

红参水提物中人参三萜在人源肠 Caco-2 细胞单层模型上的吸收转运研究

杨秀伟*, 周琪乐, 杨雁芳, 张友波, 徐 崑

北京大学药学院 天然药物学系 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要: **目的** 研究红参水提物中人参三萜在人小肠上皮细胞的吸收特性。**方法** 利用人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型测试红参水提物中人参三萜从顶端 (apical, AP) 侧到底端 (basolateral, BL) 侧、BL 侧到 AP 侧 2 个方向的转运过程。应用色谱-质谱技术对人参三萜进行定量分析, 计算转运参数和表观渗透系数 (P_{app})。**结果** 在 Caco-2 细胞单层模型中, 发现大多数人参三萜皂苷吸收程度中等或不良, 但是, 唯有 2 个苷元 20(S)-原人参三醇 (protopanaxatriol, PPT) 和 20(R)-PPT 吸收程度良好 (P_{app} 值接近 1×10^{-5} cm/s); 此外, 还发现人参三萜皂苷 20(S)-G-Rh₁、20(R)-G-Rh₁、G-Rk₃、G-Rh₄、PG-RT₅ 这 5 个单糖苷的 P_{app} 值皆在 1×10^{-6} cm/s 数量级, 提示它们吸收程度中等。所考察的 42 个人参三萜其中包括 8 对 R、S 差向异构体, 结果显示 R/S 异构体的吸收情况并没有显著性差异。**结论** 随着人参三萜皂苷苷元上糖取代基数目的增多, 其 P_{app} 值越来越小, 提示多糖基的人参三萜皂苷在体内很难被吸收, 可能是前药。

关键词: 红参; 人源 Caco-2 细胞单层; 人参三萜; 肠吸收; 表观渗透系数

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)12-3630-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.020

Absorption and transport characteristics of ginseng triterpenoids from *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra* water extract in a model of Caco-2 cell monolayer

YANG Xiu-wei, ZHOU Qi-le, YANG Yan-fang, ZHANG You-bo, XU Wei

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs (Peking University), Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

Abstract: Objective To study the absorption and transport characteristics of ginseng triterpenoids from the Hongshen (*Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*) water extract in human intestinal epithelial. **Methods** Caco-2 (the human colon adenocarcinoma cell lines) cell monolayer was used as an intestinal epithelial cell model. The permeability of the ginseng triterpenoids in the *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra* water extract from apical side (AP side) to basolateral side (BL side) or from BL side to AP side was evaluated. The concentration of the ginseng triterpenoids was measured by LC-MS technological method. Transport parameters and permeability coefficients (P_{app}) were then calculated. **Results** In human Caco-2 cell monolayer model, it was revealed that most ginsenosides were moderately or poorly absorbed compounds, whereas only two aglycone, 20(S)-protopanaxatriol (PPT) and 20(R)-PPT, exhibited as well absorbed compounds (P_{app} values were near 1×10^{-5} cm/s). In addition, the P_{app} values of five monoglycosides including 20(S)-G-Rh₁, 20(R)-G-Rh₁, G-Rk₃, G-Rh₄, and PG-RT₅ in the bi-directional transport were quantitative degree of 1×10^{-6} cm/s, which were defined as moderately absorbed compounds. Among them, there were eight pairs of R and S isomers, whereas there was no significant difference on their trends in the bi-directional transport between these R and S isomers. **Conclusion** With the increase of glycosyl substitution group at ginsenoside aglycone, the P_{app} value of ginsenoside becomes smaller and smaller, which indicated that ginsenosides with polyglycosyl group are difficult to be absorbed *in vivo*. These ginsenosides could be prodrugs.

Key words: *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra*; human Caco-2 cell monolayers; ginseng triterpenoids; intestinal absorption; apparent permeability coefficients

口服给药是临床上最常用的给药方式, 具有相对安全以及患者依从性好等优势。药物经口服进入

体内主要是通过小肠吸收, 而肠上皮细胞屏障及酶系统是决定药物吸收程度的关键因素之一。从 20

收稿日期: 2020-10-11

基金项目: 国家自然科学基金 (81973446)

*通信作者: 杨秀伟 (1958—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物化学和药物的 ADMET/Act. 研究平台建设。Tel: (010)82801569

E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

世纪 80 年代, 国外开始应用人结肠腺癌细胞系 (human colon adenocarcinoma cell line, Caco-2) 细胞建立药物肠吸收的体外模型, 目前已被广泛应用于药物的体外吸收评价研究。Caco-2 细胞来源于人体结肠腺癌细胞, 在培养条件下可自发进行上皮样分化并可形成紧密联结, 其形态学、标志酶的功能表达及渗透特征与小肠类似, 具有易于培养、同源性好、体外吸收实验重现性好等优点^[1]。

人参是驰名中外的大补中药之一, 最简单的用药形式是“独参汤”, 复杂的用药形式是通过辨证与其他中药配伍成复方应用。现代药理学研究表明, 人参中的三萜类成分, 包括其皂苷^[2], 几乎反映了人参的全部药理学作用^[3]。但有关红参中三萜类化合物的肠吸收评价研究甚少。众所周知, 中药发挥疗效是其多成分协同作用的结果, 单一活性成分的肠吸收不能完全反映单味药或其复方的肠吸收情况, 因此中药单味药或复方的肠吸收研究是必要的。针对中药提取物肠吸收转运后待测物富集难、微量成分难检测的问题, 本课题组建立了鼠尾胶原包被且给样量大的 6 孔板 Caco-2 细胞单层模型^[4]。为了从整体评价红参提取物复杂成分的肠吸收情况, 本研究采用国际上公认的可以模拟小肠上皮细胞的 Caco-2 细胞单层模型 (6 孔 Transwell 板), 对红参水煎液提取物的正丁醇萃取部位 (人参总皂苷部分) 进行体外小肠吸收转运评价研究, 探索红参中人参三萜类成分在红参整体给药方式下的肠吸收情况, 为红参的临床合理应用提供参考依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞

Caco-2 细胞株 (ATCC #HTB-37) 购自美国 ATCC (American Type Culture Collection)。

1.2 药品及主要试剂

红参样品由长春加一健康食品有限公司 (长春) 提供, 经北京大学药学院杨秀伟教授鉴定系由人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的根和根茎加工制成的红参, 凭证标本 (No. 20131201JLRG) 存放在北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室。

受试化合物对照品人参皂苷 (G)-Ra₁ (1)^[5]、G-Ra₂ (2)、G-Rb₁ (3)、G-Rb₂ (4)、G-Rb₃ (5)、G-Rc (6)、G-Rd (7)、G-Re (8)、G-Rg₁ (9)、G-Rg₅ (10)、G-Rg₆ (11)、G-Rg₉ (12)、G-Rh₄ (13)、G-Rk₁ (14)、G-Rk₃ (15)、G-Rs₁ (16)、G-Rs₂ (17)、G-Rs₄ (18)、G-F₄ (19)、G-Ro (20)、G-Ro 甲酯 (21)、

20-glu-G-Rf (22)、20(S)-G-Rf (23)、20(R)-G-Rf (24)、20(S)-G-Rg₂ (25)、20(R)-G-Rg₂ (26)、20(S)-G-Rg₃ (27)、20(R)-G-Rg₃ (28)、20(S)-G-Rh₁ (29)、20(R)-G-Rh₁ (30)、20(S)-G-Rs₃ (31)、20(R)-G-Rs₃ (32)、20(S)-NG-R₂ (33)、20(R)-NG-R₂ (34)、NG-R₁ (35)^[6]、20(S)-G-Rf₂ (36)、20(R)-G-Rf₂ (37)、20(S)-PPT (38)、20(R)-PPT (39)^[7], 由本课题组从生晒参或红参或人参茎叶中分离得到; 竹节参皂苷 IVa (CS-IVa, 40, 批号 PS 14052106) 购自成都普思生物科技有限公司; 拟人参皂苷 RT₅ (PG-RT₅, 41, 批号 MUST 15041410) 和 F₁₁ (PG-F₁₁, 42, 批号 MUST 15020311) 购自成都曼思特生物科技有限公司。42 个化合物的对照品经 HPLC 检测其质量分数均 > 98%, 其化学结构见图 1。

