

不同储存年份的艾条燃烧生成自由基的 ESR 波谱研究

窦传宇¹ 吴焕淦¹ 洪宗国² 崔云华¹ 周次利¹ 马晓芃¹ 刘慧荣¹ 吕丰² 郭金云²

(1 上海中医药大学上海市针灸经络研究所,上海,200030; 2 中南民族大学药学院,武汉,430074)

摘要 目的:研究艾条燃烧生成自由基种类及其含量随储存期的变化,从自由基角度探讨新、陈艾的安全性。方法:采用电子自旋共振(ESR)技术,对艾绒产地为湖北蕲春的1年、3年、5年储存期的艾条燃烧生成的自由基进行检测和分析。结果:1)储存期分别为1年、3年、5年的艾条燃烧产生的焦油和烟气中均检测到自由基信号,检测到的焦油自由基以醌/半醌自由基为主,气相自由基包括烷基、烷氧自由基和NO自由基。2)储存期为3年、5年的艾条燃烧生成醌/半醌自由基、烷类和烷氧自由基以及NO自由基的信号均低于1年艾条($P < 0.05, P < 0.01$),而储存期为3年和5年的艾条燃烧生成的醌/半醌自由基、烷类和烷氧自由基信号比较无统计学意义($P > 0.05$),5年艾条燃烧生成的NO自由基信号强度低于3年艾条($P < 0.01$)。结论:艾条燃烧生成的自由基主要为醌/半醌自由基、烷基和烷氧自由基以及NO自由基,储存期为3年和5年艾条燃烧生成的上述自由基均少于1年艾条;艾烟中自由基的检测有可能成为新陈艾鉴别和艾灸安全性评价的重要依据。

关键词 艾灸生成物;自由基;电子自旋共振(ESR);生物活性;安全性

A study on ESR Spectrum of the Free Radicals Produced by Burning Moxa Stick in Different Years

Dou Chuazun¹, Wu Huangan¹, Hong Zongguo², Zhou Cili¹, Ma Xiaopeng¹, Liu Huirong¹, Lv Feng², Guo Jinyun²

(1 Shanghai Institute of Acupuncture - Moxibustion&Meridian, Shanghai 200030, China; 2 College of Pharmacy of South - Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective: To observe the changes of species and contents of free radicals generated by burning moxa with different storage time, and discuss the security of moxa from free radicals perspective. **Methods:** Detected and analysed free radicals in burning Qichun moxa sticks with 1 year, 3 years, 5 years storage time respectively using electron spin resonance (ESR) technique. **Results:** 1) Free radicals were detected in both tar and gas phase of burning moxa, mainly quinone/semiquinone radicals in tar and alkyl, alkoxy, NO radicals in gas; 2) the signal intensity of all detected free radicals in burning moxa with 3 years and 5 years storage time was inferior to it in 1 year moxa ($P < 0.05, P < 0.01$), quinone/semiquinone radicals, alkyl and alkoxy radicals had no difference between burning 3 years moxa sticks and 5 years moxa sticks ($P > 0.05$), while the signal intensity of NO radicals in 5 years moxa was under that in 3 years moxa ($P < 0.01$). **Conclusion:** The free radicals generated from burning moxa mainly were quinone/semiquinone radicals, alkyl and alkoxy radicals, and NO radicals, free radicals mentioned above were less in burning moxa with 3 years and 5 years storage time than that in 1 year storage time moxa. The detection of free radicals might become an important evaluation basis for identification of moxa with different storage time and moxibustion security authentication.

