

基于原位反应性顶空系统对金花清感颗粒挥发油抗氧化活性研究

丁岗芯¹, 尹金芳¹, 崔恩浩¹, 邹维¹, 石峰¹, 赵建松³, 熊华斌¹, 杨志¹, 高云涛^{1,2*}

1. 云南民族大学, 云南 昆明 650500

2. 云南民族大学 云南省跨境民族地区生物质资源清洁利用国际联合研究中心, 云南 昆明 650500

3. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410000

摘要: 目的 设计一种反应性顶空系统, 包括辅助加热装置和内插式反应池的反应性顶空瓶, 用于中药中挥发油抗氧化活性研究, 建立挥发油抗氧化活性评估方法。方法 辅助加热装置加热反应性顶空瓶底部, 红外热成像仪研究反应性顶空瓶温度分布; 挥发油进入顶空并与内插式反应池中自由基发生清除反应, 分光光度法测定自由基吸光度变化; 固相微萃取针从顶空反应池上方原位取样, 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 测定顶空挥发油清除反应前后成分变化, 表征抗氧化活性成分。结果 改进的金属浴辅助加热装置实现样品区及顶空温差大于 50 °C, 使挥发油快速释放进入顶空的同时避免自由基热分解; 金花清感颗粒 (Jinhua Qinggan Granules, JQG) 用量为 1.50 g, 样品温度 90 °C, 反应 30 min 时, 对 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS] 自由基清除率达 88.95% ($n=6$, RSD=1.91%); 建立的抗氧化活性评估方法的精密度和重复性 RSD ($n=8$) 分别为 2.50%、1.24%; 经 GC-MS 分析鉴定出 57 种挥发油, 包括蒎烯、青蒿酮等, 其中清除反应前后峰面积减少达到 30% 以上的有 35 种, 占总挥发性油的 61.40%, 据此推断具有抗氧化活性的成分主要为萜类和醛酮、酚酸等化合物, 主要包括罗勒烯、 α -细辛脑等。结论 JQG 挥发油具有良好的抗氧化活性; 设计制作的反应性顶空系统可在一个小型密闭反应瓶中原位一步完成挥发油的释放-清除自由基-顶空微萃取进样 3 个过程; 建立的方法具有快速、高效、重现性好等特点, 可用于中药挥发油的抗氧化活性评估以及活性成分鉴定。

关键词: 反应性顶空系统; 固相微萃取; 气相色谱-质谱联用; 金花清感颗粒; 挥发油; 抗氧化活性; 自由基; 蒎烯; 青蒿酮; 萜类; 醛酮; 酚酸; 罗勒烯; α -细辛脑

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)13-3972-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.13.010

Study on antioxidant activity of volatile oil from Jinhua Qinggan Granules based on reactive headspace system *in situ*

DING Gang-xin¹, YIN Jin-fang¹, CUI En-hao¹, ZOU Wei¹, SHI Feng¹, ZHAO Jian-song³, XIONG Hua-bin¹, YANG Zhi¹, GAO Yun-tao^{1,2}

1. Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

2. Yunnan International Joint Research Center for clean utilization of biomass resources in cross-border ethnic areas, Yunnan University for nationalities, Kunming 650500, China

3. Hunan Agricultural University, Changsha 410000, China

Abstract: Objective A reactive headspace system was designed, including a reactive headspace bottle of an plug-in reaction tank and an auxiliary heating device, which was used to study the antioxidant activity of volatile oil in traditional Chinese medicine, the methods of antioxidant activity evaluation and component analysis of volatile oil were established. **Methods** The auxiliary heating device heats the bottom of the reactive headspace bottle and the infrared thermal imager studies the temperature distribution of the reactive headspace bottle; the volatile oil enters the headspace and scavenges the free radical in the interpolation reaction tank; the change of absorbance of free radical is measured by spectrophotometry; the changes of components before and after headspace volatile oil removal reaction were determined by SPME-GC-MS to characterize the antioxidant components. **Results** The improved

收稿日期: 2022-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21367025); 云南省科技计划项目 (2017FD118)

作者简介: 丁岗芯, 女, 硕士研究生, 研究方向为功能抗氧化成分的分析与评价。Tel: 15012355553 E-mail: 517308180@qq.com

