

熟地黄多糖含量近红外模型的建立及其对肥胖小鼠肾损伤炎症的抑制作用

李东洋^{1,2}, 黄凤玉^{1,2}, 孟鑫宇¹, 刘庆普^{1,2*}, 雷敬卫^{1,2}, 谢彩侠^{1,2*}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046)

(2. 河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 河南郑州 450046)

摘要: 建立近红外光谱法快速测定熟地黄多糖 (RGP) 含量的方法, 并探讨不同含量 RGP 对肥胖小鼠炎症的影响。采集熟地黄的近红外漫反射光谱, 结合偏最小二乘法 (PLS), 采用多元散射校正法、直接差分法和一阶导数法对光谱进行处理, 以 4 040.12~11 221.66 cm^{-1} 为波长区间, 19 为主成分数建立 RGP 含量的定量分析模型, 其含量的预测值为 34.63%~45.28%, 测定值为 34.49%~45.09%, 绝对偏差为 -0.41%~0.26%, 相对偏差为 0.121%~0.995%。并建立高脂饮食诱导的肥胖小鼠模型, 以不同含量 RGP 给药 14 周后测定空腹血糖 (FPG)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、肌酐 (Cr) 和肾脏指数, 观察小鼠肾脏组织病理形态。与模型组相比, RGP 高含量组小鼠的体质量、TC、TG、Cr、FPG 和肾脏指数分别下降 11.29%、31.59%、47.63%、34.63%、28.57%、19.00%; RGP 的干预可明显改善肾脏组织结构损伤, 抑制炎症细胞的浸润, 且作用效果与含量高低呈正相关。由此表明建立近红外光谱模型可快速准确地测定 RGP 含量; RGP 具有调节肥胖小鼠血脂异常, 抑制肾脏炎症反应, 保护肾脏结构的作用, 为 RGP 的开发利用提供实验依据。

关键词: 熟地黄多糖; 近红外光谱技术; 快速测定; 高脂饮食; 抗炎作用

文章编号: 1673-9078(2024)10-79-88

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1160

Near-infrared Model for Quantifying *Rehmannia glutinosa* Polysaccharide Content and Its Anti-inflammatory Effect on Kidney Injury in Obese Mice

LI Dongyang^{1,2}, HUANG Fengyu^{1,2}, MENG Xinyu¹, LIU Qingpu^{1,2*}, LEI Jingwei^{1,2}, XIE Caixia^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

(2. Henan Provincial Engineering and Research Center for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

引文格式:

李东洋, 黄凤玉, 孟鑫宇, 等. 熟地黄多糖含量近红外模型的建立及其对肥胖小鼠肾损伤炎症的抑制作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 79-88.

LI Dongyang, HUANG Fengyu, MENG Xinyu, et al. Near-infrared model for quantifying *Rehmannia glutinosa* polysaccharide content and its anti-inflammatory effect on kidney injury in obese mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 79-88.

收稿日期: 2023-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82073952); 河南省科技攻关项目 (202102310511); 河南中医药大学博士科研基金 (BSJJ2018-09); 河南中医药大学博士科研基金 (RSBSJJ2020-01)

作者简介: 李东洋 (1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药物质量与分析, E-mail: 2507526422@qq.com

通讯作者: 刘庆普 (1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药质量控制与分析, E-mail: liuqingpugo@163.com; 共同通讯作者: 谢彩侠

(1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药质量控制研究, E-mail: nanyang.xcx@163.com

Abstract: A method for the rapid determination of the *Rehmannia glutinosa* polysaccharide (RGP) content by near-infrared spectroscopy (NIRS) was established. The effects of different RGP concentrations on inflammation in obese mice were investigated. The NIR diffuse reflectance spectra of *Rehmanniae Radix Praeparata* were collected and analyzed using the partial least squares (PLS) method. The spectra were processed using the multivariate scatter correction (MSC), direct difference, and first order derivative methods within a wavelength range of 4 040.12~11 221.66 cm^{-1} . The quantitative analysis model for evaluating the RGP content was established by taking into consideration 19 principal components; the predicted contents were 34.63%~45.28%, the measured contents were 34.49%~45.09%, the absolute deviations were -0.41%~0.26%, and the relative deviations were 0.121%~0.995%. The obese mice model was generated using a high-fat diet. Renal function index (RFI), renal histopathology, and fasting blood glucose (FPG), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and creatinine (Cr) levels were evaluated after 14 weeks of RGP administration at various doses. The body weight, TC, TG, Cr, FPG, and RFI in the high-RGP content group decreased by 11.29%, 31.59%, 47.63%, 34.63%, 28.57%, and 19.00%, respectively (compared with the model group). RGP could significantly attenuate structural damage and inhibit inflammatory cell infiltration in kidney tissues, and these effects were positively correlated with the RGP content. These results showed that the NIRS model can quickly and accurately determine the RGP content, and that RGP can ameliorate dyslipidemia, inhibit the kidney inflammatory response, and protect the renal structure in obese mice. The findings of this study can help substantiate the development and utilization of RGP.

Key words: *Rehmannia glutinosa* polysaccharide; near-infrared spectroscopy; rapid determination; high-fat diet; anti-inflammatory effect

地黄是玄参科植物地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 的块根^[1]。由生地黄酒制干燥后入药的称为熟地黄, 具有滋阴补血、益精填髓的功效, 临床上多用于肝肾阴虚、骨蒸潮热、血虚萎黄和心悸等病症^[2]。国家卫生健康委员会将其列为可用于保健食品的中药, 且民间食用地黄已有一千多年历史^[3], 现代研究表明地黄的主要化学成分有环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、多糖类、氨基酸类等^[4], 其中多糖类日益受到人们关注, 其研究也越来越深入。然而, 目前熟地黄多糖 (RGP) 的含量测定方法仍然以苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法和 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS 法) 等方法为主, 这些方法不仅操作繁琐、费时、误差大, 且存在危险因素^[5]。因此, 寻找一种操作简单、结果准确、快速安全且可满足大批次 RGP 含量测定的方法具有重要意义。