DMEM 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, 批号 8120426)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 1872295)、非必需氨基酸 (nonessential amino acids, NEAA, 批号 2188976)、0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (trypsin-EDTA, 批号 2192749) 和青霉素 (penicillin) - 链霉素 (streptomycin) 双抗 (批号 2257205) 购自美国 Gibco 公司; Hank's 缓冲溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) 和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司; 乙腈和甲醇均为质谱级 (美国 Avantor Performance Materials, Inc.); 乙酸铵 (HPLC 级, LOT# BCBK6717V, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。6 孔聚碳酸酯膜转运板 (Transwell, #3414)、15 及 50 mL 塑料离心管和 25 cm² 及 75 cm² 细胞培养瓶等均购自美国 Corning Costar 公司。I 型鼠尾胶原 (RTC, 批号 SLBW1777) 购自德国 Sigma 公司。实验用水由 Milli-Q Advantage A10 制水机 (美国 Millipore 公司) 制备。

1.3 仪器

GALAXY B 型 CO₂ 气体培养箱 (英国 RS Biotech 公司)、JJT-1300 型超净工作台 (北京昌平长城空气净化公司)、Evom 细胞电阻仪 (美国 World Precision Instrument 公司)、XDS-1 倒置显微镜 (重庆光电仪器总公司)、GRX-9051B 型热空气消毒箱 (上海福玛实验设备有限公司)、座式蒸汽压力灭菌锅 (上海龙杰机械装备有限公司)、HZS-H 型恒温水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)、TDL-5-A 型低速台式大容量离心机 (上海安亭科学仪器厂)、LGJ0.5 冷冻干燥机 (北京四环科学仪器厂)。

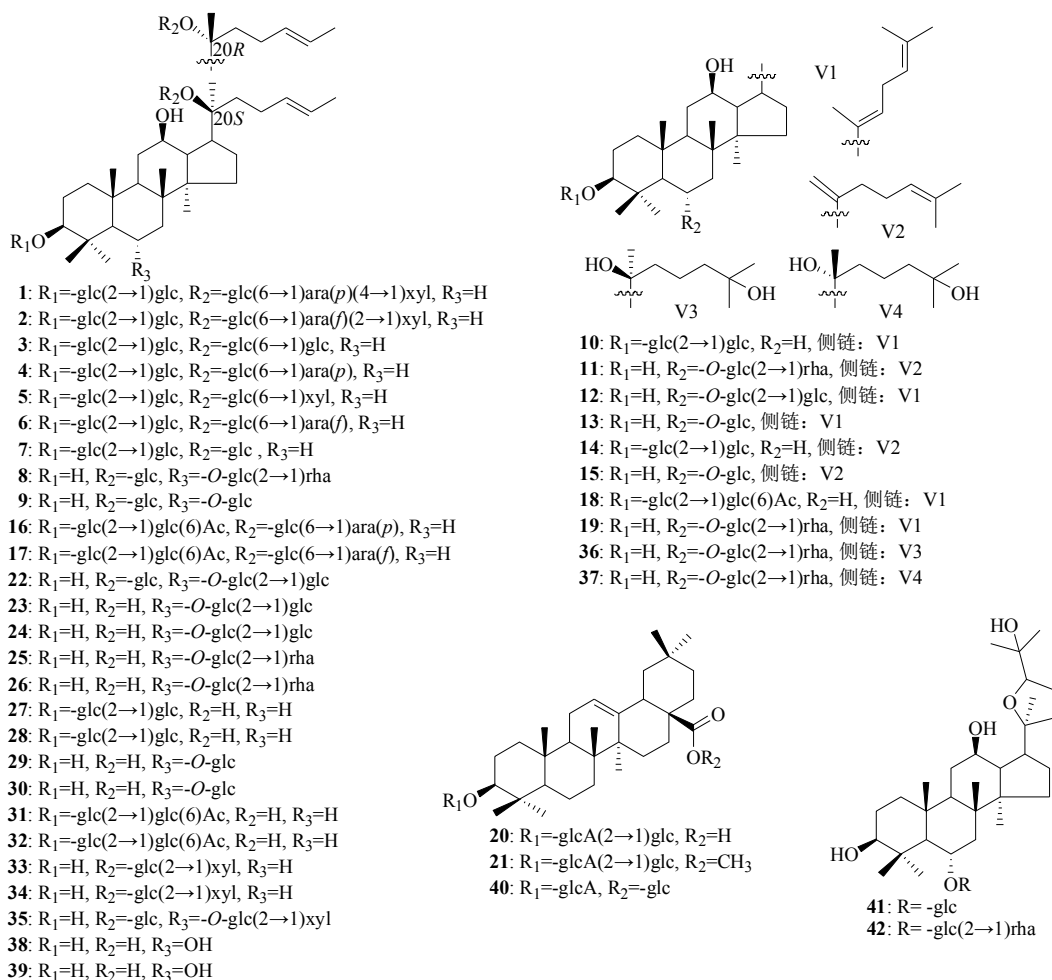


图 1 人参三萜的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of ginseng triterpenoids

岛津 LCMS-8050 超高效液相色谱-质谱仪, 包括 Nexera X2 UFLC 液相系统、LC-30AD 二元泵、SIL-30AC 自动进样器、SPD-M30A 检测器和 CTO-20AC 柱温箱, 以及 8050 型三重四级杆定量质谱, 配备 ESI 离子源和 LabSolution 工作站 (日本岛津公司)。Waters ACQUITY UPLC® BEH Shield RP₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 爱尔兰 Waters 公司); 配备 Waters ACQUITY UPLC® BEH Shield RP₁₈ VanGuard™ 预柱 (5 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 爱尔兰 Waters 公司)。PALLAS 3.3.2.6 ADME/Tox 预测软件 (CompuDrug Chemistry Ltd.)。

2 方法

2.1 培养液和缓冲溶液的配制

完全 DMEM 培养液-10、HBSS 平衡盐溶液、磷酸缓冲液 (PBS) 的配制参考文献方法^[8]。

2.2 胶原包被 Transwell 嵌套

用无菌水配制 2 mg/mL 鼠尾胶原储备液, 按 10

μg/cm² 配制鼠尾胶原包被工作液。

2.3 红参总皂苷 (总三萜) 提取物冻干粉制备

取红参水煎液的正丁醇萃取物^[6]少量, 加适量水分散, 经冷冻干燥后得红参总皂苷提取物冻干粉。

2.4 细胞培养和种板

从液氮中取出冻存的 Caco-2 细胞, 以完全 DMEM-10 培养复苏, 待细胞稳定后, 每 4~5 天传代 (细胞汇合率约 80%), 传代比例为 1:5。取鼠尾胶原包被工作液 0.6 mL 加入到 6 孔板的 Transwell 嵌套中, 在超净台中放置 2 h, 使其干燥并部分包被。吸走嵌套中剩余的胶原溶液, 立即用 1 mL PBS 漂洗后, 嵌套即可使用。细胞汇合率达到 80% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 将细胞从培养瓶瓶壁上消化下来, 用完全 DMEM-10 终止消化并将细胞悬液的细胞数稀释到 2.5×10^5 个/mL。向 6 孔板的底端 (basolateral, BL) 侧加入 2.6 mL 完全 DMEM-10 培养液, 向孔板的顶端 (apical, AP) 侧加入 1.5 mL

