

雄黄水飞炮制机制研究

李 千, 李莎莎, 张 慧, 张海霞, 姜水蓝, 刘艺淇, 王煜杰, 杨 超, 张欣悦, 徐新房*, 李向日*

北京中医药大学中药炮制研究中心/中药品质评价北京重点实验室/国家中医药管理局中药炮制技术传承基地, 北京 102488

摘 要: **目的** 通过对水飞雄黄和干研雄黄物相结构、元素组成、总砷及可溶性砷含量及抗炎活性进行比较, 以阐明雄黄水飞的炮制机制。**方法** 制备了粒径基本一致的水飞雄黄和干研雄黄, 分别采用 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 法明确其物相结构并测定伴生矿石含量, 采用扫描电子显微镜-能谱仪观测水飞品和干研品形貌特征并检测其元素种类和比例, 采用火焰光度原子吸收分光光度法和氢化物发生-原子吸收光度法对 2 种雄黄中总砷及可溶性砷含量进行了测定。采用二甲苯诱导昆明小鼠耳肿胀实验模型观察雄黄水飞品及干研品不同剂量组的抗炎作用。**结果** 水飞雄黄和干研雄黄的物相均是 AsS 和/或 As₄S₄; 水飞品相比于干研品, 其伴生矿石含量有所减少、与氧结合的砷含量较低、总砷及可溶性砷含量较高。抗炎实验表明, 阳性药醋酸地塞米松组、水飞品高剂量组及干研品高剂量组的耳肿胀度与对照组相比均显著降低, 水飞品高剂量组的耳肿胀度与干研品高剂量组相比降低有显著性差别。**结论** 与干研法炮制雄黄相比, 水飞法炮制雄黄并不改变其物相种类, 但有除杂、减毒及增效三重效果, 揭示了水飞法炮制雄黄的机制, 丰富了水飞法炮制雄黄的科学内涵。

关键词: 雄黄; 水飞; 干研; X 射线衍射法; 扫描电镜-能谱; 原子吸收光谱; 炮制机制

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2023)23 - 7751 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.017

Research on processing mechanism of water grinding on *Realgar*

LI Qian, LI Sha-sha, ZHANG Hui, ZHANG Hai-xia, JIANG Shui-lan, LIU Yi-qi, WANG Yu-jie, YANG Chao, ZHANG Xin-yue, XU Xin-fang, LI Xiang-ri

Research Center of TCM Processing, Beijing University of Chinese Medicine/Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine/Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base of National Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To compare the phase structure, element composition, soluble arsenic content, total arsenic content and anti-inflammatory activity between water grinding Xionghuang (*Realgar*) and grinding *Realgar* to clarify the mechanism of water grinding processing. **Method** The same particle size of water grinding products and grinding products of *Realgar* were prepared. X-ray diffraction method was used to determine phase species composition and the associated ore content; Scanning electron microscope-energy spectrometer was used to observe the morphological characteristics of the water grinding products and grinding products and detect their element types and element weight percentages. The total arsenic and soluble arsenic contents of two kinds of *Realgar* were determined by flame photometric atomic absorption spectrophotometry and hydride generation-atomic absorption photometry. The anti-inflammatory effects of different dose groups of water grinding *Realgar* and grinding *Realgar* were observed in the experimental model of xylene-induced ear swelling in Kunming mice. **Results** The phase species composition of water grinding *Realgar* and grinding *Realgar* are AsS or / and As₄S₄; compared with the grinding *Realgar*, water grinding *Realgar* had lower associated ore, lower arsenic bound to oxygen, and higher total and soluble arsenic. The anti-inflammatory experiment showed that the ear swelling in the positive drug dexamethasone acetate group, the water grinding *Realgar* high dose group and the grinding *Realgar* high dose group were significantly lower compared with the blank control group, and the ear swelling in the water grinding *Realgar* high dose group was significantly different compared with the grinding *Realgar* high dose group. **Conclusion** Compared with the grinding *Realgar*,

收稿日期: 2023-06-16

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项课题 (2019YFC1711500); 中央高校基本科研业务费 (2023-JYB-KYPT-17)

作者简介: 李 千, 硕士研究生, 研究方向为中药品质评价与中药炮制。E-mail: 20220935102@bucm.edu.cn

*通信作者: 徐新房, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药炮制及其药效物质基础研究。E-mail: xuxinfang007@163.com

李向日, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药品质评价与中药炮制。E-mail: lixiangri@sina.com

water grinding *Realgar* had not change the phase species. The water grinding products have effects of eliminating impurity, reducing toxicity and increasing treatment efficiency, which clarifies the mechanism of water grinding method and enriches the scientific connotation of water grinding method of *Realgar*.

