

薬用人参成分ジンセノサイドのヒト腸内フローラによる代謝

金岡 又雄, 赤尾 光昭, 小橋 恭一*

富山医科薬科大学薬学部衛生化学

Metabolism of ginseng saponins, ginsenosides, by human intestinal flora

Matao KANAOKA, Teruaki AKAO and Kyoichi KOBASHI*

Hygienic and Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received August 2, 1994. Accepted October 12, 1994.)

Abstract

Ginsenoside Rb₁ (G-Rb₁) and ginsenoside Rg₁ (G-Rg₁), major components of ginseng saponins, were cultured with fresh human feces under anaerobic conditions. G-Rb₁ was metabolized rapidly within 8 hours, but G-Rg₁ was metabolized slowly within 2 days by the successive hydrolysis. From the identified products, metabolic pathways of G-Rb₁ and G-Rg₁ by human intestinal bacteria were elucidated as follows: G-Rb₁→G-Rd→G-F₂→Compound K→20(S) Ppd and G-Rg₁→G-Rh₁→20(S) Ppt, respectively.

Key words ginseng saponin, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rg₁, metabolism, human intestinal bacteria.

Abbreviations C-K, compound K; G-F₁, ginsenoside F₁; G-F₂, ginsenoside F₂; G-Rb₁, ginsenoside Rb₁; G-Rd, ginsenoside Rd; G-Rg₁, ginsenoside Rg₁; 20(S)G-Rg₃, 20(S) ginsenoside Rg₃; G-Rh₁, ginsenoside Rh₁; HPLC, high performance liquid chromatography; 20(S)Ppd, 20(S) protopanaxadiol; 20(S)Ppt, 20(S) protopanaxatriol; TLC, thin layer chromatography; EIA, enzyme immunoassay.

緒 言

分析機器の発達とともに和漢薬の主成分はもちろん、微量成分の構造が急速に解明されつつある。しかし薬効を示す成分の解明は遅れている。これは *in vitro* で活性を示す成分が *in vivo* で活性を示さず、逆に *in vitro* で活性がなくても *in vivo* で活性を示す場合もあり、活性成分を特定することを困難にしているからである。特に和漢薬は経口的に投与されるので、消化管、中でも腸内細菌によってその成分が代謝されて活性型に変化し、その薬効を発現することが、甘草の glycyrrhizin およびセンナの sennoside 等の配糖体成分について明らかにされている¹⁾。

