

雄黄锆球水飞-超声辅助纳米化工艺及其“效-毒”关系研究

康 爽, 葛松奇, 吴京臻, 徐天艺, 王馨晨, 王楚盈, 杨辛欣*, 于 澎*

长春中医药大学, 吉林 长春 130117

摘要:目的 建立超声辅助雄黄 *Realgar* 纳米化工艺, 阐明纳米化改造在雄黄安全阈值内实现“减毒增效”的科学内涵。方法 采用星点设计-响应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化雄黄锆球水飞参数, 结合酸洗与超声剪切制备纳米化雄黄; 通过激光粒度分析仪 (laser particle size analyzer)、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、比表面积及孔隙度分析仪的 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 分析法及液相色谱-原子荧光光谱联用仪 (liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry, LC-AFS) 对 4 种炮制品 (干法粉碎雄黄、传统水飞雄黄、SDS 水飞雄黄、纳米化雄黄) 进行表征; 利用线虫模型评价各炮制品毒性, 小鼠创面模型评价其药效。结果 雄黄锆球水飞最佳工艺为研磨 3.9 h、水飞 3 次、加锆球 (直径分别为 1、2、3、4 mm 锆球质量比为 1:1:2:4) 190 g; 250 W 功率下超声 30 min 可将水飞后雄黄样品粒径降至 300 nm。BET 分析结果显示, 纳米化雄黄介孔发达; LC-AFS 检测结果显示, 与干法粉碎雄黄样品相比, 3 种炮制方法均可降低雄黄样品中 As^{3+} 含量, 纳米化雄黄样品略高但低于安全限度。线虫实验中, 纳米化雄黄样品毒性最低 ($P < 0.001$); 小鼠创面模型中, 其创面愈合率最高, 显著降低炎症因子并上调生长因子表达 ($P < 0.05$)。结论 锆球水飞-超声辅助工艺可成功制备纳米化雄黄, 在安全阈值内兼具减毒与增效双重优势, 为雄黄炮制技术升级提供了理论依据。

关键词: 雄黄; 纳米化; 锆球水飞-超声辅助; 减毒增效; 星点设计-响应面法; Brunauer-Emmett-Teller (BET); 液相色谱-原子荧光光谱联用; As^{3+} ; 炎症因子; 生长因子

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)19-7615-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.19.011

Study on zirconium ball water-grinding combined with ultrasound-assisted nanonization process of *Realgar* and its “efficacy-toxicity” relationship

KANG Shuang, GE Songqi, WU Jingzhen, XU Tianyi, WANG Xinchun, WANG Chuying, YANG Xinxin, YU Peng
Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To establish an ultrasound-assisted nanonization process for *realgar* and elucidate the scientific connotation of achieving toxicity reduction and efficacy enhancement within safety thresholds through nanonization. **Methods** The parameters of zirconium ball water-grinding were optimized using central composite design-response surface methodology (CCD-RSM), and nano-*realgar* was prepared by combining acid washing with ultrasonic shearing. Four processed products (dry-ground *Realgar*, traditional water-floating *Realgar*, SDS-assisted water-floating *Realgar* and nano-*Realgar*) were characterized by laser particle size analyzer, scanning electron microscope (SEM), specific surface area and porosity analyzer based on the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method, and liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry (LC-AFS). Toxicity was evaluated using a *Caenorhabditis elegans* model, and efficacy was assessed using a mouse wound model. **Results** The optimal process parameters of zirconium ball water-grinding were determined as milling for 3.9 h, three cycles of levigation, and the addition of 190 g of zirconia balls (the mass ratio of zirconium balls with diameters of 1, 2, 3, 4 mm is 1:1:2:4); The particle size of *Realgar* sample can be reduced to 300 nm 30 min of sonication at 250 W. BET analysis showed that nano-*realgar* had well-developed mesopores. LC-AFS results indicated that, compared with the dry-milled product, all processing methods reduced the As^{3+} content, with nano-*Realgar* being slightly higher but still below the safety limit. In the *C. elegans* assay, nano-*Realgar* exhibited the lowest toxicity ($P < 0.001$). In the mouse wound model,

收稿日期: 2026-04-02

基金项目: 吉林省自然科学基金资助项目 (YDZJ202501ZYTS271); 长春中医药大学大学生创新训练项目 (S202510199014)

作者简介: 康 爽, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制关键技术及科学内涵研究。E-mail: 1733718286@qq.com

*通信作者: 杨辛欣, 女, 博士, 副教授, 从事中药炮制研究。E-mail: yangxx@ccucm.edu.cn

于 澎, 男, 硕士, 教授, 从事中药炮制研究。E-mail: yupeng@ccucm.edu.cn

it achieved the highest healing rate, significantly reducing inflammatory factors and upregulating growth factor expression ($P < 0.05$).

Conclusion The zirconium ball water-grinding combined with ultrasound-assisted nanonization process successfully prepares nano-*Realgar*, which possesses dual advantages of toxicity reduction and efficacy enhancement within safety thresholds, providing a theoretical basis for upgrading the processing technology of *Realgar*.

Key words: *Realgar*; nanonization; zirconium ball water-grinding combined with ultrasound assistance; toxicity reduction and efficacy enhancement; central composite design-response surface methodology; Brunauer-Emmett-Teller (BET); liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry; As^{3+} ; inflammatory factor; growth factor

在中医药宝库中,矿物药凭借独特药效占据不可或缺的地位,但其安全性争议长期制约临床合理应用,尤以含砷矿物药的毒性风险最为突出。雄黄作为临床常用矿物药,主含二硫化二砷(As_2S_2),兼具解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟定惊等核心功效,广泛用于痈肿疔疮、蛇虫咬伤、疟疾、惊痫等病症治疗,如何控制其砷成分的毒性风险始终是临床应用的关键挑战。传统水飞法作为矿物药经典炮制减毒技术,虽可通过物理分离作用降低部分毒性成分含量,但受限于“经验化操作”特性,存在关键工艺参数缺乏量化标准、批间重复性差、粒径分布宽、活性成分损失有等突出问题,难以实现毒性精准控制与药效协同增强的双重目标。

近年来,随着纳米技术与现代分析手段的飞速发展,国内外学者开始探索以纳米化手段改造矿物药的可行性^[1]。国外已有研究将硫化砷制备为纳米颗粒,旨在通过粒径效应调控生物可利用度以提升药效;国内学者也通过球磨法^[2]、溶胶-凝胶法^[3]等技术尝试制备雄黄纳米粉,但系统的工艺优化与深入的安全性评价仍显不足。近年来,关于雄黄“效-毒”关系的研究逐渐受到关注。在炮制减毒方面,研究表明酸洗炮制品不仅可降低毒性,且药效有所提高^[4]。在安全性评价方面,已有研究表明纳米化雄黄在 5.0 g/kg 剂量下未见明显急性毒性反应^[2]。然而,针对纳米化雄黄在安全阈值内如何平衡“效”与“毒”的系统研究仍较为有限。本研究在工艺优化的基础上,综合运用线虫毒性模型和小鼠创面愈合模型,系统评价纳米化雄黄的“效-毒”关系,为其临床安全应用提供实验依据。

本研究旨在建立一种高效、可控的雄黄纳米化炮制工艺,并对其工艺参数、理化性质及初步安全性有效性进行考察。研究首先采用星点设计-响应面法(central composite design-response surface methodology, CCD-RSM),对研磨时间、加球量、研磨球比例及加水量等关键工艺参数进行系统优化,以实现粒径可控、分布均匀的纳米化雄黄制备;

在此基础上,通过酸洗工艺进一步降低可溶性砷含量,控制安全性风险。进而,综合运用 BET 比表面积测定、液相色谱-原子荧光形态分析等技术,系统表征纳米化雄黄的孔隙结构关联砷释放行为,阐释其“微观结构-成分释放”关系;通过线虫模型(毒性筛选)与动物模型(药效验证)开展体内外协同评价,明确纳米化改造在安全阈值内实现“减毒增效”的可行性,为雄黄现代炮制技术升级与质量可控化提供坚实的理论支撑与实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

JM1L 型搅拌式球磨机,长沙天创粉末技术有限公司; BT-2001 型激光粒度分布仪,丹东百特仪器有限公司; Datacolor800 型色度仪,上海德塔颜色商贸有限公司; FA12048 型电子分析天平,十万分之一,上海精密科学仪器有限公司; GZX-9070MBE 型电热鼓风干燥箱,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; HJ-2B 型磁力搅拌器,苏瑞仪器有限公司; SA-20 型液相色谱-原子荧光形态分析仪,北京吉天仪器; Autosorb Station 1 型全自动比表面与孔隙度分析仪,美国 Quantachrome Instruments 公司; SU8020 型场发射扫描电子显微镜,日本日立公司; Agilent ICPOES730 型电感耦合等离子体质谱仪,美国安捷伦科技公司; DS-806AT 型溶出度仪,深圳市华溶分析仪器有限公司。

1.2 试剂

硫酸钾(批号 C15450919)、硫酸铵(批号 C14909767)、酚酞(批号 C15045605)、碳酸氢钠(批号 C14357924)、碘(批号 C15973111)、胆固醇(批号 C871831)、 $MgSO_4$ (批号 M822187)、氢氧化钠(批号 20230622),分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司; $CaCl_2$ (批号 20230719,分析纯)、胃蛋白酶(批号 20240315,生化纯)、无水乙醇(批号 10009218)、过氧化氢(批号 10011218),国药集团化学试剂有限公司; $NaClO$,批号 20240112,分析纯,西陇科学股份有限公司; 硫酸(批号

2023101501)、硝酸(批号 20240105),分析纯,成都市科隆化学品有限公司;吡啶橙染液(批号 R20290)、硫代硫酸钠(批号 A07GS157176)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS, 批号 20220816),上海源叶生物科技有限公司;碘化钾,批号 20221020,分析纯,天津福晨化学试剂厂;磷酸二氢钾,批号 20231108,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;可溶性淀粉,批号 20230322,分析纯,天津光复精细化工有限公司;4%多聚甲醛溶液,批号 23319085,安徽 Biosharp 生物技术有限公司。磷酸盐缓冲液、M9 缓冲液、NGM 平板、OP50 菌液均为实验室自制。

