

纳米雄黄炮制方法的探讨

程佩佩, 方玉, 夏叶, 黄静, 答国政, 尚祥伟, 张秀桥*
(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**以炮制品得率及残渣质量,粒径分布,As₂S₂和As₂O₃的含量为指标,考察不同炮制方法对纳米雄黄的影响,筛选其最佳炮制方法。**方法:**采用高能球磨法制备纳米雄黄生品,利用水飞法、酸水飞法和碱水飞法对其进行炮制,计算各炮制品得率及残渣质量;利用激光散射法测定粉体粒径,电镜扫描法观察粉体的表现形貌;直接碘量法和二乙基二硫代氨基甲酸银法(Ag-DDC法)分别测定各样品中As₂S₂与As₂O₃的含量。**结果:**水飞品、酸水飞品和碱水飞品的得率分别为96.71%,95.86%,79.08%,残渣质量分别为0.328,0.891,2.208 g;生品及各炮制品的平均粒径分别为(157.3±4.8),(143.9±6.2),(137.7±4.5),(139.8±5.3) nm;As₂S₂质量分数分别为(94.26±1.33%),(98.97±0.98%),(99.58±1.45%),(99.37±2.60%),As₂O₃质量分数分别为(9.64±0.68),(3.44±0.29),(2.83±0.27),(18.17±1.70) mg·g⁻¹。**结论:**3种炮制方法均能减小纳米雄黄生品的粉体粒径,提高其As₂S₂的含量,且水飞法和酸水飞法均可降低其As₂O₃的含量。确定最佳炮制方法为酸水飞法。

[关键词] 纳米雄黄;炮制方法;粒径;酸水飞法;As₂S₂;高能球磨法

[中图分类号] R283.3;R284.1;R943.1;R283.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0022-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220022

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1037.014.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 10:37

Discussion of Processing Methods of Nano-Realgar

CHENG Pei-pei, FANG Yu, XIA Ye, HUANG Jing, DA Guo-zheng, SHANG Xiang-wei, ZHANG Xiu-qiao*
(Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of different processing methods on nano-Realgar for screening the best processing methods, with processed products yield, weight of the residue, particle size distribution and the contents of As₂S₂ and As₂O₃ as indicators. **Method:** Raw products of nano-Realgar were prepared by high-energy ball milling technology and processed by water, acid water and alkali water, then calculated the yield of processed products and the weight of residue. The average size and the morphology of particles were determined by laser scattering analyzer and scanning electron microscopy (SEM). And the contents of As₂S₂ and As₂O₃ in different samples were detected by direct iodine titration method and silver diethyl dithiocarbamate (Ag-DDC) method, respectively. **Result:** Yields of processed products by water, acid water and alkali water were 96.71%, 95.86% and 79.08%, the weights of residue were 0.328, 0.891, 2.208 g. The average sizes of raw products and processed products by water, acid water and alkali water were (157.3±4.8), (143.9±6.2), (137.7±4.5), (139.8±5.3) nm, contents of As₂S₂ of them were (94.26±1.33%), (98.97±0.98%), (99.58±1.45%) and (99.37±2.60%), contents of As₂O₃ were (9.64±0.68), (3.44±0.29), (2.83±0.27), (18.17±1.70) mg·g⁻¹. **Conclusion:** These three kinds of processing

[收稿日期] 20151209 (007)

[基金项目] 武汉市科学技术计划项目(2015061701011645);武汉市2012年高新技术产业发展行动计划生物技术与新医药专项(201260523194)

[第一作者] 程佩佩,在读硕士,从事中药品种、质量及资源开发研究,Tel:13343581351,E-mail:1173814267@qq.com

[通讯作者] *张秀桥,教授,博士生导师,从事中药品种、质量及资源开发研究,Tel:027-68890106,E-mail:qiaoxzh2000@163.com

methods can reduce the average particle size of raw products of nano-Realgar and improve the content of As_2S_2 . In addition, the water and acid water method can both reduce the content of As_2O_3 in raw products of nano-Realgar. The acid water processing is the best.