紅参末を服用したヒトの血清中には, ginsenoside Rb₁ (G-Rb₁) は EIA²⁾ および HPLC 法のいずれでも検出

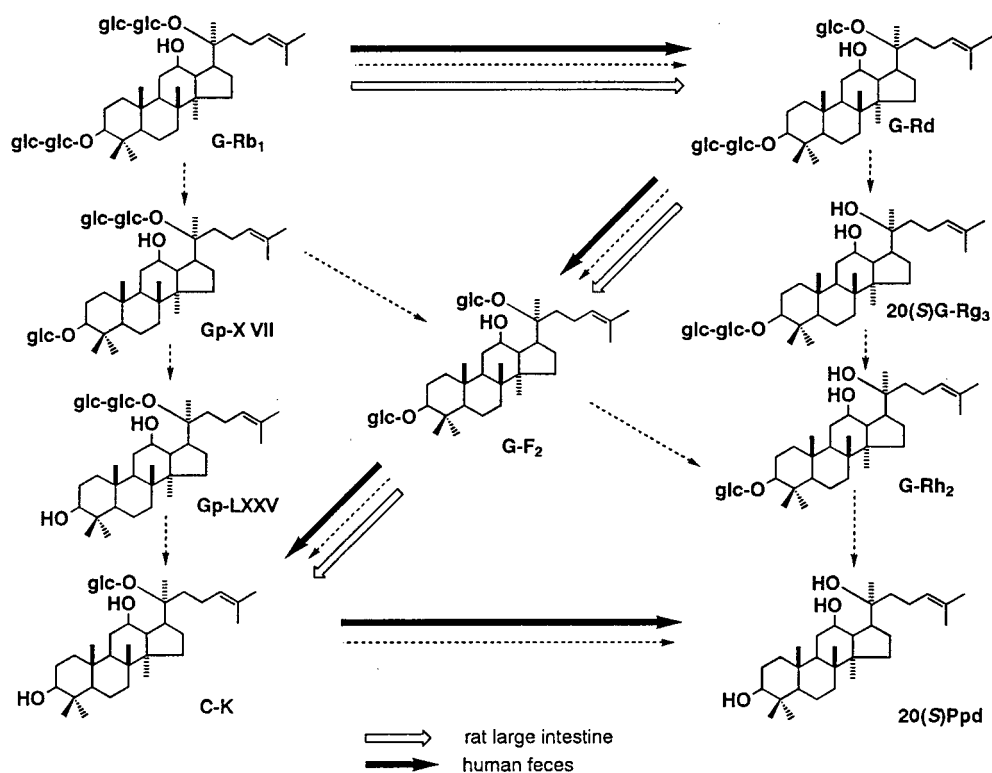
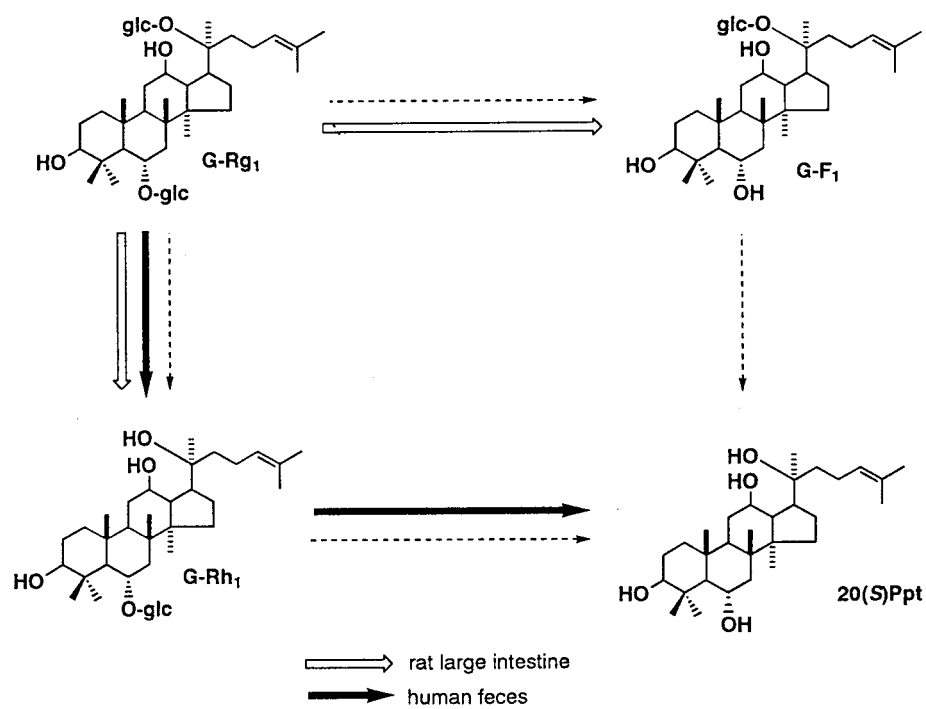
されず, G-Rb₁ はそのまま吸収されることはほとんどないと推定される³⁾。G-Rb₁ のような配糖体は腸内細菌によって代謝され, その代謝物が吸収されと考えられる。この代謝物の EIA を開発し, これを用いて真の有効成分の体内動態を検討する目的で本研究に着手した。

紅参末のサポニン分画の主成分である G-Rb₁ (proto-panaxadiol, Ppd 系) と G-Rg₁ (proto-panaxatriol, Ppt 系) については, Chart 1 および Chart 2 に点線で示す加水分解経路が考えられる。本研究では G-Rb₁ および G-Rg₁ が嫌気的条件下, *in vitro* でヒト腸内細菌叢によってどのように代謝されるかを検討した。

材料と方法

(1) 材料: 基質として用いた G-Rb₁ および G-Rg₁, 標品として用いた G-Rd, 20(S) G-Rg₃, G-Rh₁, 20(R) G-

*〒930-01 富山市杉谷2630
2630 Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-01, Japan

Chart 1 Metabolic pathway of G-Rb₁Chart 2 Metabolic pathway of G-Rg₁

Rh₁ は韓国煙草人蔘公社より供されたものを用いた。G-F₂ および C-K⁴⁾ は G-Rb₁ を naringinase (シグマ製) で加水分解して調製した。20(S) Ppd⁵⁾ は G-Rb₁ を, 20(S) Ppt⁶⁾ は G-Rg₁ をそれぞれ過よう素酸ナトリウムで処理して得た。また 20(R) Ppd⁷⁾ および 20(R) Ppt⁶⁾ は G-Rb₁ および G-Rg₁ を塩酸で加水分解後, カリウム-tert ブトキシド処理して得た。