已充分混匀的细胞悬液。为避免培养初期死细胞堵塞膜表面,种板后的第 1、3 天换液时先换 AP 侧;第 5 天以后细胞膜已基本形成。为避免暴露在空气中时间过长,换液时先换 BL 侧。

2.5 Caco-2 细胞单层完整性的考察

按标准操作规程^[4]方法,用电阻仪测定 6 孔 Transwell 中的 Caco-2 细胞单层电阻值,以确定单层细胞的紧密性与完整性。本实验所用 6 孔细胞单层的电阻值均大于 $800\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ 。

2.6 转运实验

2.6.1 红参总三萜提取物供试品的配制 本实验剂量选择根据红参中的特征性成分之一 G-Rg₅ 的含量来换算,依据单体化合物的 Caco-2 细胞单层评价给药剂量,设计 G-Rg₅ 给药剂量为 $50\ \mu\text{mol/L}$,实验前用 DMSO 配制成 $5\ \text{mmol/L}$ 储备液,实验时再以 HBSS 缓冲液稀释 100 倍;换算成红参总三萜提取物的给药剂量为 $3.472\ \text{mmol/L}$,即准确称取红参总皂苷提取物冻干粉 $133.3\ \text{mg}$ 溶于 $500\ \mu\text{L}$ 的 DMSO 中配制成储备液,作为测试液。

2.6.2 红参总三萜提取物的转运实验 在培养的第 21 天取出 6 孔 Caco-2 细胞单层 Transwell 板,测定单层细胞电阻后,用 $37\ ^\circ\text{C}$ 的 HBSS 缓冲液洗涤 AP 侧和 BL 侧各 2 次,之后补加 HBSS (AP 侧加 $1500\ \mu\text{L}$, BL 侧加 $2600\ \mu\text{L}$),在恒温水浴摇床上温育 ($37\ ^\circ\text{C}$ 、 $50\ \text{r/min}$),30 min 后取出,再次测定单层细胞的电阻值以确定其紧密性与完整性。然后吸走 HBSS 溶液 (保存、备用),根据实验设计,分别在单层细胞的两侧加入测试液和 HBSS 溶液:转运实验时,AP 侧向 BL 侧转运 (AP→BL),AP 侧加测试液 $1500\ \mu\text{L}$,BL 侧加空白 HBSS 溶液 $2600\ \mu\text{L}$;外流实验时,BL 侧向 AP 侧转运 (BL→AP),BL 侧加测试液 $2600\ \mu\text{L}$,AP 侧加空白 HBSS 溶液 $1500\ \mu\text{L}$ 。加好后置于恒温水浴摇床温育 ($37\ ^\circ\text{C}$ 、 $50\ \text{r/min}$)。90 min 后,取出 Transwell 板,收集 AP 侧和 BL 侧的溶液。转运实验时,给药侧 AP 取样 $500\ \mu\text{L}$,接收侧 BL 取样 $2300\ \mu\text{L}$;外流实验时,给药侧 BL 取样 $500\ \mu\text{L}$,接收侧 AP 取样 $1300\ \mu\text{L}$ 。样品用封口膜封口、扎孔,然后置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻保存,待测。

2.7 含量测定

2.7.1 样品处理 Caco-2 细胞单层过膜样品经冷冻干燥后,BL 侧样品各加入 $300\ \mu\text{L}$ 甲醇复溶,AP 侧样品各加入 $200\ \mu\text{L}$ 甲醇复溶,涡旋 2 min,混匀后超声溶解 10 min,再经 $15\ 000\times g$ 离心 10 min,

取上清,进样预设的 LC-MS/MS 系统测定。

2.7.2 混合对照品的制备 精密称取上述 42 个人参三萜皂苷对照品适量,用甲醇超声溶解制得除 20(R)-G-Rg₃ ($0.2\ \text{mg/mL}$) 外,质量浓度均为 $1\ \text{mg/mL}$ 的各对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量,用甲醇稀释配制成含 $1\ \mu\text{g/mL}$ 的 20(S)-G-Rh₁、G-Rg₆、20(S)-NG-R₂、20(S)-G-Rg₂、G-Rb₃、G-Ra₂、20(R)-G-Rg₃, $500\ \text{ng/mL}$ 的 20(R)-G-Rh₁、20(R)-G-Rg₂、G-Rs₂、G-Rs₁、NG-R₁、20-glu-G-Rf、竹节参皂苷 IVa、20(S)-G-Rg₃、G-Rg₉、20(S)-PPT、20(R)-PPT、G-Rk₃, $4\ \mu\text{g/mL}$ 的 G-F₄、G-Rs₄、G-Rh₄, $2\ \mu\text{g/mL}$ 20(S)-G-Rf、G-Re、G-Rk₁, $200\ \text{ng/mL}$ 的 20(R)-G-Rf、20(R)-NG-R₂、20(S)-G-Rf₂、20(R)-G-Rf₂, $250\ \text{ng/mL}$ 的 G-Ro 甲酯、G-Ra₁、PG-F₁₁、G-RT₅、20(S)-G-Rs₃、20(R)-G-Rs₃, $5\ \mu\text{g/mL}$ 的 G-Rd、G-Ro、G-Rb₁、G-Rb₂、G-Rc、G-Rg₁、G-Rg₅ 的混合对照品溶液。

2.7.3 色谱-质谱条件 液-质联用系统为岛津 LCMS-8050 系列,色谱条件以及质谱参数与红参药动学的分析方法^[9]完全一致,本实验中利用三重四极杆质谱测定 42 个人参三萜成分设定的多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 离子对及一级四极杆预偏置电压 (Q1 pre bias)、三级四极杆预偏置电压 (Q3 pre bias)、碰撞能量 (CE) 等参数与红参药材含量测定的 MRM 参数^[10]一致,除了滞留时间 (dwell time, DT) 略有调整外,由于更换预柱,各化合物的保留时间 (t_R) 亦略有变化。色谱-质谱参数见表 1。

2.7.4 工作曲线的绘制 将混合对照品溶液用第 3 次洗涤细胞的 HBSS 缓冲液倍比稀释成一系列浓度的混合对照品溶液,冷冻干燥后,甲醇复溶,涡旋 2 min,混匀后超声溶解 20 min,再经 $16\ 000\times g$ 离心 10 min,取上清 $2\ \mu\text{L}$ 在既定的 LC-MS 条件^[10]下进样分析。以对照品的质量浓度为横坐标 (x),峰面积积分值为纵坐标 (y),得到各对照品的线性回归方程 (表 2)。

2.7.5 精密度、准确度、回收率 用 HBSS 缓冲溶液将各对照品配制低、中、高 3 个浓度的混标溶液,冻干后甲醇复溶,漩涡 2 min,混匀后超声溶解 10 min,在 $15\ 000\times g$ 条件下离心 10 min,取上清液进样 LC-MS 系统检测。1 d 内连续测定 3 次,根据各分析物峰面积计算日内精密度和准确度;1 周内连续测定 3 d,根据各化合物峰面积计算日间精密度和准确度 (表 3)。取 $0.5\ \text{mL}$ 空白 HBSS 溶液,