Key words: *Realgar*; water grinding products; grinding products; X-ray diffraction; scanning electron microscope-energy spectrometer; atomic absorption spectrometry; processing mechanism

雄黄为硫化物类矿物雄黄族雄黄，始载于汉代《神农本草经》，其辛，温；有毒；归肝、大肠经。具有解毒杀虫，燥湿祛痰，截疟的功效^[1]。现代研究发现雄黄治疗血液系统疾病、恶性淋巴系统疾病以及实体瘤等疾病效果显著^[2-3]。雄黄入药时，未有特殊规定均用炮制品^[4]，《中国药典》2020 年版规定雄黄的炮制方法为水飞法，各省炮规中雄黄的炮制方法为水飞法和干研法。其中机械干研法极大地提高雄黄生产效率，而传统水飞法相比而言生产效率低，但在各标准中水飞法使用更多，其优势所在还需现代研究进一步阐明。本实验室前期研究了水飞法及干研法炮制雄黄对其肝毒性的影响，发现干研雄黄的肝毒性高于水飞雄黄^[5]，本实验进一步探究水飞法和干研法炮制雄黄对其抗炎作用的影响。

雄黄是具有很高药用价值的矿物药，可以借鉴地质学、矿物学的研究方法和手段，因此本研究比较了水飞雄黄和干研雄黄的物相结构、元素组成、总砷及可溶性砷含量。采用 X 射线衍射法 (X-ray diffraction method, XRD) ^[6-9]，对水飞及干研雄黄进行分析，明确雄黄炮制品的物相结构；利用物相分析软件对雄黄水飞品和干研品物相进行半定量分析，比较其伴生矿石含量上的差异。雄黄是一种含有重金属砷的矿物药，所含砷主要分为结合砷和游离砷，结合砷主要为与硫结合的砷和与氧结合的砷，与硫结合的砷难溶于水，溶解性较差，难于吸收，认为其毒性较小；而与氧结合砷微溶于水，其毒性较强，是雄黄中主要毒性物质，故本实验采用扫描电子显微镜-能谱仪^[10]对水飞品和干研品形貌、元素种类及元素占比进行测定，比较不同炮制方法的减毒作用强弱。雄黄中的可溶性砷，是雄黄发挥药效的主要成分，采用火焰光度原子吸收分光光度法和氢化物发生-原子吸收光度法分别对雄黄中总砷及可溶性砷含量进行测定；采用二甲苯诱导小鼠耳肿胀实验模型观察雄黄水飞品及干研品不同剂量组的抗炎作用^[11]，揭示雄黄水飞炮制的科学内涵。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PL2002 型电子天平，梅特勒-托利多仪器有限

公司；SHB-III 型循环水多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；DHG-9070A 型电热鼓风干燥箱，常州诺基仪器有限公司；BT-9300Z 型激光粒度分布仪，丹东百特仪器有限公司；Empyrean 型 X 射线衍射仪，荷兰帕纳科公司；Quanta250 型扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、EDAX 型能谱仪，FEI 公司；NovAA400 型原子吸收光谱仪，德国耶拿分析仪器股份公司；AA-6880F 型原子吸收分光光度计，日本岛津公司；SB25-12DTDN 型超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；MAXS Xpress 型密闭微波消解仪，美国 CEM 公司；Sartorius BT25S 型十万分之一天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；FA1104B 型万分之一电子分析天平，上海越平科学仪器有限公司；DZDW-1000W 型可调万用电炉，泰州市骏前电热电器厂。

1.2 动物

昆明小鼠 48 只，雄性，体质量为 (22±2) g，购买于斯贝福生物技术有限公司，实验动物生产许可证 SCXK (京) 2019-0010。饲养于北京中医药大学实验动物中心 (全新风，温度 20~23 ℃，相对湿度 40%~60%，人工光照，12 h 明暗周期)，本实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准，批准号 BUCM-4-2023020101-1008。

1.3 试剂与试药

1.3.1 试剂 砷标准液，GSB04-1714-2004，国家标准样品；碘化钾，批号 20170319，上海麦克林生化科技股份有限公司；抗坏血酸 (批号 20170918)、四氢硼钠 (批号 20170718)、盐酸 (批号 20170912)、硝酸 (批号 20170921)，北京化工厂；娃哈哈纯净水；羧甲基纤维素钠，批号 20171012，天津市福晨化学试剂厂；二甲苯，批号 20200901，天津市大茂化学试剂厂；醋酸地塞米松片，批号 1704014，天津力生制药股份有限公司。

1.3.2 试药 由于雄黄是有毒中药，因此雄黄药材的收集委托生产企业协助完成，经北京中医药大学中药学院李向日教授鉴定，为硫化物类矿物雄黄族雄黄 *Realgar*，主含二硫化二砷 (As₂S₂)，具体信息见表 1。

取上述雄黄样品 (XH-1~XH-7) 分别制备雄黄样品的水飞品及干研品, 具体的炮制方法如下。①雄黄水飞品: 取雄黄原药材, 除去杂石, 置于研钵

中, 研磨, 制成细粉; 后取雄黄细粉 10 g, 加去离子水 5 mL, 研磨 5 min 至糊状, 加去离子水 400 mL, 搅拌 1 min, 静置 2 min, 倾取混悬液, 残渣继续研磨, 重复上述操作 10 次, 合并混悬液, 静置过夜, 弃去上清液, 抽滤, 于 40 ℃ 恒温干燥过夜, 研散, 即得雄黄水飞品。②雄黄干研品: 取上述雄黄原药材, 置研钵中, 研磨至与水飞法雄黄粒径大小大致在同一水平, 即得雄黄干研品。雄黄水飞品和干研品分别记为 XH-1-1~XH-7-1 及 XH-1-2~XH-7-2。在粒径仪监督下, 水飞雄黄和干研雄黄粒径基本趋于一致, 结果见表 2 和图 1。