近红外光谱 (Near Infrared, NIR) 技术是一种使用简单方便、分析快速、不破坏样品, 不会产生任何有毒废弃物的新型分析技术^[6], 已广泛用于产地溯源、真伪鉴别以及质量控制等方面中药研究^[7]。吕悦等^[8]建立的黄精多糖 NIR 定量模型, 预测结果相对偏差均小于 2%, 证实 NIR 法可用于黄精的在线监控和质量控制; 华海敏^[9]将茯苓 NIR 光谱和含量数据进行关联并建立定量模型, 结果表明预测值与测定值之间的拟合性良好, 证实该模型具有良好

的预测精度; 杨越等^[10]建立柴胡多糖 NIR 定量模型, 预测结果相对偏差为 8.28%, 证实 NIR 法可用于测定柴胡提取液中多糖的含量变化。这些研究都证实了 NIR 光谱技术可用于中药多糖含量的快速测定, 基于此, 本研究拟基于 NIR 技术建立一种快速测定 RGP 含量的方法。

肥胖症是一种由遗传因素、环境因素、炎症、氧化应激等多种原因相互作用而引起的慢性代谢性疾病。根据报告统计, 目前全球约 6.5 亿人患有肥胖症^[11]。现代医学通过肠道脂肪酶抑制类药物、兼有减重作用的降糖药物、手术治疗等方法治疗肥胖症, 但由于个体差异大, 不良反应明显, 治疗效果不太理想^[12]。研究证明地黄对肥胖症具有较好的疗效^[13], 且大都认为是环烯醚萜苷类成分发挥了主要作用^[14], 多糖类成分往往被忽视。作为地黄的重要有效成分, 地黄多糖在抗炎、抗氧化、调节血糖等方面具有重大药用价值^[15-17], 且在不同炮制品中熟地黄多糖含量最高^[18]。肾脏组织发生炎症反应是肥胖症的主要病因之一^[19,20], 有关熟地黄多糖成分通过抗炎减轻肥胖作用的研究, 尚未见报道, 故本文通过高脂饮食诱导肥胖小鼠探讨 RGP 对肥胖小鼠肾脏组织炎症的影响, 对 RGP 的进一步开发研究具有重大意义。

为此, 本文基于 NIR 技术, 结合偏最小二乘法 (Partial Least Squares, PLS) 建立了地黄多糖的定量

分析模型,并对 RGP 对肥胖小鼠抗炎作用进行探讨,旨在为 RGP 的开发利用及相关食品产业的发展创新提供一定参考依据。

1 材料与方 法

1.1 主要材料与试剂

D-无水葡萄糖(批号 SG8510),北京索莱宝科技有限公司;无水乙醇(分析纯),天津市恒兴化学试剂制造有限公司;硫酸(分析纯),烟台市双双化工有限公司;苯酚(分析纯),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;高脂饲料(批号:22110204A8),美国 Research Diets. Inc 公司;普通饲料, Moldiets 模尔生物;总胆固醇(Total Cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、肌酐(Creatinine, Cr)试剂盒,南京建成生物工程研究所;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染液(G1005), servicebio 公司;DAB 显色剂(G1211), servicebio 公司。

熟地黄药材样品共 80 批(河南、山西、河北、山东等产地),由河南中医药大学董诚明教授鉴定为玄参科(Scrophulariaceae)地黄属(*Rehmannia*)植物。将熟地黄置于烘箱,65℃烘干,粉碎后过 65 目(4 号筛)筛,保存于干燥器中,备用。

实验动物:C57BL/6 雄性小鼠,体质量(20±2)g,SPF 级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2021-0006。动物实验室饲养,安静通风,温度 23~27℃,光照时间 12 h,自由饮食饮水。

1.2 主要仪器与设备

Nicolet 6700 型傅立叶变换近红外光谱仪,配有 Antaris 积分球采样系统、样品杯旋转器、OMNIC 光谱采集软件和 TQ Analyst 8.0 分析软件,美国 Thermo Nicolet 公司;Evolution 260 Bio 型紫外-可见分光光度计,德国 Thermo Fischer Scientific 公司;YB-800B 型多功能粉碎机,浙江永康速锋工贸有限公司;ME204E/02 型万分之一电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;101-3AB 型电热鼓风干燥箱,北京中兴伟业世纪仪器有限公司;Centrifuge-5804R 小型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;550 鱼跃血糖仪,江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;JB-P5 包埋机,武汉俊杰电子有限公司;RM2016 病理切片仪,上海徠卡仪器有限公司;KD-P 组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;Nikon

Eclipse E100 正置光学显微镜,日本尼康公司。

1.3 试验方法

1.3.1 RGP 含量近红外模型的建立

1.3.1.1 NIR 光谱采集

分别取 80 批药材样品粉末适量,平铺于标准样品杯中,以空气作参比,扣除背景,以样品杯旋转方式采集光谱。选择漫反射采样方法,分辨率为 8 cm⁻¹,光谱扫描范围为 12 000~4 000 cm⁻¹,扫描次数为 64 次^[21]。每批样品重复采样采集 3 次,求平均光谱。

1.3.1.2 RGP 含量测定

精密称取药材样品粉末适量,加入 200 mL 无水乙醇,95℃加热回流脱脂 5.5 h 后,取出药渣用无水乙醇冲洗两到三次,并于烘箱 65℃烘干。干燥后的药渣以料液比 1:50 加入蒸馏水,在 95℃条件下加热回流提取 2 h,提取液浓缩至适量,加入 5 倍量无水乙醇,边加边搅拌,置于 4℃冰箱中 12 h,4 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,沉淀于烘箱中 60℃烘干,即得粗制多糖。并根据《中国药典》中苯酚-硫酸法测定 RGP 含量^[1],以无水葡萄糖为标准品,吸光度(Y)为纵坐标,对照品溶液浓度(X)为横坐标绘制标准曲线^[22]。每个样品含量重复测定三次,取平均值^[23]。

$$B = \frac{C}{D} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B—多糖含量, %;