表 1 各分析物的色谱-质谱参数

Table 1 Chromatography-mass spectrometry parameters of each analyte

分析物	t_R/min	MRM 转变 (m/z) 母离子→子离子	滞留时间/ ms	Q1 Pre Bias/V	碰撞能量/ eV	Q3 Pre Bias/V
20-glu-G-Rf	4.650	961.6→637.4	37	10	41	31
20(S)-G-Rf ₂	4.802	801.5→493.4	37	5	39	23
20(R)-G-Rf ₂	4.985	801.5→493.4	37	5	39	23
NG-R ₁	4.985	931.5→637.4	37	22	39	32
G-Rg ₁	5.441	799.5→637.4	37	23	25	31
G-Re	5.532	945.5→637.4	37	20	40	32
PG-RT ₅	7.538	653.5→161.2	32	34	23	29
PG-F ₁₁	7.629	799.5→653.5	32	15	32	32
G-Ro	7.842	955.5→793.4	32	10	46	40
20(S)-G-Rf	8.450	799.5→475.4	32	24	42	23
20(R)-G-Rf	8.754	799.5→475.4	32	24	42	23
20(S)-NG-R ₂	9.301	769.5→475.4	32	10	38	32
CS-IVa	9.331	793.5→631.4	32	10	42	31
G-Ra ₂	9.483	1 209.6→1 077.5	32	5	49	39
G-Rb ₁	9.726	1 107.6→945.5	32	10	46	34
20(R)-NG-R ₂	9.909	769.5→475.4	32	10	38	32
20(S)-G-Rg ₂	10.122	783.5→475.4	32	10	39	32
20(S)-G-Rh ₁	10.152	637.4→475.3	32	19	24	33
20(R)-G-Rg ₂	10.456	783.5→475.4	32	10	39	32
G-Ra ₁	10.517	1 209.6→1 077.5	32	5	49	39
G-Rc	10.517	1 077.6→945.5	32	10	45	34
20(R)-G-Rh ₁	10.608	637.4→475.3	32	19	24	33
G-Rb ₂	11.185	1 077.6→783.5	32	32	47	40
G-Rb ₃	11.489	1 077.6→783.5	32	32	47	40
G-Rd	12.614	945.6→783.4	43	5	38	39
G-Rg ₉	12.614	781.5→619.4	50	23	30	31
G-Rs ₂	12.827	1 119.6→1 077.5	43	34	40	40
G-Rs ₁	13.191	1 119.6→1 077.5	43	34	40	40
G-Ro 甲酯	14.012	969.5→807.4	50	16	23	40
G-Rg ₆	14.740	825.4→765.4	50	19	22	37
G-Rk ₃	15.015	679.4→619.4	50	25	19	31
G-F ₄	15.037	825.4→765.4	50	19	22	37
G-Rh ₄	15.471	679.4→619.4	50	25	19	31
20(S)-G-Rg ₃	17.295	783.4→621.3	50	24	32	30
20(R)-G-Rg ₃	17.660	783.4→621.3	50	24	32	30
20(S)-PPT	18.875	475.4→391.3	97	10	30	43
20(R)-PPT	19.301	475.4→391.3	97	10	30	43
20(S)-G-Rs ₃	20.821	825.5→783.4	117	5	29	39
20(R)-G-Rs ₃	21.277	825.5→783.4	117	5	29	39
G-Rk ₁	23.191	765.5→603.4	117	23	30	29
G-Rg ₅	23.799	765.5→603.4	117	23	30	29
G-Rs ₄	27.021	807.5→765.5	193	15	29	27

表 2 各分析物的标准曲线、 r^2 和线性范围

Table 2 Calibration curve, coefficient and linear range of each analyte

分析物	标准曲线	r^2	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	分析物	标准曲线	r^2	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)
G-Ra ₁	$y=916.57x+724.23$	0.999 5	2~125	20(S)-G-Rh ₁	$y=1\,253.20x+3\,432.45$	0.999 7	2~500
G-Ra ₂	$y=58.98x+60.70$	0.999 2	2~125	20(R)-G-Rh ₁	$y=1\,466.39x+1\,534.44$	0.999 3	2~500
G-Rb ₁	$y=71.69x+957.32$	0.999 5	4~500	G-Rh ₄	$y=165.55x+1\,247.54$	0.999 5	8~2000
G-Rb ₂	$y=77.56x+503.94$	0.999 3	4~500	G-Rk ₁	$y=96.59x-173.55$	0.999 7	4~500
G-Rb ₃	$y=104.12x+209.95$	0.999 6	2~125	G-Rk ₃	$y=3\,180.32x-3\,423.28$	0.999 3	4~500
G-Rc	$y=59.13x-176.14$	0.999 5	4~500	G-Rs ₁	$y=425.43x+258.74$	0.999 1	2~125
G-Rd	$y=335.60x+2\,760.56$	0.999 3	2~250	G-Rs ₂	$y=285.76x+202.06$	0.999 5	2~125
G-Re	$y=280.65x+509.05$	0.999 8	2~250	20(S)-G-Rs ₃	$y=1\,571.33x+567.91$	0.999 4	2~125
20(S)-G-Rf	$y=1\,292.99x+2\,512.05$	0.999 7	4~500	20(R)-G-Rs ₃	$y=1\,958.83x+951.37$	0.999 7	2~125
20(R)-G-Rf	$y=632.64x+690.08$	0.999 7	2~250	G-Rs ₄	$y=94.60x-167.39$	0.999 9	5~250
20-glu-G-Rf	$y=299.18x+419.81$	0.999 7	2~125	G-F ₄	$y=81.32x+337.38$	0.999 5	8~1000
20(S)-G-Rf ₂	$y=637.56x-276.43$	0.999 5	1~125	NG-R ₁	$y=520.36x+392.93$	0.999 8	2~250
20(R)-G-Rf ₂	$y=724.14x+376.91$	0.999 6	1~125	20(S)-NG-R ₂	$y=1\,818.13x+997.15$	0.999 4	2~250
G-Rg ₁	$y=1\,035.64x+8\,305.15$	0.999 4	4~500	20(R)-NG-R ₂	$y=952.42x-331.47$	0.999 8	1~125
20(S)-G-Rg ₂	$y=2\,039.26x+2\,515.69$	0.999 4	2~250	20(S)-PPT	$y=1\,956.60x+516.22$	0.999 6	2~125
20(R)-G-Rg ₂	$y=2\,602.49x+5\,707.82$	0.999 6	2~250	20(R)-PPT	$y=1\,281.18x+49.04$	0.999 6	2~125
20(S)-G-Rg ₃	$y=804.76x-70.89$	0.999 6	2~250	PG-F ₁₁	$y=1\,235.72x+126.42$	0.999 4	2~125
20(R)-G-Rg ₃	$y=1\,567.88x+649.86$	0.999 3	1~125	PG-RT ₅	$y=840.43x+243.53$	0.999 6	1~125
G-Rg ₅	$y=67.47x+191.81$	0.999 4	8~2000	CS-IVa	$y=1\,167.69x+922.23$	0.999 8	2~125
G-Rg ₆	$y=189.18x+442.68$	0.999 4	4~500	G-Ro	$y=505.23x+4\,081.85$	0.999 3	4~500
G-Rg ₉	$y=81.35x-319.02$	0.999 4	2~500	G-Ro 甲酯	$y=1\,594.19x+646.20$	0.999 6	1~125

表 3 各分析物的日内和日间精密度、准确度以及回收率 ($n=6$)Table 3 Intra- and inter-day precision, accuracy and recovery for 42 analytes ($n=6$)

分析物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内		日间		回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%
		精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	
G-Ra ₁	5	5.37	4.93	7.63	5.88	92.63±5.46
	25	4.04	8.39	6.66	1.82	95.76±0.77
	125	2.28	5.43	3.47	1.27	87.97±1.08
G-Ra ₂	5	6.89	7.42	7.11	6.82	90.61±6.85
	25	2.52	1.16	3.30	2.00	87.66±3.58
	125	2.72	6.73	1.95	0.64	96.89±3.86
G-Rb ₁	10	5.51	2.53	7.06	7.98	90.14±6.57
	50	8.49	7.94	6.60	4.59	90.78±2.20
	250	1.58	-2.32	4.33	0.45	88.37±3.99
G-Rb ₂	10	5.83	8.29	6.84	7.45	93.47±5.10
	50	1.88	2.16	8.40	3.85	87.22±7.80
	250	1.61	5.24	3.29	1.10	96.06±2.48
G-Rb ₃	5	3.35	-4.17	4.81	-1.80	93.99±6.50
	25	5.86	-0.60	7.70	2.81	91.69±5.11
	125	6.54	-2.30	5.66	-7.32	97.85±7.15

