

# 玫瑰花初步筛选、分离及其体外抗病毒活性研究

杨 稳， 杨 佳， 周长征\*

(山东中医药大学药学院，山东 济南 250355)

**摘要：**目的 对玫瑰花 *Rosae rugosa* Thunb. 的初步筛选、分离及其体外抗病毒活性进行研究。方法 用不同极性溶剂提取玫瑰花，分别采用呼吸道合胞病毒 RSV-MA104、单纯疱疹 I 型病毒 (HSV-1) -MA104、肠道病毒 71 型 (EV-71) -RD 细胞感染模型进行病毒筛选。对鲜玫瑰花渗透水溶液进行体外抗病毒实验，同时用酶标仪测定中性红染色后的 A540 值，计算治疗指数 (TI)。结果 鲜玫瑰花的渗透水溶液对肠道 EV-71 病毒有明显的抑制作用，TI 值大于 160.3；80% 乙醇沉淀物对 EV-71 的抑制作用最好，TI 值大于 188.1；D101 大孔树脂分离效果较好，其中 25% 乙醇洗脱的第 1 个柱体积效果最好，TI 值为 532.8。结论 鲜玫瑰花 25% 醇洗脱部位的多酚类成分具有很好的抗 EV-71 活性。

**关键词：**玫瑰花；筛选病毒；大孔树脂；提取分离；抗病毒活性

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2018)11-2481-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.11.024

## Preliminary screening, isolation of *Rosae rugosa* and its antiviral activity *in vitro*

YANG Wen, YANG Jia, ZHOU Chang-zheng\*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**KEY WORDS:** *Rosae rugosa* Thunb. ; screening viruses; macroporous resin; extraction and separation; antiviral activity

玫瑰花为蔷薇科植物玫瑰 *Rosa rugosa* Thunb. 的干燥花蕾。春末夏初花将开时分批采收，及时低温干燥。玫瑰花具有行气解郁，和血止痛的功效。用于肝胃气痛、食少呕恶、月经不调、跌打伤痛<sup>[1]</sup>。含有黄酮、香茅醇、萜类、鞣质、多酚、挥发油、多糖等成分<sup>[2-4]</sup>。多酚对肠道致病菌具有不同程度的抑制作用，对人体呼吸系统合胞病毒 (RSV) 有抑制作用，对于胃肠炎病毒、流感病毒也有比较强的抑制作用。其水提取物具有中等强度的抗 HIV 作用，其作用机理可能是不同化合物可分别作用于病毒复制的不同阶段<sup>[5-6]</sup>。

玫瑰花在《食物本草》中就有记载“玫瑰花主利肺脾、益肝胆、辟邪恶之气，食之芳香甘美、令人神爽”。古代医学名著《本草正义》记载“玫瑰花香气最浓，清而不浊、和而不猛、柔肝醒胃、行气和血、芳香诸品，殆无其匹”。我国古籍中有

许多关于玫瑰花作用的记载<sup>[7]</sup>，为玫瑰花的抗病毒研究提供资料，为中药现代化研究做基础。

肠道 EV-71 病毒属于微小病毒科中的肠道病毒，也是发现最晚的病毒，有极强的感染性和致病率。肠道 EV-71 病毒可引起婴幼儿手足口病、脑膜炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎等多种神经性疾病<sup>[8]</sup>。据有关文献报道<sup>[9]</sup>，玫瑰花具有抑制 HIV 以及呼吸道合胞病毒的作用，目前还没有关于抑制 EV-71 及 HSV 的研究。本实验主要开展筛选玫瑰花所抑制病毒的种类及其分离有效抗病毒的部位。

### 1 材料

1.1 药品与试剂 玫瑰花购自道地产区济南市平阴县，经山东中医药大学药学院徐凌川教授鉴定为正品。利巴韦林购自辰新药业股份有限公司。D101 型大孔树脂（沧州宝恩化工有限公司）；AB-8 型大孔树脂（南京大学化工厂）；DM301 型大孔

收稿日期：2017-11-30

基金项目：山东省中医药抗病毒应用基础与关键技术及产业化课题 (XTCX2014C01-04)

作者简介：杨 稳 (1990—)，男，硕士生，研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail：1441801912@qq.com

\*通信作者：周长征 (1966—)，男，教授，研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail：568712561@qq.com