C—提取液中多糖的质量, g;

D—地黄质量, g。

1.3.1.3 RGP 含量定量模型的建立与验证

(1) 药材样品校正集和验证集的选择

根据 RGP 含量测定结果,并按照校正集与验证集样品 4:1 的比例、验证集样品的含量范围在校正集样品含量范围内的原则^[24],从 80 份熟地黄样品中分别选择 64 批、16 批样品作为多糖的校正集、验证集。

(2) 光谱预处理方法的原则

光谱预处理在 NIR 光谱分析中通常是有效和必要的。通过选择不同光程类型、导数、滤噪(平滑)方法等,以减少由于药材样品物理性质及采样条件的差异而造成光谱基线漂移和偏移的影响,更利于建模时有用信息的提取^[25]。通过 TQ Analyst

分析软件对原始光谱进行预处理,常用的预处理方法有原始光谱(Constant)、多元散射校正法(MSC)、标准正则变换(SNV)、一阶导数法(First Derivative)、二阶导数法(Second Derivative)、平滑滤波系数法(SG)、直接差分法(ND)^[26]。

不同预处理方法后,根据校正集内部交叉验证相关系数(R^2)、校正均方根偏差(RMSEC)、预测均方根偏差(RMSEP)等性能参数来评价模型的准确性, R^2 越接近1,RMSEC、RMSEP越小,表示模型预测结果越好^[27]。

(3) 建模光谱波长区间的选择

在NIR定量分析模型的建立中,通过软件的波长区间优化功能和对不同波长区间的手动优化,以 R^2 和RMSECV为评价指标, R^2 越接近1,RMSECV越小,表示光谱范围越佳。

(4) 主成分数的选择

用PLS法建立模型时,主成分数的选择对模型的准确性和适用性有较大影响,过大或过小都会影响模型的预测结果。本实验通过交叉验证均方根偏差(RMSECV)来选择主成分数,RMSECV越小,主成分数越佳,模型预测结果越准确^[28]。

(5) 定量模型的建立

将80批熟地黄样品用于建立模型,其中64批样品作为校正集样品,16批样品作为验证集样品。通过TQ Analyst 8.0分析软件中的PLS法建立模型,选择最佳光谱预处理方法、光谱波长区间和主成分数建立RGP定量分析模型。

(6) 定量模型的验证

在多糖定量分析模型中,将16批验证集样品进行定量分析,预测其多糖含量,并与参考值进行比较来判断模型的预测性能。

1.3.2 RGP抗炎作用的研究

1.3.2.1 不同含量RGP水提物的制备

根据RGP含量近红外模型验证集结果,选择多糖含量最低、中间和最高的三组药材样品作为低、中、高含量组用于抗炎作用研究。取1.3.1.2中所选择的三组多糖配置成4 g/kg(临床等效剂量)的RGP溶液,均放置4℃储存备用。

1.3.2.2 动物实验

C57BL/6小鼠均适应性喂养一周并称取每只小鼠体重,随机抽取8只作为正常组(ND),以普通饲料喂养;其它48只作为造模组,均以高脂饲料喂养。正常饲养9周后,将高脂饮食组体质量小于

普通饮食组体质量的小鼠剔除,分别随机抽取8只作为模型组(HFD)、RGP组(4 g/kg)、辛伐他丁(Simvastatin, Sim)组(5 mg/kg)。连续灌胃给药四周,正常组和模型组均灌胃同等体积的0.9% NaCl注射液。实验连续进行14周,实验结束后,称取各组每只小鼠体质量,并将各组小鼠禁食16 h,尾静脉取血,血糖仪检测空腹血糖(FPG)。

1.3.2.3 血清指标检测

各组小鼠摘眼球取血,收集血液并离心取上清液用于血清生化指标的检测。小鼠血清中TG、TC、Cr的检测均采用试剂盒进行检测并严格按照说明书进行操作。

1.3.2.4 肾脏指数的测定

小鼠取血后,迅速解剖取出肾脏并称量。计算肾脏指数,以此评价肾脏损伤程度。

$$E = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

E —肾脏指数, %;

m_1 —肾脏质量, g;

m_2 —体质量, g。

1.3.2.5 肾脏组织病理形态学观察

取肾脏组织,以生理盐水冲洗干净后,取一部分肾脏经4 wt.% 甲醛溶液固定24 h,常规石蜡包埋,切片,进行苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, H&E)染色。光学显微镜下观察各组肾脏组织病理并拍照。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析。实验结果以平均值±标准差表示。多组间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析评估统计学意义,并进行Dunnett's posthoc检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 RGP含量近红外模型的建立

2.1.1 NIR光谱采集结果

80份熟地黄样品的NIR光谱原始叠加图,如图1所示。

2.1.2 RGP含量测定结果

绘制对照品标准曲线,得回归方程 $Y = 9.8814X - 0.0006$ ($R^2 = 0.9994$),多糖检测质量浓度线性范围

为 0.02~0.10 mg/mL。

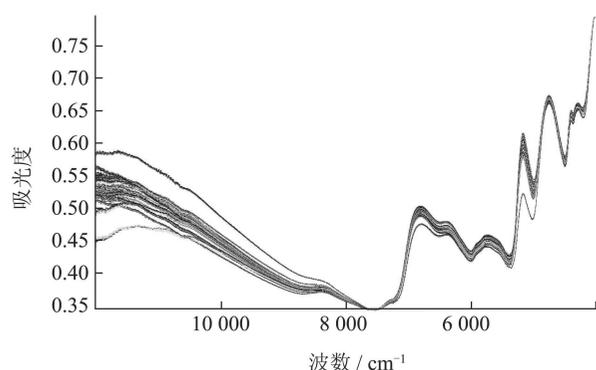


图 1 80 批熟地黄样品 NIR 光谱原始叠加图

Fig.1 NIR primordial spectral superposition of 80 batches of medicinal samples

RGP 含量结果，如表 1 所示。

表 1 RGP 含量测定结果

Table 1 Results of content determination of RGP ($n=3$, %)