*通信作者: 高云涛, 男, 教授, 博士, 研究方向为功能抗氧化成分的分析与评价。Tel: 13888610792 E-mail: 2314972096@qq.com

metal bath auxiliary heating device realizes the temperature difference between the sample area and the headspace more than 50 °C, so that the volatile oil can be quickly released into the headspace and avoid the thermal decomposition of free radicals. When the dosage of Jinhua Qinggan Granule (JQG) was 1.50 g, the sample temperature was 90 °C, and the reaction time was 30 min, the free radical scavenging rate of JQG's volatile oil to the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) was 88.95% ($n = 6$, RSD = 1.91%); The RSD ($n = 8$) of the precision and repeatability of the established antioxidant activity evaluation method were 2.50% and 1.24%; the solid-phase microextraction needle was sampled in situ from above the headspace reaction tank, and 57 kinds of volatile oils were identified by GC-MS analysis, including pinene, artemisinin, etc. among them, 35 kinds had a peak area reduction of more than 30% before and after the removal reaction, accounting for 61.40% of the total volatile oils. Therefore, it is inferred that the components with antioxidant activity are mainly terpenoids, aldehydes, ketones, phenolic acids and other compounds, mainly including basilene α -asarone, etc. **Conclusion** The volatile oil of JQG has good antioxidant activity; the reactive headspace system can complete the three reaction processes in a small closed reaction bottle in one step, including release, removal with free radical and headspace microextraction injection of volatile oil; this method is rapid, efficient and reproducible, and it can be used to evaluate the antioxidant activity and identify the active components of the volatile oil of traditional Chinese medicine.

Key words: reactive headspace system; SPME; GC-MS; Jinhua Qinggan Granules; volatile oil; antioxidant activity; free radical; pinene; artemisinin; terpenoids; aldehydes and ketones; phenolic acid; basilene; α -asarone

在芳香类中药中,其挥发性成分或挥发油可减少氧化损伤^[1],具有良好的抗氧化作用^[2-3]。新冠肺炎患者呼吸窘迫、肺部纤维化、器官衰竭等病症与炎症风暴息息相关^[4],而炎症风暴可使机体内产生自由基,进一步诱发氧化损伤^[5-6],因此在治疗新冠肺炎患者时,通过中药挥发油清除病毒感染产生的自由基^[7]以及抗氧化辅助性治疗^[8-9]能够有效减轻患者的不适症状。

新冠肺炎在中医学中属于疫病范畴^[10],病因为感受“疫戾”之气,病位在肺,基本病机特点为“湿、热、毒、瘀”。芳香类中药具有清热解毒、辟除秽浊、扶助正气的功效^[11],金花清感颗粒(Jinhua Qinggan Granules, JQG)属于芳香类中药,它由麻杏石甘汤和银翘散加减而成,麻杏石甘汤中麻黄、杏仁、石膏、甘草具有辛凉宣泄、清肺平喘的作用,银翘散的主要功效是辛凉透表、清热解毒^[12]。在我国新冠肺炎爆发流行后,JQG 被列为治疗新冠肺炎推荐用药之一^[13],它在改善临床症状、减少转重率、提升免疫能力等方面具有较好的疗效^[14-17],其作用机制^[18-19]、活性成分^[20]以及潜在药效^[21]也受到关注。但在治疗中,药品一般为口服,经食道吸收后达到清除自由基的作用,所以对其挥发油经呼吸道吸入后清除自由基的研究甚少。古人将芳香类中药研磨成粉、装于香囊、佩于胸前,用于驱除瘟疫^[22],在现代医学中,将雾化、芳香治疗等吸入式疗法用于辅助治疗新冠肺炎中、重症患者^[23-24],因此,研究 JQG 挥发性油气体状态下清除自由基能力和抗氧化成分,可为 JQG 在新冠肺炎病程中的治疗作用和机制提供参考,也可为筛选吸入式疗法药品提供方法。

挥发油抗氧化的研究一般分为 2 个过程,首先采用水蒸气蒸馏、有机溶剂^[25-27]等方式对样品中挥发油进行提取,再通过提取液的自由基清除反应和成分变化来评价其抗氧化性,但传统方式获得的提取液含有高沸点或难挥发的成分,并不能真实反映出样品中挥发油本身对自由基清除的作用,制约了挥发油的抗氧化活性研究。顶空-固相微萃取是研究挥发油的重要方法,主要用于样品色谱进样前处理^[28],不能对挥发油的抗氧化活性进行评价。因此,本实验构建一种原位反应性顶空系统,建立对挥发油抗氧化成分从释放-萃取-反应一体化的方法,可应用于研究挥发油清除自由基能力的评估和抗氧化成分的表征,实现原位、快速和高效对挥发油抗氧化活性的评价。据此,本实验研究了 JQG 挥发油对 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), ABTS] 自由基的清除和其抗氧化活性成分分析,以此作为评价 JQG 挥发油抗氧化活性的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Fisher ISQ 型气相色谱-质谱联用仪,美国 Thermo Fisher 公司; 50/30 μ m DVB/CAR/ PDMS, 57328-U 型固相微萃取纤维头,美国 Supelco 公司; TESTO 869 红外热成像仪,北京时代创科科技有限公司; TU1950 型紫外-可见分光光度计,上海普析光学分析仪器公司; 20 mL 钳口顶空瓶、瓶盖、聚四氟乙烯硅胶垫片,湖州立荣仪器有限公司。

