

美洲大蠊药渣中多糖制备工艺优化及促创面愈合的综合利用研究

王 婷¹, 王 潇¹, 李佳鑫¹, 傅超美¹, 耿福能², 瞿 燕^{1*}, 章津铭^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 西部中药材综合开发利用教育部工程研究中心, 四川 成都 611137
2. 四川好医生药业集团, 四川 成都 610000

摘要: **目的** 采用响应面法优化美洲大蠊药渣中多糖提取工艺, 并考察其促创面愈合的作用, 为美洲大蠊药渣综合利用提供思路。**方法** 在单因素实验基础上, 采用 Box-Behnken 设计最佳美洲大蠊多糖提取工艺, 并分析其单糖组成。采用 0.1、0.05、0.025 g/mL 美洲大蠊多糖作用于创面损伤模型小鼠, 计算创面愈合率, 用苏木精-伊红和天狼猩红染色评价创面愈合程度。**结果** 美洲大蠊多糖的最佳提取工艺为碱液浓度 0.02 mol/L, 提取时间 1.65 h, 提取温度 62 ℃, 该条件所得多糖转移率为 13.68%, 且由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖 7 种单糖组成。创面愈合实验表明, 第 3、6、9、14 天多糖给药组创面愈合率均高于模型组, 且组织切片染色表明该多糖组分能促进胶原和肉芽组织生成, 从而促进创面愈合。**结论** 响应面法优化的提取工艺切实可靠, 提取率高; 美洲大蠊药渣提取多糖能促进小鼠创面愈合, 提示美洲大蠊药渣中多糖具有开发为创面用相关产品的应用前景。

关键词: 美洲大蠊药渣; 多糖; 响应面法; 苯酚-硫酸法; 创面愈合

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)10-2339-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.013

Optimization of polysaccharide preparation and comprehensive utilization of wound healing in residue of *Periplaneta americana*

WANG Ting¹, WANG Xiao¹, LI Jia-xin¹, FU Chao-mei¹, GENG Fu-neng², QU Yan¹, ZHANG Jin-ming¹

1. Key Laboratory Standardization of Chinese Herbal Medicine of Ministry of Education, Research Center for Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, College Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Good Doctor Pharmaceutical Group, Chengdu 610000, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction of polysaccharide from the residue of *Periplaneta americana* by response surface method and study the effect of *P. americana* polysaccharide (PAP) on wound healing, so as to provide ideas for the comprehensive utilization of *P. americana* residues. **Methods** On the basis of single factor experiment, Box-Behnken response surface method was used to design the best extraction process. And the monosaccharide composition of polysaccharide was analyzed. Polysaccharide concentrations of 0.1, 0.05, and 0.025 g/mL were applied to the wound injury model mice. The wound healing rate was calculated, and hematoxylin-eosin (HE) and Sirius Red staining were used to evaluate the wound healing degree. **Results** The optimum extraction technology of PAP were as follows: The concentration of NaOH was 0.02 mol/L; And the extraction time was 1.65 h; The extraction temperature was 62 ℃. The transfer rate of polysaccharide extracted by this process was 13.68%. The polysaccharide of the *P. americana* consisted of seven monosaccharides of mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, glucose, galactose, and fucose. Wound healing experiment showed that wound healing rate of the polysaccharide group on day 3, 6, 9, and 14 was higher than that of the model group, and HE and Sirius Red staining showed that the polysaccharide could promote the formation of collagen and

收稿日期: 2019-02-15

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-SC-53); 2017 年四川省“千人计划”青年人才项目; 2018—2020 年中国科协青年人才托举工程项目 (2018QNRC1-01)

作者简介: 王 婷 (1995—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药新制剂与新剂型。Tel: 17628284952 E-mail: wangting199501@163.com

*通信作者 瞿 燕 (1976—), 女, 博士, 教授, 主要从事中药制剂新技术与新辅料的研究。Tel: (028)61800231 E-mail: quyan028@126.com
章津铭 (1987—), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药新型给药系统研究。Tel: 13551043885 E-mail: cduetcmzjm@126.com

granulation tissue, thus promoting the wound healing. **Conclusion** The optimized extraction process of PAP from *P. americana* residues by response surface method was reliable, with high extraction rate. And PAP could promote wound healing in mice, suggesting that the polysaccharide from *P. americana* residues could be used as wound related products.