[Key words] nano-Realgar; processing methods; particle size; acid water method; As_2S_2 ; high-energy ball milling method

雄黄具有解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟的功效,主要成分为 As_2S_2 ,还含有 As_2O_3 及硅、铁、钙、镁等矿物杂质^[1-2],其中 As_2O_3 具有急性、慢性或蓄积性砷中毒及致癌、致畸、致突变等作用。近年来多项研究证实雄黄具有良好的抗肿瘤作用,其中对血液系统恶性肿瘤效果尤为显著^[3-7]。但雄黄难溶于水,在胃肠道中仅极少部分被吸收,故其生物利用度低,临床应用受到限制^[8]。有研究证明纳米技术可改变雄黄的理化性质,增加其水溶性,从而提高其生物利用度^[9-10]。另有研究表明雄黄经纳米化后粒径减小、比表面积增加,从而导致其更容易发生氧化反应形成较高含量的 As_2O_3 而带来毒性^[11-12]。因此,通过炮制方法去除夹杂在纳米雄黄中的 As_2O_3 对其安全用药是十分必要的。药用雄黄的炮制方法在历代本草文献上记载有研粉(《金匱要略》),水飞(《太平惠民和剂局方》),煮(《本草纲目》),熬(《外台秘要》)^[13]等。1995年版《中国药典》中采用干研法和水飞法并用,《中国药典》从2000年版开始均改为仅用水飞法。近代有学者对雄黄的炮制方法进行研究及改进,结果发现醋煮法、酸奶浸制法、酸洗法和碱洗法等去毒效果均优于水飞法^[14-17]。2015年版《中国药典》记载雄黄的炮制方法是水飞法,但对水飞法的操作记载欠具体。本实验以水飞法为切入点,增加了酸水飞法和碱水飞法,探讨不同炮制方法对纳米雄黄的影响,以炮制品得率、残渣质量、粒径分布及 As_2S_2 与 As_2O_3 的含量为考察指标,筛选其最佳炮制方法,为纳米雄黄的质量控制研究及安全用药提供科学依据。

1 材料

PM 系列行星式球磨机(上海顶派机械设备有限公司),JSM-6510 型扫描电子显微镜(日本 Jeol 公司),Zetasizer Nano S90 型激光粒度测试仪(英国马尔文公司),UV-1800 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),DZF-6050 型真空干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),JA2003 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。天然雄黄购于湖南石门,经湖北中医药大学张秀桥教授鉴定为硫化物类矿物雄黄族雄黄,符合2015年版《中国药典》(一部)相关项下的

规定, As_2S_2 质量分数 95.83%; As_2O_3 对照品[中国计量科学研究院,批号 GBW(E)060161,纯度 99.96%],水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 纳米雄黄生品的制备^[18] 采用高能球磨法。将天然雄黄药材粉碎过 200 目筛后,按球料比 40:1 加入球磨罐中,每罐加水 10 mL,密封球磨罐,对应的球磨罐总质量保持一致,球磨转速 $400\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,正反转交替进行,球磨 16 h 后取出,即得。

2.2 纳米雄黄炮制品的制备 采用四分法精密称取纳米雄黄生品 3 份,每份 10 g,分别置于 3 个同样大小的研钵中,依次加入水,5% 盐酸溶液,1% 氢氧化钠溶液 5 mL,研磨 5 min 至糊状后,分别加水,5% 盐酸溶液,1% 氢氧化钠溶液 100 mL,搅拌 1 min,静置 2 min 后将上层悬液倾出。下沉的粉体按上述方法继续研磨,重复操作 10 次,最后分别用相应溶液冲洗研钵,合并各次悬液,静置 12 h,倾去上清液,抽滤,抽滤物用水冲洗至上清液呈中性,于 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温真空干燥 24 h,研细备用^[19]。

2.3 纳米雄黄炮制品得率及残渣质量的测定 运用四分法取纳米雄黄生品 10 g,精密称定,按 2.2 项下方法炮制,收集各炮制品,精密称定后计算得率。另将炮制过程中所废弃的水飞液、酸水飞液和碱水飞液转移至已恒重的蒸发皿中,蒸干,待冷却后精密称定,得各残渣质量,其中碱水飞品的残渣质量应为上述方法所得残渣质量减去氢氧化钠质量后的数值^[20]。同时观察所得炮制品性状及残渣形态,见表 1。结果纳米雄黄各炮制品得率排序为水飞品 > 酸水飞品 > 碱水飞品;残渣质量则正好相反。根据炮制品性状及残渣形态观察,说明水飞法和酸水飞法对纳米雄黄生品性状特征无明显影响,而碱水飞法则明显改变了其性状特征。