表 1 雄黄药材信息

Table 1 Information on Realgar samples

编号	产地	收集时间	编号	产地	收集时间
XH-1	云南	2015-05	XH-5	贵州	2014-06
XH-2	湖北	2015-06	XH-6	贵州	2015-05
XH-3	甘肃	2015-06	XH-7	贵州	2015-04
XH-4	湖南	2015-08			

表 2 雄黄各样品质地描述及中位粒径 (D_{50})

Table 2 Texture description and median diameter (D_{50}) of each Realgar sample

编号	规格	质地	$D_{50}/\mu\text{m}$	编号	规格	质地	$D_{50}/\mu\text{m}$
XH-1-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	10.91	XH-4-2	干研品	粉末状, 手感细腻	8.20
XH-1-2	干研品	粉末状, 手感细腻	9.41	XH-5-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	10.96
XH-2-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	11.79	XH-5-2	干研品	粉末状, 手感细腻	8.71
XH-2-2	干研品	粉末状, 手感细腻	8.68	XH-6-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	9.75
XH-3-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	10.56	XH-6-2	干研品	粉末状, 手感细腻	9.32
XH-3-2	干研品	粉末状, 手感细腻	8.36	XH-7-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	9.54
XH-4-1	水飞品	粉末状, 手感细腻	10.29	XH-7-2	干研品	粉末状, 手感细腻	8.41

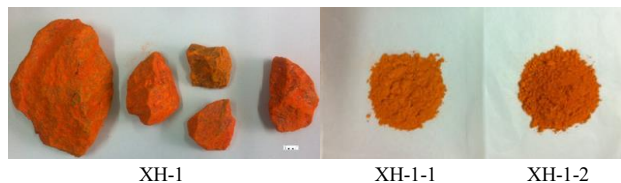


图 1 雄黄样品

Fig. 1 Samples of Realgar

2 方法与结果

2.1 XRD 法测定雄黄水飞品及干研品物相组成

2.1.1 实验条件 采用 Cu 靶带石墨单色器、Lynxeye 探测器, 扫描时间 10 min, 管电压 40 kV, 管电流 40 mA, 扫描速度 10°/min, 扫描范围 10°~70°, 扫描步长 0.013 13°。

2.1.2 样品制备 取适量的雄黄样品粉末, 置于样品槽内, 压平, 放于载物台上, 按照“2.1.1”项下实验条件进行测定。获得样品 XRD 图谱, 采用 High score plus 及 Origin 8.0 软件分析处理, 并与标准 PDF 卡片对比。

2.1.3 水飞品与干研品 XRD 测定结果 采用 XRD 法对雄黄样品进行测定, 获得样品 XRD 图谱与标准 PDF 卡片比较, 结果见图 2~8, 发现雄黄水飞品和干研品的物相主成分组成, 并不是《中国药典》

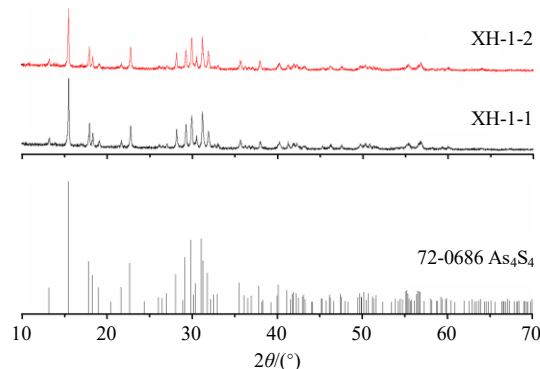


图 2 XH-1-1、XH-1-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (As_4S_4)

Fig. 2 XRD profiles of XH-1-1, XH-1-2 samples and standard PDF card (As_4S_4)

2020 年版规定的 As_2S_3 , 而是 α -雄黄 (AsS) 和/或 β -雄黄 (As_4S_4), 说明雄黄经水飞炮制后, 并不会改变雄黄中主成分的物相组成。采用物相分析软件, 对所得的图谱进行半定量分析 (表 3), 发现不同产地雄黄样品的物相主成分结构种类及含量差异较大。XH-2~XH-4、XH-6 雄黄样品中均有伴生矿石存在, 伴生矿石种类不一, 说明不同产地其伴生矿石的种类差异较大, 但同一雄黄样品其水飞品与干研品相比所含伴生矿含量有所减少, 说明水飞法在

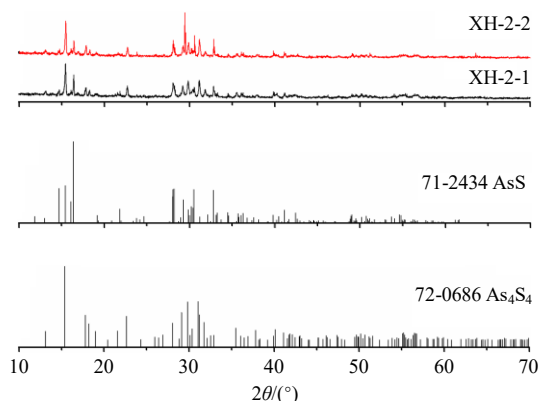


图 3 XH-2-1、XH-2-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (AsS、As₄S₄)