编号	多糖含量	编号	多糖含量	编号	多糖含量
S1	49.95	S28	52.38	S55	47.52
S2	50.96	S29	51.98	S56	48.22
S3	51.27	S30	50.48	S57	47.12
S4	41.20	S31	43.55	S58	48.52
S5	39.32	S32	42.35	S59	47.64
S6	41.33	S33	42.97	S60	48.04
S7	40.42	S34	41.26	S61	48.33
S8	38.11	S35	42.16	S62	48.43
S9	38.52	S36	42.15	S63	48.52
S10	47.02	S37	43.15	S64	43.79
S11	46.82	S38	41.35	S65	45.09
S12	46.61	S39	41.45	S66	45.69
S13	40.74	S40	40.65	S67	44.59
S14	41.14	S41	41.96	S68	45.18
S15	41.05	S42	42.06	S69	44.83
S16	50.85	S43	41.11	S70	47.92
S17	49.85	S44	43.57	S71	47.83
S18	50.15	S45	41.48	S72	49.13
S19	43.59	S46	44.79	S73	47.22
S20	43.63	S47	44.69	S74	47.73
S21	43.34	S48	43.89	S75	47.62
S22	43.37	S49	34.49	S76	43.72
S23	43.07	S50	35.72	S77	45.80
S24	43.48	S51	33.66	S78	46.31
S25	45.09	S52	46.51	S79	45.70
S26	44.23	S53	46.21	S80	45.57
S27	44.89	S54	46.41		

2.1.3 RGP 含量定量模型的建立与验证结果

药材样品校正集和验证集的选择结果，如表 2 所示。

表 2 样品多糖校正集和验证集含量范围

Table 2 Content range of sample polysaccharide in calibration set and validation set

样品	批数	批号	含量范围/%	平均含量/%
校正集	64	S1~S3、S5、S8~S12、S14~S19、S21、S23~S24、S26~S30、S33、S35~S39、S41~S42、S44~S48、S51~S63、S65~S75、S77~S80	33.66~52.38	45.58
		S4、S6~S7、S13、S20、S22、S25、S31~S32、S34、S40、S43、S49~S50、S64、S76	34.49~45.09	41.35

2.1.3.1 最佳光谱预处理方法的选择

不同预处理方法结果，如表 3 所示。由表 3 可知，RGP 含量模型的最佳光谱预处理方法为 MSC+ND+First Derivative， R^2 为 0.996 81，RMSEC 为 0.287，RMSEP 为 0.207。

表 3 不同预处理方法对定量模型性能的影响

Table 3 Effects of different pretreatment methods on quantitative model performance

光谱预处理方法	R^2	RMSEC	RMSEP	RMSECV
Constant	0.996 63	1.14	1.96	2.18
MSC+First Derivative	0.992 24	0.447	1.66	2.29
MSC+Second Derivative	0.998 40	0.203	1.76	2.45
SNV+First Derivative	0.992 41	0.442	1.66	2.26
SNV+Second Derivative	0.998 48	0.198	1.76	2.46
MSC+ND+First Derivative	0.996 81	0.287	0.207	1.22
MSC+ND+Second Derivative	0.997 52	0.253	0.937	1.37
MSC+SG+First Derivative	0.989 80	0.512	1.76	2.29
MSC+SG+Second Derivative	0.980 11	0.713	2.07	2.57
SNV+SG+First Derivative	0.990 00	0.507	1.79	2.25
SNV+SG+Second Derivative	0.980 58	0.705	2.07	2.57
SNV+ND+First Derivative	0.996 66	0.294	0.272	1.53
SNV+ND+Second Derivative	0.997 61	0.248	0.985	1.35

2.1.3.2 最佳光谱范围的选择

结果见表4, 在4 040.12~11 221.66 cm⁻¹波长区间, R²最接近1, RMSECV最小, 故此波长区间为最佳建波光谱范围。

表4 不同光谱范围对定量模型性能的影响
Table 4 Effects of different spectral ranges on the quantitative model performance

光谱范围/cm ⁻¹	R ²	RMSECV
4 018.76~10 463.48	0.991 80	1.57
4 040.12~11 221.66	0.996 81	1.22
4 147.26~11 331.45	0.995 73	1.76
4 438.52~9 652.76	0.978 82	1.80
4 011.93~11 695.75	0.994 20	2.11

2.1.3.3 最佳主成分数的选择

结果如图2, 多糖定量模型的RMSECV最小为1.22, 故最佳主成分数为19。

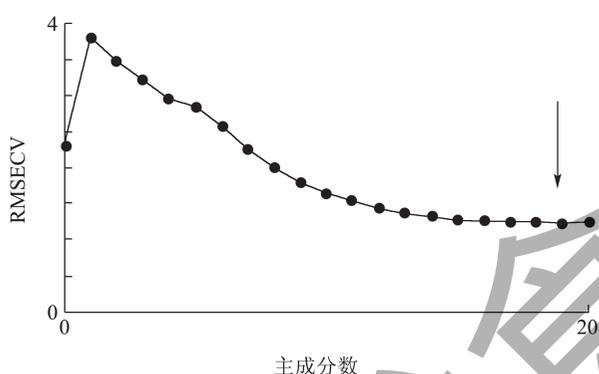


图2 主成分数对定量模型性能的影响

Fig.2 Effects of principal factor number on quantitative model performance

2.1.3.4 定量模型的建立结果

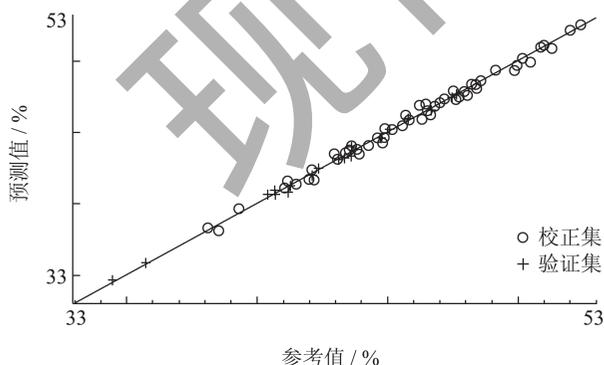


图3 RGP的参考值与预测值的相关性

Fig.3 Correlation between reference values and NIR predicted for RGP

采用MSC+ND+First Derivative 光谱预处理方法, 4 040.12~11 221.66 cm⁻¹光谱波长区间, 19个主成分

数建立RGP定量分析模型, 且模型的R²=0.996 81, RMSEC=0.287, RMSEP=0.207, RMSECV=1.22。NIR预测值与参考值之间的相关图、误差分布图见图3、图4。由图可知, NIR预测值和苯酚-硫酸法参考值很接近, 两者相关性很高, 模型预测能力较高, 故该模型可以用于RGP的含量预测。