树脂(南京大学化工厂);X-5型大孔树脂(南京大学化工厂)。1640细胞培养液(美国GIBCO公司,含10%牛血清);1640细胞维持液(美国GIBCO公司,含2%牛血清)。pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)(含NaCl8g、KCl0.2g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>2.9g,加蒸馏水至1L,过滤除菌,分装置4℃备用)。中性红染液、中性红脱色液、没食子酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);磷钼钨酸(厦门海标科技有限公司);其他化学试剂均为分析纯。

**1.2 细胞与病毒** 细胞株与病毒MA104细胞、RD细胞(山东省医学科学院基础医学研究所微生物室);呼吸道合胞病毒、单纯疱疹I型病毒、肠道病毒71型(中国疾病预防控制中心病毒病研究所流感病毒研究室)。

**1.3 仪器** 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);恒温水浴锅(常州汉彩实验仪器制造有限公司);超净工作台(上海力申科学仪器有限公司产品);CKX-31倒置显微镜、荧光倒置显微镜(日本奥林帕斯公司产品);隔水式二氧化碳培养箱(美国Forma公司);TD5M型高速台式离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);MK3酶标仪(芬兰Labsystems公司);高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂);-40℃低温冰柜(三洋公司);-80℃,725型超低温冰柜(美国Thermo Forma公司);微量移液器(法国Gilson公司)。

## 2 方法

**2.1 玫瑰花提取物制备** 分别称取玫瑰花100g,采用不同溶剂(水、95%乙醇、乙酸乙酯、石油醚)浸泡1h冷凝回流提取2次,第1次料液比为1:10,提取2h;第2次料液比为1:8,提取1h,分别浓缩到1g/mL(按干花质量算),冷藏备用。

**2.2 制备鲜玫瑰花渗透液<sup>[10]</sup>** 称取新鲜玫瑰花100g,粉碎,用水为溶剂渗透,过滤,取滤液,浓缩至1g/mL(按鲜花质量算),冷藏备用。

**2.3 酒沉浓度的筛选** 分别取“2.2”项下新鲜玫瑰渗透液20mL,缓慢加入95%乙醇快速搅拌,计算并调节水溶液中含醇量为50%、60%、70%、80%、90%,冷藏放置48h,抽滤,滤饼加水至1g/mL(按鲜花质量算),上清液减压浓缩至1g/mL(按鲜花质量算),分别做体外抗病毒实验。

## 2.4 大孔树脂筛选

**2.4.1 大孔树脂预处理** 根据玫瑰花中的具体成

分(黄酮、香茅醇、萜类、鞣质、多酚、挥发油、多糖等),选择非极性或弱极性树脂<sup>[11]</sup>,分别称取D101(非极性)、DM301(弱极性)、X-5(非极性)、AB-8(弱极性)4种树脂200g进行筛选,先用95%乙醇浸泡24h,乙醇液面高出树脂5cm,再用湿法装柱装入层析柱中,用95%乙醇冲洗树脂柱,随时检查流出来的液体,将液体与水按1:5混合,若混合后所得溶液不呈白色浑浊而为澄清透明时,停止用乙醇洗脱,最后用蒸馏水冲洗树脂柱,至流出液没有醇味,备用。

**2.4.2 大孔树脂上样及洗脱** 将“2.3”项下抗病毒效果较好的乙醇沉淀物制成20mL水溶液分别加入处理好的大孔树脂柱中,药物水溶液高出树脂5cm,静置1h,待其完全吸附,分别用蒸馏水、25%、50%、75%乙醇洗脱,控制其体积流量为3BV/h,每种洗脱液接收5个柱体积,将洗脱液分别浓缩至5mL(相当于1g/mL),进行体外抗病毒实验。

## 2.5 体外抗病毒实验

**2.5.1 细胞复苏传代<sup>[12]</sup>** 把冻存的MA104细胞、RD细胞从液氮中取出,迅速放入37℃水中快速搅拌使其溶解,离心(800r/min,5min),弃掉冻存液,往细胞沉淀中加入10%1640培养基混匀,将细胞转入细胞培养瓶中,放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养48h,待其长成单层后,用0.25%胰蛋白酶消化,进行1:2传代培养,等到细胞长成单层时用于后续实验。