Fig. 3 XRD profiles of XH-2-1, XH-2-2 samples and standard PDF cards (AsS, As₄S₄)

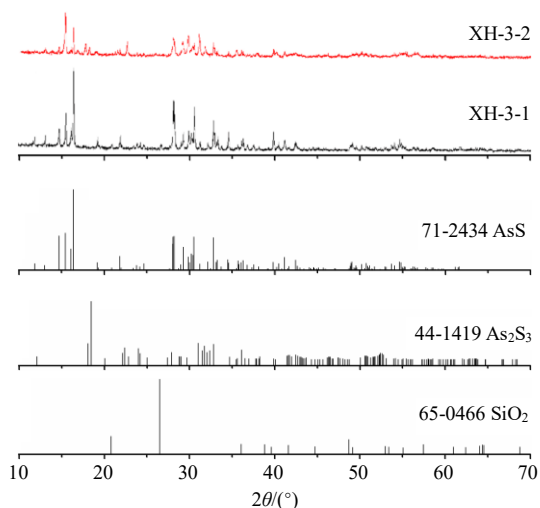


图 4 XH-3-1、XH-3-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (AsS、As₂S₃、SiO₂)

Fig. 4 XRD profiles of XH-3-1, XH-3-2 samples and standard PDF cards (AsS, As₂S₃, SiO₂)

一定程度上可以减少雄黄中杂质的含量，水飞雄黄可起到除杂目的。

2.2 Quanta 250 型扫描电子显微镜-EDAX 型能谱仪观察雄黄水飞品及干研品形貌及元素测定

2.2.1 实验条件 加速电压 20 kV，工作距 9.9 mm，采集时间 100~200 s，死时间为 20%~40%，在 10 000 倍 SEM 下观察。

2.2.2 样品制备 将雄黄水飞品及干研品，用导电胶粘贴于载物台上，将其均匀分布于导电胶表面，吹去表面灰尘、小颗粒等，用于能谱测定元素含量；然后喷以钛铝合金膜，制得 SEM 形貌观察用样品。

2.2.3 雄黄水飞品和干研品形貌观察 XH-6 的水飞雄黄和干研雄黄粒径相差无几，故后续实验测定

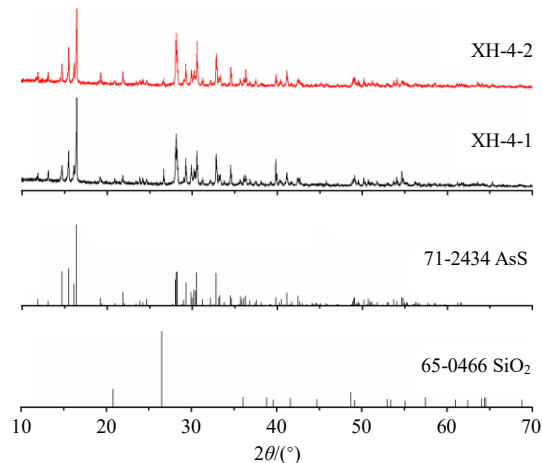


图 5 XH-4-1、XH-4-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (AsS、SiO₂)

Fig. 5 XRD profiles of XH-4-1, XH-4-2 samples and standard PDF cards (AsS, SiO₂)

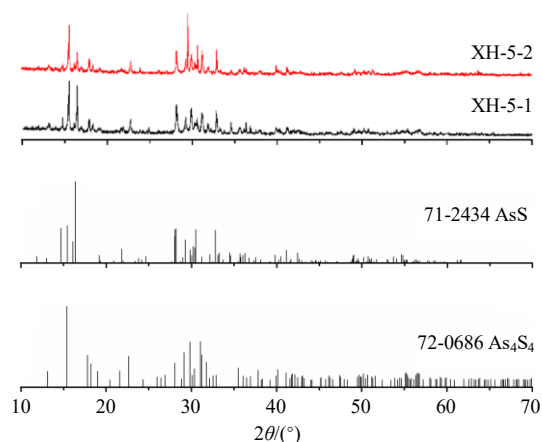


图 6 XH-5-1、XH-5-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (AsS、As₄S₄)

Fig. 6 XRD profiles of XH-5-1, XH-5-2 samples and standard PDF cards (AsS, As₄S₄)

均使用 XH-6 的水飞雄黄和干研雄黄，于 10 000 倍 SEM 下通过 SEM 分别观察 XH-6 水飞雄黄和干研雄黄形貌特征，如图 9 所示，发现水飞品表面纹理清晰且平滑，呈钝圆状，表面附着细小粉末较多，而干研品呈多角状，边角呈锐尖状，表面附着细小粉末少。

2.2.4 雄黄水飞品和干研品的元素测定 通过 SEM 观察雄黄不同炮制品的形貌特征，发现在 10 000 倍 SEM 下，可以初步区分水飞品和干研品，因此在此倍镜下对雄黄粉末进行元素测定，结果发现，不同炮制方法下得到的雄黄粉末表面只检测出 O、As、S 3 种元素，此结果与 XRD 图谱物相分析结果基本一致。元素原子百分比测定结果见表 4，图 10 为 XH-6