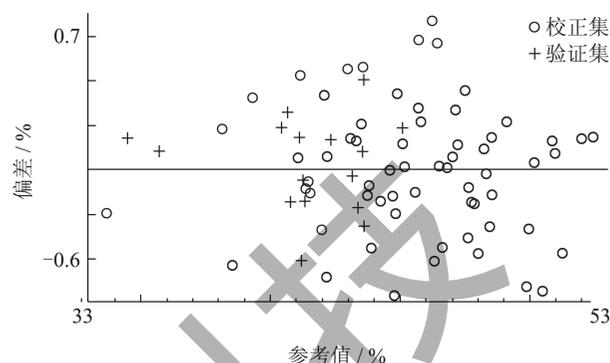


图4 RGP的参考值与预测值的偏差

Fig.4 Deviation between reference values and NIR predicted for RGP

2.1.3.5 定量模型的验证结果

如表5所示, 以苯酚-硫酸法测定的参考值与以NIR所建立模型预测值结果接近, 预测结果最大相对偏差为0.995%, 最小相对偏差为0.121%, 平均相对偏差为0.389%, 表明模型的预测效果较好, 可以用于熟地黄中多糖的含量测定。

表5 多糖定量模型验证结果 (%)

Table 5 Results of quantitative model validation of polysaccharide (%)

编号	参考值	预测值	偏差	相对偏差
S4	41.20	40.79	-0.41	0.995
S6	41.33	41.19	-0.14	0.339
S7	40.42	40.61	0.19	0.470
S13	40.74	40.59	-0.15	0.368
S20	43.63	43.38	-0.25	0.573
S22	43.37	43.20	-0.17	0.392
S25	45.09	45.28	0.19	0.421
S31	43.55	43.63	0.08	0.184
S32	42.35	42.48	0.13	0.307
S34	41.26	41.21	-0.05	0.121
S40	40.65	40.91	0.26	0.640
S43	41.11	41.26	0.15	0.365
S49	34.49	34.63	0.14	0.406
S50	35.72	35.80	0.08	0.224
S64	43.79	43.72	-0.07	0.160
S76	43.72	43.61	-0.11	0.252

2.1.4 RGP含量近红外模型的建立的结果

本研究采用 NIR 光谱技术与 PLS 相结合的方法,对 80 批熟地黄样品进行定量研究。在采用不同处理方法优化模型后,结果显示最佳预处理方法为 MSC+ND+First Derivative,最佳光谱区间为 4 040.12~11 221.66 cm^{-1} ,最佳主因子数为 19,经外部验证,平均相对偏差为 0.389%,证明建立的定量模型可以较准确的测定出 RGP 的含量。本研究以苯酚-硫酸法测定值为参考值,结合 NIR 光谱技术,建立了快速测定 RGP 含量的 NIR 定量分析模型。在传统的多糖含量测定方法中,如苯酚-硫酸、蒽酮-硫酸等方法,样品的前处理较为繁琐,且所用的试剂具有毒性和危险性,NIR 光谱法无需样品的前处理,大大缩短了测定时间,提高了检测分析效率,可用于大批量熟地黄中多糖含量的快速测定,且在保证结果准确的前提下,操作简单,不破坏样品,无污染,极大地降低了实验成本。

2.2 RGP抗炎作用的研究

2.2.1 RGP对肥胖小鼠体质量和空腹血糖的影响

RGP 对肥胖小鼠体质量和空腹血糖的影响如表 6 所示。

表 6 RGP对肥胖小鼠体质量和空腹血糖的影响

Table 6 Effect of RGP on body weight and fasting blood glucose in obese mice ($\bar{x}\pm S, n=8$)

组别	实验开始时 体质量/g	实验结束时 体质量/g	空腹血糖 (mmol/L)
ND	22.01 ± 0.77	28.00 ± 1.10	5.90 ± 0.81
HFD	22.76 ± 0.83	32.68 ± 2.56 ^{***}	7.16 ± 0.72 ^{**}
RGP-L	21.23 ± 0.82	28.60 ± 2.30 ^{###}	6.95 ± 0.62
RGP-M	23.04 ± 0.51	28.58 ± 1.72 ^{###}	6.51 ± 0.74
RGP-H	23.28 ± 0.39	27.99 ± 1.17 ^{###}	6.18 ± 0.65
Sim	21.84 ± 0.97	26.83 ± 0.98 ^{###}	6.23 ± 0.48 ^{##}

注:与 ND 组比较,^{***} $P<0.001$;与 HFD 组比较,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$ 。

由表 6 可知,与 ND 组相比,HFD 组小鼠的体质量和空腹血糖高度显著升高 ($P<0.01$),辛伐他丁 (Sim) 能显著降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠的体质量和空腹血糖 ($P<0.01$),经 RGP 干预后,小鼠实验结束时的体质量和空腹血糖与 HFD 组相比均有明显降低。Liu 等^[29]通过丹参多糖抑制高脂饮食小鼠的体质量,结果显示丹参多糖可以抵抗高脂饮食诱导的显著体质量增加或肥胖,小鼠体质量降