续表 3

分析物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内		日间		回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%
		精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	
G-Rc	10	7.47	4.63	4.29	3.57	88.01±5.18
	50	2.66	3.99	7.78	5.53	86.86±5.05
	250	7.03	3.27	2.65	6.52	91.91±2.38
G-Rd	5	5.72	4.34	6.09	4.99	84.32±7.03
	25	0.83	1.70	2.05	8.16	93.76±8.43
	125	3.88	1.19	2.45	7.93	83.49±3.26
G-Re	5	3.29	8.42	4.26	6.72	91.66±4.84
	25	3.57	-2.32	6.41	-4.78	96.76±7.74
	125	2.61	2.59	7.81	-3.48	87.97±5.69
20(S)-G-Rf	10	8.26	2.73	6.67	5.20	84.52±4.21
	50	0.84	2.25	2.23	8.71	93.58±2.51
	250	3.73	3.13	4.05	3.29	88.45±3.23
20(R)-G-Rf	5	4.78	6.62	5.26	5.82	84.00±6.18
	25	3.18	0.64	5.13	7.68	90.99±1.76
	125	3.52	5.19	2.42	6.78	88.09±3.44
20-glu-G-Rf	5	5.10	4.60	5.92	4.52	88.81±5.46
	25	1.02	2.61	8.35	7.32	95.16±6.70
	125	5.78	1.45	1.88	3.14	87.92±2.29
20(S)-G-Rf ₂	5	3.30	8.24	2.53	6.62	89.41±6.29
	25	7.46	-0.66	4.29	-3.06	86.75±1.80
	125	2.41	2.83	3.61	1.23	88.54±3.52
20(R)-G-Rf ₂	5	6.54	2.67	8.10	5.10	93.19±6.00
	25	0.82	2.21	2.17	8.53	90.78±2.02
	125	3.65	3.06	3.92	3.22	87.45±2.41
G-Rg ₁	10	3.36	8.41	4.38	6.76	85.33±5.35
	50	7.61	-0.67	2.52	-3.13	89.69±0.75
	250	2.46	2.89	3.68	1.26	92.14±1.05
20(S)-G-Rg ₂	5	5.22	-8.20	6.60	-5.33	83.71±4.12
	25	6.74	1.75	5.19	3.35	85.92±6.19
	125	3.80	-1.28	7.26	-3.69	89.92±1.63
20(R)-G-Rg ₂	5	7.33	5.35	5.54	3.74	92.74±5.71
	25	5.30	2.12	0.78	7.86	95.37±3.13
	125	3.50	1.36	1.10	2.92	93.97±1.82
20(S)-G-Rg ₃	5	4.18	5.25	5.43	3.66	88.53±6.76
	25	5.22	2.08	0.76	3.71	93.77±1.34
	125	3.43	1.27	1.07	2.86	87.01±3.84
20(R)-G-Rg ₃	5	3.31	1.43	4.27	5.31	89.40±6.95
	25	1.14	2.96	2.55	2.11	86.80±6.50
	125	3.20	3.73	3.28	1.26	91.49±4.27
G-Rg ₅	20	7.12	-3.61	6.47	-8.03	88.26±4.87
	100	6.61	1.71	5.09	3.28	90.67±4.20
	500	5.12	-4.25	5.68	-5.22	91.64±7.98
G-Rg ₆	10	7.25	6.86	7.03	6.96	88.89±8.13
	50	2.58	7.57	3.37	2.04	90.94±4.96
	250	2.70	0.65	1.90	1.19	87.74±5.08

续表 3

分析物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内		日间		回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%
		精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	
G-Rg ₉	10	3.88	7.27	6.27	7.91	87.38±4.23
	50	1.31	-0.47	1.79	2.12	90.11±7.66
	250	1.90	2.65	3.49	2.02	95.65±2.61
20(S)-G-Rh ₁	10	6.36	5.43	5.75	6.13	86.96±2.49
	50	4.46	2.81	4.61	7.42	85.45±4.23
	250	3.27	2.13	3.84	3.27	92.87±3.56
20(R)-G-Rh ₁	10	7.46	3.72	7.14	5.51	84.76±7.98
	50	4.99	3.05	8.56	6.10	91.90±2.14
	250	2.33	5.88	3.31	5.41	93.87±3.86
G-Rh ₄	20	8.33	2.13	5.06	3.81	85.86±6.37
	100	4.30	-3.40	2.97	-6.41	90.38±5.01
	500	7.07	-1.02	6.68	4.52	87.18±5.60
G-Rk ₁	10	4.74	5.99	6.81	3.81	91.62±5.83
	50	1.73	3.81	3.56	9.95	88.67±8.23
	250	3.12	2.73	3.84	7.77	94.31±1.85
G-Rk ₃	10	5.49	7.78	5.54	6.09	94.95±6.71
	50	4.13	8.56	6.80	5.03	92.23±3.51
	250	3.54	1.86	2.32	1.30	91.06±3.78
G-Rs ₁	5	3.96	2.71	6.39	8.07	89.39±5.66
	25	1.34	-0.48	1.83	-2.16	90.63±4.54
	125	1.94	5.40	3.57	2.06	86.64±3.78
G-Rs ₂	5	3.38	7.58	4.35	6.44	91.86±4.11
	25	8.30	4.05	6.69	8.42	85.92±1.81
	125	6.24	3.81	3.35	7.34	87.42±3.88
20(S)-G-Rs ₃	5	4.68	6.49	8.25	5.71	86.99±8.36
	25	3.12	0.63	5.03	7.52	86.50±6.44
	125	3.45	5.09	5.16	6.65	90.24±5.70
20(R)-G-Rs ₃	5	2.45	7.85	5.08	8.35	88.83±4.20
	25	3.76	1.10	7.76	4.76	86.77±6.31
	125	6.89	0.69	2.47	1.94	89.95±7.69
G-Rs ₄	5	4.21	2.09	6.54	3.73	86.36±4.29
	25	8.16	-3.34	2.91	-6.28	87.83±6.59
	125	6.93	-0.98	4.96	4.43	88.52±3.30
G-F ₄	20	3.42	-4.26	4.91	-1.84	85.86±5.00
	100	5.98	-0.61	7.86	2.87	96.03±7.64
	500	6.68	-2.35	5.78	-7.47	86.70±2.43
NG-R ₁	5	4.22	2.94	8.49	4.63	91.94±6.93
	25	2.66	-4.13	6.54	-7.63	90.75±3.32
	125	1.86	-3.51	5.79	-5.70	89.20±1.87
20(S)-NG-R ₂	5	2.50	8.01	5.18	8.52	91.87±5.88
	25	3.83	1.12	7.92	4.86	84.46±1.98
	125	1.03	1.98	2.52	0.71	93.62±2.36
20(R)-NG-R ₂	5	4.84	6.11	6.95	3.89	88.62±5.60
	25	1.76	2.79	3.63	8.15	92.89±1.79
	125	3.18	3.88	3.92	7.93	86.36±6.23