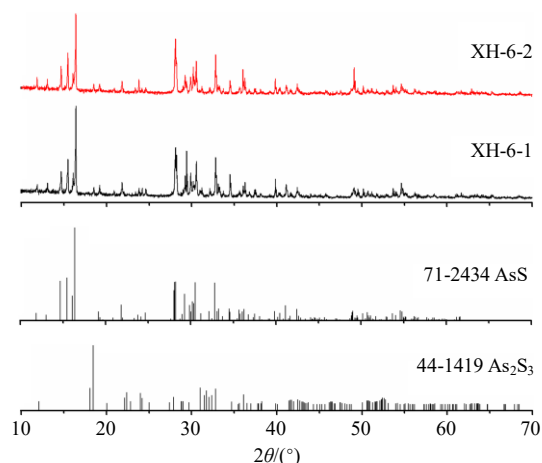


图 7 XH-6-1、XH-6-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (AsS、As₂S₃)

Fig. 7 XRD profiles of XH-6-1, XH-6-2 samples and standard PDF cards (AsS, As₂S₃)

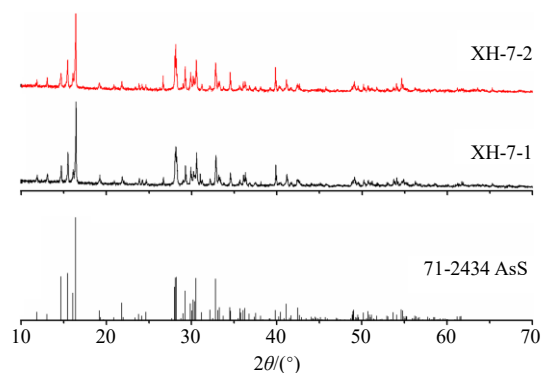


图 8 XH-7-1、XH-7-2 样品的 XRD 图谱与标准 PDF 卡片 (AsS)

Fig. 8 XRD profiles of XH-7-1, XH-7-2 samples and standard PDF card (AsS)

样品元素测定能谱图。水飞品的氧元素原子百分比明显小于干研品，而与氧结合的砷是雄黄中主要毒性成分，水飞品相对于干研品而言，其比值明显要低，即与氧结合的砷含量降低，毒性降低，说明雄黄经水飞炮制后降低了雄黄毒性成分，起到水飞减毒的目的。

2.3 火焰光度原子吸收分光光度法测定雄黄水飞品及干研品总砷含量

2.3.1 实验条件 砷空心阴极灯，检测波长为 193.7 nm，灯电流 5 mA，狭缝宽度 0.5 mm，燃烧头高度为 8 mm，火焰类型：空气-乙炔，燃气体积流量 1 L/min，背景校正：四线氙灯，测定时间 4 s，测试次数 3 次。

2.3.2 样品制备 取样品粉末 10 mg，精密称定，置聚四氟乙烯消解罐内，加硝酸-盐酸 (4:1) 8 mL，

表 3 雄黄样品半定量分析 ($n = 3$)

Table 3 Semi-quantitative analysis of Realgar samples ($n = 3$)

雄黄样品	化合物名称	化学式	晶系	质量分数/%
XH-1-1	四硫化四砷	As ₄ S ₄	单斜	100
XH-1-2	四硫化四砷	As ₄ S ₄	单斜	100
XH-2-1	硫化砷	AsS	单斜	53
	四硫化四砷	As ₄ S ₄	单斜	47
XH-2-2	硫化砷	AsS	单斜	44
	四硫化四砷	As ₄ S ₄	单斜	37
	硫酸钙	CaSO ₄	方晶	19
XH-3-1	硫化砷	AsS	单斜	97
	二氧化硅	SiO ₂	方晶	3
XH-3-2	硫化砷	AsS	单斜	74
	三硫化二砷	As ₂ S ₃	单斜	23
	二氧化硅	SiO ₂	方晶	3
XH-4-1	硫化砷	AsS	单斜	98
	二氧化硅	SiO ₂	方晶	2
XH-4-2	硫化砷	AsS	单斜	90
	二氧化硅	SiO ₂	方晶	10
XH-5-1	硫化砷	AsS	单斜	62
	四硫化四砷	As ₄ S ₄	单斜	38
XH-5-2	硫化砷	AsS	单斜	57
	四硫化四砷	As ₄ S ₄	单斜	43
XH-6-1	硫化砷	AsS	单斜	89
	三硫化二砷	As ₂ S ₃	单斜	11
XH-6-2	硫化砷	AsS	单斜	84
	三硫化二砷	As ₂ S ₃	单斜	16
XH-7-1	硫化砷	AsS	单斜	100
XH-7-2	硫化砷	AsS	单斜	100