低 11.79%,而 RGP 低、中、高含量组使小鼠体质量分别降低 11.29%、12.55%、12.47% (RGP-L、RGP-M、RGP-H : $P<0.001$);使小鼠空腹血糖分别降低 2.97%、9.08%、13.61%。RGP 与丹参多糖相比降低肥胖小鼠体质量效果更显著,具有作用周期短、起效快的特点。以上结果表明 RGP 可以降低高脂饮食诱导的肥胖小鼠的体质量和空腹血糖。

2.2.2 RGP对肥胖小鼠血脂的影响

为探讨 RGP 对高脂饮食诱导的肥胖小鼠血脂的影响,实验检测了小鼠血清 TG 和 TC,结果如图 5 所示。

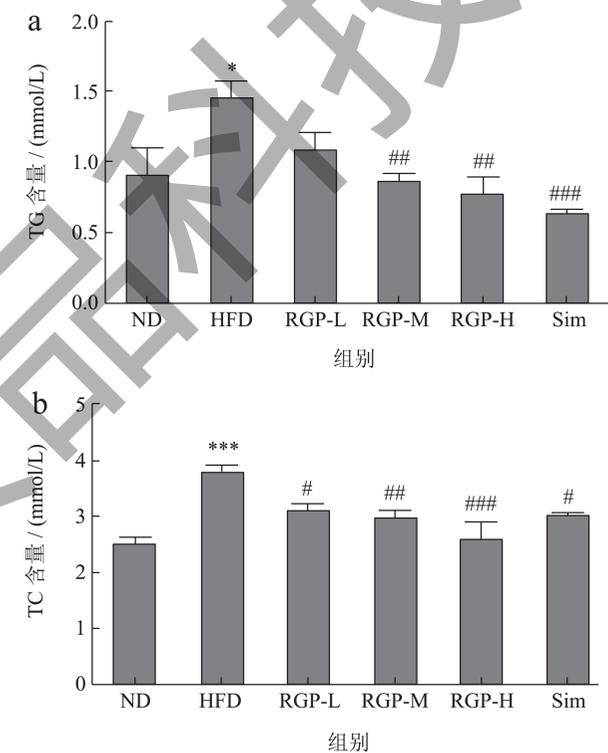


图 5 RGP 对肥胖小鼠血脂的影响

Fig.5 Effect of RGP on blood lipids in obese mice ($n=8$)

注:与 ND 组比较,^{*} $P<0.05$,^{***} $P<0.001$;与 HFD 组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$ 。

由图 5 可知,与 ND 组相比,HFD 组小鼠的 TG 和 TC 水平均显著升高 ($P<0.05$, $P<0.001$),说明高脂饮食诱导的肥胖小鼠出现血症紊乱,脂代谢异常,这与黄敏仪等^[30]的研究结果一致;经 RGP 干预后,RGP 中、高含量组均可使肥胖小鼠血清 TG 降低 40.94%、47.63% (RGP-M : $P<0.01$, RGP-H : $P<0.01$),效果显著,RGP 低含量组的小鼠血清 TG 与 HFD 组相比虽无显著性差异,但也降低 25.71%;RGP 低、中、高含量组使血清 TC 分

别降低 18.14%、21.42%、31.59% (RGP-L: $P < 0.05$, RGP-M: $P < 0.01$, RGP-H: $P < 0.001$)。Yan 等^[31]在探讨大麦草多糖在高脂饮食诱导的小鼠中的抗高脂血症作用中, 结果证实该多糖虽具有降脂作用, 可以抑制 HFD 引起的肥胖, 但小鼠血清 TG、TC 与 HFD 组相比无明显差异。RGP 改善血脂异常作用效果优于大麦草多糖, 更加适用于高脂血症的干预治疗。以上结果表明 RGP 可以改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠的血脂紊乱。

2.2.3 RGP对肥胖小鼠肾脏指数、Cr的影响

肾脏指数、血清 Cr 均是判断肾脏组织是否出现损伤的重要指标之一^[32]。由图 6 可知, HFD 组小鼠的肾脏指数和 Cr 水平与 ND 组相比极显著升高, 升高 12.08%, 说明高脂饮食已经导致小鼠的肾功能受损; 与 HFD 组相比, RGP 低、中、高含量组小鼠肾脏指数分别降低 10.10%、14.45%、19.00% (RGP-L: $P < 0.05$, RGP-M: $P < 0.01$, RGP-H: $P < 0.001$), 小鼠 Cr 水平分别降低 19.35%、26.42%、34.63% (RGP-L: $P < 0.05$, RGP-M: $P < 0.01$, RGP-H: $P < 0.001$), 证明 RGP 可显著降低小鼠的肾脏指数和 Cr 水平, 且降低 Cr 水平效果更佳。以上结果表明 RGP 可以改善高脂饮食诱导的肥胖小鼠的肾功能损伤。

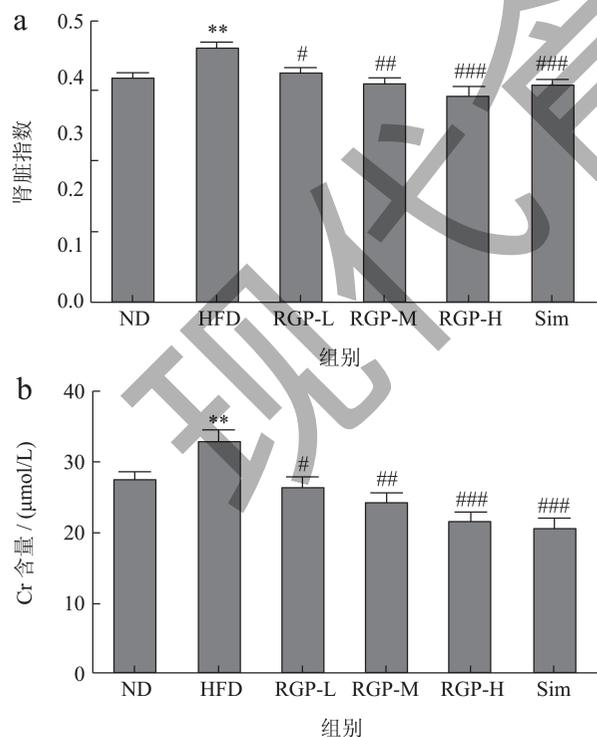


图 6 RGP 对肥胖肾脏指数、Cr 的影响

Fig.6 Effect of RGP on obesity renal index and Cr ($n=8$)