小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(货号 PT512)、小鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(货号 PI301)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(货号 PI326),上海碧云天生物技术有限公司。血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA, 批号 WL00009b)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1, 批号 WL02193)、血小板衍生生长因子-A 亚基(platelet-derived growth factor-A subunit, PDGF-A, 批号 WL02880),沈阳万类生物科技有限公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG,批号#31460,美国 Thermo Fisher Scientific Inc.;苏木精,批号 H8070,北京索莱宝科技有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)粉末,批号 A602440-0050,生工生物工程(上海)股份有限公司;DAB 显色液,批号 DAB-1031,福州迈新生物技术开发有限公司。

1.3 样品

研究收集的雄黄原药材(产地湖南省),按照《中国药典》2025 年版^[5]雄黄药材项下要求进行检查符合要求,经长春中医药大学化学学院王哲副教授鉴定,为硫化物类矿物雄黄族雄黄 *Realgar*。

1.4 动物

ICR 小鼠,雄性,体质量 20~22 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,生产许可证号 SCXK(辽)2024-0001。小鼠饲养于 SPF 屏障环境,室温(22 $\pm$ 2)℃,相对湿度(50 $\pm$ 10)%,12 h 光、暗循环,自由采食饮水。适应性饲养 7 d 后进行实验。本研究经长春中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号 2024586。秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis*

elegans, 野生型 N2,由长春中医药大学中药药理学实验室惠赠。

2 方法与结果

2.1 工艺评价指标设计与评分

2.1.1 含量测定 雄黄参照《中国药典》2025 年版一部,雄黄项中含量测定项下方法,对样品进行含量测定。

2.1.2 色度测定 取适量雄黄样品粉末平铺于校准好的色差仪检测孔,重复测量 3 次以确保准确性,取 L^* 、 a^* 、 b^* 均值(L^* 为明度值, a^* 为红绿色度值, b^* 为黄蓝色度值),对样品进行色度值测定,取得色度数据。结合古籍中对雄黄性状描述“好者作鸡冠色,不臭而坚实。若黯黑及虚软者不佳”《新修本草》(唐·苏敬)^[6];“雄黄,赤如鸡冠,光明晔晔者良”《本草经集注》(陶弘景,南北朝)^[7]强调正品雄黄应呈鲜艳的鸡冠红色(朱红色)^[8],晶体表面具金属光泽,断面有闪烁反光,因此确定红绿色度 a^* 值为评价指标。

2.1.3 粒度测定 取样品约 0.2 g,过五号筛,至 50 mL 烧杯中,加纯化水 30 mL,搅拌均匀后备用。启动激光粒度分布测试仪,对仪器进行背景校正,加样时将样品粉末混悬液倒入测试仪的分散池中,经仪器搅拌、超声分散后,样品会循环到测试区进行检测,最后记录样品中位径测定结果^[9]。

2.1.4 评分方法 为使实验结果能够全面地、科学地反映该工艺的可行性,以药典规定的 As_2S_2 含量为核心质控指标;色度 a^* 值反映雄黄“鸡冠红”的传统性状标准,中位径表征粉体粒径分布特征,二者代替传统感官指标评价性状。采用线性插值法将各指标数据进行标准化转换。含量测定得分: $Y_1 = 100 \times (R_1 - R_{1min}) / (R_{1max} - R_{1min})$,色度测定得分: $Y_2 = 100 \times (R_2 - R_{2min}) / (R_{2max} - R_{2min})$,中位径得分: $Y_3 = 100 \times [1 - (R_3 - R_{3min}) / (R_{3max} - R_{3min})]$,其中, $R_1 \sim R_3$ 分别为该样品的 As_2S_2 含量、色度 a^* 值、中位径, $R_{1min} \sim R_{3min}$ 分别为测定结果中 As_2S_2 含量、色度 a^* 值、中位径的最小值, $R_{1max} \sim R_{3max}$ 分别为测定结果中 As_2S_2 含量、色度 a^* 值、中位径的最大值。

根据层次分析法确定各指标权重系数,结果见表 1,权重系数采用层次分析法(analytic hierarchy process, AHP)确定。根据预实验中各指标对工艺质量的贡献程度,对 As_2S_2 含量、色度、中位径进行两两比较,构建判断矩阵; As_2S_2 含量得分、色度得分、中位径得分的权重系数分别为 0.57、0.10、0.33,

表 1 工艺指标准则层判断矩阵

Table 1 Judgment matrix of criterion layer for process evaluation			
工艺指标	As ₂ S ₂ 含量	色度	中位径
As ₂ S ₂ 含量	1	5	2
色度	1/5	1	1/4
中位径	1/2	4	1

经检验，其一致性比率（consistency ratio，CR）= 0.021 2，CR<0.10，表明权重系数有效。采用综合评分法，对水飞工艺进行考察，综合评分（Y）=0.57 Y₁+0.10 Y₂+0.33 Y₃。

2.2 雄黄铅球水飞工艺单因素考察

2.2.1 研磨时间考察 精密称定 30 g 雄黄样品，倒入尼龙研磨桶中，加入 200 g 直径为 4 mm 的氧化铅球，加入纯化水 300 mL，以 800 r/min 的转速分别研磨 1、2、4 h，滤过分离残渣、铅球和混悬液，将混悬液倒入烧杯中沉淀 48 h，取下层沉淀，干燥，测定其 As₂S₂ 含量、色度、粒度，并计算综合得分，结果见表 2。结果显示，随着研磨时间从 1 h 延长至 4 h，样品的关键指标呈现规律性变化，综合得分同步大幅提升，表明延长研磨时间对样品纯度、颗粒细化及综合性能均有显著优化作用，同时收率的提高进一步支持了工艺有效性，因此研磨时间 4 h 为佳。

表 2 研磨时间考察结果

Table 2 Results of grinding time investigation				
研磨时间/h	As ₂ S ₂ /%	a*值	中位径/μm	综合得分
1	98.62	1.54	9.70	0.00
2	100.10	1.69	8.01	69.93
4	100.52	1.76	6.72	100.00

2.2.2 加水量考察 精密称定 30 g 雄黄样品，倒入尼龙研磨桶中，加入 200 g 直径为 4 mm 的氧化铅球，分别加入纯化水 200、300、400、500 mL，以 800 r/min 的转速分别研磨 90 min，滤过分离残渣、铅球和混悬液，将混悬液倒入烧杯中沉淀 48 h，取下层沉淀，干燥，测定其 As₂S₂ 含量、色度、粒度，并计算综合得分，结果见表 3。结果显示，不同加水量对雄黄样品研磨效果影响显著，300 mL 加水量在提升样品纯度、控制色度、优化综合性能等方面效果最优，而 500 mL 加水量整体表现最差。

2.2.3 加球量考察 精密称定 30 g 雄黄样品，倒入尼龙研磨桶中，分别加入 100、200、300、400 g 直径为 4 mm 的氧化铅球，加入纯化水 300 mL，以

表 3 加水量考察结果

Table 3 Results of investigation on water-adding amount				
加水量/mL	As ₂ S ₂ /%	a*值	中位径/μm	综合得分
200	100.57	2.13	7.85	70.47
300	100.75	1.85	8.35	85.20
400	100.39	2.25	10.14	56.56
500	99.14	1.98	11.29	3.25

800 r/min 的转速分别研磨 90 min，滤过分离残渣、铅球和混悬液，将混悬液倒入烧杯中沉淀 48 h，取下层沉淀，干燥，测定其 As₂S₂ 含量、色度、粒度，并计算综合得分，结果见表 4。结果表明，加球量的变化对雄黄粉的多项质量指标具有显著调控作用。当加球量逐渐增加时，主成分含量和外观色度值整体趋势表现为下降；粉体粒度中位径同样呈现减小趋势。综合考虑各指标的变化趋势及相互关联，加球量控制在 100~300 g 时，雄黄粉的综合性能表现最为稳定，各指标间协调较好，能够兼顾主成分保留、色度控制、粒度细化、均匀度提升。

表 4 加球量考察结果

Table 4 Results of investigation on ball-loading amount				
加球量/g	As ₂ S ₂ /%	a*值	中位径/μm	综合得分
100	99.81	2.67	10.06	67.00
200	98.29	2.32	9.09	60.28
300	97.75	1.93	9.30	45.32
400	96.07	1.20	8.36	33.00

2.2.4 不同直径研磨球质量比考察 精密称定 30 g 雄黄样品，倒入尼龙研磨桶中，加入 200 g 直径分别为 1、2、3、4 mm 的氧化铅球，不同直径研磨球质量比分别设置为 1：1：1：1、3：3：1：1、1：3：3：1、1：1：3：3、1：1：4：2、1：1：2：4，分别加入纯化水 300 mL，以 400 r/min 的转速分别研磨 90 min，滤过分离残渣、铅球和混悬液，将混悬液倒入烧杯中沉淀 48 h，取下层沉淀，干燥，测定其 As₂S₂ 含量、色度、粒度，并计算综合得分，结果见表 5。根据实验结果，不同直径研磨球加入比例对雄黄粉的多项性能指标有显著影响。分析发现，采用直径分别为 1、2、3、4 mm 的氧化铅球质量比为 1：1：2：4 时，研磨后的粉体在保持较高 As₂S₂ 含量和适宜色度 a*值的同时，中位径较小，综合性能表现优异。因此，选择此比例为最佳研磨球加入比例，以兼顾粉体细度、均匀度和生产效率。

2.3 雄黄铅球水飞工艺的 CCD-RSM 优选

2.3.1 试验设计与结果 基于单因素实验结果，固

表 5 研磨球比例考察结果

不同直径研磨 球质量比	As ₂ S ₂ / %	a*值	中位径/ μm	综合 得分
1:1:1:1	100.05	1.67	7.52	1.96
3:3:1:1	100.89	1.82	4.14	93.11
1:3:3:1	100.20	1.62	6.42	16.57
1:1:3:3	99.97	1.68	7.44	2.72
1:1:4:2	100.01	1.93	7.25	13.62
1:1:2:4	100.92	1.88	4.60	94.74

定加入直径分别为 1、2、3、4 mm，质量比为 1:1:2:4 的研磨球，离心机转速设为 800 r/min，对研磨时间 (X_1)、水飞次数 (X_2) 及加球量 (X_3) 3 个因素采用 Design-Expert 13 软件进行 3 因素 3 水平的 CCD-RSM 实验设计^[10]，以综合评分 (Y) 作为响应值，共设计 17 组试验进行 RSM 优化分析。各因素水平设置及响应值结果见表 6，通过多元回归分析对模型方程中的各项系数进行拟合优化。