续表 3

分析物	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内		日间		回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%
		精密度 RSD/%	准确度 RE/%	精密度 RSD/%	准确度 RE/%	
20(S)-PPT	5	5.60	4.25	5.97	4.89	89.94±6.74
	25	0.81	1.66	2.01	8.07	92.20±8.28
	125	3.81	1.16	2.40	3.77	90.40±3.24
20(R)-PPT	5	4.14	2.88	5.68	4.54	91.02±7.02
	25	2.60	-4.05	1.82	-7.48	88.29±3.25
	125	1.41	-3.44	6.32	-5.59	94.01±1.92
PG-F ₁₁	5	5.06	4.51	5.80	4.33	88.54±7.52
	25	1.03	2.56	3.18	2.15	86.65±6.56
	125	2.67	1.43	1.85	3.08	85.95±3.42
PG-RT ₅	5	3.37	6.50	4.17	5.02	87.48±6.44
	25	5.88	1.69	1.84	2.89	95.02±2.87
	125	2.70	2.10	3.94	3.64	93.03±4.89
CS-IVa	5	3.22	3.26	4.18	6.65	89.48±4.74
	25	3.49	-2.27	6.28	-4.68	94.82±7.59
	125	4.51	2.54	1.65	-3.35	92.01±5.58
G-Ro	10	7.35	-0.12	6.86	-1.81	86.51±4.31
	50	2.33	3.50	1.36	-8.27	94.58±2.48
	250	1.95	-5.37	3.90	5.19	97.16±3.63
G-Ro 甲酯	5	3.44	2.75	4.94	5.13	91.20±4.98
	25	6.00	7.76	4.26	7.03	92.89±2.93
	125	5.64	0.26	8.10	3.71	86.62±6.58

精密加入适量高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液 ($n=6$), 分别用上述方法处理, 进行检测, 记录峰面积为 A_1 ; 另取等量的高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液 ($n=6$), 补足相同体积的甲醇, 直接进样检测, 记录峰面积为 A_2 , 计算回收率 (回收率 = A_1/A_2)。见表 3。

2.7.6 质控样品制备 按照“2.7.4”项下方法制备得到系列浓度 (7 个质量浓度) 的混合对照品溶液, 取 2、5、7 标准曲线浓度点平行制备 6 份样品, 即为低、中、高浓度的质控样品。

2.7.7 稳定性 常温稳定性: 将高、中、低 3 个浓度的质控样品室温密封放置 24 h, 测定其浓度; 冻融循环稳定性: 将高、中、低 3 个浓度的质控样品经反复 3 次 -20 °C 冰冻-室温溶解后, 测定其浓度; 长期稳定性: 将高、中、低 3 个浓度的质控样品置于 -20 °C 下 1 个月, 测定其浓度。稳定性考察结果表明, 高、中、低质控样品的常温稳定性 (RSD 值为 0.86%~1.68%)、冻融循环稳定性 (RSD 值为 4.11%~1.93%) 及长期稳定性 (RSD 值为 1.22%~3.98%) 满足生物样品分析的相关要求。

2.8 表观渗透系数 (P_{app}) 计算和数据处理

受试分析物在 Caco-2 细胞单层模型中的 P_{app} 值按公式计算。每数据点为平行 3 孔的平均值, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/A \times 1/C_0$$

Q 为累积转运量, 代表分析物在接收室出现的总量 ($\mu\text{mol/L}$); dQ/dt 表示速率 ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{s}$); C_0 为分析物在给药室的初始浓度 ($\mu\text{mol/L} \cdot \text{cm}$); A 为聚碳酸酯膜的表面积 (cm^2)

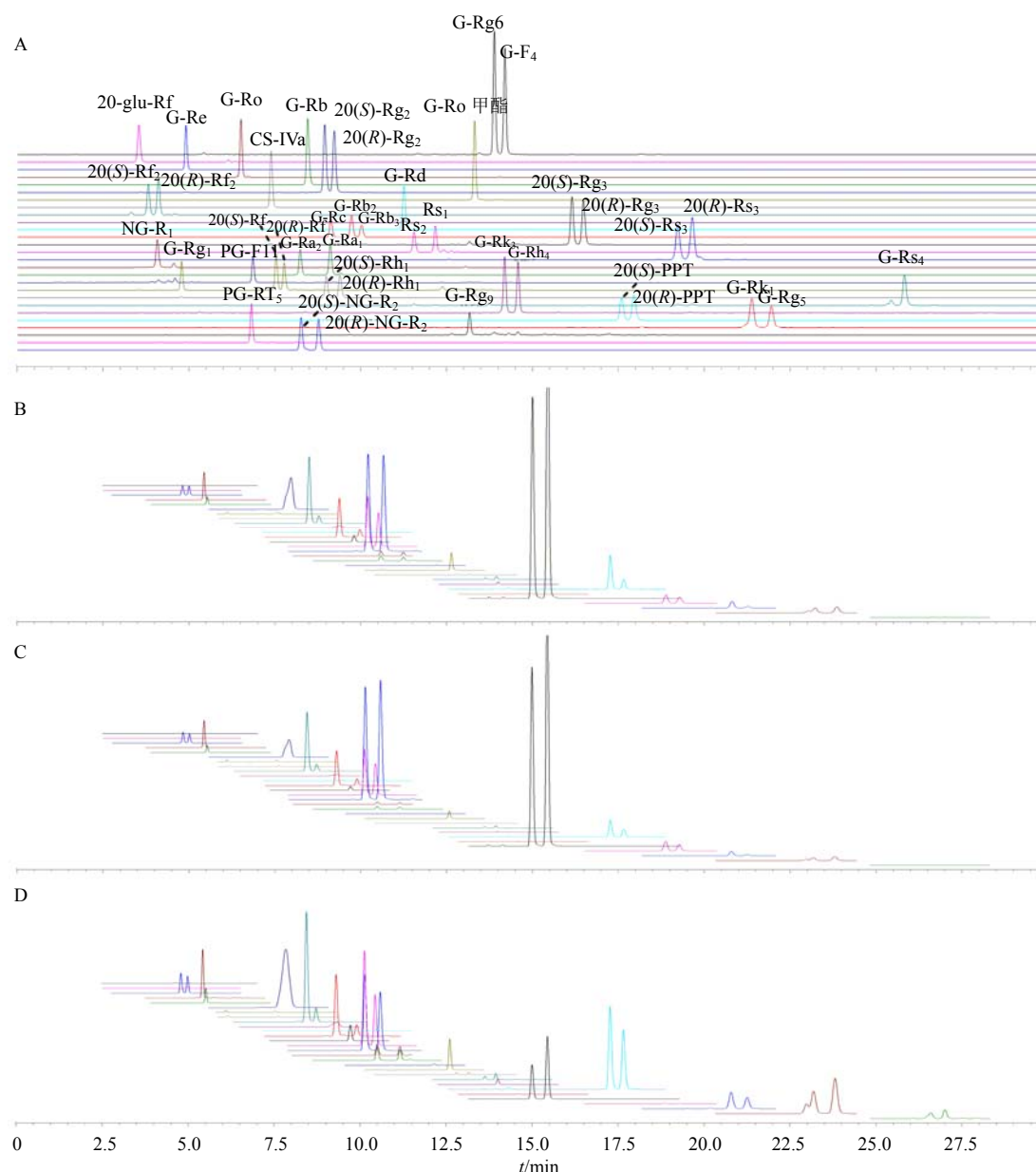
3 结果

3.1 MRM 色谱图

42 个人参三萜混合对照品的 MRM 叠加色谱图、Caco-2 单层过膜前红参总人参三萜提取物的 MRM 离子对色谱图以及红参总人参三萜过膜后 AP 侧和 BL 侧的 MRM 叠加色谱图分别见图 2-A~D, 如图 2 所示, 每个 MRM 通道上的同分异构体都能达到满意的分离度。