2.4 粒径的测定 取少量待测的干燥样品粉体,加入适量乙二醇,超声分散 10 min,将混悬液加至样品池中,对样品粒径进行自动扫描检测($n=3$),结果生品、水飞品、酸水飞品、碱水飞品的平均粒径分别为 (157.3 ± 4.8) , (143.9 ± 6.2) , (137.7 ± 4.5) , (139.8 ± 5.3) nm,多分散系数依次为 $(0.395 \pm$

表 1 纳米雄黄各炮制品的得率、残渣质量及性状描述

Table 1 Yield, residue weight and description of properties in different processed products of nano-Realgar

炮制品	得率/%	性状	残渣质量/g	残渣形态
水飞	96.71	微有特异臭气,棕黄色粉体	0.328	无色无臭固体
酸水飞	95.86	微有特异臭气,棕黄色粉体	0.891	无色无臭固体
碱水飞	79.08	微有特异臭气,红褐色片状固体	2.208	淡蓝色恶臭固体

0.217), (0.401 ± 0.235), (0.287 ± 0.158), (0.321 ± 0.209), 纳米雄黄各炮制品的平均粒径与生品相比均显著下降 ($P < 0.05$)。

2.5 表观形貌观察 采用扫描电镜法 (SEM)。取少量待测的干燥样品粉体,用试样台导电胶粘住一层样品,均匀分散后镀膜,放入扫描电镜中,抽真空至 5×10^{-3} Pa,调节加速电压 30 kV,工作距离 11 mm,观察生品及各炮制品的表观形貌并拍照,见图 1。结果显示生品的粉体颗粒近似圆形或椭圆形,粒度分布均匀,存在明显团聚现象,其中较大的颗粒是由小颗粒团聚而成。各炮制品均可观察到有团聚现象发生,其中水飞品团聚现象较其他 2 种炮制品更为明显。

其 As_2S_2 的含量测定结果也可能偏大。而酸水飞品中 As_2S_2 含量最高的原因可能是盐酸不仅可以有效地去除生品中的 As_2O_3 ,还可以将不锈钢磨球与球磨罐内壁因长时间高速机械撞击而磨损产生的不锈钢杂质去除^[21],另原矿物中存在的其他矿物类杂质在变为纳米级后也容易被盐酸去除。

表 2 纳米雄黄生品及各炮制品中 As_2S_2 和 As_2O_3 的含量测定 ($n = 3$)

Table 2 Contents of As_2S_2 and As_2O_3 in different samples of nano-Realgar ($n = 3$)

样品	As_2S_2 /%	As_2O_3 /mg·g ⁻¹
生品	94.26 ± 1.33	9.64 ± 0.68
水飞品	98.97 ± 0.98 ¹⁾	3.44 ± 0.29 ¹⁾
酸水飞品	99.58 ± 1.45 ¹⁾	2.83 ± 0.27 ¹⁾
碱水飞品	99.37 ± 2.60 ¹⁾	18.17 ± 1.70

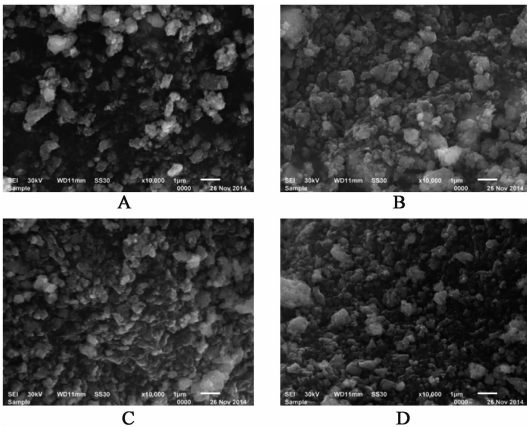
注:与生品相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.7 As_2O_3 的含量测定