表 6 CCD-RSM 优化的因素水平、实验设计及其结果

编号	X_1 /h	X_2 /次	X_3 /g	As ₂ S ₂ / %	a*值	中位径/ μm	Y
1	2 (-1)	1 (-1)	200 (0)	93.29	20.84	4.862	25.22
2	4 (+1)	1	200	95.76	21.59	4.039	49.93
3	2	3 (+1)	200	100.42	23.92	5.712	65.20
4	3 (0)	3	100	100.17	26.86	5.522	81.20
5	2	2 (0)	100 (-1)	97.87	21.67	4.127	55.70
6	4	2	100	100.68	26.36	3.292	86.83
7	2	2	300 (+1)	97.35	21.62	6.150	43.06
8	4	2	300	100.14	23.27	4.038	71.42
9	3	1	100	94.71	21.41	5.708	30.11
10	4	3	200	101.06	26.69	2.990	93.22
11	3	1	300	94.01	21.19	3.364	40.93
12	3	3	300	100.29	23.41	4.110	71.94
13	3	2	200	99.76	22.38	3.744	70.14
14	3	2	200	99.81	23.09	3.786	71.34
15	3	2	200	100.57	23.81	3.645	77.97
16	3	2	200	98.97	21.61	3.659	65.27
17	3	2	200	99.16	21.97	3.694	66.63

2.3.2 模型建立及优化 使用软件 Design-Expert 13 对 17 批实验数据进行分析，建立 2 次多元回归方程： $Y=70.270+14.030 X_1+20.670 X_2-3.310 X_3+0.8275 X_1X_2-0.6925 X_1X_3-5.020 X_2X_3-1.840 X_1^2-10.040 X_2^2-4.180 X_3^2$ 。并对其进行方差分析，结果

见表 7。其中 $P<0.05$ ， $F=8.51$ ，说明模型具有显著差异性；失拟值 $P>0.05$ ，失拟不显著， $R^2=0.9162$ ，说明该方程拟合度较好，可准确预测实际情况，矫正决定系数 $R_{adj}^2=0.8086$ ，说明此模型能解释 80.86% 的效应值变化。综上所述，该模型拟合度和可信度均有效，试验误差小，模型合理，可用于雄黄水飞工艺的分析 and 预测且能保证良好的准确度。根据回归分析结果，结合响应面三维立体图（图 1），通过 Design-Expert 13 软件分析预测最佳参数：研磨时间为 3.9 h、水飞次数为 3 次、加入研磨球为 190 g。

表 7 方差分析结果

误差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
回归模型	6 083.59	9	675.95	8.51	0.005 0	极显著
X_1	740.74	1	740.74	9.32	0.018 5	显著
X_2	3 306.88	1	3 306.88	41.62	0.000 3	极显著
X_3	857.19	1	857.19	10.79	0.013 4	显著
X_1X_2	17.39	1	17.39	0.22	0.654 1	
X_1X_3	2.79	1	2.79	0.04	0.856 7	
X_2X_3	4.35	1	4.35	0.06	0.821 7	
X_1^2	380.34	1	380.34	4.79	0.064 9	
X_2^2	619.7	1	619.70	7.80	0.026 8	显著
X_3^2	56.46	1	56.46	0.71	0.427 1	
残差	556.14	7	79.45			
失拟值	449.33	3	149.78	5.61	0.064 6	不显著
误差	106.81	4	26.70			
合计	6 639.73	16				

2.3.3 工艺验证 基于响应面优化模型预测结果，结合实际生产可行性，最终确定雄黄铅球水飞最佳工艺参数如下：称取雄黄原料 30 g，加入直径分别为 1、2、3、4 mm 质量比为 1:1:2:4 的研磨球共计 190 g，注入 300 mL 纯化水，在 800 r/min 转速下研磨 3.9 h，每次研磨后收集混悬液，残渣以 200 mL 纯化水冲洗。将残渣与研磨球重新装桶，重复上述操作 2 次。合并 3 次所得混悬液，静置 48 h 后弃去上清液，沉淀物 40 ℃低温干燥，粉碎过筛即得成品。经 3 次平行验证实验结果（表 8）表明，该工艺条件下各关键指标（As₂S₂ 含量、中位径）的 RSD 均控制在 1%~5%；单因素方差分析结果显示，3 次验证实验间 As₂S₂ 含量、色度 a* 值和中位径的差异均无统计学意义，证明工艺重复性良好^[11]。

2.4 酸洗纯化工艺

经铅球水飞制备得到的雄黄粉体中，仍伴随部分可溶性砷盐、铁盐等无机杂质，该类杂质会影响

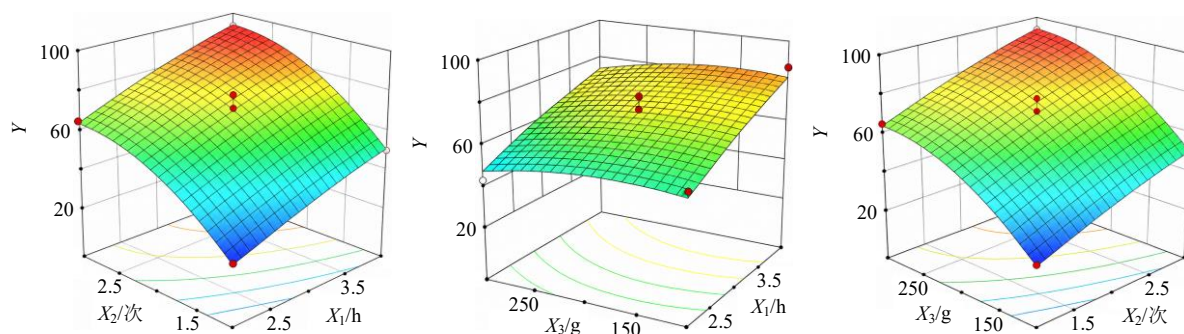
图 1 X_1 、 X_2 、 X_3 对雄黄水飞工艺影响的响应面图Fig. 1 Response surface plots for effects of X_1 , X_2 , and X_3 on water-grinding process of Realgar

表 8 工艺验证实验结果

Table 8 Results of process validation experiments

编号	As ₂ S ₃ /%	色度 a^* 值	中位径/ μm
1	100.74	2.801	2.673
2	100.47	2.734	2.715
3	99.21	2.998	2.638
平均值	100.14 ± 0.82	2.811 ± 0.120	2.685 ± 0.030
RSD/%	0.82	4.16	1.23

雄黄粉体纯度与用药安全性。因此本研究进一步设置酸洗纯化工艺，目的是通过酸液浸洗除去水飞雄黄粉中可溶性有毒砷盐及金属杂质，在尽量保留主成分的前提下，实现雄黄粉体的进一步除杂纯化。

2.4.1 酸洗辅料筛选 选取酸洗溶液分别为米醋(pH 3.12)、冰醋酸、盐酸，为了确保不同酸洗溶液在相同 pH 值条件下进行对比，冰醋酸和盐酸均被稀释至 pH 3.12，以匹配米醋的酸度水平。称取 3 份铅球水飞雄黄粉末，每份 5.0 g，分别加入 50 mL 酸溶液(固液比 1:10)，磁力搅拌处理 30 min，静置 1 h 后水洗至中性，40 °C 干燥制备样品。平行 3 次实验。

2.4.2 粒度测试 按照“2.1.3”项下方法进行粒度测试，结果见图 2。最后，记录相关中位径结果，米醋组(2.997 ± 0.118) μm ，稀醋酸组(3.653 ± 0.124) μm ，稀盐酸组(3.825 ± 0.131) μm ($n=3$)，结果显示，米醋组的中位径最小，低于稀醋酸组和稀盐酸组，单因素方差分析显示，3 组样品间粒径差异极显著($P<0.001$)。表明米醋中多种物质可抑制颗粒团聚，推测其有机酸成分可能通过络合作用与颗粒表面金属离子结合，形成空间位阻从而抑制团聚。盐酸组粒径增大，可能与酸蚀导致表面粗糙有关。

2.5 表面活性剂辅助铅球水飞工艺对雄黄纳米化的影响研究

已有文献表明，SDS 作为表面活性剂可吸附于

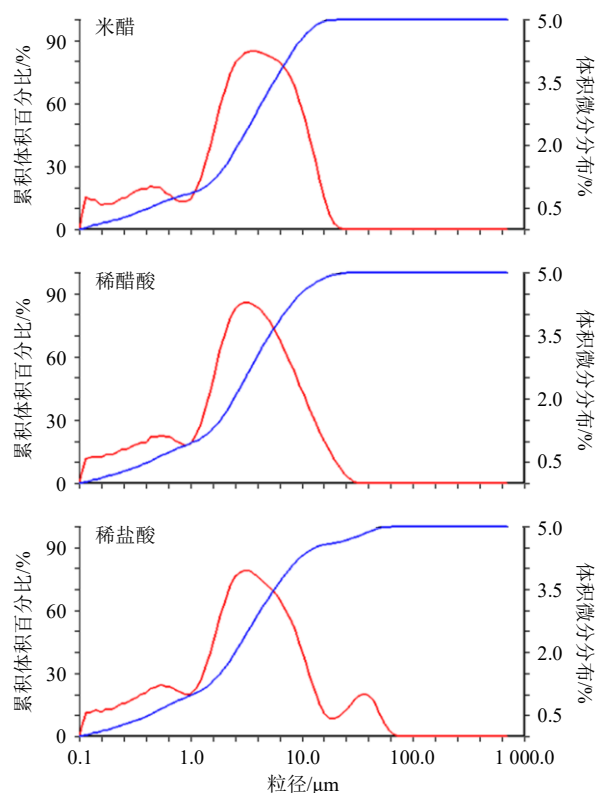


图 2 米醋、稀醋酸、稀盐酸酸洗雄黄粉末粒度分布情况

Fig. 2 Particle size distribution of Realgar powder after acid-washing with rice vinegar (a), dilute acetic acid (b) and dilute hydrochloric acid (c)

雄黄颗粒表面，依靠静电排斥作用减轻纳米雄黄颗粒团聚，改善粉体分散性，有利于雄黄的纳米化^[13]。因此本实验对该工艺条件展开了进一步考察，研究 SDS 辅助铅球水飞工艺对雄黄纳米化的影响。

2.5.1 SDS 水飞质量浓度考察 SDS 是一种阴离子表面活性剂，常用于湿法研磨(水飞)过程中，因此，在已优化铅球水飞机械参数基础上，引入表面活性剂作为分散助剂，利用其吸附在雄黄颗粒表面，通过静电斥力/空间位阻抑制纳米颗粒的二次团聚，以增强颗粒的分散性。