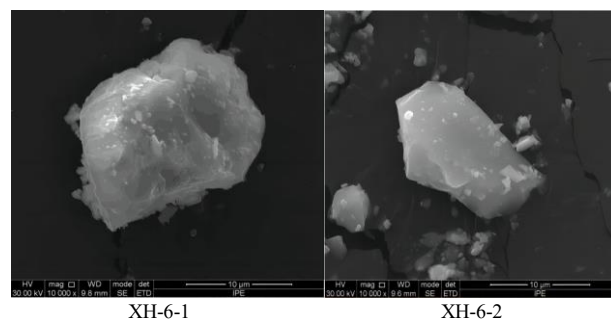


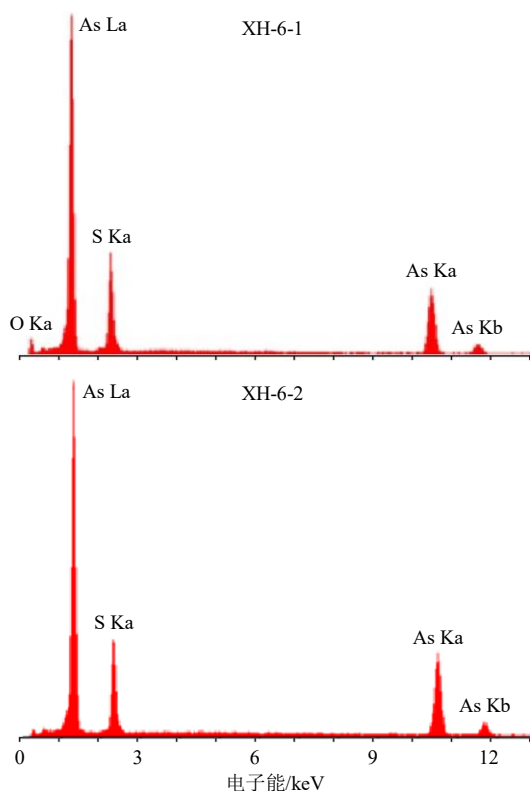
图 9 雄黄 XH-6 形貌的二次电子图像 ($\times 10\,000$)

Fig. 9 Secondary electronic image of XH-6 Realgar ($\times 10\,000$)

混匀，盖好内盖，旋紧外套，置微波消解炉内，按照预定的消解程序进行消解。消解完全后，转移至 100 mL 量瓶中，并稀释至刻度，摇匀，精密移取 20 mL，置 50 mL 量瓶中，并稀释至刻度，摇匀，即得。

表 4 元素原子占比测定结果 ($n=3$)Table 4 Results of element atomic percentage determination ($n=3$)

样品	O/%	As/%	S/%
XH-6-1	9.32	47.43	43.25
XH-6-2	10.46	50.72	38.82

图 10 XH-6 二次电子图能谱图 ($\times 10\,000$)Fig. 10 XH-6 secondary electron map energy spectrum map ($\times 10\,000$)

同法同时制备试剂空白溶液。

2.3.3 线性关系考察 精密吸取砷标准液适量，加 3%硝酸溶液进行稀释，制成 10、20、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。按照“2.3.1”项下实验条件进行测定，计算回归方程为 $Y=0.005\,5X+0.004\,4$ ， $R^2=0.999\,8$ ， $n=6$ 。结果表明，砷在 10~80 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度的线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 精密吸取 40 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液，按照“2.3.1”项下实验条件重复测定 6 次，6 次测定结果 RSD 为 0.40%，说明该方法精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 按照“2.3.2”项下方法制备 XH-7-2 样品溶液，分别在 0、3、9、12、16、24 h 测定吸光度，6 次测定含量 RSD 为 2.16%，说明此样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 按照“2.3.2”项下方法制备方

法平行制备 6 份 XH-7-2 样品溶液，依次进行测定，6 次测定含量 RSD 为 0.98%，重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密称定已测定总砷含量的 XH-7-2 样品粉末，每份 5 mg，精密加入对照品溶液适量，按照“2.3.2”项下方法制备样品溶液，依次进行测定。结果样品平均加样回收率为 98.61%，RSD 为 4.41%。

2.3.8 总砷含量测定结果 水飞品及干研品中总砷含量测定结果见表 5，结果表明水飞雄黄总砷比干研雄黄含量高。

表 5 水飞雄黄及干研雄黄的总砷含量 ($n=3$)Table 5 Total arsenic content of water grinding Realgar and grinding Realgar ($n=3$)

样品	总砷/%	样品	总砷/%	样品	总砷/%
XH-1-1	69.02	XH-3-2	63.47	XH-6-1	75.18
XH-1-2	66.61	XH-4-1	68.23	XH-6-2	76.51
XH-2-1	69.25	XH-4-2	65.97	XH-7-1	65.03
XH-2-2	69.02	XH-5-1	65.64	XH-7-2	63.88
XH-3-1	64.34	XH-5-2	64.25		

2.4 氢化物发生-原子吸收光度法测定雄黄水飞品及干研品可溶性砷含量

2.4.1 实验条件

(1) 原子吸收光谱仪仪器条件：砷空心阴极灯，检测波长为 193.7 nm，灯电流 8 mA，狭缝宽度 0.5 mm，燃烧头高度为 15 mm，火焰类型：空气-乙炔，燃气流量 1 L/min。