3.2 红参总三萜提取物转运实验结果

红参中 42 个人参三萜类化合物转运和外流的 P_{app} 值和 $P_{appAP \rightarrow BL}/P_{appBL \rightarrow AP}$ 值见表 4。从表 4 结果可见, 红参中绝大多数人参三萜的 P_{app} 值在 $8 \times 10^{-7} \sim 9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 预测它们经肠道吸收程度为中



A-42 个人参三萜混合对照品的 MRM 色谱图 B-红参水煎液正丁醇提取物 Caco-2 细胞单层过膜后 BL 侧样品的 MRM 色谱图 C-红参水煎液正丁醇提取物 Caco-2 细胞单层过膜后 AP 侧样品的 MRM 色谱图 D-红参水煎液正丁醇提取物的 MRM 叠加色谱图
A-MRM chromatograms of the 42 ginseng triterpenoid mixed reference standards B-MRM chromatograms of basolateral side sample on the absorption and transport of butanol fraction of red ginseng water extract in Caco-2 cell monolayer C-MRM chromatograms of apical side sample on the absorption and transport of butanol fraction of red ginseng water extract in Caco-2 cell monolayer D-MRM chromatograms of butanol fraction of red ginseng water extract

图 2 红参提取物过膜前后及其代表性的 42 个三萜类化合物的 MRM 色谱图

Fig. 2 Typical MRM chromatograms for *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra* extracts before and after membrane crossing and 42 representative triterpenes of *Ginseng Radix et Rhizoma Rubra* extracts

等或不良。从总体趋势可以看出, 人参皂苷昔元 PPT 最容易被吸收, 然后是单糖苷, 诸如 G-Rb₁、G-Rc 的四糖苷和 G-Ra₁、G-Ra₂ 的五糖苷等则很难被吸收。

4 讨论

本实验对红参中人参三萜提取物进行了

Caco-2 细胞单层模型吸收转运评价研究, 利用 UFLC-MS/MS 高灵敏度等优势对红参过膜样品中的 42 个人参三萜同时进行了测定。在吸收转运实验中, 发现大多数人参三萜吸收程度为中等或不良, 唯有 2 个人参三萜皂苷元 20(S)-PPT 和 20(R)-PPT

表 4 红参提取物中 42 个人参三萜类成分在 Caco-2 细胞单层模型的转运和外流的 P_{app} 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 P_{app} Values of transport and efflux of 42 triterpenes in Ginseng Radix et Rhizoma Rubra extract by Caco-2 cell monolayer model ($\bar{x} \pm s, n=3$)

人参三萜	$P_{app AP \rightarrow BL} / (cm \cdot s^{-1})$	$P_{app BL \rightarrow AP} / (cm \cdot s^{-1})$	$\frac{P_{app AP \rightarrow BL}}{P_{app BL \rightarrow AP}}$	人参三萜	$P_{app AP \rightarrow BL} / (cm \cdot s^{-1})$	$P_{app BL \rightarrow AP} / (cm \cdot s^{-1})$	$\frac{P_{app AP \rightarrow BL}}{P_{app BL \rightarrow AP}}$
G-Ra ₁	$(1.01 \pm 0.15) \times 10^{-7}$	$(0.98 \pm 0.12) \times 10^{-7}$	0.97	20(S)-G-Rh ₁	$(1.65 \pm 0.19) \times 10^{-6}$	$(1.92 \pm 0.23) \times 10^{-6}$	1.17
G-Ra ₂	$(1.06 \pm 0.13) \times 10^{-7}$	$(0.90 \pm 0.08) \times 10^{-7}$	0.85	20(R)-G-Rh ₁	$(2.03 \pm 0.29) \times 10^{-6}$	$(2.40 \pm 0.34) \times 10^{-6}$	1.18
G-Rb ₁	$(2.06 \pm 0.32) \times 10^{-7}$	$(1.81 \pm 0.19) \times 10^{-7}$	0.88	G-Rh ₄	$(5.18 \pm 0.54) \times 10^{-6}$	$(4.48 \pm 0.47) \times 10^{-6}$	0.87
G-Rb ₂	$(2.70 \pm 0.34) \times 10^{-7}$	$(2.54 \pm 0.24) \times 10^{-7}$	0.94	G-Rk ₁	$(4.03 \pm 0.26) \times 10^{-7}$	$(3.71 \pm 0.15) \times 10^{-7}$	0.92
G-Rb ₃	$(2.53 \pm 0.12) \times 10^{-7}$	$(2.68 \pm 0.13) \times 10^{-7}$	1.06	G-Rk ₃	$(5.68 \pm 0.60) \times 10^{-6}$	$(5.34 \pm 0.57) \times 10^{-6}$	0.94
G-Rc	$(2.43 \pm 0.11) \times 10^{-7}$	$(2.11 \pm 0.29) \times 10^{-7}$	0.87	G-Rs ₁	$(2.63 \pm 0.17) \times 10^{-7}$	$(2.36 \pm 0.16) \times 10^{-7}$	0.90
G-Rd	$(3.41 \pm 0.53) \times 10^{-7}$	$(2.86 \pm 0.29) \times 10^{-7}$	0.84	G-Rs ₂	$(2.59 \pm 0.45) \times 10^{-7}$	$(2.31 \pm 0.42) \times 10^{-7}$	0.89
G-Re	$(4.16 \pm 0.44) \times 10^{-7}$	$(5.19 \pm 0.58) \times 10^{-7}$	1.25	20(S)-G-Rs ₃	$(2.98 \pm 0.25) \times 10^{-7}$	$(2.79 \pm 0.21) \times 10^{-7}$	0.94
20(S)-G-Rf	$(4.78 \pm 0.39) \times 10^{-7}$	$(6.14 \pm 0.52) \times 10^{-7}$	1.29	20(R)-G-Rs ₃	$(2.40 \pm 0.14) \times 10^{-7}$	$(2.83 \pm 0.13) \times 10^{-7}$	1.18
20(R)-G-Rf	$(4.36 \pm 0.71) \times 10^{-7}$	$(5.84 \pm 0.69) \times 10^{-7}$	1.34	G-Rs ₄	$(1.16 \pm 0.10) \times 10^{-7}$	$(1.28 \pm 0.09) \times 10^{-7}$	1.10
20-glu-G-Rf	$(4.48 \pm 0.34) \times 10^{-7}$	$(4.75 \pm 0.75) \times 10^{-7}$	1.06	G-F ₄	$(6.03 \pm 0.47) \times 10^{-7}$	$(5.61 \pm 0.63) \times 10^{-7}$	0.93
20(S)-G-Rf ₂	$(4.94 \pm 0.65) \times 10^{-7}$	$(6.72 \pm 0.48) \times 10^{-7}$	1.36	NG-R ₁	$(3.88 \pm 0.14) \times 10^{-7}$	$(5.27 \pm 0.47) \times 10^{-7}$	1.36
20(R)-G-Rf ₂	$(5.31 \pm 0.29) \times 10^{-7}$	$(7.60 \pm 0.53) \times 10^{-7}$	1.43	20(S)-NG-R ₂	$(5.10 \pm 0.41) \times 10^{-7}$	$(6.45 \pm 0.54) \times 10^{-7}$	1.26
G-Rg ₁	$(5.22 \pm 0.32) \times 10^{-7}$	$(7.12 \pm 0.87) \times 10^{-7}$	1.36	20(R)-NG-R ₂	$(5.06 \pm 0.34) \times 10^{-7}$	$(5.78 \pm 0.46) \times 10^{-7}$	1.14
20(S)-G-Rg ₂	$(4.23 \pm 0.29) \times 10^{-7}$	$(5.11 \pm 0.31) \times 10^{-7}$	1.21	20(S)-PPT	$(8.04 \pm 0.69) \times 10^{-6}$	$(9.81 \pm 0.52) \times 10^{-6}$	1.22
20(R)-G-Rg ₂	$(6.11 \pm 0.83) \times 10^{-7}$	$(7.43 \pm 0.75) \times 10^{-7}$	1.22	20(R)-PPT	$(9.10 \pm 0.43) \times 10^{-6}$	$(1.06 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	1.17
20(S)-G-Rg ₃	$(4.08 \pm 0.27) \times 10^{-7}$	$(3.63 \pm 0.16) \times 10^{-7}$	0.89	PG-F ₁₁	$(4.12 \pm 0.25) \times 10^{-7}$	$(7.09 \pm 0.49) \times 10^{-7}$	1.72
20(R)-G-Rg ₃	$(1.35 \pm 0.11) \times 10^{-7}$	$(1.66 \pm 0.08) \times 10^{-7}$	1.23	PG-RT ₅	$(1.16 \pm 0.18) \times 10^{-6}$	$(1.49 \pm 0.23) \times 10^{-6}$	1.28
G-Rg ₅	$(3.84 \pm 0.21) \times 10^{-7}$	$(4.42 \pm 0.18) \times 10^{-7}$	1.15	CS-IVa	$(3.57 \pm 0.20) \times 10^{-7}$	$(3.09 \pm 0.48) \times 10^{-7}$	0.87
G-Rg ₆	$(5.28 \pm 0.35) \times 10^{-7}$	$(4.70 \pm 0.41) \times 10^{-7}$	0.89	G-Ro	$(3.17 \pm 0.41) \times 10^{-7}$	$(2.62 \pm 0.35) \times 10^{-7}$	0.83
G-Rg ₉	$(4.34 \pm 0.12) \times 10^{-7}$	$(4.88 \pm 0.13) \times 10^{-7}$	1.13	G-Ro 甲酯	$(2.75 \pm 0.19) \times 10^{-7}$	$(2.12 \pm 0.17) \times 10^{-7}$	0.77