采用单因素实验设计,设置 SDS 质量浓度梯度分别为 1.0、2.3、5.8 g/L,3 种质量浓度分别为 SDS 的不饱和溶液、饱和溶液、过饱和溶液^[13]。分别采用水和乙二醇作为溶剂进行配制^[14]。雄黄 30 g,加液量 300 mL,球磨转速 800 r/min,水飞时间 3.9 h,水飞 3 次。滤过分离残渣、铅球和混悬液,将混悬液倒入烧杯中沉淀 48 h,取下层沉淀,干燥,每组

实验重复 3 次,测试中位径,结果见图 3 和表 9。SDS 质量浓度为 2.3 g/L(即 SDS 饱和质量浓度)时,粒径最小,但样品中位径大于铅球水飞样品。SDS 表面活性剂辅助铅球水飞虽在理论上可改善分散性,但实际操作中易在颗粒表面形成稳定的吸附层,阻碍冲击能的有效传递,导致碎裂效率受限,未能实现预期的纳米化效果。

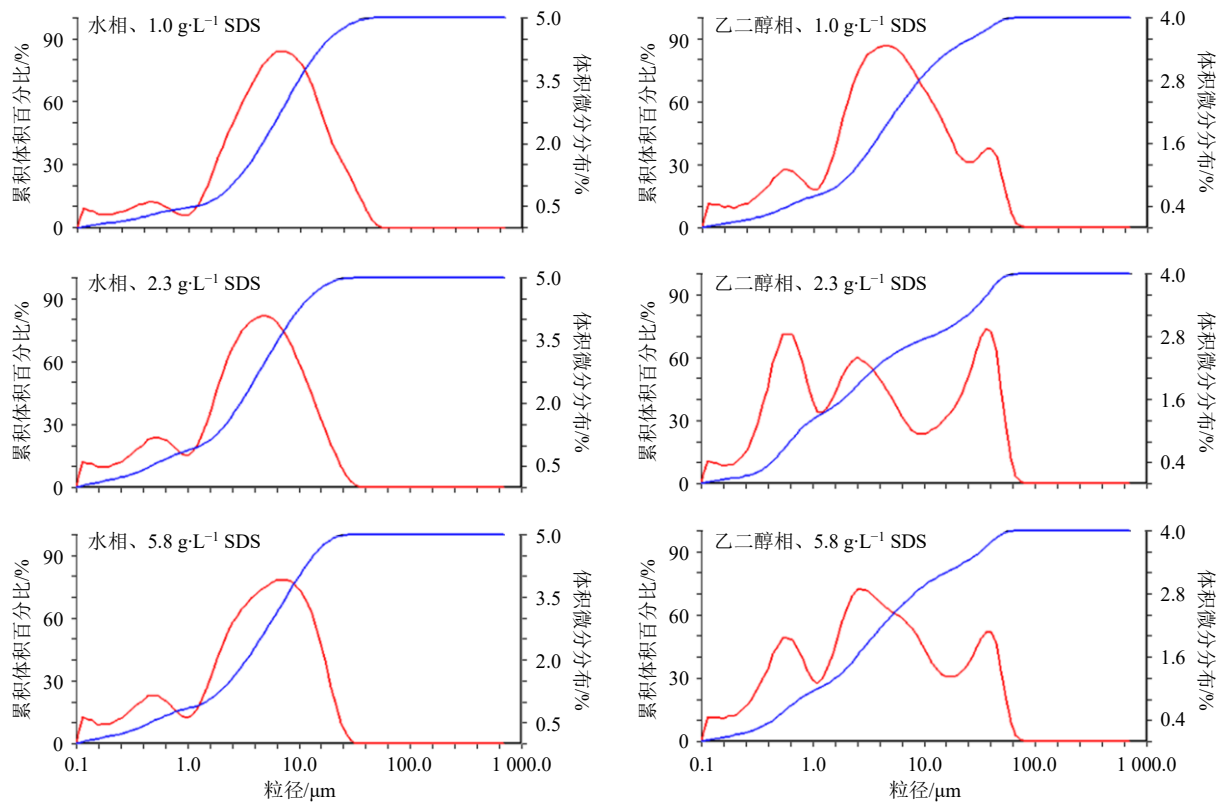


图 3 不同分散介质(水相、乙二醇相)与不同质量浓度(1.0、2.3、5.8 g·L⁻¹) SDS 处理下雄黄颗粒的粒度分布
Fig. 3 Particle size distribution of Realgar particles treated with different dispersion media (water phase, ethylene glycol phase) and different mass concentrations (1.0, 2.3, 5.8 g·L⁻¹) of SDS

表 9 不同分散介质与不同质量浓度 SDS 处理下的雄黄颗粒中位径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Median particle of Realgar particles treated with different dispersion media and different mass concentrations SDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SDS/ (g·L ⁻¹)	平均中位径/μm	
	水相	乙二醇相
1.0	6.718±0.262	5.635±0.214
2.3	4.625±0.187	3.337±0.153
5.8	5.951±0.235	4.264±0.191

2.5.2 SDS 水飞酸洗考察 SDS 吸附于雄黄颗粒表面,可能是造成雄黄粒径增大原因,采用乙二醇溶液帮助分散,酸洗方法帮助 SDS 从雄黄表面脱附。烧杯中加入 5 g“2.3.3”项中制备的雄黄粉和 50 mL

米醋溶液,采用磁力搅拌以 300 r/min 搅拌 30 min 后进行真空抽滤,收集处理后的雄黄。该过程重复 1 次和 3 次以获得 4 批雄黄粉。测试中位径,结果见表 10 与图 4。对 SDS 水飞雄黄,多次酸洗可进一步减小粒径;而对 SDS+乙二醇水飞样品,酸洗次

表 10 不同溶剂相与不同酸洗次数处理下雄黄粉的中位径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Median particle diameter of Realgar powder under different solvent phases and acid-washing cycles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

酸洗 次数	平均中位径/μm	
	水相	乙二醇相
1	4.428±0.242	2.196±0.086
3	4.466±0.186	4.501±0.331

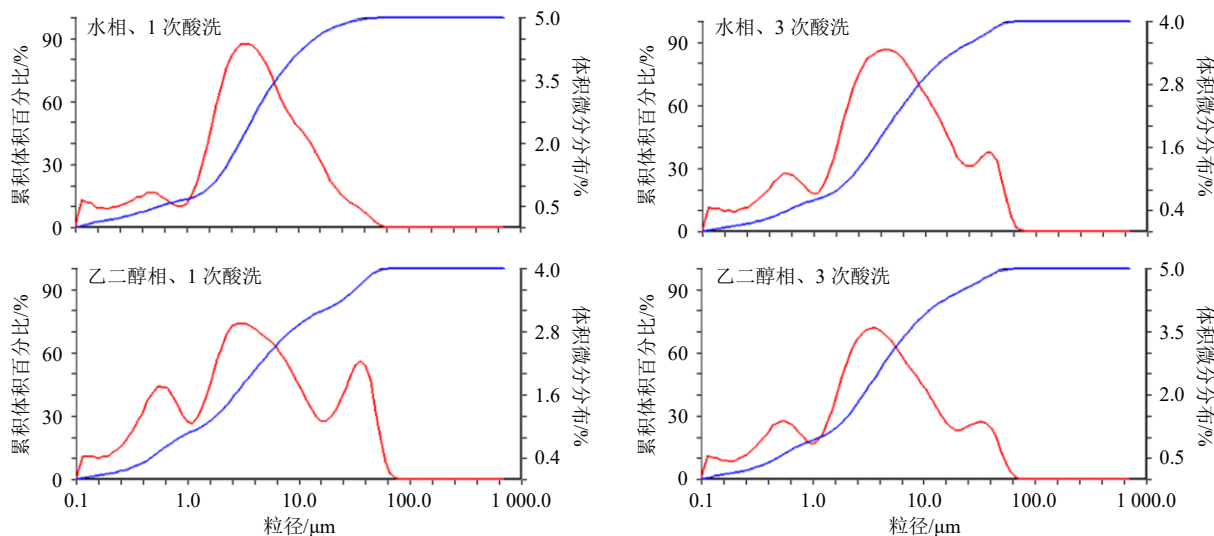


图 4 不同溶剂相与不同酸洗次数处理下雄黄颗粒的粒度分布

Fig. 4 Particle size distribution of Realgar particles treated with different solvent phases and different acid-washing cycles

数对粒径影响不大, 均未实现纳米化。

2.6 超声时间对雄黄纳米化的影响

取等量锆球水飞雄黄样品 5 份, 分别进行 5、10、20、30、40 min 超声处理, 超声功率为 250 W, 水浴控温 25 ℃。采用激光粒度分布仪进行粒径测定, 结果见表 11。雄黄颗粒粒径随超声时间呈先降后升趋势, 30 min 时雄黄粒径最小为 300 nm, 实现锆球水飞雄黄粉末纳米化。

表 11 不同超声时间对雄黄粉末中位径影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Median particle diameter of Realgar powder at different ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	平均中位径/ μm	超声时间/min	平均中位径/ μm
5	2.549 ± 0.216	30	0.300 ± 0.082
10	1.244 ± 0.143	40	0.645 ± 0.135
20	0.922 ± 0.117		

2.7 雄黄不同炮制品的表征研究

2.7.1 雄黄不同炮制品样品的制备

(1) 干法粉碎雄黄: 将雄黄块敲碎、研细, 过 5 号筛后使用。

(2) 传统水飞雄黄: 取雄黄粉末, 置容器内, 加适量水共研成糊状, 再加水, 搅拌, 倾出混悬液。残渣再按上法反复操作数次, 合并混悬液, 静置, 分取沉淀, 40 ℃低温干燥 12 h, 研散。

(3) SDS 水飞雄黄: 取雄黄粉末 30 g, 加 SDS 溶液 300 mL, 球磨转速 800 r/min, 水飞时间 3.9 h, 倾出混悬液, 残渣按上述方法重复操作 2 次, 合并 3 次所得混悬液, 静置 48 h, 取下层沉淀, 干燥后再用盐酸酸洗, 抽滤后 40 ℃低温干燥 12 h, 研散。

(4) 纳米化雄黄: 取雄黄粉末 30 g, 置研磨筒中, 加适宜比例的研磨球, 加 300 mL 水研磨 3.9 h, 倾出混悬液, 残渣按上述方法重复操作 2 次, 合并 3 次所得混悬液, 静置 48 h, 分取沉淀, 米醋酸洗沉淀, 超声剪切 30 min。40 ℃低温干燥 12 h, 研散。

