取液 (1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 共同处理细胞 12 h, 收集细胞上清液, 按 NO 试剂盒说明操作, 测定细胞上清液中 NO 的含量。

由图 3 可知, 与对照组相比, 模型组 RAW264.7 细胞 NO 分泌水平显著升高 ($P < 0.05$)。转化前三七花提取物对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 NO 具有显著抑制作用的最低质量浓度为 3.125 $\mu\text{g/mL}$, 而转化后三七花提取物具有显著抑制作用的最低质量浓度为 1.562 $\mu\text{g/mL}$ 。并且在相同质量浓度中, 转化后三七花提取物更能显著抑制 LPS 引起 RAW264.7 细胞中 NO 的分泌 ($P < 0.05$)。

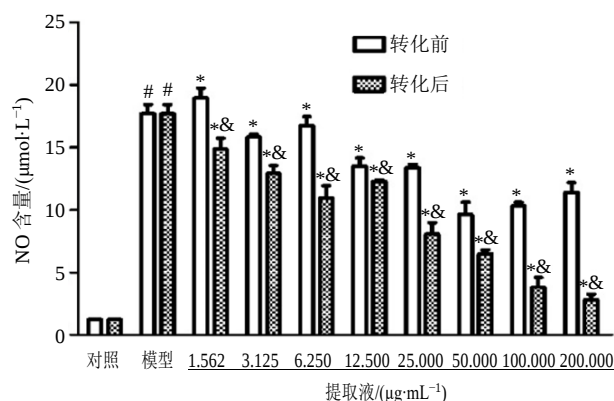


图3 三七花提取物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of extract from PNF on release of NO from RAW264.7 cells stimulated by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.9 转化前后三七花提取物对 RAW264.7 细胞白介素-6 (IL-6) 分泌的影响

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 在 LPS 的诱导下会释放出大量的促炎因子 IL-6, 细胞中促炎因子分泌的增加可加速炎症的发展^[27]。RAW264.7 细胞以 8×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 培养 24 h, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激细胞 2 h, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 和提取液 (1.56、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 共同处理细胞 12 h, 收集细胞上清液, 按 IL-6 ELISA 试剂盒说明操作, 测定细胞上清液中 IL-6 的含量。

从如图 4 可以看出, 模型组 IL-6 的分泌显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 转化前三七花提取物在质量浓度大于 3.125 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可显著抑制 IL-6 的释放 ($P < 0.05$), 而转化后三七花提取物在质量浓度大于 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 时, 就可以显著抑制促炎因子 IL-6 的释放 ($P < 0.05$)。在相同质量浓度中, 转化后三七花提取物对 IL-6 抑制率显著高于转化前三七花提取物 ($P < 0.05$)。

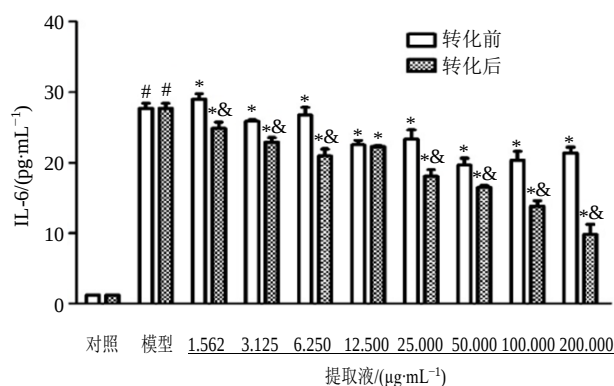


图4 三七花提取物对 LPS 刺激 RAW264.7 细胞 IL-6 释放量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of PNF extract on release of IL-6 from RAW264.7 cells stimulated by LPS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

本研究添加食品级氨基酸, 通过单因素实验和正交试验探索了一种安全高效绿色的将三七花中原有人参皂苷转化为稀有人参皂苷的方法。结果表明, 添加 Asp 可以显著增加三七花中稀有人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃、Rk₁、Rg₅ 的含量, 这可能是因为 Asp 是酸性氨基酸, 在热裂解的条件下, 较高浓度的 H⁺ 和较多的二醇组皂苷显著促进了水解反应的发生。人参二醇组皂苷在 C-20 位的糖苷键断裂生成中间产物 20(S)-Rg₃ 和 20(R)-Rg₃, 再进一步脱水水解成稀有人参皂苷 Rk₁ 和 Rg₅, 这大大促进