Key Words Moxibustion Product; Free Radicals; Electron Spin Resonance (ESR); Biological Activity; Security

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.08.002

灸法是中医的基本疗法,目前艾灸作用机制与安全性是灸法研究中亟待解决的两大问题^[1]。艾灸燃烧生成物的研究已成为艾灸安全性研究的重要组成部分,现有研究主要集中在艾叶燃烧产生的稳定化学成分^[2-5],却忽略了艾灸过程中产生的自由基。自由基是含有单电子的化学基团,反应活性高,能与人体内不同分子发生反应。自由基影响酶的活化、参与白细胞免疫反应和人的衰老过程,还能导致基因突变与细胞

凋亡^[6-7]。本工作拟采用电子自旋共振仪(ESR),配合相应的自由基捕捉剂和吸收液,对1年、3年、5年不同储存年份艾条燃烧产生的自由基进行研究,从自由基角度探讨新陈艾的安全性,为新陈艾安全性评价提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 湖北李时珍蕲艾制品厂产1年、3年、5年艾条。艾绒等级3:1,直径18 mm,长度200

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2009CB522900);上海市卫生局科研项目资助;国家自然科学基金(编号:81102637)

作者简介:窦传宇(1984—),男,上海中医药大学上海市针灸经络研究所针灸免疫研究室

通信作者:吴焕淦(1956—),男,二级教授,973计划项目首席科学家、博士生导师,主要从事针灸临床及针灸治病机制的研究,上海市宛平南路650号上海市针灸经络研究所,邮编:200030, E-mail: wuhuangan@126.com

洪宗国(1958—),男,教授,研究方向为艾灸机制, E-mail: hongzongguo@yahoo.com.cn

mm, 重量 22 g, 含水量 $\leq 13\%$ 。

1.2 实验试剂与仪器 苯(A. R., 北京益利精细化学有限公司), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (A. R., 北京化学试剂三厂), 乙酸乙酯(A. R., 北京化工厂), 邻苯二酚、对苯二酚、连苯三酚、氢氧化钠(A. R., 国药集团化学试剂有限公司), PBN(phenyl-tert-butynitron, 美国 SIGMA 公司), DETC(diethyldithiocarbamate, 美国 SIGMA 公司), 剑桥滤纸(Cambridge filter), 电子自旋共振仪(ESP300, 德国 BRUKER 公司), 珠江 9 型自动定时曝光器(广州自动化仪表厂), ACO 系列电磁式空气泵(浙江森森实业有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备 1) 实验准备: 实验前将艾条放入硅胶干燥剂中平衡 24 h。在通风橱内搭建如图 1 所示实验装置, 燃烧塔上方为倒置玻璃漏斗, 玻璃管道中间以橡皮管相连, ②为烟焦油捕集器, 可更换滤纸, 以捕集焦油自由基, ③试管内加有相应自由基捕集剂, 以捕集气相自由基。

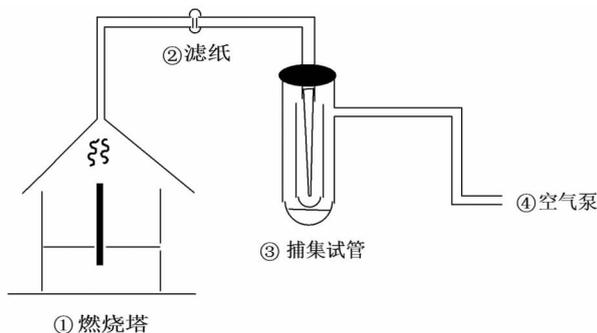


图 1 实验装置

2) 溶液配置: 分别配制 10 mmol/L 的 PBN 苯溶液、含 6 mmol/L DETC 和 3 mmol/L FeSO_4 的水溶液作为自由基捕集液, 现配现用。配制 0.1 mol/L 邻苯二酚、对苯二酚、连苯三酚和氢氧化钠溶液, 备用。

3) 自由基捕集: 使用时每次吸取 1 mL 捕集液加入 ③试管中, 更换 ②中滤纸。点燃艾条置于 ①燃烧塔内, 待燃烧产生稳定烟气后即打开空气泵, 使烟气通过倒扣的漏斗进入玻璃管道, 经 ②烟焦油捕集器捕捉焦油自由基, 经 ③试管中 PBN 捕集液或 $(\text{DETC})_2 - \text{Fe}^{2+}$ 复合物捕捉气相自由基。每个样本抽取 1 min, 重复 5 次。实验过程中保持实验室温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度为 $(55 \pm 10)\%$ 。