注: a 为肾脏指数, b 为肌酐 (Cr); 与 ND 组比较, $**P < 0.05$; 与 HFD 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ 。

2.2.4 RGP对肥胖小鼠肾脏组织病理形态的影响

RGP 对肥胖小鼠肾脏组织病理形态的影响结果如图 7 所示。

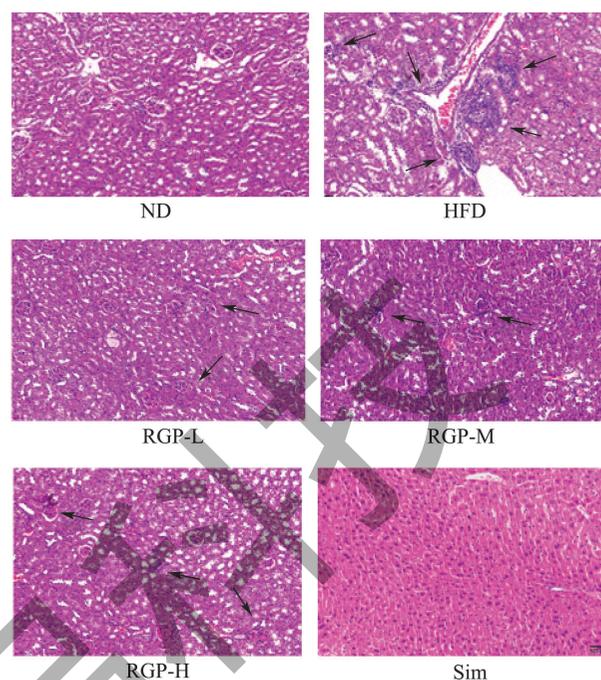


图 7 RGP 对肥胖小鼠肾脏组织病理形态的影响
Fig.7 Effect of RGP on the histopathologic morphology of kidney in obese mice (H&E, $\times 400$)

由图 7 可知, 对各组小鼠进行 H&E 染色分析, 结果显示, ND 小鼠肾脏组织结构正常无异变, 各部分排列整齐, 未出现炎症细胞浸润情况。与 ND 相比, HFD 组小鼠肾脏组织炎症细胞浸润显著增多, 部分肾小球体积增大、毛细血管轻度扩张, 肾小球系膜区增宽、系膜细胞增生, 这表明高脂饮食损伤了小鼠肾脏组织结构。经 RGP 干预后, RGP 不同含量组均能改善肥胖小鼠肾脏组织损伤, 且改善能力与含量高低呈正相关; RGP-L 组和 RGP-M 组小鼠肾脏组织结构中仍存在损伤, 但与 HFD 组小鼠相比, 肾脏组织结构损伤程度明显得到改善; RGP-H 组小鼠肾脏组织结构中几乎看不到炎症细胞浸润, 肾脏组织结构损伤程度得到显著改善。Wang 等^[33]探讨灵芝多糖改善高脂饮食诱导的炎症, 结果表明给药后可显著降低过高的脂质水平, 但仅部分减轻了肾脏组织损伤及炎症细胞浸润, 与 RGP 改善肾脏组织炎症作用相比, RGP 效果更加显著; 黄昊乐等^[34]探讨黄芪多糖对高脂大鼠肾脏的保护作用, 结果表明黄芪多糖组虽能改善高脂造成肾损伤的功能性指标, 但未明显改善肾损伤, 与 RGP 显著改善肾损伤结果相比, 在保护肾脏组织方面 RGP

效果更佳。以上结果表明 RGP 具有抗炎作用,对高脂饮食诱导的肥胖小鼠肾脏组织具有保护作用。

2.2.5 RGP 抗炎作用的研究结果

本研究中,高脂饮食诱导的小鼠在经过 RGP 干预后体重出现明显下降,表明 RGP 对体重具有控制作用,但不排除是由于小鼠进食量不同所导致的,需要进一步研究证实。同时,高脂饮食使小鼠血清 TC、TG、Cr 显著升高,说明高脂饮食的小鼠脂代谢出现异常,长期脂代谢异常,可导致肾脏组织出现损伤^[35]。在本研究中,高脂饮食的小鼠肾脏指数明显升高,且病理结果显示小鼠肾脏出现损伤,炎症细胞浸润明显增加,这些结果证明高脂饮食可损伤小鼠肾脏,加重炎症反应。而 RGP 干预后,小鼠 TC、TG、Cr 水平显著降低,这说明地黄对高脂饮食小鼠脂代谢异常具有改善作用,同时,小鼠肾脏结构和炎症细胞浸润情况得到明显改善。这些结果表明 RGP 对肾脏具有一定保护作用,对炎症细胞具有抑制作用。RGP 不仅在抗炎减轻肥胖方面具有显著的效果,而且作为民间食用千年的大宗药材,具有药材来源广、安全稳定等特点,不断的研发和创新,使其成为保健功能食品获得更多可能。同时炎症作为肥胖-相关组织损伤的致病机制之一,RGP 对其反应机制及相关蛋白表达的影响尚不明确,需要作进一步探讨。