了稀有人参皂苷的生成。

LPS 是全身炎症反应综合症的一种重要致病因子, 可与巨噬细胞表面抗原识别受体相结合而刺激细胞^[28-29], 继而激活多条炎症通路, 产生一系列促炎因子, 引起机体严重的炎症反应^[30-32]。适度的巨噬细胞增殖可提高机体抵御外界和修复机体损伤的能力, 而过度刺激会引起细胞的免疫反应, 导致细胞凋亡和机体损伤。因此本实验运用此炎症模型对转化后三七花与转化前抗炎效果进行比较, 探究转化后三七花的药理作用。在转化前后的三七花提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞活性、NO 的分泌和炎症因子 IL-6 的释放量的影响进行了考察中可以看出, 与三七花提取物相比较, 转化后三七花提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应有更好的抑制作用 ($P < 0.05$)。这有可能是因为稀有皂苷的增加, 根据文献记载稀有人参皂苷 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃ 可通过调节 iNOS 的表达抑制 NO 的产生, 抑制 LPS 或 UV 照射诱导的细胞 ROS 水平^[24]; 人参皂苷 Rg₅ 可以通过抑制 LPS 与巨噬细胞 Toll 样受体 (TLR) -4 结合而减轻肺部炎症^[33]; Rk₁ 和 Rg₅ 对 TNF- α /IFN- γ -和 LPS 诱导的趋化因子和细胞因子的产生有明显的抑制和下调作用, 抑制这些介导因子的产生可降低 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 和 ROS 的生成^[25]。因此, 稀有皂苷的增加可能是转化后三七花对于 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应有显著抑制的原因。但其抗炎机理有待进一步验证。本论文对稀有人参皂苷的转化提供了新的绿色、安全和高效率的转化方法, 为三七花的生产与利用提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 12-13.
- [2] 甘昌敏, 陈洪熠, 龚云麒. 三七花化学成分的研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2019, 40(9): 73-75.
- [3] 高明菊, 崔秀明, 曾江, 等. 三七花的研究进展 [J]. 人参研究, 2009, 21(2): 5-7.
- [4] Zhang S Q, Chen C, Lu W X, et al. Phytochemistry, pharmacology, and clinical use of *Panax notoginseng* flowers buds [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(11): 2155-2163.
- [5] 廖文琴, 可燕, 蒋嘉烨, 等. 三七花总皂苷抑制人乳腺癌细胞侵袭的体外研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(5): 77-81.
- [6] 田会东, 郭丽娜, 王单单, 等. 三七主要活性成分作用机制的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 72-77.
- [7] 可燕, 蒋嘉烨, 王现珍, 等. 三七根及花总皂苷抗肿瘤细胞诱导的血小板聚集研究 [J]. 中药材, 2010, 33(1): 96-99.
- [8] 曾露露, 赵婷, 李莹, 等. 高效液相色谱法同时测定黑参中 4 种稀有人参皂苷的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(12): 1069-1072.
- [9] Xu D, Wang C, Zhao W, et al. Antidepressant-like effects of ginsenoside Rg₅ in mice: Involving of hippocampus BDNF signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 645: 97-105.
- [10] Xiao N, Lou M D, Lu Y T, et al. Ginsenoside Rg₅ attenuates hepatic glucagon response via suppression of succinate-associated HIF-1 α induction in HFD-fed mice [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(6): 1084-1093.
- [11] Yao C J, Chow J M, Chuang S E, et al. Induction of Forkhead Class box O3a and apoptosis by a standardized ginsenoside formulation, KG-135, is potentiated by autophagy blockade in A549 human lung cancer cells [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(3): 247-256.
- [12] Jo S K, Kim I S, Yoon K S, et al. Preparation of ginsenosides Rg₃, Rk₁, and Rg₅-selectively enriched ginsengs by a simple steaming process [J]. *Eur Food Res Technol*, 2015, 240(1): 251-256.
- [13] 孙成鹏, 高维平, 赵宝中, 等. 柠檬催化转化原人参二醇组皂苷制备人参皂苷 Rg₅ 的初步研究 [J]. 中成药, 2013, 35(12): 2694-2698.
- [14] 赵钰, 刘春莹, 赵妍, 等. 人参果浆中人参皂苷 Re 的提取和生物转化 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 25-30.
- [15] 夏娟. 酸性氨基酸催化水解制备稀有人参皂苷的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [16] Wang C Z, Zhang B, Song W X, et al. Steamed American ginseng berry: Ginsenoside analyses and anticancer activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(26): 9936-9942.
- [17] Liu Z, Xia J, Wang C Z, et al. Remarkable impact of acidic ginsenosides and organic acids on ginsenoside transformation from fresh ginseng to red ginseng [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(26): 5389-5399.
- [18] 朱素英. 响应面法优化三七花多酚的提取工艺及其抗氧化性分析 [J]. 食品科学, 2015, 36(10): 65-69.
- [19] 李先. 三七花皂苷的化学成分研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [20] Yoshikawa M, Morikawa T, Kashima Y, et al. Structures of new dammarane-type triterpene saponins from the flower buds of *Panax notoginseng* and hepatoprotective effects of principal ginseng saponins [J]. *J Nat Prod*,