(2) 糞便懸濁液の調製: 健康成人 (23 歳, 男子) の新鮮糞便 2.4 g を希釈用塩溶液 9.6 ml で 5 倍希釈し, 懸濁液を調製した。希釈用塩溶液は 0.78% K₂HPO₄ 溶液, 37.5 ml; 0.47% KH₂PO₄, 1.18% NaCl, 1.20% (NH₄)₂SO₄, 0.12% CaCl₂, 0.25% MgSO₄ · H₂O を含む溶液, 37.5 ml; 0.1% resazurin 水溶液, 1 ml; L-cysteine HCl · H₂O, 0.5 g; 2.5% L-ascorbic acid 水溶液, 2 ml; 8% Na₂CO₃ 溶液, 50 ml; 寒天, 0.5 g を精製水 860 ml に溶解し, CO₂ ガスを液内に通気して酸素を除去後, オートクレーブ滅菌して調製した。

(3) 培養: G-Rb₁ 11.1 mg または G-Rg₁ 8 mg に GAM ブイヨン液 9 ml と上記糞便懸濁液 1 ml を加えて嫌気ボックス中 37°C で培養を行った。

(4) 抽出と精製: 培養液から経時的 (0, 8, 24, 36, 48 時間後に, G-Rg₁ では更に 60, 72 時間後に) に一定量をサンプリングし n-ブタノールで抽出, その 2~10 μl を

下記の展開溶媒系で TLC, 調製 TLC および HPLC を行って分離同定した。TLC プレートとして Merck 60 F₂₅₄ silica gel (厚さ 0.25 mm, 0.5 mm) を使用した。展開溶媒として G-Rb₁ およびその代謝物の分離には CHCl₃: MeOH: H₂O (65: 35: 10, 下層) を, G-Rg₁ およびその代謝物の分離には CHCl₃: MeOH (4: 1) を用いた。展開後リンモリブデン酸試薬により発色し, 島津クロマトスキャナー-CS-910 (λs=600 nm) を用いて, それぞれ G-Rb₁, G-Rg₁ およびこれらの代謝物の標準品で検量線を作成し定量した。

(5) HPLC の条件: 機器, 島津 LC-6A; 検出, 203 nm; カラム, Nucleosil 5C₁₈ 150×4.6 mm φ; 流速, 1 ml/min; 温度, 40°C。

移動相およびそれぞれの化合物の保持時間 (t_R) を以下に示す。68% CH₃CN-H₂O: 20(S) Ppd (19.2), 20(R) Ppd (20.3). 50% CH₃CN-H₂O: C-K (14.1), 20(R) Rh₂ (16.6). 42% CH₃CN-H₂O: G-F₂ (10.1), 20(S) G-Rg₃ (13.9), G-Rg₃ (15.1). 32% CH₃CN-H₂O: G-Rh₁ (13.6), 20(R) G-Rh₁ (14.9), G-F₁ (18.3), G-Rd (20.5)。

結 果

G-Rb₁ はヒト糞便懸濁液との培養により, 8 時間以内

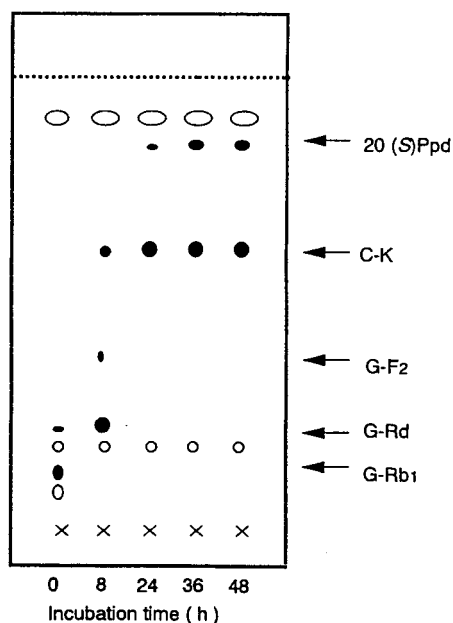


Fig. 1 (a) TLC profile of G-Rb₁ and its metabolites.