1.2 试剂

JQG, 聚协昌(北京)药业有限公司,产品批

号 200501; ABTS, 美国 Sigma 公司; 过硫酸钾(AR), 优耐德引发剂(上海)公司。

2 方法与结果

2.1 原位反应性顶空方法

2.1.1 原位反应性顶空系统设计 反应性顶空系统包括原位顶空反应瓶和辅助加热装置 2 部分, 原位顶空反应瓶如图 1 所示, 包括瓶体和内插式反应池 2 个部分。瓶体由普通顶空瓶、复合垫片及瓶钳口盖 3 部分组成, 主要作用为承载样品和保存样品挥发性成分; 内插式反应池部件从上至下由钳口挂柱、1 mL 反应池组成, 挂柱负责连接瓶盖和反应池。使用时, 将待测样品置于顶空瓶底部, 反应池置于样品上方的顶空; 使用压盖器将瓶盖、复合垫片和挂柱密闭压紧于瓶口上, 再将反应性顶空瓶置于辅助加热装置中; 样品预热 3 min, 用微量进样针吸取一定体积的 ABTS 自由基溶液后刺穿顶空瓶盖的复合垫片, 将吸取的自由基溶液注入反应池中, 继续加热反应一定时间; 用微量进样针吸取出反应后的自由基溶液, 采用分光光度计在 734 nm 处测定吸光度 ($A_{\text{样品}}$), 同时测定空白样的吸光度 ($A_{\text{空白}}$), 依据下式计算的样品挥发油对自由基的清除率^[3]。

$$\text{自由基清除率} = (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) / A_{\text{空白}}$$

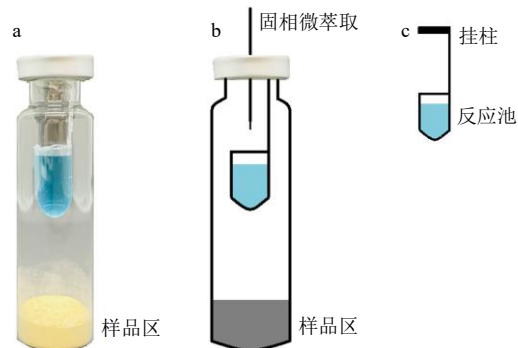


图 1 顶空反应瓶的实物图 (a)、结构示意图 (b) 和反应池的结构示意图 (c)

Fig. 1 Physical drawing (a) and structural diagram (b) of headspace reaction bottle, and structural diagram of reaction cell (c)

在清除反应过程中, 将固相微萃取纤维头刺穿垫片并置于反应池上方顶空, 分别萃取清除反应前和清除反应后的挥发油成分, 以研究反应前后挥发油成分的变化。

2.1.2 辅助加热装置及性能测试 本实验的反应性顶空系统的辅助加热装置主要用于加热顶空反应瓶底部的待测样品, 使其快速升温所需温度, 以保证

挥发油从待测样品基质中释放并进入顶空与反应池中自由基发生清除反应。经过 ABTS 自由基稳定性试验, 当自由基溶液温度高于 40 °C 时, 30 min 时的自由基分解达到 10% 以上, 误差较大, 而低于 40 °C, 30 min 时自由基分解约为 3%, 可满足测定要求, 因此, 在整个加热过程中, 同一个顶空瓶的底部和顶空需保持“上冷下热”, 形成足够的温差。

基于此, 本实验为金属浴加热器设计了特制的加热模块, 采用红外热成像分析了其加热过程中, 底部样品和顶空上部反应池温度分布及变化, 并与盘式加热装置、水浴加热装置进行比较。温度设定在 90 °C, 加热 5 min, 3 种加热方式下的顶空瓶温度分布如图 2 所示, 改进的金属浴加热器主要对样品多方向聚焦式加热, 加热 5 min 能够将底部样品温度加热到 90 °C, 整个过程, 顶部温度低于 38 °C, 形成较大的温差 ($\Delta T > 50$ °C), 保证样品挥发油释放, 同时满足自由基溶液稳定存在的温度条件, 还能同时处理 24 个样品, 而水浴加热和盘式加热不仅不能精准的控温, 它们顶空的温度大于 45 °C, 不能达到样品挥发油释放和自由基稳定存在的温差。

2.2 影响 ABTS 自由基清除反应的因素

2.2.1 反应温度和反应时间对清除率的影响 选择 JQG 作为样品, 先考察了反应温度对自由基清除率的影响, 结果如表 1 所示。当样品加入量为 1.50 g, 反应时间为 30 min 时, 在 75~90 °C, 随着样品区温度的升高, 清除率增大, 然而温度超过 90 °C 后, 清除率随之减小。从误差棒可以看出, 样品区温度低于 75 °C 时, RSD 值较高, 到了 80 °C, RSD 值明显下降, 这是因为样品区温度低于 80 °C, 样品挥发油未能充分的释放, 说明该过程受温度影响较大, 同时也说明该反应的速率大小受样品加热温度的控制。在 90 °C 时, 挥发油已稳定充分从样品基质中释放, 进入了顶空, 并较好的与反应池中自由基溶液完成清除反应, 但是当样品区温度超过 90 °C, 顶空温度也超过了 40 °C, 导致顶空反应池中自由基溶液不稳定, 发生热分解, 因此根据清除率和 RSD 值, 本实验选择 90 °C 为样品加热温度。