Key words: *Periplaneta americana* residues; polysaccharides; response surface method; phenol-sulfuric acid method; wound healing

美洲大蠊 *Periplaneta americana* L., 俗称“蟑螂”, 为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫。美洲大蠊是地球上最古老的昆虫之一, 通过化石标本证实早在 3.8 亿年前就出现在地球上, 顽强的生命力和适应力提示其存在较好的药用价值。美洲大蠊入药始载于汉代《神农本草经》, 通称蜚蠊^[1], 在我国历代本草专著如《本草纲目》《新修本草》等中均有记载。其性寒味咸, 有毒, 具活血散瘀、解毒消痞、利尿消肿之功效^[2]。

近年来, 美洲大蠊的药用价值受到科学界越来越广泛的认同, 大量研究表明其具有促黏膜愈合、抗肿瘤、抗菌、抗肝纤维化等作用^[3-9], 并将其开发出康复新液、心脉隆注射液、肝龙胶囊等上市品种, 其中以康复新液的临床价值和市场影响力最大, 在近期公布的《中药大品种科技竞争力报告(2018版)》排行榜中, 好医生药业集团的康复新液再次蝉联消化系统用药中药大品种科技竞争力第 1 名^[10]。康复新液已广泛应用于临床消化内科、口腔科、耳鼻喉科、外科、肛肠科、皮肤科、妇产科、儿科等科室, 治疗复发性阿弗他溃疡、胃食管反流病、消化性溃疡、溃疡性结肠炎、各类外伤、烧伤、术后创面、放射性损伤等, 在促进各类黏膜、皮肤创面的愈合方面^[11], 具有疗效好、副作用小等特点。

目前药学工作者普遍认为, 美洲大蠊中蛋白质、氨基酸、肽类、含氮小分子等化学成分是其主要药效成分^[12-17], 其上市品种康复新液即是采用将美洲大蠊药材脱脂后, 用较高体积分数乙醇提取制得, 内含多种肽类、氨基酸、多元醇等物质。但调研发现, 美洲大蠊是目前使用量最大的虫类中药材, 康复新液等制剂的生产过程产生了大量醇提后药渣, 这部分药渣目前采用堆放、发酵、制作动物饲料等粗放方式处理, 未能对其实现药渣资源的综合利用和开发。已有研究者发现, 美洲大蠊药渣中具有较高含量的壳聚糖类多糖, 并对其中甲壳素与壳聚糖的提取工艺进行了考察^[18], 但仍缺乏对美洲大蠊药渣高价值利用的深入研究。

壳聚糖、甲壳素等天然多糖因具有良好的组织相容性和生物可降解性, 且具有良好的保湿透气性能, 广泛应用于创面敷料研究中^[19]。本实验采用碱

提法结合响应面优化法, 考察美洲大蠊醇提后的药渣中多糖的提取工艺, 进一步采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(PMP)柱前衍生 HPLC 法测定多糖的单糖组成。随后制备创面损伤小鼠模型, 以考察美洲大蠊多糖的促创面愈合作用, 为美洲大蠊资源的综合利用研究提供新思路。

1 材料

1.1 仪器与设备

UV756CRT 型紫外可见分光光度计, 上海佑科仪器仪表有限公司; LC-2030C 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司, 含 Agilent C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); DZKW-4 型电热恒温水浴锅, 北京中兴伟业仪器有限公司; SHZ-D 型循环水式多用真空泵, 河南省予华仪器有限公司; D05 型低速离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司。

1.2 材料与试剂

美洲大蠊醇提后药渣, 四川好医生药业集团有限公司提供; 对照品无水葡萄糖(批号 MUST-18032905, 质量分数>99.85%)、甘露糖(批号 G-042-171216, 质量分数>98%)、鼠李糖(批号 S-037-171216, 质量分数>98%)、葡萄糖醛酸(批号 wkq18022708, 质量分数>98%)、半乳糖醛酸(批号 wkq18022807, 质量分数>97%)、半乳糖(批号 B-079-171216, 质量分数>98%)、岩藻糖(批号 wkq18022403, 质量分数>98%), 购于成都瑞芬思生物科技有限公司; 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、PMP, 购于成都市科隆化学品有限公司; 盐酸、苯酚、硫酸、水合氯醛、多聚甲醛、氢氧化钠, 购于成都市科隆化学品有限公司。

1.3 实验动物

昆明小鼠, 80 只, 雄鼠, 体质量 20~25 g, 成都达硕动物实验研究中心, 均喂养于光照 12 h, 湿度 40%~60%, 温度 23~25 °C 的环境中, 自由进食进水, 适应性喂养 1 周。

2 方法与结果

2.1 美洲大蠊药渣中多糖提取

称取醇提后的美洲大蠊药渣 10 g, 加入 NaOH 稀碱液, 水浴温浸提取, 由预实验确定提取次数为 2 次。合并 2 次提取液。提取液加 1 mol/L HCl 溶液

或 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至中性, 3 500 r/min 离心 15 min, 收集上清液。减压浓缩至固定体积, 加 3 倍量 95% 乙醇醇沉 24 h, 取沉淀烘干。按试验方案料液比、碱液浓度、提取温度、提取时间进行提取, 调节 pH 值、离心、浓缩至固定体积、醇沉, 40 °C 烘干即得美洲大蠊粗多糖。

2.2 美洲大蠊多糖测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取无水葡萄糖对照品 50.23 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加纯水定容至刻度, 即得质量浓度为 1.004 6 mg/mL 的葡萄糖对照品母液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取干燥至恒定质量的美洲大蠊粗多糖 5 mg, 以少量蒸馏水溶解, 定容至 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 配成质量浓度为 0.5 mg/mL 的多糖溶液, 即得供试品溶液。