2.7.2 粒度测试条件 仪器与检测方法同“2.1.3”项下。结果(表 12 和图 5)表明, 不同炮制方法对雄黄粉体粒径具有显著影响。雄黄干法粉碎中位径为 $(12.110 \pm 0.261) \mu\text{m}$, 经传统水飞处理后降至 $(8.977 \pm 0.152) \mu\text{m}$, 而 SDS 水飞工艺进一步将粒径减小至 $(2.196 \pm 0.314) \mu\text{m}$ 。纳米化雄黄的中位径最小, 达到 $(0.300 \pm 0.082) \mu\text{m}$, 显示其粉体粒度最为细腻。

表 12 不同炮制品雄黄粉末的中位径 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Median particle diameter of Realgar powder from different processed products ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	平均中位径/ μm	样品	平均中位径/ μm
干法粉碎雄黄	12.110 ± 0.261	SDS 水飞雄黄	2.196 ± 0.314
传统水飞雄黄	8.977 ± 0.152	纳米雄黄	0.300 ± 0.082

2.7.3 雄黄不同炮制品的微观形态分析 采用日立 SU8020 型扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (3.0 kV) 对 4 种雄黄粉末进行形貌表征, 放大倍数为 5 000~50 000。离子溅射仪喷金 60 s, 金靶纯度 99.99%, 及测试真空度 ($< 0.63 \text{ mPa}$), 每组样品至少拍摄 5 个不同视野用于形貌统计。根据 SEM 结果(图 6), 4 种雄黄炮制品的微观形态差异显著: 干法粉碎与传统水飞法制得的粉末粒径较大、分布不均, 呈表面平整的片状或多边

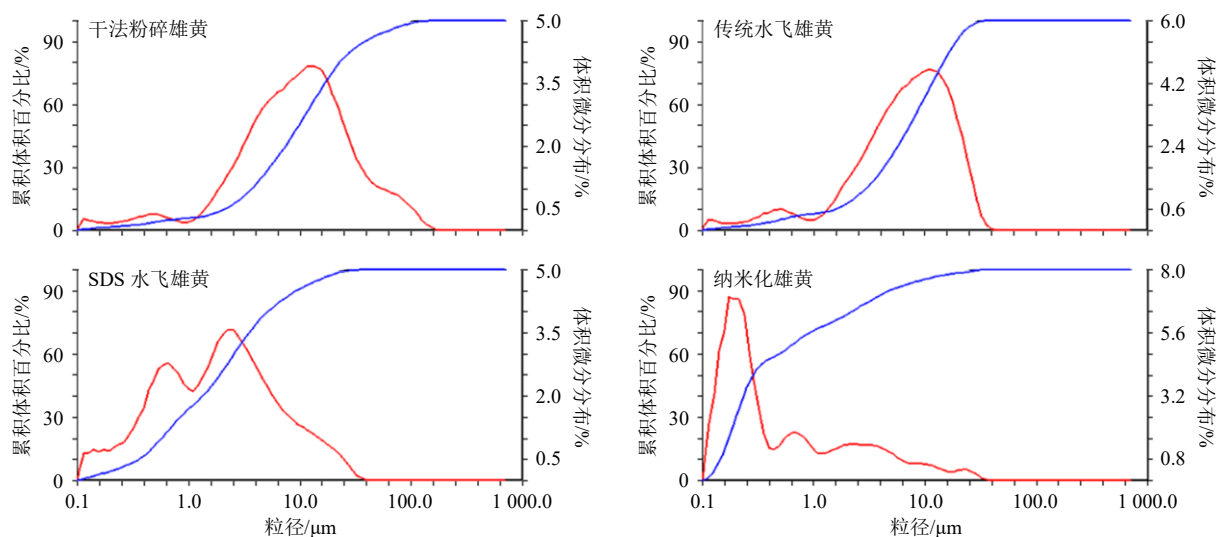


图 5 不同炮制方法雄黄样品粉末的粒度分布

Fig. 5 Particle size distribution of *Realgar* sample powder prepared by different methods

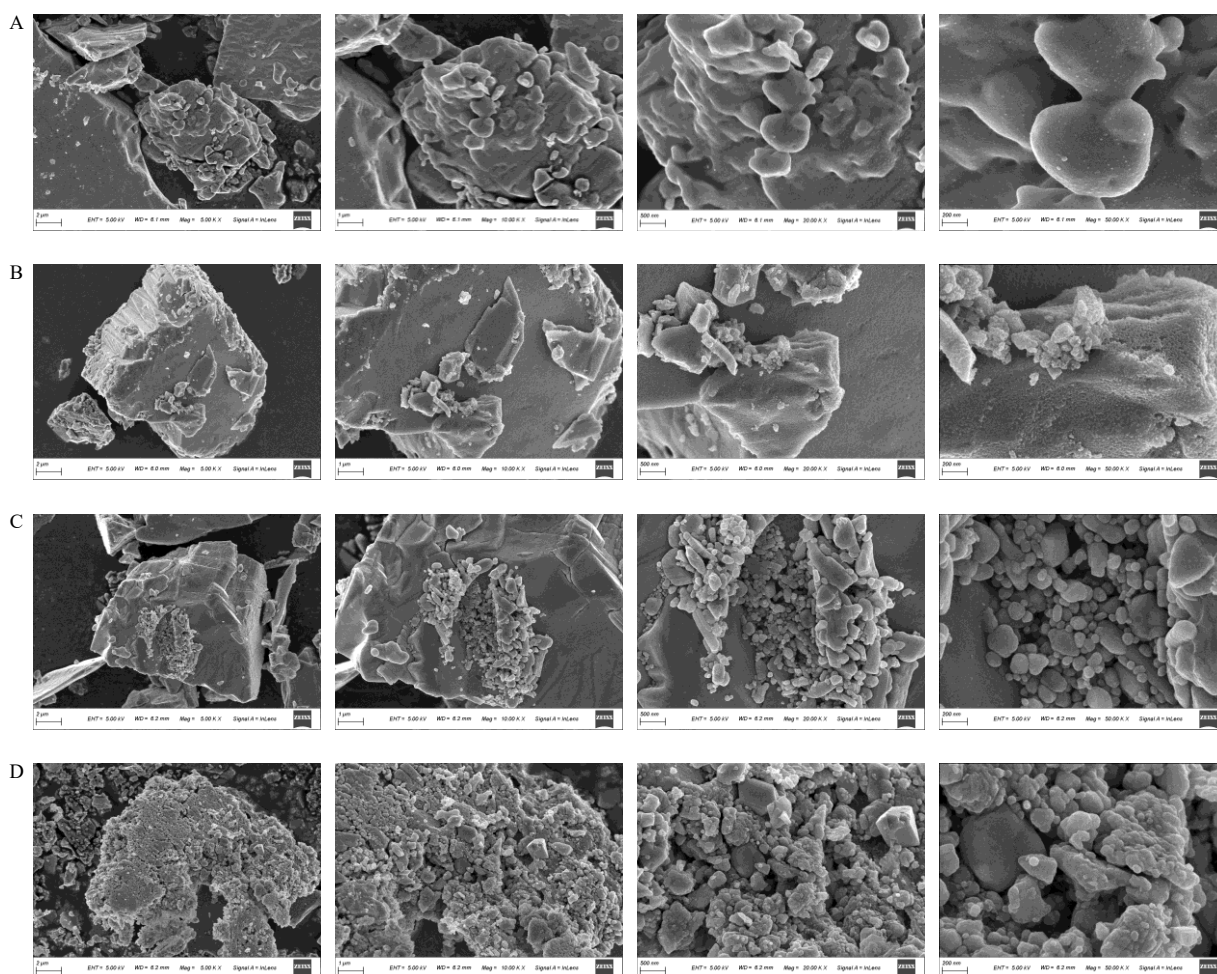


图 6 干法粉碎 (A)、传统水飞 (B)、SDS 水飞 (C)、纳米化 (D) 雄黄粉末 SEM 结果图

Fig. 6 SEM images of dry-ground (A), traditional water-floating (B), SDS-assisted water-floating (C) and nanometer (D) *Realgar* powders

形碎块；而 SDS 水飞与纳米水飞组则粒径小、分布均匀，颗粒形态更趋于圆滑，并出现轻微团聚，其

中纳米化雄黄的粒径最小，颗粒形态趋于球形或类球形。结果表明，水飞处理在有效降低雄黄粒径的

同时保留了其固有的晶体结构特征,但显著影响了颗粒的整体形貌与分散状态。

2.7.4 雄黄不同炮制品的孔隙结构特性 采用美国 Quantachrome Instruments 公司生产的全自动比表面与孔隙度分析仪 (Autosorb Station 1) 进行测试,样品在 100 °C 下脱气 1 h。结果如图 7 所示,4 种雄黄炮制样品的氮气吸附-脱附等温线呈现明显差异:干法粉碎样品呈 III 型等温线,孔隙结构极不发达;传统水飞与 SDS 水飞雄黄样品均显示具有 H3 型回滞环的 IV 型等温线,表明水飞工艺成功引入介孔结构^[15],其中,SDS 辅助处理进一步优化了孔道分布;纳米化雄黄在中等相对压力后吸附量急剧上升,回滞环更为显著,结合 SEM 图像 (图 6),干法粉碎和