(2) 氢化物发生仪器条件：含 3%硼氢化钠和 1%氢氧化钠溶液（临用前配制）作为还原剂，盐酸溶液（3→100）为载液，氩气为载气。

2.4.2 样品制备 精密称定样品粉末 8 mg，置 100 mL 锥形瓶中，精密加入 50 mL 人工肠液，摇匀，密塞，置 37 $^{\circ}\text{C}$ 中超声处理（功率 250 W、频率 40 kHz）2 h，每隔 15 min 充分摇匀 1 次，放冷后，摇匀，离心，吸取中间溶液适量，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，精密量取续滤液 2 mL，置于 100 mL 量瓶中，然后分别加入 4 mL 10%抗坏血酸溶液和 4 mL 25% KI 溶液，稀释至刻度，摇匀，即得。

2.4.3 线性关系考察 精密吸取砷标准溶液适量用 0.1 mol/L 硝酸稀释至刻度，制得 2000 ng/mL 的储备液。精密吸取以上储备液制成 20、40、60、80、100、120 ng/mL 对照品溶液，按照“2.4.1”项下条件进行测定。计算得回归方程为 $Y=0.001\,7X+$

0.029 9 ($R^2=0.996\ 5$, $n=6$)。结果表明,砷在 20~120 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度的线性关系良好。

2.4.4 水飞品和干研品中可溶性砷含量测定结果 雄黄水飞品及干研品可溶性砷含量测定结果见表 6,不同炮制品其可溶性砷质量分数均在 1.80%~4.45%,不同来源及产地其可溶性砷差异较大。可溶性砷是雄黄发挥药效的主要成分,比较水飞雄黄及干研雄黄可溶性砷含量,发现除 XH-2 与 XH-5 水飞品及干研品外,同一雄黄矿石来源,水飞品可溶性砷含量高于干研品,说明经水飞炮制后雄黄药效增强。

表 6 水飞雄黄及干研雄黄的可溶性砷含量 ($n=3$)

Table 6 Soluble arsenic content of water grinding Realgar and grinding Realgar ($n=3$)

样品	可溶性砷/%	样品	可溶性砷/%
XH-1-1	2.08	XH-4-2	3.59
XH-1-2	1.80	XH-5-1	2.99
XH-2-1	1.85	XH-5-2	3.08
XH-2-2	1.95	XH-6-1	4.29
XH-3-1	3.61	XH-6-2	3.76
XH-3-2	2.76	XH-7-1	3.06
XH-4-1	4.45	XH-7-2	2.62

2.5 雄黄水飞品及干研品抗炎作用比较

2.5.1 分组与给药 小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为对照组、醋酸地塞米松组,雄黄水飞品低、高剂量组,雄黄干研品低、高剂量组,每组 8 只。其中雄黄水飞品及研品低剂量为 39.0 mg/kg、高剂量为 130.0 mg/kg,醋酸地塞米松的给药剂量为 1.5 mg/kg。以 0.5%羧甲基纤维素钠溶液助悬,将雄黄 XH-6 水飞品及干研品分别配制成低剂量和高剂量的雄黄混悬液,对各给药组小鼠每天 ig 1 次,连续 3 d,对照组小鼠给予等体积 0.5%羧甲基纤维素钠溶液。

2.5.2 样品采集 末次给药 30 min 后,于小鼠左耳两面均涂抹二甲苯致肿,每只 20 μL ,右耳不涂作为空白对照。1 h 后处死小鼠,用打孔器在左耳和右耳同一部位打下耳片,称定质量,计算肿胀度。

2.5.3 统计分析 采用统计分析软件 SAS 8.2 进行数据统计分析,选用单因素方差分析对各组小鼠的肿胀度进行统计分析,以 $P<0.05$ 作为差异显著性检验的标准。小鼠耳肿胀度统计分析结果见表 7。由耳肿胀度的统计结果可知,与对照组相比,水飞

表 7 雄黄不同炮制品对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 7 Effects of different Realgar products on ear swelling ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿胀度/mg
对照组	—	3.38±1.09
醋酸地塞米松	1.5	0.69±0.35**
雄黄水飞品	39.0	2.66±0.99
	130.0	1.13±0.40**
雄黄干研品	39.0	3.00±0.87
	130.0	2.25±0.98*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

品高剂量组、干研品高剂量组以及醋酸地塞米松组的耳肿胀度明显降低 ($P<0.05$ 、0.01),水飞品低剂量组、干研品低剂量组的耳肿胀度无明显差异;与干研品高剂量组相比,水飞品高剂量组的耳肿胀度明显降低 ($P<0.05$)。以上统计结果说明雄黄水飞品与干研品均有抗炎作用,但水飞品在抗炎方面的药效优于干研品。

3 讨论

本研究采用 XRD 分析测试技术,对我国药用雄黄主成分的物相结构及伴生矿石的情况进行研究,发现我国药用雄黄的主成分并不是药典中规定的 As_2S_2 ,而是 AsS 或/和 As_4S_4 ;与之前众多研究表明雄黄应为 As_4S_4 或 AsS 相一致,而 As_2S_2 应为烧黄^[12-17],建议对于《中国药典》2020 年版中有关雄黄的主成分规定进行修订。不同产地雄黄样品的主成分物相结构及含量差异较大,造成此差异主要原因是我国不同产地的伴生矿床较复杂。我国药用雄黄伴生矿石以雌黄 (As_2S_3) 及石英 (SiO_2) 为主,在 XRD 图谱中见到了 As_2S_3 、 SiO_2 和 CaSO_4 的特征图谱信息,未见 As_2O_3 的特征图谱信息,分析原因可能是由于其含量较低所致。因此,在研究评价其他矿物类药材质量时,最好从矿种形成的源头及产地开始考察,注意考察其伴生矿物的情况。运用 XRD 技术对物相组成进行半定量分析,发现水飞法炮制雄黄并不会改变雄黄的物相结构,水飞法相对于干研法而言,能够在一定程度上减少雄黄中伴生矿石的含量,水飞雄黄可起到除杂目的。