反应时间对清除率的影响如表 2 所示。根据表 2, JQG 对 ABTS 的清除率随着反应时间的增加而增大, 30 min 后趋于平稳, 在 30 min 时, 清除率最高, 持续加热 30 min 以上, 自由基清除率 RSD 值开始明显增加, 这是因为加热样品状态下, 随着反应时间增加, 内插式反应池中放置 ABTS 自由基溶

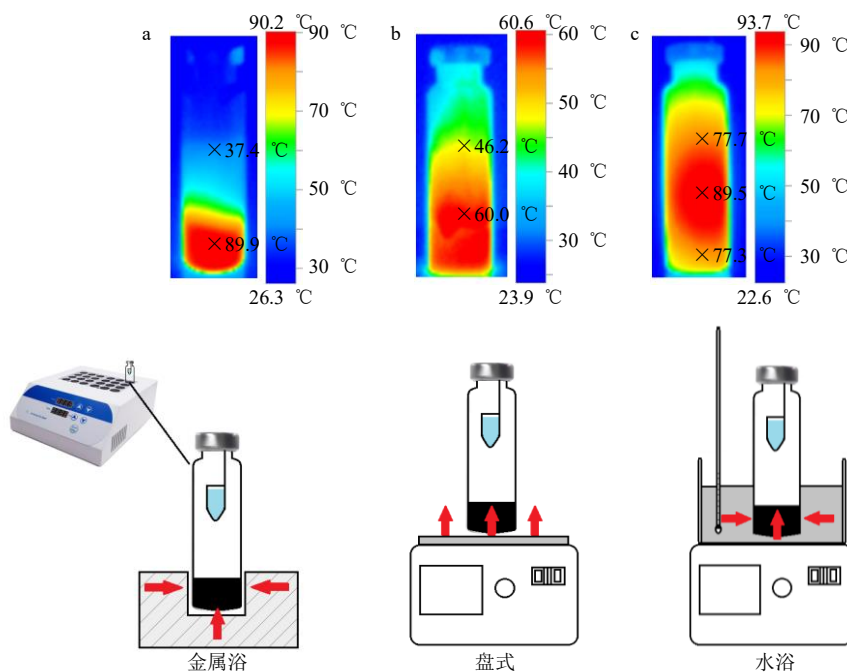


图 2 金属浴加热样品红外热成像图 (a)、盘式加热样品红外热成像图 (b) 和水浴加热样品红外热成像图 (c)

Fig. 2 Infrared thermogram of metal bath heated sample (a), disk heated sample (b), and water bath heated sample (c)

表 1 反应温度对自由基清除率的影响

Table 1 Effect of reaction temperature on scavenging radical

温度/°C	清除率/%	RSD/%	温度/°C	清除率/%	RSD/%
75	40.00	44.05	90	89.11	2.71
80	50.92	7.67	95	87.98	4.84
85	85.87	5.25			

表 2 反应时间对自由基清除率的影响

Table 2 Effect of reaction time on scavenging radical

时间/min	清除率/%	RSD/%	时间/min	清除率/%	RSD/%
5	13.53	13.46	25	83.44	4.07
10	32.03	13.19	30	88.76	2.52
15	48.74	7.68	35	89.57	5.44
20	71.20	4.85	40	89.02	12.46

液逐渐稳定性变差，导致精密度下降所致，因此，选择 30 min 为反应的最佳时间。

2.2.2 样品用量对清除率的影响 进一步研究了样品用量对清除率的影响，如表 3 所示。随着样品加入量的增加，清除率增大，在 1.50 g 时清除率达到最高值；当样品加入量大于 1.50 g 时，随之减小。

观察图 3 可知，在 0.50~2.50 g，由于顶空瓶的直径一定，样品加入的质量越大，在顶空瓶中堆积高度也越高，堆积高度过高会导致底部样品的挥发油不能完全充分释放，使反应受到影响，清除效果减弱，因此 JQG 最佳加入量为 1.50 g。

表 3 样品用量对自由基清除率的影响

Table 3 Effect of dosage on scavenging radical

样品用量/g	清除率/%	RSD/%	样品用量/g	清除率/%	RSD/%
0.50	72.50	20.10	2.00	85.75	2.92
1.00	87.99	2.86	2.50	83.32	1.86
1.50	89.06	2.25			

