

# 大黄蒽醌苷对肠道病毒的灭活作用

吴 家 驹

(湖北省沙市市卫生防疫站,沙市)

大黄是一种药源广、临床上使用较多的中药。在研究它的抗病毒作用时,我们曾发现它对肠道病毒有很强的灭活作用。并推测可能与某种成份有关。在此工作的基础上,又应用组织培养法,对大黄中主要成份对病毒的作用做了初步的研究,发现主要是蒽醌苷对肠道病毒有很强的灭活作用。现报告如下。

## 试 验 方 法

### 一、毒种

试验所用的肠道病毒毒种有 CoxB<sub>4</sub>、CoxB<sub>1</sub>、CoxA<sub>9</sub>、Polio 1 及 Echo 11 等,这些毒种均由昆明医学生物学研究所供给。试验前在原代人胚肾单层细胞中传代,滴定 TCID<sub>50</sub> 后分装保存于 -20℃ 备用。

### 二、药液制备与含量测定

#### (一) 水煎剂

取切碎大黄\* 10 克,用蒸馏水洗净,加 10 倍量的重蒸水浸泡,用文火煮沸半小时,收集两次药液,离心去渣,浓缩到 50 毫升即为 20% 的药液,常压蒸汽灭菌后备用。

#### (二) 游离蒽醌的提取

称取大黄粉末 5 克,用苯—20% 硫酸抽提,使蒽醌苷类完全水解成游离蒽醌<sup>[1]</sup>,再用 pH 梯度萃取法分离出大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚,分别测定浓度,灭菌后备用。

---

\* 大黄由本市中医医院供给。

### (三) 葱醌苷的提取

按文献报道的方法<sup>[1,2]</sup>,制成三种葱醌苷的粗提物:

1. 铅盐沉淀物:取大黄粉末5克,用90%乙醇加热提取(进行三次),浓缩后用三氯甲烷萃取,水层用醋酸铅沉淀,通硫化氢脱铅后,滤液调至中性即为粗葱醌苷。

2. 氯仿萃取水溶液:取大黄粉末5克,90%乙醇加热提取,浓缩后用氯仿萃取,水溶液即为粗葱醌苷。

3. 乙醚粗提残渣:如上法,用90%乙醇提取,蒸干乙醇后,用乙醚反复提出可溶性成份,乙醚挥发后,残渣即为粗葱醌苷。用重蒸水配成定量溶液,分别测定浓度,常压蒸汽灭菌后备用。

### (四) 葱醌含量测定

称取1,8-二羟基葱醌10毫克,溶解于100毫升5% NaOH和2% NH<sub>4</sub>OH的混合液中,取不同量经碱液显色后,用分光光度计测定光密度,作成标准曲线,用以测定上述各种游离葱醌和粗葱醌苷的含量。

## 三、病毒的灭活作用

将灭菌药液用水解乳蛋白稀释成云雾状,与等量病毒稀释液( $10^{-1}$ — $10^{-2}$ )混合,一般在37℃温箱中作用一小时,再用水解乳蛋白稀释成 $10^{-3}$ — $10^{-9}$ ,根据病毒滴度取五个稀释度接种人胚肾细胞管,每个稀释度接种四管,每管0.2毫升,同时作未加药物的滴定对照,37℃培养观察细胞病变,第七天计算TCID<sub>50</sub>,以加药物的病毒滴度比对照滴度降低二个对数值为有灭活作用的标准。

## 试验结果

### 一、大黄水煎剂对肠道病毒的灭活作用

为了摸索大黄水煎剂中灭活病毒的有效成份,将水煎剂作了不同的处理。

1. 水煎剂置冰箱后,逐渐有沉淀析出,取其上清液和加热易溶解的沉淀物,分别进行试验。

2. 水煎剂用苯抽提后,用其不同浓度的溶液与CoxB<sub>4</sub>病毒作用。其病毒滴定结果如表1。

表1 大黄水煎剂经不同处理后对CoxB<sub>4</sub>病毒的作用

水 煎 剂	大黄浓度 (%)	病毒滴度	对照滴度	降低滴度
		(log TCID <sub>50</sub> )		
全 部*	2	4.77	7.67	2.90
全 部	0.5	4.50	7.33	2.83
全 部	0.1	5.00	7.33	2.33
苯抽提后全部	2	4.33	7.67	3.34
沉淀后上清液	5	<4.00	7.33	>3.33
沉淀后上清液	0.5	4.44	7.33	2.89
沉淀后沉淀物	5	<4.00	7.33	>3.33
沉淀后沉淀物	0.5	4.33	7.33	3.00

\* 水煎剂全部即包括药液和药渣两部分。

由表1可以看出,在水煎剂的沉淀物和上清液中均含有灭活病毒的成份。经苯提取后的水煎剂滴度不降低。但大黄中的游离葱醌难溶于冷水,而较易溶于苯、氯仿、乙醚等有机溶剂,葱醌苷则可溶于水,且易溶于热水,而在苯、氯仿、乙醚等有机溶剂中的溶解度很小或不溶。由此推测,大黄中灭活病毒的成份很可能是葱醌苷而不是游离葱醌。

### 二、游离葱醌对肠道病毒无灭活作用

由于游离葱醌难溶于冷水,在试验时将药液调至微碱(pH 7.8左右),并保温,各种游离葱醌均经三次试验,药物含量为20—310微克/毫升。其结果表明,无论是哪一种游离葱醌对CoxB<sub>4</sub>病毒均无灭活作用(如表2)。