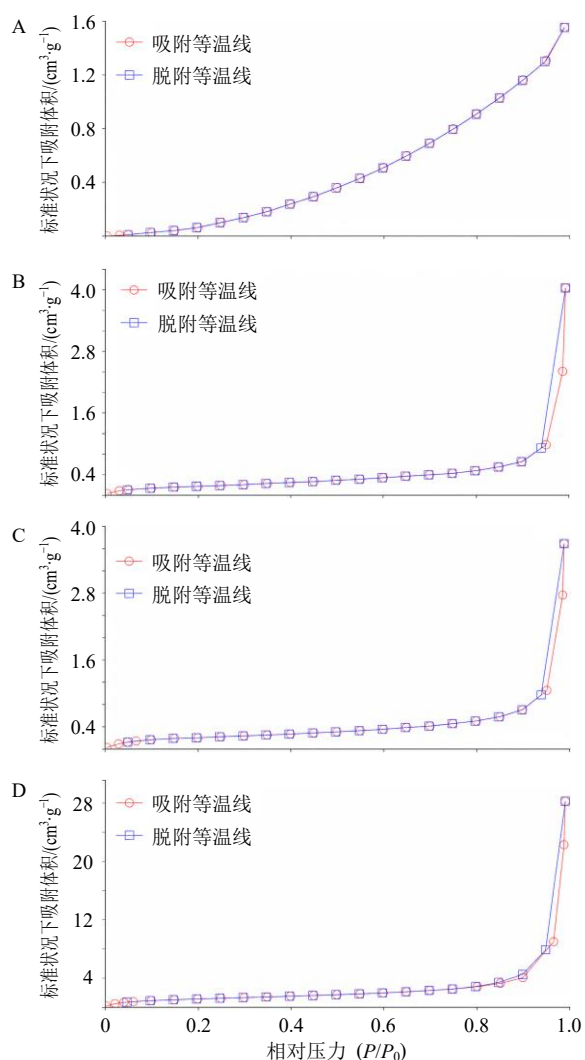


图 7 干法粉碎 (A)、传统水飞 (B)、SDS 水飞 (C)、纳米化 (D) 雄黄样品的氮气吸附-脱附等温线图

Fig. 7 Nitrogen adsorption-desorption isotherms of dry-ground (A), traditional water-floating (B), SDS-assisted water-floating (C) and nanometer (D) Realgar samples

传统水飞样品呈表面平整的片状或多边形碎块,其孔隙可能主要源于片状颗粒的不规则堆积;而纳米化雄黄颗粒呈球形或类球形,颗粒间堆积更为紧密,其发达的介孔网络可能同时来源于颗粒内部的纳米孔道和颗粒间的规整堆积孔,同时说明其具备更集中、更发达的介孔网络。

进一步通过 BET 模型和多点法计算比表面积及孔结构参数见表 13。结果表明,纳米化雄黄的比表面积和总孔容均为 4 组中最高,显著高于传统水飞样品。干法粉碎样品的比表面积最低,几乎无孔隙结构发育。C 常数的变化从传统水飞的 5 134.15 降至纳米化雄黄的 43.70,进一步反映了材料表面性质的改变。这一结果证实,超声辅助纳米化工艺在显著降低粒径的同时,有效构建了高度发达的介孔网络,有利于活性成分的可控释放及生物界面相互作用。

表 13 不同雄黄样品的 BET 比表面积与孔结构参数

Table 13 BET specific surface area and pore-structure parameters of different Realgar samples

样品类型	比表面积/ (m ² ·g ⁻¹)	总孔容/ (cm ³ ·g ⁻¹)	平均孔 径/nm	C 常数
干法粉碎雄黄	0.035	0.003	3.803	-5.611
传统水飞雄黄	0.661	0.006	3.795	5 134.151
SDS 水飞雄黄	0.784	0.006	3.388	39.818
纳米化雄黄	4.307	0.043	3.405	43.702

2.7.5 雄黄及其不同炮制品中 As³⁺、As⁵⁺含量研究

(1) 测试条件: 采用 SA-20 型液相色谱-原子荧光形态分析仪^[16], 设备参数设定为分析元素 As, 总电流 100 mA, 辅电流 45 mA, 负高压 285 V, 载气流量 300 mL/min, 屏蔽气体流量 600 mL/min。

(2) LC-AFS 测试结果: 分别对雄黄 4 种炮制品进行检测, 结果见表 14 和图 8。基于检测结果可知, 各样品中 As⁵⁺含量均低于检出限 (<10 mg/kg), 表明不同炮制工艺均可降低 As⁵⁺含量, 且雄黄中的可溶性砷仍以 As³⁺为主要形态。纳米化雄黄不但减

表 14 不同炮制工艺雄黄样品中 As³⁺与 As⁵⁺含量测定结果

Table 14 Determination results of As³⁺ and As⁵⁺ contents in Realgar samples from different processing technologies

样品类型	As ³⁺ /(mg·kg ⁻¹)	As ⁵⁺ /(mg·kg ⁻¹)
干法粉碎雄黄	1 950	<10
传统水飞雄黄	546	<10
SDS 水飞雄黄	592	<10
纳米化雄黄	1 840	<10

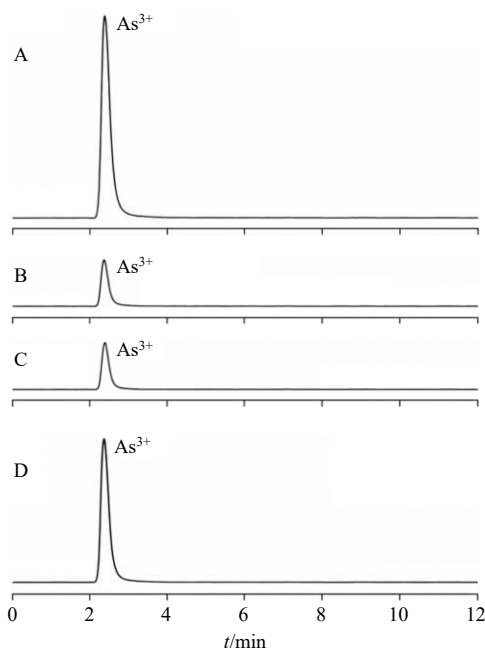


图 8 干法粉碎 (A)、传统水飞 (B)、SDS 水飞 (C)、纳米化 (D) 雄黄样品的 LC-AFS 外标校正谱图

Fig. 8 LC-AFS external standard calibration chromatograms of dry-ground (A), traditional water-floating (B), SDS-assisted water-floating (C) and nanometer (D) Realgar samples

小粒径提高生物利用度,其 As^{3+} 含量也较干法粉碎法减少,但其优势主要体现在粒径减小、溶出率提高及介孔结构介导的毒性降低,综合实现了减毒增效,提高了用药安全性。

2.8 胃液中可溶性砷的提取及电感耦合等离子体原子发射光谱 (inductively coupled plasma atomic emission spectrum, ICP-OES) 法测定

2.8.1 供试品溶液的制备与取样 精密称取不同炮制雄黄粉末各 0.3 g, 采用溶出度仪浆法测定,以人工胃液 900 mL 为溶出介质,转速 75 r/min,温度 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。分别于 15、30、60 min 取样 10 mL,过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜,取续滤液即得供试品溶液。

2.8.2 溶出液中砷含量测定 取 2 mL 滤液,加 1 mL 硝酸消解, 120°C 赶酸至剩余 1 mL,定容至 10 mL, ICP-OES 测定。平行 3 次实验。

2.8.3 溶出液中砷的 ICP-OES 测定结果 基于胃肠溶出液 ICP-OES 检测结果 (表 15), 纳米化雄黄在胃肠环境中砷的溶出特性可有效佐证其毒性较低。在 15、30、60 min 各时间节点, 纳米化雄黄组的砷溶出量均低于传统水飞组与 SDS 水飞组, 且其溶出量随时间推移上升幅度最为平缓, 未出现其他水飞组样的大幅激增现象。双因素重复测量方差分析进

表 15 不同雄黄炮制品在胃液不同时间点可溶性砷含量

Table 15 Soluble arsenic content of different processed Realgar products in gastric fluid at various time points

样品	溶出砷/(mg·kg ⁻¹)		
	15 min	30 min	60 min
传统水飞雄黄	15.07	19.47	28.30
SDS 水飞雄黄	19.60	23.64	30.71
纳米化雄黄	14.95	18.40	20.07

一步验证了这一趋势, 组间效应 ($F=42.16$, $P<0.001$)、时间效应 ($F=38.74$, $P<0.001$) 及交互效应 ($F=8.93$, $P<0.01$) 均显著, 表明纳米化雄黄在胃肠溶出过程中砷的释放较为温和。

2.9 不同炮制品的线虫毒性研究

2.9.1 线虫培养及同期化 取秀丽隐杆线虫, 在 NGM 培养基上培养, 该培养基经高压灭菌后滤过加入 CaCl_2 、胆固醇、 MgSO_4 及磷酸盐缓冲液。将活化后的 OP50 菌液涂布于 NGM 平板, 转移线虫至平板后, 置于 20°C 培养箱中培养。为获得同期化线虫, 选取怀卵成虫, 经 M9 缓冲液冲洗后, 用 NaOH/NaClO 裂解液 (由 5 mol/L NaOH 、 NaClO 、M9 缓冲液按 1:2:7 比例配制, 用于线虫同期化) 震荡处理使虫卵释放, 再经 M9 缓冲液反复清洗并离心, 最终将虫卵在 20°C 下孵化以获得同期化的幼虫^[17]。

2.9.2 雄黄炮制品对线虫行为的影响 以 M9 缓冲液为溶剂溶解 4 种雄黄炮制品, 经涡旋与冰水浴超声处理, 配制 1、4、8 mg/mL 3 种质量浓度的混悬液, 于 4°C 保存备用。另外, 秀丽隐杆线虫的摄食具有明确的粒径选择性, 成年线虫可有效摄食的颗粒直径上限约为 $3 \mu\text{m}$, 粒径在 $0.5\sim 3.0 \mu\text{m}$ 的颗粒可被高效摄入并运输至肠道^[18]。干法粉碎雄黄的中位径远大于该摄食上限, 线虫摄入极为有限, 其表观低毒性可能仅反映摄食不足, 而非炮制工艺的真正减毒效应。因此, 本研究未将干法粉碎组纳入线虫毒性实验, 以确保各组间毒性差异能够真实反映炮制工艺对雄黄生物学效应的影响。

本研究中 1、4、8 mg/mL 3 个质量浓度梯度的设定, 主要参考了相关文献报道的雄黄在线虫模型中的暴露质量浓度范围^[20]。其中, 8 mg/mL 为雄黄在该实验体系中的最大溶解度, 1、4 mg/mL 分别为低、中剂量组。设置空白对照组、传统水飞雄黄组、SDS 水飞雄黄组、纳米化雄黄组, 共 4 组。分别设置 1、4、8 mg/mL 3 个质量浓度梯度, 将同期化线

虫转移至无食物 NGM 培养基, 加入相应质量浓度雄黄暴露液, 在无菌条件下恒温暴露 24 h; 暴露结束后滴加 M9 缓冲液使线虫短暂恢复, 随后通过记录 30 s 内每组 10 条线虫的头部摆动次数, 量化评估雄黄炮制品对其神经肌肉运动行为的影响^[19]。干法粉碎雄黄组因颗粒粒径过大, 在线虫暴露体系中迅速沉降, 线虫无法有效摄入, 故未纳入毒性比较。