本研究采用扫描电子显微镜-能谱仪,观察到雄黄水飞品和干研品的形貌、元素种类及含量具有差异。将雄黄样品粉末于 10 000 视野下进行观察,可

初步从表面形貌区分水飞雄黄与干研雄黄,水飞雄黄上附有较多的细小粉末。雄黄经水飞后,与氧结合的砷元素含量降低,说明其毒性降低,结合本实验室前期研究的水飞雄黄和干研雄黄对大鼠亚急性毒性的影响,发现水飞雄黄对大鼠的肝毒性低于干研雄黄^[4],说明水飞法炮制雄黄能起到炮制减毒的目的。

本研究采用火焰光度原子吸收分光光度法和氢化物发生-原子吸收光度法分别对 2 种雄黄中总砷及可溶性砷含量进行了测定,结果显示,大部分水飞品总砷及可溶性砷的含量大于干研品,可能与水飞品表面附有较多细小粉末,提高了溶解度有关;而 XH-2 与 XH-5 干研品可溶性砷含量与水飞品接近,可能是由于其干研品中位粒径明显小于水飞品中位粒径。可溶性砷是雄黄发挥药效作用的主要物质;动物实验结果表明雄黄水飞品与干研品均有抗炎作用,但水飞品在抗炎方面的药效优于干研品,说明经水飞炮制后雄黄药效增强。水飞品与干研品相比与氧结合的砷含量降低,而可溶性砷含量却有所增加,推测其原因是由于水飞品形貌上的改变,雄黄水飞后其表面附着细小粉末较多而导致其可溶性砷含量增加。

本研究说明了水飞法炮制雄黄并不改变其物相种类,但有除杂、减毒及增效三重效果,本研究揭示了水飞法炮制雄黄的机制,丰富了水飞法炮制雄黄的科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 350-351.
- [2] 陶雨晨,任建业,王冬琴,等. 基于肠道菌群探讨砷剂治疗血液系统恶性肿瘤的研究进展 [J]. 重庆医学, 2022, 51(3): 525-528.
- [3] 裴可,冯慧超,郑文利,等. 纳米雄黄抗肿瘤的药理毒理研究及临床应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 214-219.
- [4] 李千,李莎莎,徐新房,等. 不同炮制工艺对雄黄性状

及成分含量影响的研究 [J]. 环球中医药, 2023, 16(3): 424-430.

- [5] Han T, Zhang H, Xu W, *et al.* Study on the mechanism of reducing hepatotoxicity of water-grinding *Realgar* by metabolomics, morphology, and chemical analysis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8538287.
- [6] 李莎莎,林青华,徐何方,等. 市售雄黄药材及饮片质量考察 [J]. 中医药学报, 2016, 44(2): 10-12.
- [7] 李伟东,高倩倩,赵根华,等. 矿物药炮制研究方法述评 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 596-600.
- [8] 明小芳,尚祥伟,张超,等. 纳米雄黄酸水飞品 X 射线衍射及拉曼光谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(20): 89-94.
- [9] 明晶. 几种矿物药的 X 射线衍射、拉曼光谱及近红外光谱法鉴别研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
- [10] 张慧,高岩,熊慧,等. 采用扫描电镜-能谱仪比较水飞法、水洗法及干研法对雄黄饮片质量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 22-26.
- [11] 何海,赵沙沙,张小荣,等. 不同配伍比例牛蒡子-甘草药对中 12 个活性成分溶出量及抗炎作用的差异性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(8): 1040-1046.
- [12] 汤毅珊,王宁生. 雄黄及含雄黄复方中砷含量、形态和晶形分析 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(2): 30-34.
- [13] 汪寅夫,李清,刘琦,等. X 射线衍射和电子探针技术在矿物药雄黄鉴定及质量评价中的应用 [J]. 岩矿测试, 2014, 33(5): 706-713.
- [14] 田金改,吕扬,周俊国,等. 矿物药雄黄及其伴生矿物的 X-衍射图谱分析研究 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18(2): 86-89.
- [15] 黄必胜,袁明洋,陈科力. X 射线衍射技术在矿物类中药鉴定中的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(11): 917-921.
- [16] Ito T, Morimoto N, Sadanaga R. The crystal structure of *Realgar* [J]. *Acta Cryst*, 1952, 5(6): 775-782.
- [17] Porter E J, Sheldrick G M. Crystal structure of a new crystalline modification of tetra-arsenic tetrasulphide (2,4,6,8-tetrathia-1,3,5,7-tetra-arsatricyclo[3,3,0,0,3,7]-octane) [J]. *J Chem Soc Dalton*, 1972, 13(13): 1347.

[责任编辑 郑礼胜]