捕捉自由基完成后, 将 PBN 捕集液移入 1.5 mL EP 管内, 编号, 放入冰盒, 即刻进行 ESR 检测。 $(\text{DETC})_2 - \text{Fe}^{2+}$ 捕集液中加入 0.3 mL 乙酸乙酯, 剧烈震荡 3 min, 5000 g 离心 6 min, 分离上清后低温避光保存, 用于 ESR 测定。将捕集焦油自由基后的滤纸编号, 放

入通风柜内摊开经 24 h 晾干, 用于 ESR 检测。

1.3.2 ESR 波谱仪检测条件 ESR 波谱仪检测前预热 1 h, 室内温度控制为 21°C 。ESR 波谱仪检测条件如下表 1 所示, ESR 检测波段为 X 波段, 焦油自由基检测功率为 1.02 mW, 气相自由基检测功率为 12.8 mW, 微波频率为 9.75 Hz, 调频 100 kHz, 调幅 $2.88e + 00G$, 时间常数为 327.68 ms。

表 1 波谱仪检测条件

	焦油自由基检测条件	气相自由基检测条件
Microwave Band	X	X
Microwave Power	1.02mW	12.8mW
Center Field	3477.85G	3470.00G
Sweep Width	200G	100G
Microwave Frequency	9.75Hz	9.75Hz
Modulation Frequency	100kHz	100kHz
Modulation Amplitude	2.88e+00G	2.88e+00G
Receiver Gain	4.00e+05	4.00e+05
Time Constant	327.68msec	327.68msec
Resulting Sweep Time	83.89seconds	83.89seconds
Temperature	21 °C	21 °C

1.3.3 检测方法 检测时抽取捕集自由基后的 PBN 捕集液 400 μL 加入直径为 4 mm 的玻璃检测管内, 放入 ESR 检测腔检测。取收集到的乙酸乙酯溶液 150 μL 加入直径 2 mm 的玻璃管内, 放入 ESR 检测腔内检测。取晾干后的焦油自由基捕集滤纸, 小心卷成条状放入直径为 3 mm 的透明塑料管内, 放入 ESR 检测腔检测。

检测前将 0.1 mol/L 的邻苯二酚、对苯二酚和连苯三酚分别与氢氧化钠溶液按 1:1 体积混合, 即刻用于 ESR 检测, 检测条件与焦油自由基相同。

2 结果

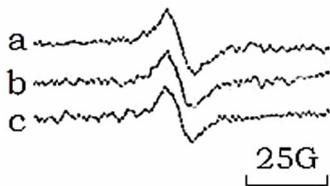
2.1 艾条燃烧产生自由基的 ESR 图谱

2.1.1 不同储存期艾条燃烧产生焦油自由基图谱 焦油中自由基用滤纸捕集后可直接用 ESR 检测得到如图所示谱线, 结合已有文献报道^[8], 烟焦油中主要含有醌/半醌自由基和多环芳烃自由基, 可由电子自旋共振条件公式 $h\nu = g\beta H$ 计算分析, 醌/半醌自由基饱和功率在 2 mW, 而多环芳烃自由基饱和功率在 100 mW, 我们在 1.02 mW 功率下检测到的 ESR 波谱中多环芳烃只占不到 1%, 主要为半醌类自由基 $(\text{QH}\cdot)$ ^[9-10]。

2.1.2 不同储存期艾条产生烟气自由基经 PBN 捕集后获得的图谱 根据 ESR 波谱和超精细分裂常数, 结合已有文献报道, 经 PBN 捕集的烟气自由基主要包括: 烷氧自由基 $(\text{RO}\cdot)$ 和烷类自由基 $(\text{R}\cdot)$ ^[10]。

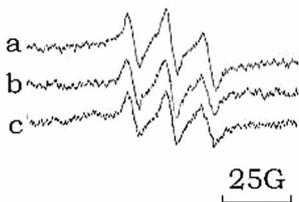
2.1.3 经 $(\text{DETC})_2 - \text{Fe}^{2+}$ 复合物捕集到的烟气自由基图谱 DETC 首先与亚铁离子结合生成 $(\text{DETC})_2 -$