2.2.3 多糖测定方法及转移率计算 取“2.2.2”项下制得的供试品溶液 1 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 迅速加浓硫酸 (95%~98%) 5 mL, 振摇 2 min 后, 置沸水浴中加热 15 min, 取出, 置冷水中冷却 5 min, 在 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。以蒸馏水代替供试品溶液同法操作作为空白。由回归方程计算多糖质量浓度, 按以下公式计算多糖转移率。

$$\text{多糖转移率} = CV/m$$

C 为样品溶液中多糖质量浓度, V 为样品溶液体积, m 为美洲大蠊粗多糖质量

2.2.4 线性关系考察 精密吸取葡萄糖母液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6 mL, 分别定容至 10 mL 得到质量浓度为 10.0、20.1、40.2、80.4、120.6、160.7 $\mu\text{g/mL}$ 的葡萄糖对照品溶液, 分别取 1 mL, 按“2.2.3”项下方法检测。以葡萄糖质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 得出线性回归方程为 $Y = 8.836\ 9\ X - 0.090\ 3$, $r^2 = 0.997\ 9$, 结果表明无水葡萄糖在 10.0~160.7 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 1 mL, 按“2.2.3”项下方法操作测定 A 值, 连续测定 6 次, 测得吸光度值 RSD 为 0.36%, 表明该仪器与方法的精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按样品测定方法操作, 每隔 0.5 h 测定 1 次 A 值并计算多糖转移率, 4 h 内多糖平均转移率为 7.23%, RSD 为 1.21%, 结果表明 4 h 内供试品溶液稳定。

2.2.7 重复性试验 取 6 份美洲大蠊粗多糖, 按

“2.2.2”项下制备供试品溶液, 按“2.2.3”项下方法测定并计算多糖转移率, 测得多糖平均转移率为 7.28%, RSD 值为 1.20%, 表明重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密吸取已测定的样品溶液 0.5 mL, 分别精密加入 3 种不同质量浓度的葡萄糖对照品溶液 0.5 mL, 按“2.2.3”项下方法操作, 计算平均回收率为 97.25%, RSD 为 1.05%, 表明加样回收率良好。

2.2.9 样品中多糖的测定 精密称取美洲大蠊粗多糖样品, 按“2.2.2”项下操作制备供试品溶液, 按照“2.2.3”项下多糖测定方法测得 A 值, 并计算多糖转移率。

2.3 单因素实验考察美洲大蠊多糖提取工艺

2.3.1 不同碱液浓度对美洲大蠊多糖提取的影响 称取醇提后的美洲大蠊药渣 10 g, 固定其他条件, 按“2.1”项下方法提取多糖, 分别考察碱液浓度 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mol/L 对多糖转移率的影响。结果美洲大蠊多糖转移率分别 9.37%、10.47%、10.92%、8.42%、4.45%。实验结果显示碱液浓度为 0.03 mol/L 时, 多糖转移率最高, 故选择碱液浓度 0.03 mol/L 作为响应面的中点。

2.3.2 不同提取时间对美洲大蠊多糖提取的影响 称取醇提后的美洲大蠊药渣 10 g, 固定其他条件, 考察提取时间 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 对美洲大蠊多糖转移率的影响, 结果美洲大蠊多糖转移率分别为 2.59%、3.32%、6.15%、3.81%、1.90%。在提取时间 1.5 h 时, 多糖转移率达到最大值, 故选择提取时间 1.5 h 作为响应面的中点。

2.3.3 不同提取温度对美洲大蠊多糖提取的影响 称取醇提后的美洲大蠊药渣 10 g, 固定其他条件, 分别考察提取温度 40、50、60、70、80 °C 对多糖转移率的影响, 结果美洲大蠊多糖转移率分别为 2.25%、2.73%、3.31%、3.08%、1.49%。实验表明随温度升高, 多糖转移率逐渐升高, 温度超过 60 °C, 多糖转移率下降, 故选择提取温度 60 °C 作为响应面的中点。

2.3.4 不同料液比对美洲大蠊多糖提取的影响 称取醇提后的美洲大蠊药渣 10 g, 固定其他条件, 考察不同料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 对多糖转移率影响。结果美洲大蠊多糖转移率分别为 2.67%、2.46%、2.65%、2.35%、2.34%。结果表明不同料液比对多糖转移率影响不显著, 其中料液比为 1:10 时, 多糖转移率最高, 故统一选择料

液比 1 : 10。

2.4 响应面试验考察美洲大蠊多糖提取工艺

由单因素实验确定各因素范围, 选取提取碱液浓度 (A)、提取时间 (B)、提取温度 (C) 为主要影响因素, 运用 Design Expert 8.0 软件进行 3 因素 3 水平 Box-Behn Design (BBD) 试验设计, 试验因素及水平以及响应面设计结果见表 1。根据实验结果, 以美洲大蠊多糖转移率为因变量 (Y), 运用软件对各个因素进行多元 2 次方程拟合, 得到的方程式为 $Y=13.01-2.42 A+1.00 B+0.53 C-0.041 AB-0.12 AC+0.41 BC-2.33 A^2-1.81 B^2-1.85 C^2$ 。