3 结论

本研究不仅证明了 NIR 光谱技术快速测定熟地黄中多糖含量的可行性,为熟地黄多糖含量的测定提供了一种绿色、快速、无损的分析方法;而且也证实了熟地黄多糖可以降低肥胖小鼠体质量及血糖血脂,保护肾脏结构,其机制可能与减轻肾脏炎症反应有关。随着中药制药行业的高速发展,NIR 光谱技术将在中药质量控制研究中具有广阔的应用前景,本研究为其他中药及有效成分含量的快速测定及开发治疗肥胖症、辅助降血脂、缓解肾损伤的地黄多糖类功能食品提供了一定试验依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 王勃,吕辰子,何美菁,等.熟地黄炮制研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2018,20(6):1010-1017.
- [3] 李为民.至阴之品-地黄说[M].北京:人民卫生出版社,2010.
- [4] 陈金鹏,张克霞,刘毅,等.地黄化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,2021,52(6):1772-1784.
- [5] 吴诗云,钟益宁,张焱,等.熟地黄多糖含量测定方法研究[J].安徽农业科学,2016,44(35):154-156,161.
- [6] 陆婉珍,袁洪福,徐广通,等.现代近红外光谱分析技术.第二版[M].北京:中国石化出版社,2007.
- [7] 陈依晴,孙发哲.近红外光谱技术在中药质量检测中的应用[J].轻工科技,2020,36(11):77-78,85.
- [8] 吕悦,吴杭莎,韦飞扬,等.黄精多指标成分近红外光谱快速定量分析模型建立[J].中成药,2022,44(9):2878-2884.
- [9] 华海敏.近红外光谱技术在茯苓多糖提取过程中的应用研究[D].广州:广东药科大学,2022.
- [10] 杨越,杨留长,纪晓亮,等.近红外光谱法快速测定柴胡提取过程中的药效成分[J].分析测试学报,2020,39(11):1311-1319.
- [11] 中国超重/肥胖医学营养治疗指南.2021版.[J].中国医学前沿杂志,2021,13(11):1-55.
- [12] 王勇,王存川,朱晒红,等.中国肥胖及2型糖尿病外科治疗指南.2019版.[J].中国实用外科杂志,2019,39(4):301-306.
- [13] BHATTAMISRA S K, YAP K H, RAO V, et al. Multiple biological effects of an iridoid glucoside, catalpol and its underlying molecular mechanisms [J]. Biomolecules, 2019, 10(1): 32-32.
- [14] 朱俏俏,钟亮,戚进.地黄中环烯醚萜类化学成分的研究进展[J].海峡药学,2015,27(9):1-5.
- [15] 任恒,张爽,祁晨,等.地黄多糖提取工艺、生物活性及机制研究进展[J].食品安全质量检测学报,2023,14(4):222-231.
- [16] LIU C Y, ZHANG T T, ZHAO P, et al. Purification and structural analysis of a novel polysaccharide from *Rehmannia radix praeparata* [J]. Chemical Biology & Drug Design, 2023, 102(3): 514-522.
- [17] LIN G L, LI Y Y, CHEN X H, et al. Extraction, structure and bioactivities of polysaccharides from *Sanghuangporus* spp: A review [J]. Food Bioscience, 2023, 53: 2212-4292.
- [18] 田家屹,马芳,韩玲玉.基于红外光谱的鲜地黄、生地黄和熟地黄成分差异分析[J].光谱学与光谱分析,2022,42(10):3203-3209.
- [19] 唐慎微.《经史证类备急本草》[M].北京:图书馆出版社.
- [20] LIU M, XIE J, SUN Y. TLR4/My D88/NF- κ B-mediated inflammation contributes to cardiac dysfunction in rats of PTSD [J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2020, 40(6): 1029-1035.
- [21] CEN H Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality [J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18(2): 72-83.
- [22] 张子玉,汪东风,范明昊,等.茶多糖含量的快速测定方法[J].食品安全导刊,2022,24:81-86.
- [23] 王迎春,唐子惟,彭腾,等.苯酚-硫酸法测定酒蒸多花黄精

- 多糖含量的优化[J].食品工业科技,2021,42(18):308-316.
- [24] 耿晓桐,王丰青,谢彩侠,等.怀地黄叶片中总环烯醚萜苷及总苯乙醇苷含量快速分析模型的建立[J].天然产物研究与开发,2019,31(5):786-796,901.
- [25] KASEMSUMRAN S, THANAPASE W. A feasibility study on non-destructive determination of oil content in palm fruits by visible-near infrared spectroscopy [J]. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2012, 20(6): 687-694.
- [26] SWARBRICK B, GROUT B, NOSS J. The rapid, at-line determination of starch content in sucrose-starch blends using near-infrared reflectance spectroscopy; a process analytical technology initiative [J]. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2005, 13(1): 1-8.
- [27] 史晶晶,张迪文,白雁,等.近红外光谱法快速测定女贞子药材中水分含量[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(8):92-95.
- [28] 谢彩侠,谢惠英,白雁,等.近红外光谱法快速测定知母中芒果苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(10):59-62.
- [29] LIU Z H, MA C, GAO H W, et al. A polysaccharide from *Salvia miltiorrhizae radix* inhibits weight gain of mice with high-fat diet via modulating intestinal bacteria [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2024, 104(1): 479-487.
- [30] 黄敏仪,陈可纯,罗朵生,等.田黄方对高脂饮食诱导小鼠肾脏损伤的改善作用及机制研究[J].广东药科大学学报,2022,38(2):1-7.
- [31] YAN J K, CHEN T T, LI L Q, et al. The anti-hyperlipidemic effect and underlying mechanisms of barley (*Hordeum vulgare* L.) grass polysaccharides in mice induced by a high-fat diet [J]. Food & Function, 2023, 14(15): 7066-7081.
- [32] 温蕊,周广宇,赵圆圆,等.肥胖相关性肾小球病诊治进展[J].中国实验诊断学,2019,23(5):927-931.
- [33] WANG W S, ZHANG Y H, WANG Z Y, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides improve lipid metabolism against high-fat diet-induced dyslipidemia [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 12(309): 116321.
- [34] 黄昊乐.黄芪多糖对高血脂大鼠肾脏的保护机制研究[J].中国现代应用药学,2014,31(6):693-695.
- [35] 张明昊,高一盈,董文霞,等.复方丹参片对高脂血症模型大鼠血脂水平的改善及肾功能保护作用机制研究[J].中国药房,2022,33(7):818-824.