Fe²⁺ 复合物, 然后与 NO 反应形成捕集复合物 (DETC)₂ - Fe²⁺ - NO, 电子顺磁共振检测有三重峰特征谱线^[11]。



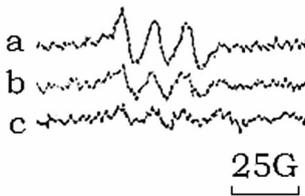
a, b, c 分别代表储存期为 1 年、3 年、5 年艾条燃烧产生的焦油自由基 ESR 波谱。

图 2 不同储存期艾条产生焦油自由基比较



a, b, c 分别代表储存期为 1 年、3 年、5 年艾条燃烧产生的自由基 ESR 波谱。

图 3 PBN 捕集到的烟气自由基图谱比较



a, b, c 分别代表储存期为 1 年、3 年、5 年艾条燃烧产生的自由基 ESR 波谱。

图 4 (DETC)₂ - Fe²⁺ 复合物捕集到的烟气自由基图谱比较

2.1.4 半醌自由基再现反应生成自由基信号 邻苯二酚、对苯二酚和连苯三酚分别与氢氧化钠溶液反应, 在 1.02 mW 功率下都可检测到相同的自由基信号, 以对苯二酚为例, 文献报道^[10], 对苯二酚可在碱性条件下发生自氧化生成半醌自由基, 这与我们得到的结果一致。



图 5 对苯二酚在碱性条件下产生的自由基 ESR 波谱

2.2 艾条燃烧产生自由基的相对含量 测量自由基 ESR 波谱各峰值信号强度的平均值, 用以表示自由基的相对含量, 不同储存期艾条燃烧产生的焦油自由基及经捕集得到的气相自由基信号强度见表 2。

结果测得储存期为 3 年、5 年的艾条燃烧产生醌/半醌自由基、烷类和烷氧自由基以及 NO 自由基的信号强度都低于 1 年艾条 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 3 年和 5 年艾条燃烧产生的醌/半醌自由基、烷类和烷氧自由基信号无统计学意义 ($P > 0.05$), 5 年艾条燃烧产生的 NO 自由基信号强度低于 3 年艾条 ($P < 0.01$)。

表 2 不同储存期艾条产生自由基信号强度 ($\bar{x} \pm s$)

储存年份	样本量	焦油自由基	PBN 捕集自由基	NO 自由基
1 年	5	9422.20 ± 1114.22	9861.80 ± 932.42	6205.60 ± 486.18
3 年	5	7730.60 ± 1207.52 *	8444.66 ± 648.28 *	4673.07 ± 634.48 **
5 年	5	7500.80 ± 1233.58 *	8468.33 ± 1004.02 *	3474.40 ± 336.08 **△△

注: 与 1 年艾条比较, * $P < 0.05$; 与 1 年艾条比较, ** $P < 0.01$; 与 3 年艾条比较, △△ $P < 0.01$ 。

3 讨论

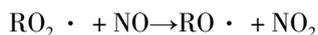
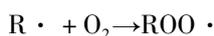
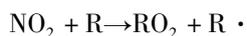
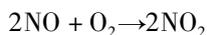
艾灸是中医临床常用的治疗方法。古代医家认为艾灸临床疗效以陈艾为佳。《孟子·离娄上》云:“犹七年之病, 求三年之艾”。《本草纲目》载:“凡用艾叶, 需用陈久者, 治令细软, 谓之熟艾, 若生艾灸火, 则易伤人肌脉。”现代研究认为: 伴随艾存储时间的延长, 艾叶挥发油总量减少, 挥发油中多数烯类、部分醇类与醛类化合物的含量也逐渐降低, 而各化合物相应的醇、酮、酸等氧化产物的含量则逐渐增多^[12]。陈艾挥发油减少使其燃烧更加缓慢柔和, 并推测陈艾经过几年的存放, 有害物质挥发殆尽而安全性提高^[13]。本研究中, 储存时间较长的艾条 (3 年艾条、5 年艾条) 燃烧产生的焦油自由基和烟气自由基比储存时间较短的艾条 (1 年艾条) 燃烧产生的自由基少。