方差分析结果见表 2。模型的各项方差分析中模型本身的 $P<0.000 1$, 具有显著性, 失拟项 $P=0.393 9>0.05$, 无显著性差异; 另外该模型的校正决定性系数 $R_{adj}^2=0.992 4$, 表明模型对美洲大蠊多糖提取实验的拟合度良好。A、B、C、 A^2 、 B^2 、 C^2 项对提取结果均有显著影响 ($P<0.000 1$), 由 F 值可知, 对提取的美洲大蠊多糖转移率的影响为 $A>B>C$, 即碱液浓度>提取时间>提取温度。其中 BC 交互项 $P<0.05$, 对响应值影响显著, 各因素的响应面交互作用 3D 图见图 1。

2.5 最优提取工艺预测及验证试验

通过软件优化得出美洲大蠊药渣中多糖的最佳

表 1 Box-Behnken 响应面设计及结果

Table 1 Project and results in Box-Behnken design

编号	A/(mol·L ⁻¹)	B/h	C/°C	Y/%	编号	A/(mol·L ⁻¹)	B/h	C/°C	Y/%	编号	A/(mol·L ⁻¹)	B/h	C/°C	Y/%
1	0.03 (0)	1.5 (0)	60 (0)	12.696	7	0.03	1.5	60	13.187	13	0.01	2.0	60	12.310
2	0.03	1.0 (-1)	70 (+1)	8.645	8	0.05	2.0	60	7.526	14	0.05	1.0	60	5.510
3	0.05 (+1)	1.5 (+1)	70	6.627	9	0.03	1.0	50	8.141	15	0.05	1.5	50	6.054
4	0.03	2.0	50 (-1)	9.237	10	0.01	1.5	50	10.797	16	0.03	1.5	60	13.152
5	0.03	2.0	70	11.376	11	0.01	1.0	60	10.133	17	0.03	1.5	60	13.153
6	0.01 (-1)	1.5	70	11.830	12	0.03	1.5	60	12.855					

表 2 方差分析

Table 2 ANOVA regression analysis

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著性	方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值	显著项
模型	114.790	9	233.69	<0.000 1	极显著	A^2	22.872	1	419.06	<0.000 1	极显著
A	46.819	1	857.82	<0.000 1	极显著	B^2	13.763	1	252.17	<0.000 1	极显著
B	8.042	1	147.35	<0.000 1	极显著	C^2	14.423	1	264.25	<0.000 1	极显著
C	2.256	1	41.34	0.000 4	极显著	残差	0.382	7			
AB	0.007	1	0.12	0.738 4		失拟项	0.187	3	1.28	0.393 9	
AC	0.053	1	0.97	0.356 6		误差	0.195	4			
BC	0.668	1	12.24	0.010 0	显著	总离差	115.172	16			

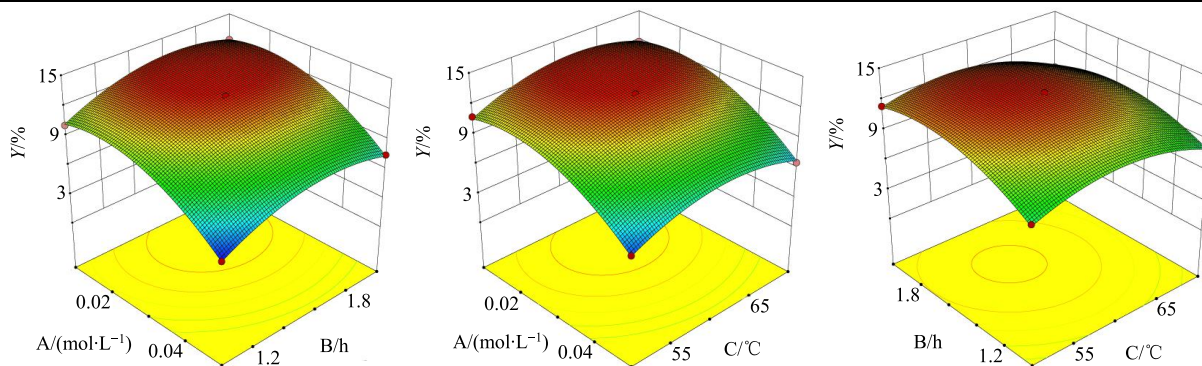


图 1 各因素交互作用响应面图

Fig. 1 3D response surface of each factor

提取工艺为碱液浓度 0.02 mol/L, 提取时间 1.65 h, 提取温度为 61.94 °C, 考虑到实际操作的可性, 选取提取工艺为碱液浓度 0.02 mol/L, 提取时间 1.65 h, 提取温度为 62 °C。按此工艺条件进行 3 批平行验证实验, 美洲大蠊多糖转移率平均值为 13.68%, RSD 为 1.4%, 回归方程所得预测值为 13.85%, 相对误差为 1.23%。表明优化后的提取工艺稳定可行。