吸收程度良好 (P_{app} 值接近 $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$)；此外，发现人参皂苷 20(S)-G-Rh₁、20(R)-G-Rh₁、G-Rk₃、G-Rh₄、PG-RT₅ 这 5 个单糖苷的 P_{app} 值均在 $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 数量级，提示它们吸收程度为中等^[11]。G-Rk₃、G-Rh₄ 的吸收强弱程度是 G-Rh₁ 的 2~3 倍，前者化学结构仅是 C₁₇ 侧链比 G-Rh₁ 多了 1 个双键。随着人参三萜皂苷糖取代基数目的增多，其 P_{app} 值越来越小，提示多糖苷的人参三萜皂苷在体内很难被吸收。在所有考察的 42 个人参三萜中，二糖苷 20(R)-G-Rg₃ 的 P_{app} 值相对较小，推测可能与其溶解度有关，20(R)-G-Rg₃ 在甲醇中微溶，在水中几乎不溶，虽然其在红参水煎液中含量不低，但在过膜实验中，并不能完全以分子状态透过膜。在 Caco-2 细胞单层过膜吸收评价实验中，所考察的 42 个人参三萜还包括了 8 对 R、S 异构体，结果显示 R/S 异构体的吸收情况并没有显著性差异。以上结果相对于文献报道的单体人参皂苷给药量大多一致^[12-18]，存在少数的波动，推测红参总三萜提取物中化合物之间可能存在着相互作用。实际上，口服人参皂苷

会经肠内细菌转化为少糖基的人参皂苷^[19]（即所谓的稀有人参皂苷）吸收进入体内发挥生物学作用^[20]，由此推测人参三萜皂苷是前药（pro-drug）。本实验结果为确定红参的有效成分^[21-22]提供了肠吸收方面的科学依据。结果提示，人参如果配伍能够促进肠内细菌活跃、分泌大量能够水解人参皂苷的水解酶的中药，使多糖基人参皂苷水解为少糖基皂苷或苷元而吸收进入体循环，更有益于发挥人参三萜的生物学活性^[3,23]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨海涛, 王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用 [J]. 药学报, 2000, 35(10): 797-800.
- [2] 杨秀伟. 人参中三萜类化学成分的研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 7-15.
- [3] 杨秀伟, 富力. 人参中三萜类化学成分的生物活性及药理学作用 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 36-55.
- [4] 杨雁芳, 吴妮, 杨秀伟. 用于中药复方物质基础研究的 Caco-2 细胞胶原包被 6 孔转运板体系的构建 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 515-519.

- [5] 王洪平, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. 吉林人参根和根茎的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2807-2817.
- [6] 周琪乐, 徐嵬, 杨秀伟. 中国红参化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 233-249.
- [7] 杨秀伟, 李珂珂, 周琪乐. 人参茎叶中 1 个新皂苷 20(S)-人参皂苷 Rf₂ [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3137-3145.
- [8] 马莲, 杨秀伟. 盐酸黄连碱和小檗红碱在人源 Caco-2 细胞单层模型中的吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2523-2527.
- [9] Zhou Q L, Zhu D N, Yang Y F, *et al.* Simultaneous quantification of twenty-one ginsenosides and their three aglycones in rat plasma by a developed UFLC-MS/MS assay: Application to a pharmacokinetic study of red ginseng [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 137: 1-12.
- [10] Zhou Q L, Zhu D N, Yang X W, *et al.* Development and validation of a UFLC-MS/MS method for simultaneous quantification of sixty-six saponins and their six aglycones: Application to comparative analysis of red ginseng and white ginseng [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159: 153-165.
- [11] 杨秀伟, 杨晓达, 王莹, 等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立 [J]. 中西医结合学报, 2007, 5(6): 634-641.
- [12] Han M, Sha X, Wu Y, *et al.* Oral absorption of ginsenoside Rb1 using *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Planta Med*, 2006, 72(5): 398-404.
- [13] 韩旻, 韩丽妹, 王青松, 等. 三七皂苷的口服吸收机制 [J]. 药学学报, 2006, 41(6): 498-505.
- [14] 赵洁, 杨彩华, 胡明, 等. 人参皂苷 Rb₂ 透过 Caco-2 单细胞层的吸收特征研究 [J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(12): 2387-2390.
- [15] 赵洁, 杨彩华, 胡明, 等. 人参皂苷 Rb₃ 在 Caco-2 单细胞层模型上的吸收特征研究 [J]. 中国药房, 2010, 21(3): 196-198.
- [16] Liu H F, Yang J L, Du F F, *et al.* Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats [J]. *Drug Metab Dispos: Biol Fate Chem*, 2009, 37(12): 2290-2298.
- [17] 谢海棠, 王广基, 赵小辰, 等. Caco-2 细胞对人参皂苷 Rg₃ 的摄取及代谢研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(3): 257-260.
- [18] Li N, Wang D D, Ge G B, *et al.* Ginsenoside metabolites inhibit P-glycoprotein *in vitro* and *in situ* using three absorption models [J]. *Planta Med*, 2014, 80(4): 290-296.
- [19] 马丽媛, 王洪平, 杨秀伟. 人参茎叶总皂苷的人肠内细菌生物转化 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(1): 23-36.
- [20] 杨秀伟. 人参化学成分的代谢动力学研究 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(1): 16-35.
- [21] 杨秀伟. 基于体内过程的中药有效成分和有效效应物质的发现策略 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 365-370.
- [22] 杨秀伟. 中草药化学成分的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 961-969.
- [23] Yang X W, Ma L Y, Zhou Q L, *et al.* SIRT1 activator isolated from artificial gastric juice incubate of total saponins in stems and leaves of *Panax ginseng* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(3): 240-243.

[责任编辑 潘明佳]