自由基是具有未配对电子的原子、原子团、分子或离子, 可由共价键的热分解、辐射分解和氧化还原反应产生。自然界中广泛存在各类自由基, 自由基既可以继续生成新自由基, 又可以与其他自由基反应变成惰性分子, 实现自由基的湮灭。生物体内的自由基一方面能产生脂质过氧化损伤、影响酶活性而对人体产生损害, 另一方面也可以被人体利用从而参与 ATP 供能、杀伤病原微生物等一系列生理过程^[14-15]。

烟焦油中含有醌/半醌自由基和多环芳烃自由基, 我们采集后并经过 24 h 晾干的艾烟焦油中仍可检测到醌/半醌自由基信号, 说明焦油自由基性质比较稳定。已有的研究表明, 艾叶中主要含挥发油、黄酮、鞣酸、三萜类、烷烃类成分等^[16]。而对黄酮抗氧化作用机制研究发现, 黄酮可以通过酚羟基与氧自由基反应生成较稳定的半醌式自由基, 从而中止链式反应^[17]。半醌以稳定的自由基负离子中间体形式存在, 可被氧化成苯醌, 又可以还原得到对苯二酚, 而对苯二酚具有活泼羟基, O - H 键能够均裂生成半醌自由基^[18-19]。

艾燃烧生成物中也检测出含有邻苯二酚、对苯二酚、连苯三酚等物质^[3-4]。我们接下来运用 ESR 波谱仪对邻苯二酚、对苯二酚、连苯三酚在碱性条件下产生的自由基图谱进行了研究,当检测条件与焦油自由基相同时,可以检测到典型的半醌自由基图谱,见图 5。这和日本研究者发现艾烟在碱性环境下生成半醌自由基的报道相一致^[20]。由此我们推断,艾叶中黄酮、鞣酸等物质在燃烧过程中裂解氧化,产生半醌自由基,并最终生成稳定的酚类物质。通过相应稳定物质如对苯二酚、邻苯二酚、连苯三酚与碱作用可以再现得到半醌自由基,这一发现为我们进一步检测这些半醌自由基的生物活性奠定基础。

气相自由基不能用 ESR 波谱仪直接观察,需要采用自旋捕集技术将不稳定自由基捕捉后转化成一种能用 ESR 波谱仪检测的自旋加合物,这里用的自旋捕集剂 PBN,对烷基自由基和烷氧自由基有特异捕捉能力,而 (DETC)₂ - Fe²⁺ 复合物可以特异性的捕捉 NO 自由基。烷氧自由基的寿命极短 (< 1 s),可在烟气流动过程中生成,产生毒理学作用^[21]。艾叶中挥发油与长链烷烃成分在燃烧过程中可裂解生成烷基自由基,与氧气发生过氧化生成烷氧自由基。NO 是艾条燃烧过程中经氧化产生的中间产物,为自由基结构。通过 NO 产生烷基与烷氧基自由基,其反应过程为^[10]:



艾叶燃烟具有室内空气消毒的作用,古代用以防治瘟疫^[22],除了艾烟中的稳定化学成分如挥发油^[23]、酚类具有灭菌作用,自由基与微生物之间更容易发生相互作用。同时,由于艾灸产生的焦油自由基半衰期长,结构相对稳定,有充分的时间进入人体呼吸道,可能会导致基因诱变与细胞凋亡,是艾灸安全性的重要隐患。因此有必要对艾烟中自由基的生物活性和安全性做更深入的研究。

艾条燃烧生成自由基,我们检测到焦油自由基以醌/半醌自由基(Q·/QH·)为主,烟气自由基包括烷氧自由基(RO·)、烷类自由基(R·)和 NO 自由基。储存期 3 年和 5 年艾条燃烧生成的醌/半醌自由基、烷氧自由基(RO·)和烷类自由基(R·)要少于 1 年艾条,从自由基可能存在的安全隐患考虑,储存期为 3 年和 5 年的艾条安全性要优于 1 年艾条。本研究成功由艾灸生成物中的酚类物质再现得到醌/半醌自由基,为