2.6 美洲大蠊粗多糖的单糖组成

2.6.1 **Sevage 法除蛋白** 将上述所提的美洲大蠊粗多糖加水溶解, 制成美洲大蠊粗多糖溶液, 加入溶液体积三分之一的 Sevage 试剂 (三氯甲烷-正丁醇 5:1), 用磁力搅拌器搅拌 20 min, 离心, 取上层多糖溶液。上述脱蛋白操作重复 3 次。将所得多糖溶液旋转蒸发浓缩, 除去有机试剂, 用冷冻干燥机冻干, 即得美洲大蠊粗多糖。

2.6.2 **样品水解**^[20] 称取脱蛋白后的美洲大蠊多糖 5.4 mg, 加纯水 1 mL 使溶解, 得到质量浓度为 5.4 mg/mL 的多糖样品。吸取多糖样品溶液 100 μ L 于 5 mL 安瓿瓶中, 加入 100 μ L 4 mol/L 的 TFA 溶液, 充 N₂ 封管, 在 110 °C 的烘箱中避光水解 4 h; 冷却后将水解液转移至 5 mL 的离心管中, 并用 100 μ L 甲醇冲洗转移残余水解液, 加 200 μ L 甲醇后用 N₂ 吹干, 如此重复 3 次, 去除 TFA; 加入 50 μ L 超纯水溶解残渣, 得水解样品。

2.6.3 **衍生化反应** 在水解样品中加 50 μ L 0.6 mol/L 的 NaOH 溶液, 置于 5 mL 具塞试管中, 漩涡混匀; 再加 100 μ L 0.5 mol/L 的 PMP 甲醇溶液, 漩涡混匀, 在 70 °C 的烘箱中避光反应 100 min, 取出, 避光放置 10 min 冷却至室温, 加 100 μ L 0.3 mol/L 的 HCl 溶液中和, 加水至 2 mL, 再加等体积的氯仿, 漩涡混匀, 静置, 弃去氯仿相, 如此萃取 3 次。将水相用 0.45 μ m 微孔膜滤过后供 HPLC 进行分析。

2.6.4 **HPLC 分析条件** Agilent-5-TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相 A 液为 0.1 mol/L pH 6.7 磷酸钾盐缓冲液, B 液为乙腈, 梯度洗脱 0~20 min, 17%~20% B; 20~35 min, 20% B; 35~43 min, 20%~22% B; 43~45 min, 22%~17% B; 柱温 30 °C; 检测波长 250 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样体积 20 μ L。理论塔板数以葡萄糖峰计不低于 5 000。

2.6.5 **单糖 PMP 衍生物的 HPLC 分离及标准曲线** 分别配制浓度均为 5 mmol/L 的甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖

对照品溶液; 配制浓度分别为 1、2、3、4、5 mmol/L 的单糖混合对照品溶液。分别取 50 μ L 的单糖对照品溶液及不同浓度梯度的混合对照品溶液, 同“2.6.3”项下方法操作进行衍生化反应, 取水相用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过后供 HPLC 进行分析。

7 种单糖的 PMP 衍生物在 HPLC 中得到较好的分离, 如图 2 所示, 混合对照品溶液中各单糖 PMP 衍生物的保留时间依次为甘露糖 18.439 min、鼠李糖 23.035 min、葡萄糖醛酸 25.302 min、半乳糖醛酸 27.380 min、葡萄糖 30.287 min、半乳糖 32.840 min、岩藻糖 39.241 min。各衍生化单糖的标准曲线线性方程及相关系数见表 3。

2.6.6 **美洲大蠊多糖的单糖组成结果** 取 5.4 mg/mL 美洲大蠊多糖溶液水解、衍生后, 在检测条件下进行 HPLC 分析。如图 2 所示, 美洲大蠊多糖中单糖的保留时间与标准品甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖的保留时间十分吻合, 说明美洲大蠊多糖由这 7 种单