2.7.1 标准砷溶液的配制 参照 2015 年版《中国药典》(四部)中通则 0822 砷盐检测法中标准砷溶液的制备方法进行制备,所得 As 质量浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.7.2 标准曲线的绘制 分别精密量取标准砷溶液 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 mL 于砷化氢发生瓶中,加入盐酸 5 mL,水 21 mL 和碘化钾试液 5 mL,滴加酸性氯化亚锡试液 5 滴,室温放置 10 min,加入无砷锌粒 2.0 g,及时接上塞有乙酸铅脱脂棉的导气管,并将导气管放入盛有二乙基二硫代氨基甲酸银 (Ag-DDC) 溶液 5 mL 的吸收管中,将砷化氢发生瓶置于 40 °C 水浴中,待反应 45 min 后取出导气管,吸收管内用三氯甲烷补至 5 mL,混匀,并以配制好的 Ag-DDC 溶液为空白溶液,参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0822 砷盐检查法第二法 (Ag-DD 法),于 510 nm 处测定吸光度 A。以质量浓度为横坐标, A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.030 3X - 0.008 3$ ($r = 0.999 8$),线性范围 0 ~ 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.7.3 供试品溶液的制备和测定 精密称取样品 0.94 g,加入稀盐酸 20 mL,不断搅拌 30 min,过滤,残渣用稀盐酸洗涤 2 次,每次用量 10 mL,搅拌 10 min,将洗液与滤液合并于 500 mL 量瓶中,加水至刻



A. 生品; B. 水飞品; C. 酸水品; D. 碱水飞品

图 1 纳米雄黄生品和各炮制品 SEM ($\times 10\ 000$)

Fig. 1 SEM micrographs of raw products and different processed products of nano-Realgar ($\times 10\ 000$)

2.6 As_2S_2 的含量测定 按 2015 年版《中国药典》(一部)雄黄项下含量测定方法 (直接碘量法) 测定 ($n = 3$), 见表 2。结果与生品相比,水飞品、酸水飞品和碱水飞品中 As_2S_2 含量均显著提高。碱水飞法能提高 As_2S_2 含量的原因可能为①碱水飞品的得率最低、残渣最重,说明碱水飞法去除了部分 As_2S_2 ,同时去除了生品中一些杂质,使得剩余 As_2S_2 的纯度提高;②由于 2015 年版《中国药典》中规定雄黄 As_2S_2 含量测定的原理是将砷全部消解为三价砷后,通过碘滴定亚砷酸盐的定量反应转换成 As_2S_2 的含量;若雄黄中含有较多的氧化砷等含砷物质,则

度,摇匀。精确量取 10 mL 于 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀。精密量取 5 mL,按 2.7.2 项下方法测定 A,计算各样品中 As_2O_3 的含量,见表 2。水飞法和酸水飞法均能显著降低生品中 As_2O_3 的含量。碱水飞品中 As_2O_3 的含量明显增加,这与部分文献报道相符^[17],原因可能为与雄黄粗粉相比,由于纳米雄黄粉体颗粒处于纳米尺度,故处于表面的原子数目在体系中所占比例增大,表面效应突出,颗粒的表面能增加^[22],因此在不断地研磨过程中部分 As_2S_2 与 NaOH 反应生成 Na_3AsS_3 后,再结合空气中 O_2 及微量 SO_2 转化为 $HAsO_2$,进而脱水析出 As_2O_3 ^[23],使得碱水飞品中 As_2O_3 的含量升高。

3 讨论

雄黄有毒性,其主要毒性成分为 As_2O_3 ,水飞法可通过降低 As_2O_3 的含量达到净制减毒的目的。2015 年版《中国药典》中规定雄黄中 As_2O_3 含量按砷盐检查法检测,所显的砷斑颜色不得深于标准砷斑,但砷斑法为半定量法,不能对样品中所含的可溶性砷盐进行准确定量。若按 Ag-DDC 法测定,则 As_2O_3 质量分数宜 $\leq 5.319 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[24]。纳米雄黄生品在制备过程中经长时间的高能球磨处理,因高温及纳米尺寸效应,其 As_2O_3 含量超过了规定值,因此必须降低其含量,以保证临床用药的安全性。本文研究发现酸水飞法为纳米雄黄生品的最佳炮制方法,能够显著降低 As_2O_3 含量、减小粉体的平均粒径,并能最大程度地提高 As_2S_2 的纯度,但要科学评价其药效与毒性强弱还需结合药效学和毒理学试验来进行综合分析。此外,2015 年版《中国药典》记载雄黄的炮制方法为水飞法,然对其炮制工艺缺乏统一的规范及质量控制标准,加水量、操作次数和烘干温度等均对 As_2O_3 的含量有直接影响,但这些参数并无明确规定。后期将在酸水飞法基础上,对加水量、操作次数和烘干温度等参数进行优选,使其炮制工艺规范化;同时对指标成分的检测方法及其有效性和安全性进行评价,为纳米雄黄的临床应用提供科学依据。