**2.5.2 病毒扩增** 将呼吸道合胞病毒、单纯疱疹I型病毒接种于生长状态良好的MA104细胞上,将EV-71肠道病毒接种于生长状态良好的RD细胞上,加入2%1640培养液,放置于37℃、体积分数为5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24~48h,显微镜下观察细胞病变效应(CPE),待CPE为90%时终止实验,进行收集。将培养瓶在-20℃反复冻融3次,吹打,离心(1000r/min,5min),上清液定量分装,放入-40℃保存备用。

**2.5.3 药物细胞毒性实验** 将各供试样品用2%1640细胞维持液分别以2倍比作系列稀释(2<sup>-1</sup>~2<sup>-11</sup>)然后按稀释度顺序,横向接种于96孔板中的单层RD(MA104)细胞上,每孔为100μL,3个复孔,设置细胞对照组,将其放在37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24~48h,显微镜下观察CPE,CPE大于50%为毒性。用酶标仪测定吸光度A540值,得到其半数中毒浓度(TC<sub>50</sub>)。

2.5.4 药物体外抗病毒实验<sup>[13]</sup> 将生长状态良好的细胞接种于96孔板中，放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h，弃去上清液，每孔加入50 μL按2倍比稀释的12个不同浓度的药物溶液，每个稀释度设重复3孔，随即加入50 μL含100TCID50 EV-71的病毒悬液，细胞对照每孔加100 μL细胞维持液、病毒对照组加入病毒50 μL，细胞维持液和50 μL含100TCID50 EV-71的病毒悬液，阳性对照加入利巴韦林，96孔板置于35℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养，显微镜下持续观察细胞病变CPE，（病变率0% CPE为“-”；CPE在1%~25%为“+”；CPE在25%~50%判为“++”；CPE在50%~75%判为“+++”；CPE大于75%为“++++”），当病毒对照组出现“++++”时，而阴性对照组正常时，记录各孔的CPE，求出各样品的半数有效浓度(EC<sub>50</sub>)，并计算治疗指数(TI)。RSV、HSV-1的体外抗病毒实验同上，阳性对照，利巴韦林(RSV)、病毒清(HSV-1)。

细胞存活率 = (病变孔OD值 - 空白孔OD值) / (细胞对照孔平均OD值 - 空白孔OD值) × 100%；

细胞比距 = (高于50%病变率 - 0.5) / (高于50%病变率 - 低于50%病变率)；

表1 玫瑰花不同提取物对3种病毒的TI值

Tab. 1 TI values of different extracts of *Rosae rugosa* for three viruses

样品	TC <sub>50</sub> (MA104)	TC <sub>50</sub> (RD)	HSV-1(MA104)		RSV(MA104)		EV-71(RD)	
			EC <sub>50</sub>	TI	EC <sub>50</sub>	TI	EC <sub>50</sub>	TI
水提物	31.2	125.0	*	*	1.8	17.2	*	*
95%乙醇提取物	31.2	31.2	*	*	1.6	19.5	*	*
乙酸乙酯提取物	250.0	250.0	*	*	65.7	3.8	*	*
石油醚提取物	500.0	500.0	*	*	*	*	86.2	5.8
玫瑰花汁	62.5	250.0	*	*	0.8	79.2	1.5	160.3

注：\*表示无效，当TI值高于4，具有一定的治疗效果，可进行活性追踪

3.2 不同浓度的玫瑰花乙醇沉淀部分对EV-71抑制效果 根据预实验中病毒的筛选结果，鲜玫瑰花渗透液对EV-71有明显的抑制作用，再用不同体积分数乙醇进行醇沉，分离纯化鲜花渗透液。将上清液和沉淀部分分别进行体外抗EV-71实验，用酶标仪测定吸光度值，计算TI值，上清液均无效果，沉淀部分结果见表2。

表2可知，鲜玫瑰花渗透液80%乙醇沉淀部分的TI值大于188.1，效果最好，表明鲜玫瑰花渗

EC<sub>50</sub> = Antilog (log 高于50%存活率药物稀释度的值 - 比距)；

TC<sub>50</sub> = Antilog (log 高于50%病变率药物稀释度的值 - 比距)；

$$TI = TC_{50}/EC_{50}.$$

2.5.5 理化鉴别 对D101大孔树脂25%乙醇洗脱的第1个柱体积洗脱液进行理化鉴别，因为提取物水溶性较大，故实验只做鞣质类、黄铜类、糖苷类、生物碱类的理化鉴别，初步确定其化学物的种类。