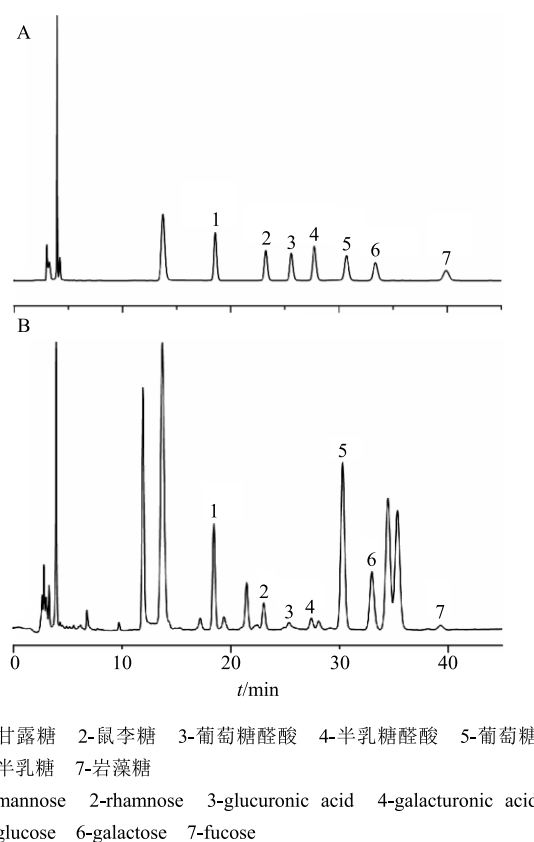


图 2 7 种单糖衍生物 (A) 和美洲大蠊多糖水解样品衍生物 (B) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC separation results of monosaccharide derivatives (A) and polysaccharide hydrolysate derivatives (B)

表 3 标准曲线线性方程及相关系数

Table 3 Regression equations and correlation coefficient

衍生物单糖种类	线性方程	<i>r</i>
甘露糖	$Y=902\ 068 X-490\ 362$	0.995 5
鼠李糖	$Y=806\ 094 X-746\ 410$	0.997 7
葡萄糖醛酸	$Y=945\ 791 X-1\ 186\ 113$	0.999 7
半乳糖醛酸	$Y=915\ 051 X-836\ 475$	0.999 8
葡萄糖	$Y=1\ 083\ 459 X-987\ 029$	0.993 7
半乳糖	$Y=869\ 987 X-950\ 462$	0.990 9
岩藻糖	$Y=1\ 106\ 101 X-1\ 877\ 459$	0.991 4

糖组成。根据单糖的峰面积及标准曲线, 计算得甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、岩藻糖 7 种单糖组成的物质的量比为 1:1.29:1.65:1.22:1.76:1.70:2.21。

2.7 美洲大蠊多糖促进小鼠创面修复的作用

2.7.1 美洲大蠊多糖溶液的配制 将上述所提的美洲大蠊粗多糖按“2.6.1”项下方法除去蛋白, 得美洲大蠊多糖。临用前加水配制成高、中、低(0.100、0.050、0.025 g/mL)美洲大蠊多糖溶液(PAP)。

2.7.2 造模、分组及给药 小鼠随机分为模型组及美洲大蠊多糖高、中、低组, 每组 18 只。适应性喂养 1 周后, 各组分别腹腔注射 5%水合氯醛(0.01 mL/g)麻醉, 在小鼠背部剪相同大小的伤口。在伤口处涂抹美洲大蠊多糖溶液, 其中模型组涂抹生理盐水, 各组每日给药 1 次, 连续给药 14 d。

2.7.3 创面愈合率计算 伤口在术后第 0、3、6、9、14 天拍照并测量小鼠伤口大小。用 Image J 软件计算伤口面积, 计算创面愈合率[创面愈合率=(治疗前创面面积-未愈合的创面面积)/治疗前创面面积]。采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

由 14 d 拍照发现, 多糖给药组明显促进小鼠创面愈合, 且在第 8 天表现明显。0~14 d 小鼠创面愈合情况见图 3。模型组在第 3、6、9、14 天平均创面愈合率为 25.3%、39.2%、63.3%、78.8%。美洲大蠊多糖高剂量给药组分别为 57.7%、73.8%、79.7%、89.3%。且在第 3、6、9、14 天给药高、中剂量组创面愈合率均高于模型组, 且结果有统计学差异($P < 0.05$), 创面愈合率结果见表 4。多糖给药组愈合率均优于模型组, 表明美洲大蠊多糖能促进创面修复。