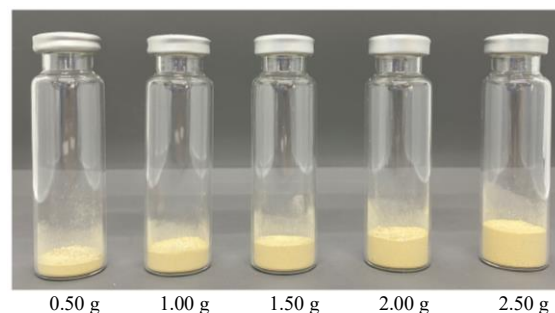


图 3 JQG 不同用量的堆积高度图

Fig. 3 Stacking height of different dosage of JQG

2.3 方法学考察

用“2.1”项中方法对反应性顶空系统的方法学进行了考察。在精密度试验中，批量称取 8 份 JQG，每份 1.50 g，测定和计算得到其挥发油对 ABTS 自由基溶液的清除率在 85.32%~92.33%，RSD 为 2.50%；在重复性试验中，连续 8 d 测定了 JQG 挥发油与 ABTS 自由基溶液反应后 ABTS 的吸光度 (A) 值，并其对 ABTS 自由基的清除率和 RSD 值，清除率在 84.13%~92.77%，RSD 在 0.10%~3.81%。

精密度试验和重复性试验表明反应性顶空系统的精密度和重复性良好,符合测定分析测定要求。

2.4 JQG 挥发油抗氧化成分分析

利用 SPME-GC/MS 对 JQG 中的总挥发油进行测定和分析,再用同样的方法对 JQG 清除自由基后的挥发油进行测定,分析 JQG 挥发油抗氧化活性成分。经 GC-MS 计算机系统 NIST 11 谱库检索、

CAS 号查询、参考文献报道^[29-30]中 JQG 中部分化学成分等进行匹配定性,确定其中化合物名称并按照萜类化合物和非萜类化合物分类如表 4 所示。

对 JQG 的总挥发油统计及定性分析,总共有 57 种化合物,其中萜类化合物有 21 种,非萜类化合物有 36 种(包括脂肪烃 6 种,醇类 2 种,醛酮类有 7 种,酚酸类 7 种,酯类 6 种,其他化合物 8 种)。

表 4 JQG 挥发油清除自由基前后成分对比

Table 4 Comparison of components of JQG before and after removal of volatile oil

编号	t_R/min	名称	相对减少率/%	分类	编号	t_R/min	名称	相对减少率/%	分类
1	3.31	α -崖柏烯	70.32	单萜烯	30	6.22	青蒿酮	—	醛酮类
2	3.48	α -蒎烯	—		31	6.90	苯乙酮	80.37	
3	4.18	罗勒烯	100.00		32	18.11	2-甲基-4-羟基苯乙酮	47.90	
4	4.34	β -蒎烯	—		33	19.14	茉莉酮	—	
5	5.51	枞油烯	52.13		34	20.63	1,13-十四二烯-3-酮	100.00	
6	6.32	γ -松油烯	56.36		35	21.80	瓜菊醇酮	100.00	
7	7.21	δ -4-萜烯	52.83		36	28.01	α -细辛脑	100.00	
8	5.85	顺式对薄荷-1(7),8-二烯-2 醇	—	单萜醇	37	23.19	丹皮酚	100.00	酚酸类
9	7.87	异蒲勒醇	53.11		38	23.49	甲基丁香酚	—	
10	11.17	薄荷醇	52.15		39	24.77	2,6-二叔丁基-4-甲酚	—	
11	11.93	α -松油醇	47.85		40	25.10	2,4-二叔丁基苯酚	34.60	
12	23.92	4-氯异龙脑	100.00		41	31.93	肉豆蔻酸	—	
13	10.07	L-薄荷酮	53.18	单萜酮	42	34.31	青蒿酸	—	
14	13.98	异胡薄荷酮	65.51		43	37.01	棕榈油酸	100.00	
15	14.83	胡椒酮	57.89		44	10.75	E-2-苯甲酸乙烯酯	76.53	酯类
16	15.24	6-甲基-3-异丙基-2-羟基环己-2-烯-1-酮	100.00		45	16.41	乙酸薄荷酯	41.36	
17	17.04	3-甲基-6-异丙基-2-羟基环己-2-烯-1 酮	69.59		46	19.77	异戊酸香叶酯	—	
18	20.30	α -可巴烯	100.00	倍半萜烯	47	20.94	十八烷酸甲酯	51.72	
19	21.99	石竹烯	44.22		48	26.96	9-十八烯-12-炔酸甲酯	—	
20	24.07	库贝醇	100.00	倍半萜醇	49	37.26	酞酸二丁酯	—	
21	24.36	菖蒲烯醇	—		50	37.54	L-抗坏血酸棕榈酸酯	—	
22	20.05	3-甲基十三烷	—	脂肪烃	51	5.41	邻异苯基甲苯	97.19	其他
23	21.23	十四烷	—		52	18.91	2,5-二甲基正己烷-2,5-二甲羟基过氧化物	30.74	
24	25.53	6-甲基十八烷	—		53	25.80	4,8a-二甲基-6-丙基-2,3,7,8-二氢萘	—	
25	26.38	4-甲基十六烷	—		54	28.64	3-甲基-2,6-二氟苯甲酸十六烷基酯	100.00	
26	26.55	3-甲基十五烷	—		55	28.98	5-吡啶糠醛	—	
27	30.40	2,6,10-三甲基十四烷	—		56	31.60	L-苯丙氨酸甲酯丁酮盐	—	
28	29.07	β -桉叶醇	100.00	醇类	57	35.93	7,9-二叔丁基-1-氧杂螺[4.5]癸-6,9-二烯-2,8-二酮	40.45	
29	32.73	三十七醇	57.08					59.57	