2.5.6 多酚含有量测定 根据修改后的《中国药典》鞣质含有量测定方法，测量总酚含有量。

### 3 结果

3.1 玫瑰花不同提取物对病毒的抑制效果 将不同极性的玫瑰花提取物药品进行体外抗病毒筛选，用酶标仪测定吸光度值，按照Reed-Muench两氏法分析数据，并计算TI值(见表1)。结果表明玫瑰花95%乙醇提取物以及水提物对RSV有一定的抑制作用，但是效果不明显，鲜花渗透液对其也有一定作用，其他2种提取物对其无抑制作用；鲜花渗透液(1 g/mL)对EV-71有明显的抑制作用，其他4种提取物对其无抑制作用，水提取物、95%乙醇提取物、乙酸乙酯提取物、石油醚提取物、鲜花渗透液对HSV-1均无抑制作用。

表2 不同浓度的玫瑰花乙醇沉淀部分对EV-71的TI值

Tab. 2 TI values of ev-71 for the concentration of *Rosae rugosa* ethanol in different concentrations

种类	TC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	TI
50%乙醇沉淀	500.0	14.6	34.2
60%乙醇沉淀	500.0	7.2	69.6
70%乙醇沉淀	500.0	7.0	71.0
80%乙醇沉淀	500.0	2.7	188.1
90%乙醇沉淀	500.0	6.9	71.6

注：当TI值高于4，具有一定的治疗效果，可进行活性追踪

漉液的沉淀部分对EV-71具有十分明显的抑制作用，继而对80%乙醇沉淀物进行大孔树脂的分离、纯化。

**3.3 不同树脂的不同洗脱部位对EV-71抑制效果** 将80%乙醇沉淀分为4份，用蒸馏水溶解后

(每份10mL)分别上样D101、DM301、X-5、AB-84种树脂，以蒸馏水、25%、50%、75%乙醇进行洗脱，收集洗脱液，分别进行抗EV-71实验。见表3(50%、75%乙醇洗脱没有抗病毒作用，故省略)。

表3 不同树脂不同洗脱部位对EV-71TI值的影响

Tab. 3 Effects of different elution parts of different resins on the EV-71TI values

树脂	水					25%乙醇				
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5
D101	308.2	162.4	163.7	88.6	89.3	532.8	143.4	10.5	6.2	5.7
AB-8	297.0	101.8	101.3	74.1	318.7	47.3	9.8	4.7	*	*
X-5	189.4	190.5	18.8	5.9	*	172.1	40.2	*	*	*
DM301	28.4	*	221.0	25.7	*	198.1	59.3	61.8	*	*
利巴韦林						542.8				

注：\*表示无效，当TI值高于4，具有一定的治疗效果，可进行活性追踪

结果显示D101大孔树脂的效果最好，实验表明吸附率和解吸率相比也是最好的。其中25%乙醇第1个柱体积抗病毒效果最好，根据Reed-Muench两氏法分析表中数据，D101大孔树脂25%乙醇第1个柱体积的治疗指数TI为532.8，阳性对照组利巴韦林的治疗指数TI为542.8，玫瑰花D101大孔树脂25%醇洗脱部位抗病毒效果最好。

**3.4 理化鉴别结果** 实验中三氯化铁反应(酚羟基)、乙酸铅反应(酚类)、香草醛浓硫酸反应(多酚类)均为阳性反应；盐酸-镁粉反应(鉴别黄酮)、Molish试验(鉴别糖类)、碘-碘化钾反应(鉴别生物碱)现象均不明显。通过理化鉴别可以得出结论，D101大孔树脂25%乙醇洗脱的第1个柱体积洗脱液中化学成分主要为多酚类。

**3.5 总酚含有量** 在2.02~10.08 μg/mL的范围内， $Y=31.821X+0.0535$  ( $R^2=0.998$ )，吸光度与多酚含有量线性关系良好，平均回收率为100.08% ( $RSD=0.58\%$ )，总酚平均含有量为68.98%。