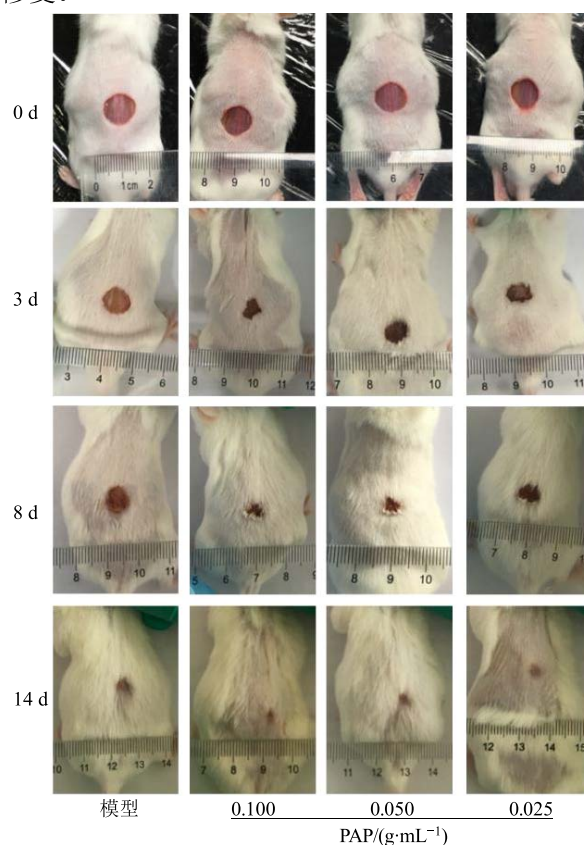


图 3 不同时间小鼠创面图

Fig. 3 Photographs of dorsal excisional skin wounds on different days

表 4 美洲大蠊多糖对创面损伤小鼠创面愈合率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 4 Effect of PAP on wound healing rate of mouse with wound ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·mL ⁻¹)	创面愈合率/%			
		3 d	6 d	9 d	14 d
模型	—	25.3±2.2	39.2±2.8	63.3±2.3	78.8±1.5
美洲大蠊多糖	0.100	57.7±4.7*	73.8±6.0*	79.7±5.5*	89.3±3.1*
	0.050	52.7±2.0*	67.0±3.6*	75.3±3.2*	85.7±1.8*
	0.025	48.3±3.6*	58.7±2.1*	74.8±4.5	82.5±1.9

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

2.7.4 病理切片染色 分别在第 3、8、14 天各组分别取 6 只小鼠用 5%水合氯醛腹腔注射麻醉实验小鼠，采用小号眼科手术剪剪取此区域皮肤全层组织（即面积为 1 cm²的正方形全层皮肤组织）。取下皮肤组织后，快速置于生理盐水中冲洗，去除皮肤上所带的少许血液，而后将取材的皮肤组织置于事先准备好的定性滤纸中，通过滤纸吸取组织上附着的少许血液。将夹有组织的滤纸放入 4%多聚甲醛溶液中，常温保存，用于 HE 染色和天狼猩红苦味酸

染色。HE 染色和天狼猩红染色见图 4。模型组真皮肉芽组织增生，皮下组织损伤，可见大量异物巨细胞和增生的肉芽组织。给药中、高剂量组创面基本愈合，创面基本完全为肉芽组织填充，并被新生表皮覆盖，肉芽组织中的成纤维细胞明显减少，较多纤维细胞、肉芽组织深部新生纤维胶原形成。其中天狼猩红染色在偏振光下观察胶原生成情况，偏振光下胶原组织呈橙红色。给药高剂量组胶原生成明显增多。

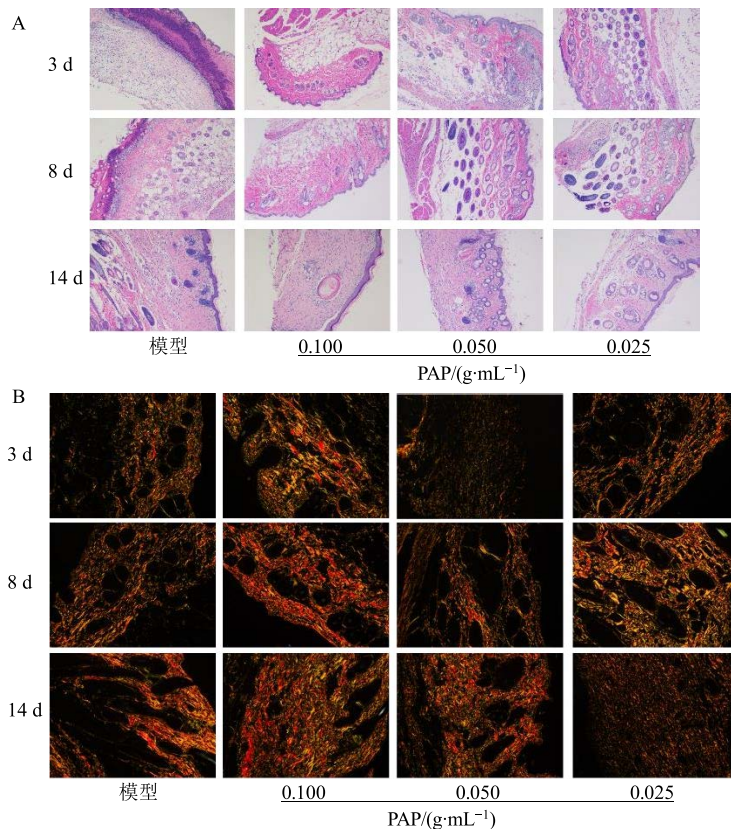


图 4 HE (A) 和天狼猩红染色 (B) 图 (×100)

Fig. 4 HE staining (A) and Polari microscope images of SR staining (B) of skin wounds treated by PAP (× 100)

3 讨论

目前已有关于美洲大蠊多糖提取的研究^[21-24]，但尚无响应面优化的报道。正交设计只能处理离散型数据，试验次数少，相较于响应面法，数据结果不够精确。Box-Behnken 设计采用非线性模型拟合，从整个区域中优选出最佳因素组合，同时可以分析各因素的变化对指标的影响规律，数据更加精确。本实验建立的回归方程能较真实地反映各筛选因素的影响，建立的模型与实际情况是比较吻合的，因此，利用响应面法优化 PAP 提取工艺是有效可行的。