“—”表示未发生变化;相对减少率=(反应前峰面积-反应后峰面积)/反应前峰面积

“—” indicates no change; relative reduction rate = (pre reaction area - post reaction area) / pre reaction area

再对 JQG 清除 ABTS 自由基后所剩挥发油的比较和分析, 得到具有抗氧化性的挥发油, 共有 35 种化合物, 萜类化合物有 17 种, 包括 α -崖柏烯、罗勒烯、枞油烯、 γ -松油烯、 δ -4-萜烯、异蒲勒醇、薄荷醇、 α -松油醇、4-氯异龙脑、*L*-薄荷酮、异薄荷酮、胡椒酮、6-甲基-3-异丙基-2-羟基环己-2-烯-1-酮、3-甲基-6-异丙基-2-羟基环己-2-烯-1 酮、 α -可巴烯、石

竹烯、库贝醇。

3 讨论

3.1 反应性顶空系统与传统方法比较

将水蒸气蒸馏法与反应性顶空法进行对比, 比较了两者的提取挥发油的温度、时间, 对 ABTS 自由基的清除率、操作流程, 结果如表 5 所示。

与水蒸气蒸馏法相比, 顶空反应系统不仅能够

表 5 反应性顶空系统与传统方法比较 ($n = 6$)

Table 5 Comparison between reactive headspace system and traditional method ($n = 6$)

方法	提取时间/h	提取温度	清除率/%	操作流程
水蒸气蒸馏	2~6	100 °C	90.69	蒸馏-浓缩-挥发油成分测定-清除自由基-剩余成分测定
反应性顶空	0.5	可小于 100 °C	88.95	原位萃取和反应-成分测定

在 30 min 内完成挥发油的提取, 还能够在一个金属浴装置中对样品进行批量化处理, 节约了大量时间, 甚至还可根据样品量的大小调整金属浴模块, 对稀有药品等用量小的样品进行处理, 而水蒸气蒸馏不仅耗时长, 对于稀有贵重的药品在用量小的情况下, 很难对其挥发油进行蒸馏提取和浓缩。

水蒸气蒸馏法与 HS-SPME 提取挥发油的温度一般不同, 二者所提取的成分也略有不同^[31], 水蒸气蒸馏法提取温度高, 对热敏性挥发油成分影响较大, 还需要后续的浓缩等操作, 而 HS-SPME 因为集萃取和浓缩为一体, 温度低于 100 °C 时也能提取出许多挥发油^[32], 对一些热敏性、遇水易分解的成分较为友好, 萃取到的是气体状态下的挥发油, 能够直接和准确地反映挥发油成分。HS-SPME 在不同加热温度下, 对挥发油的萃取也有差别, 主要体现在成分含量上, 对于同一批次 JQG 来说, 100 °C 下, 3-甲基-2,6-二氟苯甲酸十六烷基酯和 *L*-苯丙氨酸甲酯丁酮盐的含量高于 90 °C 的含量, 但 3-甲基-2,6-二氟苯甲酸十六烷基酯不属于抗氧化成分, *L*-苯丙氨酸甲酯丁酮盐面积相对减少率仅在 40% 左右, 不是主要的抗氧化成分, 因此结合 ABTS 自由基稳定存在的条件, 可将 90 °C 定为本实验所提出的方法对 JQG 挥发油抗氧化活性测定时的加热温度。此外, 本方法在该温度下的 JQG 挥发油对 ABTS 的清除率为 88.95%, 接近水蒸气蒸馏的 90.69%, 也具有较好的清除自由基效果, RSD 值为 1.91%, 符合测定要求。