- 2003, 66(7): 922-927.
- [21] 曹敏, 楼丹飞, 王国印, 等. 三七花总皂苷对自发性高血压大鼠的降压作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(2): 367-369.
- [22] Wu Z G, Ameer K, Jiang G H. Effects of superfine grinding on the physicochemical properties and antioxidant activities of Sanchi (*Panax notoginseng*) flower powders [J]. *J Food Sci Technol*, 2020: 1-12.
- [23] Li F, Lv C N, Li Q, et al. Chemical and bioactive comparison of flowers of *Panax ginseng* Meyer, *Panax quinquefolius* L., and *Panax notoginseng* Burk. [J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(4): 487-495.
- [24] Yoon S J, Park J Y, Choi S, et al. Ginsenoside Rg₃ regulates S-nitrosylation of the NLRP3 inflammasome via suppression of iNOS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 1184-1189.
- [25] Ahn S, Siddiqi M H, Aceituno V C, et al. Ginsenoside Rg₅: Rk1 attenuates TNF- α /IFN- γ -induced production of Thymus-and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) and LPS-induced NO production via downregulation of NF- κ B/p38 MAPK/STAT1 signaling in human keratinocytes and macrophages [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2016, 52(3): 287-295.
- [26] 文祎, 王振, 蔡淑娟, 等. 铁观音茶提取物对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的抑制作用及机制 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 294-299.
- [27] 林杨, 杨平, 张琦, 等. 蓝莓花色苷对脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症及结肠癌细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 食品科学 2020, 41(13): 133-140.
- [28] 刘杰, 耿晓照, 刘亚平, 等. 三七花皂甙抗炎作用的实验研究 [J]. 中药通报, 1985, 10(10): 41-43.
- [29] 刘英. 三七地上部分新食品原料开发研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2015.
- [30] Kim Y S, Ahn C B, Je J Y. Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS-induced RAW264.7 macrophage via NF- κ B and MAPK pathways [J]. *Food Chem*, 2016, 202: 9-14.
- [31] 王翠芳, 王特日格乐, 杜红喜, 等. 沙葱总黄酮水洗组分的体外抗炎活性 [J]. 食品科学, 2019, 40(23): 163-169.
- [32] 刘志, 夏娟, 李伟, 等. 天冬氨酸降解人参二醇组皂苷及其美拉德反应产物的抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2018, 39(7): 20-26.
- [33] Kim T W, Joh E H, Kim B, et al. Ginsenoside Rg₅ ameliorates lung inflammation in mice by inhibiting the binding of LPS to toll-like receptor-4 on macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1): 110-116.

[责任编辑 郑礼胜]