创面损伤是皮肤外科常见的问题，其修复过程分为凝血期、炎症期、修复期和重建期。通过动物

实验发现，PAP 给药组能显著缩小创面面积，在第 8 天表现明显。切片染色可看出 PAP 给药组能加快胶原组织生成，减少炎症细胞浸润，促进血管生成。表明 PAP 有明显的促进创面愈合作用，但对于更加具体的修复机制还有待进一步研究。

本课题可为美洲大蠊醇提药渣的处理提供可行的再利用方案。本研究对美洲大蠊粗多糖的结构进行了初步研究，确定了该多糖由甘露糖等 7 种单糖组成。但多糖结构复杂，课题组将采用红外光谱、气相色谱、核磁共振氢谱等技术方法深入探究美洲大蠊多糖的结构组成，并将多糖开发成新型创面敷贴制剂，进一步促进美洲大蠊资源综合利用。

参考文献

- [1] 孙星衍. 神农本草经 [M]. 北京: 商务印书馆, 1955.
- [2] 高洁, 沈咏梅, 岳碧松. 美洲大蠊药理作用及其临床疗效的研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 203-208.
- [3] 张臻, 傅超美, 胡慧玲, 等. D-最优混料设计优化美洲大蠊乳膏的基质配方研究 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1574-1578.
- [4] 甘平, 张旭强, 何旭, 等. 美洲大蠊醇提物对小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 123-128.
- [5] 蒋永新, 王熙才, 金从国, 等. 美洲大蠊提取物对小鼠3LL 肺癌的抑制作用及其机制探讨 [J]. 中国肺癌杂志, 2006, 9(6): 488-491.
- [6] 李晓庆. 美洲大蠊多糖提取工艺优化与抗肿瘤作用研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2016.
- [7] 李武, 段丽芳, 何贵清, 等. 美洲大蠊提取物对实验性肝纤维化的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1137-1138.
- [8] 林喆, 李全学, 徐静, 等. 美洲大蠊化学成分和生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3645-3649.
- [9] 罗廷顺, 高孟婷, 马芳芳, 等. 美洲大蠊药理作用及临床应用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5933-5935.
- [10] 中药大品种科技竞争力报告 (2017 版) [J]. 中国现代中药, 2018, 20(1): 6-13.
- [11] 张汉超, 耿福能, 沈咏梅, 等. 康复新液药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(3): 57-60.
- [12] 黄丫丫, 杨杭, 林家莉, 等. 载美洲大蠊提取物纳米粒的表征及体外释放研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3407-3414.
- [13] Predel R, Kellner R, Rapus J, et al. Isolation and structural elucidation of eight kinins from the retrocerebral complex of the American cockroach, *Periplaneta americana* [J]. *Regul Pept*, 1997, 71(3): 199-205.
- [14] Zhu J J, Yao S, Guo X, et al. Bioactivity-guided screening of wound-healing active constituents from American cockroach (*Periplaneta americana*) [J]. *Molecules*, 2018, 23(1): 101-112.
- [15] Neupert S, Fusca D, Schachtner J, et al. Toward a single-cell-based analysis of neuropeptide expression in *Periplaneta americana* antennal lobe neurons [J]. *J Comp Neurol*, 2012, 520(4): 694-716.
- [16] He Z C, Liu G M, Wang X Y, et al. Research advance on neuropeptides from *Periplaneta americana* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2008, 20(1): 180-186.
- [17] 廖芳, 朱伟, 周洁, 等. 大孔吸附树脂纯化美洲大蠊多肽的工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3420-3425.
- [18] 张锐, 刘建群, 舒积成, 等. 美洲大蠊药渣制备壳聚糖工艺的优化 [J]. 中成药, 2017, 39(12): 2625-2627.
- [19] 李玉寒, 卞君醒, 狄斌, 等. 壳聚糖复合创面敷料研究进展 [J]. 药物生物技术, 2017, 24(4): 90-93.
- [20] 莫开菊, 赵娜, 朱照武, 等. 葛仙米多糖的单糖组成分析 [J]. 食品科学, 2015, 36(18): 89-92.
- [21] 李晓庆, 许龙, 富尧, 等. 盐提法提取美洲大蠊多糖工艺优化的研究 [J]. 安徽农学通报, 2016, 22(10): 38-39.
- [22] 李晓庆, 许龙, 陈光道, 等. 稀碱法提取美洲大蠊多糖工艺条件的研究 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15): 125-126.
- [23] 李晨晨, 贾成友, 郭华, 等. 正交试验法优化美洲大蠊糖蛋白的提取工艺 [J]. 成都中医药大学学报, 2014, 37(3): 4-7.
- [24] 李晓庆, 富尧, 陈光道, 等. 木瓜蛋白酶提取蜚蠊多糖最佳工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(34): 81-82.