与水蒸气蒸馏法提取挥发油和清除 ABTS 自由基的操作流程相比, 本方法可原位一步完成, 将传统方法的提取、分离、转移、浓缩、清除反应等过

程缩减在一个容器中, 且挥发油释放-萃取-反应全过程密闭, 保证了反应的效率和精密性, 一步完成挥发油的释放-清除自由基-顶空微萃取进样 3 个反应过程, 实现萃取-反应一体化。在不影响顶空反应池中自由基的稳定性条件下, 能够在较短时间内实现挥发油释放并传质进入顶空, 与反应池中自由基发生清除反应; 在反应过程中任何时刻, 均可插入固相微萃取针在顶空原位萃取挥发油, 便于后续 GC-MS 分析成分; 避免了已有方法溶液多次转移、容器开口等导致的挥发油损失和热分解; 能够直接反应样品挥发油本身对 ABTS 自由基的清除效果, 这样简单的操作也保证较高的清除率、试验的精密度和重复性。

3.2 挥发油抗氧化成分变化分析

有学者研究发现天然产物中三萜等萜类化合物具有良好的抗氧化活性^[33-35], 本实验发现 JQG 中的部分单萜、倍半萜等也同样具有良好的抗氧化活性, 其中相对减少率为 100% 的萜类挥发油有 5 种, 包括罗勒烯、4-氯异龙脑、6-甲基-3-异丙基-2-羟基环己-2-烯-1-酮、 α -可巴烯、库贝醇。根据结构分析其抗氧化性良好的原因可能是, 它们都含有异戊烯或者异戊烷, 属于萜类化合物, 其中罗勒烯和 6-甲基-3-异丙基-2-羟基环己-2-烯-1-酮含有共轭双键与活泼氢, 其余 3 种均含有双键和活泼的氢, 它们可能更容易发生加成反应、被氧化成其他物质或者被自由基完全消耗。非萜类挥发油中, 许多具有醛酮结构的化合物也有着良好的抗氧化能力, 如瓜蒌醇酮、 α -细辛脑、丹皮酚、 β -桉叶醇、棕榈油酸等, 它们都具有醛酮、羟基、烯烃等结构存在着较为活泼的基团, 可能被 ABTS 自由基氧化, 从而发挥它们清

除自由基的作用。

3.3 展望

通过 2 个方面体现对 JQG 挥发油抗氧化活性的研究, 一是 JQG 挥发油本身对 ABTS 的清除效果, 二是对其挥发油中抗氧化活性进行了分析。反应性顶空系统的建立提供了一种气体本身清除自由基的方法, 为进一步体外筛选抗疫中药中优质的抗氧化成分提供了新思路, 为药中挥发油抗氧化活性的研究提供新方法, 也为研究中药药效提供一种较为直接的方法和参考。但本实验只从新冠肺炎患者会产生自由基发生氧化损伤, 而 JQG 挥发油具有清除自由基的作用, 以期 JQG 在新冠肺炎病程中的治疗作用和机制提供参考, 由于实验室条件有限, 未能直接对 JQG 挥发油抗击新冠病毒的效果进行研究, 但已有本实验的基础, 后续可对反应池中自由基进行更换, 换为病毒感染后的细胞、组织等, 进一步研究中药中挥发油清除自由基、清除病毒等, 为中医药中的芳香疗法提供可靠方法。

此外, 针对本系统中由于样品堆积导致样品用量增加, 挥发油清除自由基效果并未一直增加的情况, 在后续对其他样品及其挥发油进行研究时, 加入了适量的石英砂, 增大样品基质间的空隙, 提高了清除率。因为反应性顶空系统是首次提出, 还有不足之处, 希望与对此感兴趣的学者进行探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周旭凯, 田玉红, 董菲, 等. 广藿香的挥发性成分及其抗氧化性能研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1709-1716.
- [2] 李广杰, 袁航, 叶江海, 等. 落新妇花、茎、叶挥发油成分的 GC-MS 分析及抗氧化能力测定 [J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1120-1125.
- [3] 李建芳, 周枫, 张阳阳, 等. SDE 葫芦巴叶挥发性提取物 GC-MS 分析与抗氧化活性研究 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(21): 154-160.
- [4] Mehta P, McAuley D F, Brown M, *et al.* COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression [J]. *Lancet*, 2020, 395(10229): 1033-1034.
- [5] Miripour Z S, Sarrami-Forooshani R, Sanati H, *et al.* Real-time diagnosis of reactive oxygen species (ROS) in fresh sputum by electrochemical tracing; correlation between COVID-19 and viral-induced ROS in lung/respiratory epithelium during this pandemic [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, 165: 112435.