### 三、各种粗制葱醌苷对肠道病毒的灭活作用

为了探讨葱醌苷是否有灭活病毒作用及作用浓度如何,我们用5倍连续稀释法将乙醚粗提物配成一系列溶液,即625、125、25、5和1微克/毫升与CoxA<sub>4</sub>病毒作用进行试验。结果表明,625微克/毫升能使滴度对数值下降3.33,125微克/毫升能下降2.83,25微克/毫升能下降2.77,5微克/毫升能下降2.50,1微克/毫升能下降0.50。

继之又用三种粗制葱醌苷的三种浓度即

表2 几种游离蒽醌对CoxB<sub>4</sub>病毒无灭活作用的试验结果

游离蒽醌名称	第一次试验		第二次试验		第三次试验	
	浓度 (微克/毫升)	病毒滴度 (log TCID <sub>50</sub> )	浓度 (微克/毫升)	病毒滴度 (log TCID <sub>50</sub> )	浓度 (微克/毫升)	病毒滴度 (log TCID <sub>50</sub> )
大黄酸	20	7.50	100	7.50	275	7.33
大黄素	40	7.50	200	7.33	100	7.00
芦荟大黄素	50	7.33	250	7.33	260	7.00
大黄酚+大黄素甲醚	60	7.50	300	7.33	310	7.00
CoxB <sub>4</sub> (对照)		7.50		7.50		7.33

25、5 和 1 微克/毫升溶液进行试验。结果表明,25 和 5 微克/毫升两种浓度均能使 CoxB<sub>4</sub> 病毒的滴度降低二个对数值(见表 3),由此可见,三种粗制品的灭活作用相同。

表3 三种粗制蒽醌苷对CoxB<sub>4</sub>病毒的灭活作用  
(37℃, 一小时)

粗制蒽醌苷种类	药物含量 (微克/毫升)	病毒滴度 (log TCID <sub>50</sub> )	下降滴度 (log TCID <sub>50</sub> )
铅盐沉淀物	25	3.67	3.83
	5	5.50	2.00
	1	6.50	1.00
氯仿萃取水溶液	25	4.33	3.17
	5	5.50	2.00
	1	6.50	1.00
乙醚提取残渣	25	4.67	2.83
	5	5.50	2.00
	1	6.50	1.00
CoxB <sub>4</sub> (对照)		7.50	

蒽醌苷除对 CoxA<sub>9</sub> 与 CoxB<sub>4</sub> 病毒有灭活作用外,还用 CoxB<sub>1</sub>、Polio 1 及 Echo 11 等几个毒株作了试验,结果表明蒽醌苷对这几种病毒的作用相同,25 及 5 微克/毫升均能使它们降低二个对数值。

#### 四、温度与作用时间对灭活作用的影响

为了观察不同温度与作用时间对灭活作用的影响,用铅盐沉淀蒽醌苷在 37℃ 与 Polio 1 型病毒作用两小时,所得结果与上述基本相似,100 微克/毫升使滴度下降 3.17,25 微克/毫升下降 3.00,5 微克/毫升下降 2.00,1 微克/毫升

下降 1.17。由此说明,作用时间的延长并未明显增强此药的灭活作用。为了进一步证实这种情况,又在 37℃ 和 25℃ 条件下,用不同浓度的药物与 CoxB<sub>4</sub> 病毒作用 4 小时与 24 小时,测定,测其结果表明,药物浓度在 5 微克/毫升以上者,下降的滴度与作用一小时者相似,而浓度在 1 和 2 微克/毫升者仍无灭活作用。由此说明温度与时间的变化对药物的灭活作用影响不大。

## 讨 论

1. 我们在 1975 年曾发现大黄对肠道病毒有很强的灭活作用,通过本试验证明,游离蒽醌浓度在 20—310 微克/毫升时对肠道病毒均无灭活作用,而蒽醌苷则有很强的灭活作用,并对多种肠道病毒作用相同。据记载<sup>[2]</sup>,大黄中的蒽醌苷主要有五种单糖苷和三种双糖苷,由于条件所限,此次未能将各种蒽醌苷分开进行试验。根据此种苷类结构相似以及经高度稀释后仍有灭活作用,估计不只是某一种蒽醌苷的作用,这些苷类的作用可能相似。此外,我们还作了其它含蒽醌苷的中草药试验,证明何首乌、虎杖中的蒽醌苷也有相同的作用。

2. 此次试验使用的三种粗制蒽醌苷,经稀释后作用于病毒,发现在一定范围内药物浓度与滴度下降对数值成正相关,如用 100 微克/毫升左右病毒滴度可下降三个对数值即下降 1000 倍,5 微克/毫升以上的浓度,病毒滴度均能下降二个对数值,但小于此浓度时,即无明显作用。因此可以认为,浓度 5 微克/毫升的蒽醌苷粗制品有明显的灭活作用,但由于是粗制品,其

实际浓度无疑还低。

3. 关于抗病毒药物, 近来国外进行了大量的研究, 发现许多核苷类物质有很好的抗病毒作用, 有的已应用于临床<sup>[4]</sup>。而作为一种有类似结构的蒽醌苷, 对肠道病毒的作用也可能存在。近来国内已发现多种中草药有抗病毒作用, 但尚未作有效成份的实验研究, 亟待加强。

## 参 考 文 献

- [1] 北京中医学院等: 中药化学, 上海人民出版社, 1976, 第 131—137 页。
- [2] 林启寿: 中草药成份化学, 科学出版社, 1977, 第 194—220 页。
- [3] 全国中草药汇编编写组: 全国中草药汇编(上), 人民卫生出版社, 1975, 第 62—64 页。
- [4] Morris Pollard: *Antiviral Mechanisms*, Academic press, 1975. pp. 316—331.