【参考文献】

[1] 牛秋雅,陈维平,田一庄,等. 利用雄黄尾矿制备药用雄黄[J]. 化工环保,2002,22(3):169-172.
[2] 熊先孝. 论湖南石门雄黄矿区矿化角砾岩成因类型[J]. 地质论评,1997,43(5):483-489,562.
[3] 王梦昌,刘陕西,李信民. 雄黄在多发骨髓瘤治疗中的作用[J]. 临床血液学杂志,2003,16(6):249-251.
[4] 王梦昌,郭桂丽,刘陕西,等. 雄黄治疗慢性粒细胞性白血病 7 例疗效观察[J]. 陕西医学杂志,2002,31

(2):152-153.
[5] 胡晓梅,刘锋,麻柔,等. 周霁祥运用青黄散治疗白血病的经验[J]. 中医杂志,2011,52(14):1187-1189.
[6] 关键平,袁炜,杨浩,等. 雄黄治疗维甲酸耐药急性早幼粒白血病临床研究[J]. 陕西肿瘤医学,2002,10(4):281-282.
[7] 贾彦民,刘陕西. 雄黄治疗急性早幼粒细胞白血病的临床研究[J]. 中国基层医药,2004,11(2):138-139.
[8] Liu J, Lu Y, Wu Q, et al. Mineral arsenicals in traditional medicines: orpiment, realgar, and arsenolite [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 326(2):363-368.
[9] 詹秀琴,赵凤鸣,郭立玮. 超细微粒径雄黄的药代动力学研究及抑瘤作用比较[J]. 实用中医药杂志,2006,22(7):397-399.
[10] 王晓波,裘荣刚,张治然,等. 纳米级雄黄粉体药代动力学研究[J]. 解放军药理学学报,2002,18(6):324-326.
[11] 赵卫忠. 粒径大小和炮制方法对纳米雄黄抗肿瘤活性影响的研究[D]. 上海:华东理工大学,2011.
[12] 叶寒青. 纳米雄黄抗肿瘤作用机理研究[D]. 武汉:华中科技大学,2005.
[13] 张静修,原思通,张广强. 中药雄黄炮制沿革研究[J]. 中药通报,1987,12(3):55-58.
[14] 杜薇,陈彤,孔云,等. 矿物药雄黄的炮制去毒作用[J]. 微量元素与健康研究,1999,16(2):47-48.
[15] 原思通,张广强,田圣志,等. 雄黄炮制新工艺的探索[J]. 中药通报,1988,13(8):17-21,62.
[16] 李化,赵明惠,梁爱华,等. 不同产地雄黄及其炮制品中二硫化二砷和可溶性砷含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):49-52.
[17] 铁步荣,王朝晖. 雄黄炮制方法初探[J]. 中成药,1993,15(7):19-21.
[18] 潘炳力. 纳米雄黄制备工艺研究[D]. 武汉:华中科技大学,2004.
[19] 郭腾,施峰,杨刚,等. 固体分散体技术对纳米雄黄稳定性及体外溶出的影响研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(17):2782-2787.
[20] 廖晴,吉琅,邓放,等. 不同雄黄炮制品中 As_2S_2 及 As_2O_3 含量变化规律研究[J]. 中药与临床,2013,4(2):21-24.
[21] 郭永杰,罗春梅,段希祥. 钢球磨损及补加规律探讨[J]. 金属矿山,2008,38(12):121-123,144.
[22] 徐辉碧. 纳米医药[M]. 北京:清华大学出版社,2004:230.
[23] 郑雅杰,刘万宇,白猛,等. 采用硫化砷渣制备三氧化二砷工艺[J]. 中南大学学报:自然科学版,2008,39(6):1157-1163.
[24] 翁雪萍,洪美华. 雄黄中三氧化二砷盐的检查及含量测定方法概述[J]. 中国药师,2008,11(9):1117-1118.

【责任编辑 刘德文】