- [6] Chavarría A P, Vázquez R R V, Cherit J G D, *et al.* Antioxidants and pentoxifylline as coadjuvant measures to standard therapy to improve prognosis of patients with pneumonia by COVID-19 [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 1379-1390.
- [7] 张询, 万娜, 黄小英, 等. 芳香中药在抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)中的应用 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3408-3417.
- [8] 赵鹏翔, 谢飞, 刘梦昱, 等. 氢气生物医学研究进展 [J]. 生物技术进展, 2021, 11(4): 503-517.
- [9] 吴鹏飞, 王芳, 陈建国. 抗氧化剂用于辅助治疗新型冠状病毒肺炎的思考和探讨 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2020, 49(2): 143-146.
- [10] 国家卫生健康委员会办公厅, 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第三版) [J]. 天津中医药, 2020, 37(1): 1-3.
- [11] 陈春宇, 董汉玉, 纪瑞峰, 等. 基于中医药理论的芳香类中药防治新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3051-3061.
- [12] 薛阳. 中成药金花清感颗粒研究进展 [J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(12): 246-249.
- [13] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版 修订版) [J]. 中华临床感染病杂志, 2021, 14(2): 81-88.
- [14] 何黎黎, 龚普阳, 封玥, 等. 中药在抗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)引起的细胞因子风暴中的应用分析 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1375-1385.
- [15] Chen H, Song Y P, Gao K, *et al.* Efficacy and safety of Jinhua Qinggan Granules for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A protocol of a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2020, 99(24): e20612.
- [16] Liu Z, Li X, Gou C, *et al.* Effect of Jinhua Qinggan Granules on novel coronavirus pneumonia in patients [J]. *J Tradit Chin Med*, 2020(3): 6.
- [17] An X D, Zhang Y H, Duan L Y, *et al.* The direct evidence and mechanism of traditional Chinese medicine treatment of COVID-19 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111267.
- [18] 黄浪浪, 徐驹, 刘言薇, 等. 利用网络药理学探讨不同中成药治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J/OL]. 医学争鸣, [2022-01-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1481.R.20210507.1044.002.html>.
- [19] 林嘉荣, 郑慰武, 曾贵兴, 等. 金花清感颗粒治疗新型冠状病毒肺炎网络药理学的研究 [J]. 中药材, 2020, 43(8): 2070-2076.
- [20] 朱艳慧, 陈俭双, 文清, 等. 高效液相色谱法同时测定金花清感颗粒中 14 种成分含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2451-2455.

- [21] 龚普阳, 郭瑜婕, 李晓朋, 等. 基于网络药理学与分子对接技术的金花清感颗粒防治新型冠状病毒肺炎的潜在药效物质研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1685-1693.
- [22] 齐佳龙, 李静, 黄一楠, 等. 基于文献的含挥发性成分中药防治新型冠状病毒肺炎作用探究 [J]. 中医文献杂志, 2020, 38(2): 18-20.
- [23] 刘慧娟, 白明, 康乐, 等. 中药吸入疗法辅助治疗新型冠状病毒肺炎的应用分析 [J]. 重庆理工大学学报: 自然科学, 2021, 35(7): 216-222.
- [24] 倪忠, 罗凤鸣, 王吉梅, 等. 针对新型冠状病毒肺炎患者的雾化吸入治疗的建议 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2020, 19(2): 120-124.
- [25] 陈智坤, 梁呈元, 任冰如, 等. 薄荷属植物挥发性成分及药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(6): 856-861, 865.
- [26] 蒋黎艳, 谭姣, 肖新生. 植物油中挥发性风味成分分析鉴定技术研究进展 [J]. 中国粮油学报, 2021, 36(5): 174-183.
- [27] Değirmenci H, Erkurt H. Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of *Citrus aurantium* L. flowers [J]. *J Infect Public Health*, 2020, 13(1): 58-67.
- [28] Liu M P, Su Y, Guo Y L. Determination of highly volatile compounds in fresh onion (*Allium cepa* L.) by room-temperature enrichment headspace-trap coupled to cryotrapping GC-MS [J]. *Sep Sci Plus*, 2018, 1(8): 530-538.
- [29] Huang C L, Wang Y M, Li X W, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [30] Ren W, Liang P, Ma Y, *et al.* Research progress of traditional Chinese medicine against COVID-19 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111310.
- [31] 朱晓凤, 刘政权, 宛晓春, 等. SDE 和 HS-SPME 结合 GC-MS 分析霍山黄大茶香气成分的比较 [J]. 食品科学, 2020, 41(4): 214-221.
- [32] Xie Z S, Xu X J, Xie C Y, *et al.* Volatile components of Rhizoma Alpiniae Officinarum using three different extraction methods combined with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Pharm Anal*, 2013, 3(3): 215-220.
- [33] Achika J I, Ayo R G, Habila J D, *et al.* Terpenes with antimicrobial and antioxidant activities from *Lannea humilis* (Oliv.) [J]. *Sci Afr*, 2020, 10: e00552.
- [34] 刘欢, 赵巨堂, 何力, 等. 金盏花精油的微波辅助提取及其成分与抗氧化活性研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 180-188.
- [35] 徐德宏, 谭朝阳, 郑慧, 等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展 [J]. 食品科学, 2022, 43(7): 273-280.

[责任编辑 郑礼胜]