结果如表 16 所示, 不同炮制方法雄黄对线虫头部摆动的抑制作用均呈质量浓度相关性增强。在 1 mg/mL 质量浓度下各处理组与空白对照组

[(44.71±1.50) 次] 比较均无显著差异。当质量浓度升至 4 mg/mL 时, 各处理组与空白对照组比较均具有极显著差异($P<0.001$), 传统水飞组与 SDS 水飞组的头部摆动次数显著低于纳米化雄黄组($P<0.001$)。而在 8 mg/mL 高质量浓度下, 各组的抑制作用差异进一步加剧, 其强度顺序为传统水飞组 $\approx$ SDS 水飞组 $>$ 纳米化雄黄组。值得注意的是, 纳米化雄黄组在 8 mg/mL 时的头部摆动次数显著高于其他炮制组($P<0.001$), 表明其运动毒性最低, 对线虫神经肌肉功能的抑制作用最为缓和。

表 16 不同雄黄炮制品处理后对线虫头部摆动次数、体长、后代数量、荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 16 Effects of head-swing times, body length, progeny number, fluorescence intensity of *C. elegans* exposed to Realgar from different processed products ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	30 s内头部摆动次数	线虫体长/mm	后代数量/条	荧光强度
空白对照	—	44.71±1.50	10.25±0.42	245.60±15.30	48.64±4.50
传统水飞雄黄	1	43.46±1.65	8.93±0.38 ^{###}	200.50±10.80 ^{####}	69.64±6.18 ^{####}
	4	33.05±1.18 ^{####}	6.14±0.49 ^{####}	181.20±9.20 ^{####}	89.37±8.41 ^{***}
	8	23.43±1.55 ^{####}	5.18±0.45 ^{####}	164.70±8.50 ^{####}	104.41±9.25 ^{***}
SDS水飞雄黄	1	44.61±1.28	9.01±0.45 [#]	178.80±13.50 ^{####}	79.82±5.86 ^{***}
	4	32.66±1.42 ^{####}	6.47±0.52 ^{####}	202.90±11.80 ^{***}	109.04±10.12 ^{####}
	8	22.08±1.11 ^{####}	6.11±0.48 ^{####}	161.30±8.20 ^{####}	141.05±8.74 ^{####}
纳米化雄黄	1	42.82±1.57	9.32±0.40	220.30±12.20 ^{***}	84.18±7.32 ^{***}
	4	35.23±1.26 ^{***}	8.89±0.55	200.30±10.20 ^{***}	89.11±6.99 ^{***}
	8	29.46±1.36 ^{***}	8.13±0.47 ^{***}	192.50±9.50 ^{***}	96.24±5.96 ^{***}

与空白对照组比较: *** $P<0.001$; 与纳米化雄黄相同质量浓度组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs blank control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs that same mass concentration group of nano-Realgar.

2.9.3 不同雄黄炮制品对线虫生长发育的影响 暴露结束后, 将线虫转移至含 4%多聚甲醛的载玻片上麻醉并固定, 于显微镜下成像, 使用 Image J 软件分析每组 10 条线虫的体长, 以评估其生长发育状况。线虫体长分析结果(表 16)显示, 雄黄发育毒性呈质量浓度相关性, 且受炮制方法显著影响。与空白对照组相比, 仅在中、高质量浓度(4、8 mg/mL)下观察到显著抑制($P<0.001$)。其中, 传统水飞与 SDS 水飞法毒性最强, 而纳米化雄黄在各质量浓度下均表现出相对最高的生物安全性。在各质量浓度下, 传统水飞组与 SDS 水飞组线虫体长均显著低于同浓度纳米化雄黄组($P<0.001$)。

2.9.4 不同炮制品对线虫后代数目的影响 为评估线虫生殖力, 将暴露后的成虫进行单虫培养, 每日转移直至产卵结束。统计含卵平板孵育 48 h 后的幼虫总数作为单虫总后代数, 每组检测 10 条线虫^[21]。线虫生殖毒性实验结果(表 16)表明, 与空白对照组相比, 不同炮制方法雄黄均能显著降低后代数

量($P<0.001$), 并呈现质量浓度相关性。其中, 纳米化雄黄的生殖毒性始终最弱, 其后代数量在各质量浓度下均高于其他炮制品; 而 SDS 水飞与传统水飞雄黄的毒性最强, 抑制作用最为显著。在 1、8 mg/mL 质量浓度下, 传统水飞组与 SDS 水飞组后代数量均显著低于同浓度纳米化雄黄组; 在 4 mg/mL 质量浓度下, 传统水飞组显著低于纳米化雄黄组($P<0.001$)。

2.9.5 不同炮制品对线虫细胞凋亡的影响 为检测细胞凋亡, 将暴露后的线虫进行吖啶橙(AO)避光染色与恢复, 经多聚甲醛固定后, 于荧光显微镜下拍照, 并定量分析每组 10 条线虫的荧光强度^[22]。采用吖啶橙(AO)染色法检测线虫细胞凋亡结果见表 16。空白对照组荧光强度为 48.64±4.50。在 1 mg/mL 质量浓度下, 各炮制雄黄均引起荧光强度升高, 其中纳米化雄黄组荧光强度最高。随着质量浓度升高至 4 mg/mL, SDS 水飞雄黄组荧光强度上升最为显著, 传统水飞雄黄组与纳米化雄黄组数值接

近。在最高质量浓度 8 mg/mL 下, SDS 水飞雄黄组荧光强度达到 141.05, 荧光颜色更加显著, 身体表面布满荧光; 传统水飞雄黄组为 104.41, 纳米化雄黄组为 96.24。各给药组与空白组相比均呈极显著差异 ($P < 0.001$)。与同浓度纳米化雄黄组比较, 传统水飞组与 SDS 水飞组在 1、4、8 mg/mL 下均显著升高 ($P < 0.001$)。

2.10 不同炮制品的小鼠创面药效研究

2.10.1 皮肤创面愈合测试 将 ICR 小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为模型组、紫金锭组、传统水飞雄黄组和纳米化雄黄组。麻醉并备皮消毒后, 在腰椎偏上位置制作直径约 1 cm 的圆形皮下创口。模型组创面用生理盐水冲洗后涂抹凡士林; 各给药组则分别外敷对应药物与凡士林 1:1 制成的混悬膏。每日换药, 持续 14 d, 图 9 直观展示了不同处理组的愈合进程。

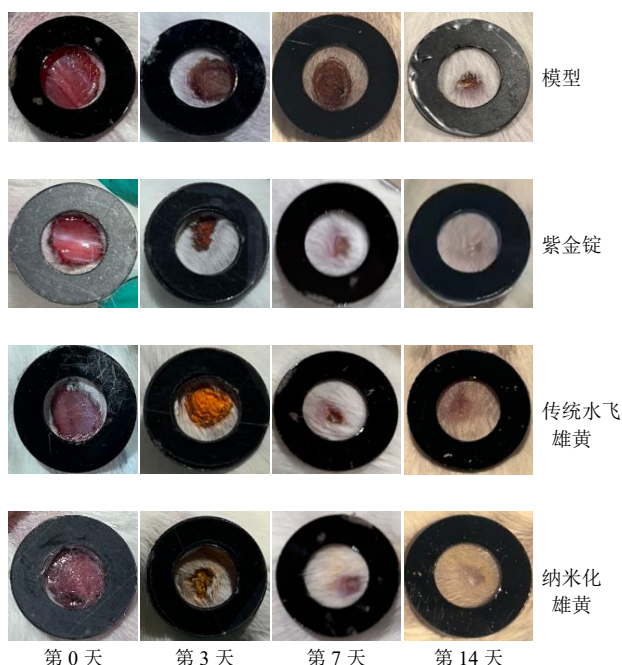


图 9 雄黄炮制品不同天数对小鼠愈合创面图 (黑色线圈内径 1 cm)

Fig. 9 Wound healing of mice treated with processed Realgar at different time points (inner diameter of black coil 1 cm)

使用 Image J 软件测量并记录第 0、3、7、14 天的创面面积, 计算愈合率^[23], 结果见表 17。与模型组相比, 各雄黄炮制品均能有效促进创面愈合。其中, 纳米化雄黄组在治疗初期的愈合速度与紫金锭组相近, 且在实验结束时第 14 天创面已基本完全愈合, 显示出最优的促愈效果和持续作用。

表 17 不同雄黄炮制品不同天数对小鼠创面愈合率 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 17 Wound-healing rate of mice treated with processed Realgar at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	创面愈合率/%		
	3 d	7 d	14 d
模型	0.45 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.88 ± 0.02
紫金锭	0.72 ± 0.03**	0.85 ± 0.02***	1.00 ± 0.01
传统水飞雄黄	0.11 ± 0.06***	0.86 ± 0.01***	0.89 ± 0.01
纳米化雄黄	0.82 ± 0.02***	0.90 ± 0.01***	1.00 ± 0.01

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 表 18、19 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; Same as tables 18, 19.