进一步研究艾灸生成物中自由基的生物活性提供了基础。

(感谢中国科学院生物物理研究所赵保路教授、张俊敬老师,中国科学院化学研究所田秋老师对本研究提供的帮助。)

参考文献

- [1] 吴焕淦,严洁,余曙光,等. 灸法研究的现状与发展趋势[J]. 上海针灸杂志,2009,2(1):1-6.
- [2] 李强,蒋伯诚,马春华,等. 关于艾灸烟雾化学成分的实验分析[J]. 黑龙江中医药,1993,16(4):44-46.
- [3] 洪宗国,农熠瑛,江丹,等. 艾叶燃烧产物化学成分的分析[J]. 中国针灸,2009,29(增刊):60-62.
- [4] 靳然,赵百孝,于密密,等. 艾燃烧生成物组分固相微萃取烟气质谱法定性分析[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(9):632-636.
- [5] Zhou CL, Feng XM, Wang JH, et al. Research advance on moxa smoke [J]. J Acupunct Tuina Sci, 2011, 9(2): 67-72.
- [6] 赵保路. 自由基生物学与物理学[J]. 物理,2007,36(8):579-583.
- [7] 赵保路,张春爱,傅文庆,等. 活性氧自由基和细胞凋亡[J]. 自然杂志,1996,18(6):324-327.
- [8] 李泽彬,殷春浩,吕海萍,等. 电子顺磁共振仪的参数最佳选择[J]. 徐州工程学院学报,2007,22(8):22-25,85.
- [9] Pryor WA, Hales BJ, Premovic PI, et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications [J]. Science, 1983, 220: 425-427.
- [10] 赵保路. 电子自旋共振技术在生物和医学中的应用[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社,2009:370-371.
- [11] Mordvintcev P, Mülsch A, Busse R, et al. On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy. Anal Biochem, 1991, 199(1):142-146.
- [12] 何正有,张艳红,魏冬,等. 湖北产鲜艾与陈艾挥发油的化学成分[J]. 中成药,2009,31(7):1079-1082.
- [13] 靳然,孟笑男,赵百孝. 灸用艾叶的道地药材及加工标准的探讨[J]. 中国针灸,2010,30(1):40-42.
- [14] 姜招峰. 自由基医学的基础理论[J]. 齐齐哈尔医学院学报,1990,11(1):39-42,48.
- [15] 王峰. 关于自由基概念的“串讲”[J]. 高分子材料科学与工程,2012,28(1):184-186.
- [16] 周次利,谭琳莹,王晓梅,等. 艾化学成分的生物作用与影响因素探讨[J]. 上海针灸杂志,2010,29(2):74-76.
- [17] 张红雨. 黄酮类抗氧化剂结构活性关系的理论解释[J]. 中国科学(B辑),1999,29(1):91-96.
- [18] Valgimigli L, Amorati R, Fumo MG, et al. The unusual reaction of semiquinone radicals with molecular oxygen[J]. J Org Chem, 2008, 73(5): 1830-1841.
- [19] 马瑞进,龙翔云,尹作栋. 对苯二酚成键特性及半醌稳定性的量子化学研究[J]. 化工技术与开发,2008,37(8):8-9.
- [20] Sakagami H, Matsumoto H, Satoh K, et al. Cytotoxicity and radical modulating activity of moxa smoke[J]. In Vivo, 2005, 19:391-398.
- [21] Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications [J]. Environ Health Perspect, 1985, 64: 111.
- [22] 林永清,赵百孝. 艾灸防止疫病的历史与现状[J]. 辽宁中医杂志,2010,37:279-280.
- [23] 洪宗国,周西友,伊定,等. 蕲艾油抑菌作用研究[J]. 中南民族学院学报:自然科学版,1995,14(1):57-59.

(2013-07-05 收稿)