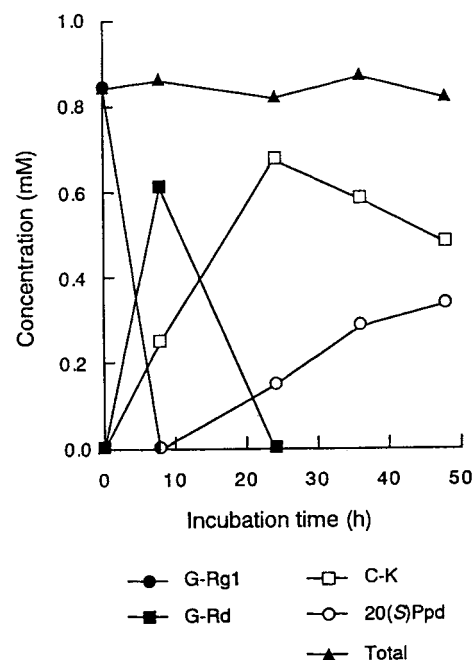


Fig. 1 (b) Metabolism of G-Rb₁ by human intestinal flora.

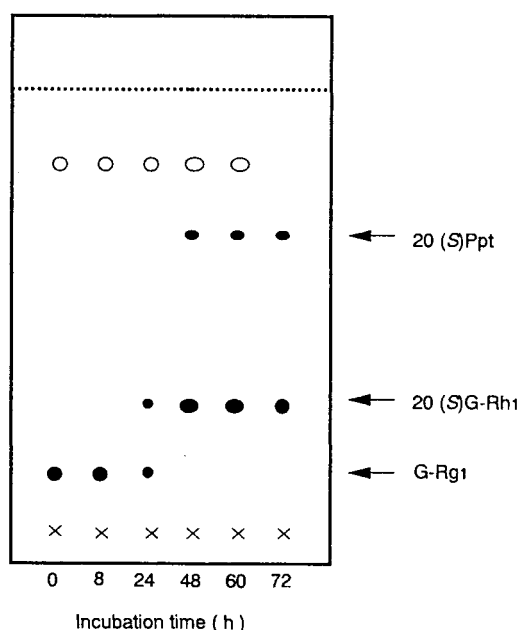


Fig. 2 (a) TLC profile of G-Rg₁ and its metabolites.

で完全に消滅し、速やかに代謝された。その8時間培養後の代謝生成物を TLC で分離した結果、Fig. 1 (a) に示すように主として G-Rd および C-K に代謝された。また 20(S)G-Rg₃ または G-F₂ に相当する小さなスポットは調製 TLC で分離後、HPLC により G-F₂ と同定した。更に 24 時間で G-Rd が消滅し、Ppd が出現した。この代謝物の経時の変化を Fig. 1 (b) に示した。G-Rb₁ はまず G-Rd へ、更に G-F₂、次いで C-K を経て Ppd に代謝されることが明らかになった。48 時間培養後には C-K と Ppd がほぼ同モル生成した。その後はゆっくりではあるが、最終的には Ppd にまで代謝されると思われる。生成物である Ppd は HPLC により分析した結果 20 S 体であったことから、G-Rb₁ は異性化を伴わず加水分解を受けたことが明らかになった。

培養時における糞便添加量の多少によって代謝様式に差は認められなかったが、添加量を多くすると代謝速度が大きくなった。

一方、G-Rg₁ は G-Rb₁ と同一条件下でのヒト糞便懸濁液との培養によって代謝され難く、Fig. 2 (a) の TLC および Fig. 2 (b) の代謝物の経時の変化量が示すように 24 時間後に減少し、48 時間後に消失した。G-Rh₁ は 24 時間後に出現し、48 時間後に最大となり、その後緩やかに減少した。Ppt は 48 時間後に出現し、その後徐々に増加したが、G-Rg₁ の約 20% が Ppt に変化したにすぎな

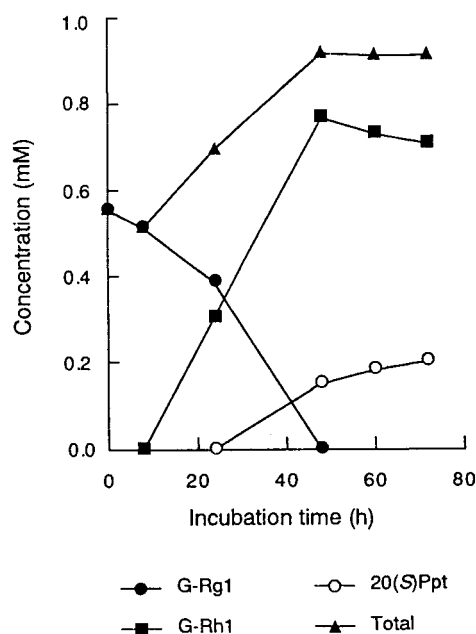


Fig. 2 (b) Metabolism of G-Rg₁ by human intestinal flora.