#### 4 讨论

本实验主要用鲜玫瑰花的渗漉液作为药液做抗病毒实验。在预实验中，玫瑰花几种不同极性溶剂的提取液效果不好。后查阅相关文献，发现抗病毒成分可能为多酚类，多酚类性质不稳定<sup>[14]</sup>，加热后结构改变，抗病毒活性大大降低，实验中没有采用丙酮水溶液低温提取多酚，原因在于丙酮残留对细胞有毒性，影响实验结果。后来利用理化鉴别，初步证实主要抗病毒成分为多酚类，再对玫瑰花渗漉液做抗病毒实验，获得很好的实验效果。在不同

体积分数乙醇沉淀液中，80%乙醇沉淀部分对EV-71的抑制效果最好，80%乙醇沉淀后，富集了水溶性成分，多酚的极性较强，可溶于水、甲醇、乙醇，实验结果中90%乙醇沉淀效果不如80%乙醇沉淀，可能是由于其中有效的多酚富集的多，所以对病毒的抑制作用比90%乙醇沉淀好。

通过不同极性的树脂洗脱液对病毒的抑制效果和解吸附率来确定最佳的大孔树脂类型，经过筛选，D101大孔树脂效果最好。实验中采用鲜花渗漉提取，不同以往的回流提取避免了多酚的遇热分解，保留了有效成分的活性，但也存在提取效率低，提取不完全的问题。在实验测完总酚含有量后，对其做了制备液相分离，目的想继续分离出抗病毒的单体物质，制备条件为30%乙腈，200 μL进样量，体积流量2 mL/min，结果在8 min左右出峰，并收集浓缩，做了质谱分析，得到分离的物质主要为脂肪类物质，抗病毒结果不理想。第1柱体积中脂肪类物质的存在表明含有量测定中总酚含有量不是很高的原因，接下来将第1个柱体积的总酚加乙醚萃取，水溶性部分浓缩，抗病毒效果没有降低，表明玫瑰花中抗病毒主要成分为多酚类。

本实验筛选出了玫瑰花抗病毒的活性部位为多酚类，D101大孔树脂25%乙醇洗脱的第1个柱体积比利巴韦林的药效还要好，TI值为532.8，表明玫瑰花多酚对肠道EV-71病毒有很好的抑制作用，而且，多酚类成分在很多文献中有抗病毒的研究基础<sup>[6,9,15]</sup>，因此，接下来将对玫瑰花多酚的对肠道EV-71病毒作用机制及其具体的活性单体物质的提取分离作更加深入的研究。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 200.
- [2] 贾佼佼, 苗明三. 玫瑰花的化学、药理及应用分析 [J]. 中医学报, 2014, 29(9): 1337-1338, 1350.
- [3] 仲 婕. 玫瑰花的新药用价值 [J]. 中国医药科学, 2011, 1(16): 9-11.
- [4] 马猛华, 崔 波, 于海峰, 等. 玫瑰花的研究进展 [J]. 山东轻工业学院学报 (自然科学版), 2008, 22(4): 38-42.
- [5] 王多宁. 玫瑰花的综合利用及其开发前景 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(1): 117-120.
- [6] 徐春生, 李 明, 李光明. 中药玫瑰花的药理研究进展 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(15): 82-84.
- [7] 李 明, 田永云, 刘泗明, 等. 中药玫瑰花的本草学考证 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 952-953.
- [8] 王 清, 牛文斐, 张加泽, 等. 薏香抗肠道 EV-71 病毒的

- 体外筛选 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(6): 1255-1258.
- [9] 刘红燕. 玫瑰花提取物中鞣质含量测定 [J]. 中国药师, 2010, 13(8): 1094-1096.
- [10] 王玉团. 玫瑰花多酚和多糖类物质的初步研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2008.
- [11] 李崇明, 熊富良, 黄志军, 等. 新药研究中大孔树脂型号与规格的选择应用 [J]. 中成药, 2008, 30 (8): 1208-1210.
- [12] 岳路路, 高 敏, 张秋红, 等. 复方黄柏液体外抗病毒试验初步研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(11): 20-22.
- [13] 牛文斐, 王 清, 张加泽, 等. 中药白头翁体外抗病毒作用 [J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2016, 37 (4): 345-349.
- [14] 陈 亮, 李医明, 陈凯先, 等. 植物多酚类成分提取分离研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1501-1507.
- [15] 张 璐, 季巧遇, 吕 红. 玫瑰花概述及研究进展 [J]. 江西中医药, 2012, 43(1): 64-66.