かった。G-Rh₁ および Ppt は HPLC により分析した結果 20 S 体であったことから、G-Rb₁ と同様に異性化を伴わず G-Rg₁ が加水分解を受けたことが明らかになった。

考 察

ヒト腸内フローラによる嫌気的培養条件下での代謝生成物の経時の変化から G-Rb₁ は Chart 1 の実線 (→) で示すように、速やかに G-Rd → G-F₂ → C-K に加水分解されることが明らかになった。この経路は Chart 1 の白線 (⇒) で示した滝野ら⁸⁾ のラットによる報告とおなじであるが、ヒト腸内フローラでは C-K はゆっくりではあるが、更に 20(S)Ppt にまで変換された。本実験ではヒト糞便を 50 倍希釈して培養しているので、体内ではより速やかに代謝が進行すると考えられ、ヒトが G-Rb₁ (紅蓼末) を服用した際、腸内ではかなりの量の 20(S)Ppt が生成しているものと考えられる。

一方、G-Rg₁ の代謝速度は、G-Rb₁ に比べてかなり遅いが、まず 20 位のグルコースが水解され、続いて非常にゆっくりであるが、6 位グルコースも水解され 20(S)Ppt を得た。しかし滝野ら⁹⁾ はラットでの *in vivo* および *in vitro* 主代謝物として 20 位あるいは 6 位のグルコースが水解された G-Rh₁ および G-F₁ を得ている (Chart 2, 白

線)。ヒト腸内フローラによる *in vitro* 代謝では G-Rh₁ とアグリコンである 20(S)Ppt が得られた (Chart 2, 実線)。ラットとヒトでの G-Rg₁ の体内動態に違いがあると思われる。

ヒトに紅蓼末を経口投与, 血中に G-Rb₁ が検出されなかったことから,³⁾ 上記のいずれかの腸内フローラ代謝物が吸収され薬効を現していると考えられる。我々は, 今後これら代謝物の EIA を確立して, G-Rb₁ および G-Rg₁ の体内動態を検討する計画である。

謝 辞

研究にご協力いただいた大森千恵子, 山下秀樹の両氏に, 論文作成にあたりご協力いただいた牧野圭子氏に深謝します。本研究は薬用人参研究会の助成を受けて行われた。

References

- 1) Akao, T., Hattori, M., Namba, T. and Kobashi, K.: Metabolic activation of crude drug components by intestinal bacterial enzymes. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 9, 1-13, 1992.
- 2) Kanaoka, M., Kato, H., Shimada, F. and Yano, S.: Studies on the enzyme immunoassay of bio-active constituents contained in oriental medicinal drugs. VI. Enzyme immunoassay of ginsenoside Rb₁ from *Panax ginseng*. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 314-317, 1992.
- 3) 加藤弘巳, 島田文恵, 矢野三郎, 金岡又尾: 薬用人参投与後の Ginsenoside Rb₁ の血中濃度測定を試み, 第 5 回薬用人参研究会, 講演要旨集, p.23, 1990.
- 4) Koizumi, H., Sanada, S., Ida, Y. and Shoji, J.: Studies on the saponins of ginseng. IV. On the structure and enzymatic hydrolysis of ginsenoside-Ra₁. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 2393-2398, 1982.
- 5) Nagai, M., Ando, T., Tanaka, N., Tanaka, O. and Shibata, S.: Chemical studies on the Oriental plant drugs. XXVIII. Saponins and sapogenins of ginseng: Stereochemistry of the sapogenin of ginsenosides-Rb₁, -Rb₂, and -Rc. *Chem. Pharm. Bull.* 20, 1212-1216, 1972.
- 6) Nagai, Y., Tanaka, O. and Shibata, S.: Chemical studies on the Oriental plant drugs. XXIV. Structure of ginsenoside-Rg₁, a neutral saponin of ginseng root. *Tetrahedron* 27, 881-892, 1971.
- 7) Shibata, S., Tanaka, O., Ando, T., Sado, M., Tsushima, S. and Ohsawa, T.: Chemical studies on Oriental plant drugs. XIV. Protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng saponins. *Chem. Pharm. Bull.* 14, 595-600, 1966.
- 8) Karikura, M., Miyase, T., Tanizawa, H., Taniyama, T. and Takino, Y.: Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₁ and -Rb₂ in the digestive tract of rats. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2357-2361, 1991.
- 9) Odani, T., Tanizawa, H. and Takino, Y.: Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponin. IV. Decomposition of ginsenoside -Rg₁ and -Rb₁ in the digestive tract of rats. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 3691-3697, 1983.