创面愈合率 = (第 0 天创面面积 - 各时间点创面面积) / 第 0 天创面面积

2.10.2 雄黄炮制品对小鼠创面组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平的影响 按照试剂盒说明书, 采用 ELISA 法检测不同时间点 (3、7 d) 皮肤组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平, 以分析不同处理对这些炎症细胞因子的影响^[24]。根据 ELISA 检测结果, 不同时间点 (3、7 d) 小鼠皮肤创面组织中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平变化如表 18 所示。结果显示, 创面形成后, 各给药组炎症因子水平随时间延长均呈现下降趋势: 至第 7 天, 各指标均较第 3 天显著降低 ($P < 0.05$)。在第 3、7 天, 相较于模型组, 紫金锭组、纳米化雄黄组的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。紫金锭组与纳米化雄黄组抗炎作用优于传统水飞雄黄组。

2.10.3 创面修复相关因子的免疫组化分析 采用免疫组化法检测小鼠给药 7 d 后创面组织中 TGF- β 1、血小板衍生生长因子-A 亚基 (platelet-derived growth factor-A subunit, PDGF-A) 和 VEGFA 的表达, 免疫组化检测项目委托沈阳万类生物科技有限公司完成。取创面组织制备石蜡切片, 经抗原修复、内源性过氧化物酶灭活、血清封闭等步骤后, 依次进行一抗和二抗孵育, DAB 显色后苏木素复染, 脱水、透明、封片。于显微镜下观察并采集图像, 结果见图 10。使用 Image J 软件计算各指标表达的平均 A 值并进行半定量分析, 结果见表 19。基于对 PDGF-A、TGF- β 1 和 VEGFA 的免疫组化半定量分析, 各组在第 7 天创面组织中的表达呈现如下特征: 模型组 3 个因子的表达水平均处于最低状态; 传统雄黄干预组各因子表达均较模型组有所提升, 其中, VEGFA 的升高具有显著性, 提示其促新生血管

表 18 不同时间点各组小鼠皮肤创面组织中炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 18 Expression levels inflammatory factors of TNF-α, IL-1β and IL-6 in skin wound tissues of mice in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TNF-α/(μg·L ⁻¹)		IL-1β/(μg·L ⁻¹)		IL-6/(μg·L ⁻¹)	
	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d
模型	348.60±28.11	187.56±23.42###	119.83±12.72	64.52±10.51###	40.21±5.62	21.66±4.31###
紫金锭	244.91±25.23***	146.11±21.05***###	83.92±10.65***	45.21±8.90***###	28.13±4.73***	15.12±3.74***###
传统水飞雄黄	313.72±26.84*	168.85±22.50###	107.82±12.14	58.13±9.93###	36.22±5.30	19.43±4.12###
纳米化雄黄	278.02±22.51***	131.32±19.62***###	95.84±11.42**	51.61±9.42***###	32.21±5.03**	17.31±3.94###

与 3 d 比较: ###*P*<0.001。

****P*<0.001 vs 3 d.

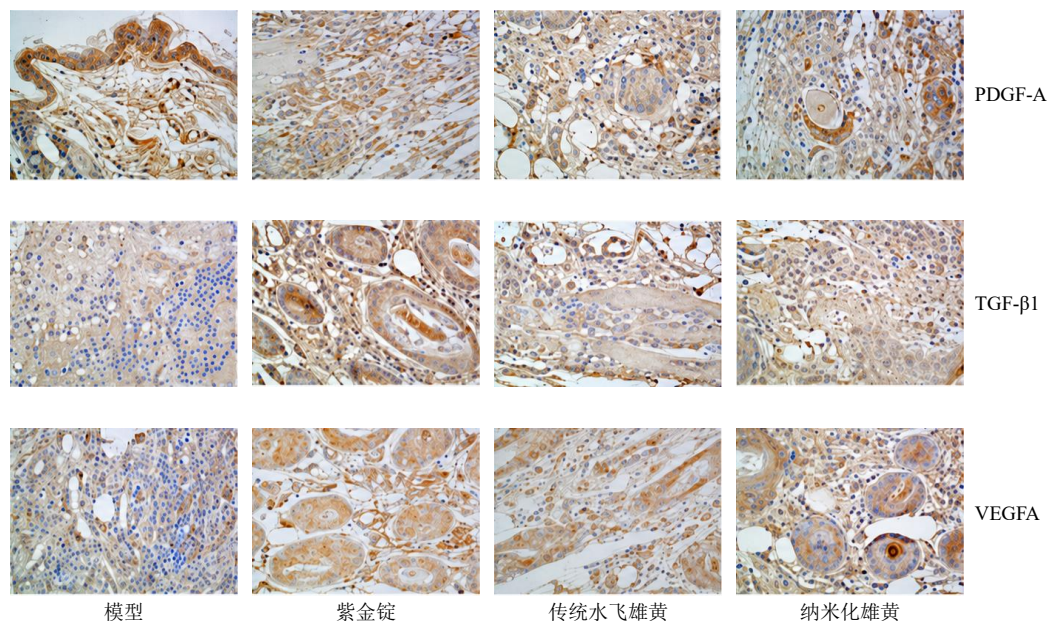


图 10 免疫组化检测结果 (×400)

Fig. 10 Immunohistochemical detection results (×400)

表 19 各组小鼠创面组织中 PDGF-A、TGF-β1、VEGFA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 19 Expression levels of PDGF-A, TGF-β1 and VEGFA in wound tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	相对表达水平 (×10 ⁻³)		
	PDGF-A	TGF-β1	VEGFA
模型	10.3±2.1	10.9±3.0	6.3±1.0
紫金锭	33.4±8.9**	37.7±3.4***	25.5±2.5***
传统水飞雄黄	15.8±3.8	15.8±1.7	12.0±2.7*
纳米化雄黄	25.1±6.8*	23.1±4.5*	20.0±5.5*

形成作用较为明确; 纳米化雄黄组则展现出全面而显著的调控作用, PDGF-A、TGF-β1 及 VEGFA 的表达均显著高于模型组, 表明其能协同增强细胞趋化与增殖、胶原合成及血管生成多环节的活性; 阳性药组各因子表达均恢复至接近正常对照组的水

平, 效果最为显著。

3 讨论

3.1 纳米化工艺与机制

本研究通过响应面法优化了雄黄铅球水飞工艺参数。在此基础上引入超声辅助处理, 旨在利用超声空化效应产生的冲击波和剪切力, 进一步降低粒径。结果显示, SDS 表面活性剂辅助水飞未能实现纳米化, 推测 SDS 在颗粒表面形成的稳定吸附层阻碍了研磨冲击能的有效传递。相比之下, 超声处理 30 min 可将粒径降至 300 nm, 表明超声空化是突破纳米化瓶颈的关键^[25]; 但超声超过 30 min 后粒径增大, 可能与颗粒表面能增加导致的再团聚有关。超声纳米化后, 经米醋酸洗进一步除去可溶性砷, 为后续应用奠定了化学基础。

3.2 孔隙结构重塑对药效行为的调控机制

本研究尝试运用物理域的粒度与孔隙结构分

析来探讨矿物药的炮制机制及质量的评价。不同雄黄样品在氮气吸附行为上展现出显著差异,直接体现了孔隙率参数的差别。传统水飞与 SDS 水飞样品表现出 IV 型等温线与 H3 型回滞环,证实了水飞工艺具有“造孔”效能,带来了比表面积和介孔孔容积的显著提升。而纳米化雄黄在中等相对压力后吸附量急剧攀升,回滞环更为显著,说明其形成了更为发达的介孔结构。BET 比表面积分析基于氮气吸附模型,属于间接表征方法,可能存在一定偏差。为增强结论的可靠性,本研究同时采用 SEM 对样品形貌进行直接观察,结果显示纳米化雄黄颗粒呈球形或类球形,颗粒间堆积孔隙较为发达,与 BET 测得的较高孔容相吻合。后续研究可进一步采用压汞法等对孔隙结构进行多角度验证。

体外溶出实验证实,纳米化雄黄在人工胃液中砷溶出平稳上升,表明介孔结构实现了砷的缓释控释。小鼠创面愈合模型显示,纳米化雄黄组第 7、14 天愈合率均显著优于传统水飞组,且炎症因子降低、生长因子上调。纳米化重塑的孔隙结构在安全阈值内实现了“减毒增效”的炮制目标。

3.3 雄黄所含 As^{3+} 的安全阈内“活性窗口”

研究发现,纳米化雄黄中的 As^{3+} 含量虽显著高于传统水飞和 SDS 水飞炮制品,但依然显著低于药典安全限度值和文献报道的安全剂量^[4]。这一升高并非源于外源性污染,而是由于剧烈的机械力在将颗粒破碎至纳米尺度的同时,极大地增加了比表面积,导致表面晶体结构畸变产生高反应活性位点,并使内部原本包裹的微量 As^{3+} 充分暴露。关键的是,这种“升高”被牢牢控制在安全阈值之下。在多层次毒效评估中,纳米化雄黄并未出现预期中的毒性增强现象;在线虫模型中,其安全阈值内的 As^{3+} “适度存在”并未导致毒性增强,干法粉碎雄黄因粒径过大,无法被线虫摄入,故未纳入比较;而纳米化雄黄虽 As^{3+} 含量较高,可被线虫正常摄入却未表现出高毒性。这提示,传统“毒性成分越低越好”的安全性思维可能忽略了药效与毒性之间的复杂关联,纳米化雄黄在安全限度内 As^{3+} 的“适度存在”或许并非完全的负面因素,支持了“风险阈值内的活性窗口”假说,为重新审视纳米矿物药的风险-获益平衡提供了新视角。

4 展望

基于本研究揭示的“效和毒”规律,未来可通过整合雄黄的物理结构参数、化学溶出行为与多层

次生物学效应数据,建立“物理化学特性-生物学效应”的精准构效模型。然而,本研究仍存在一定局限性,纳米化雄黄长期贮存过程中的团聚与氧化问题尚未系统考察,后续将由课题组继续完成多时间点的粒径、形貌及砷溶出变化监测,以完善稳定性数据;同时,不同炮制品在线虫及小鼠体内的砷蓄积量定量检测尚未完成,后续将结合 LC-AFS 法定线虫体内及小鼠血砷、肝砷、创面组织砷含量。这不仅能构建基于关键质量属性的新型评价体系,指导炮制工艺优化,更能为纳米矿物药的体内行为预测与临床精准应用提供理论基础,推动其从传统经验工艺迈向以科学设计与精准控制为核心的现代研究范式。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 林林, 刘广桢, 任小英, 等. 矿物类中药的研究进展和思考 [J]. 中国药学杂志, 2025, 60(9): 923-932.
- [2] 李园园, 马强, 居红格. 纳米雄黄的急性毒性评价及病理损害机制研究 [J]. 包头医学院学报, 2025, 41(2): 47-51.
- [3] 宋洁瑾. 纳米中药的研究进展 [J]. 天津药学, 2013, 25(5): 71-73.
- [4] 王栋, 周乐杜, 曾鹏, 等. 纯化纳米雄黄制备方法探讨 [J]. 中南药学, 2014, 12(3): 234-237.
- [5] 中国药典 [S]. 2025: 350-351.
- [6] 唐·苏敬等撰, 尚志钧辑校. 新修本草 辑复本第 2 版 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004: 7-11.
- [7] 陶弘景. 本草经集注 [M]. 影印本. 北京: 学苑出版社, 2013: 41-45.
- [8] 许诗怡, 张天旭, 冯灏, 等. 雄黄本草考证及鉴别分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2025, 27(11): 3240-3254.
- [9] 杨欣欣, 洪禹昕, 张睿, 等. 朱砂铅球水飞工艺及质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 1993-2002.
- [10] 潘淑娟, 龙利, 杨会, 等. Box-Behnken 响应面法优化艾纳香提取物颗粒剂的成型工艺 [J]. 华西药学杂志, 2025, 40(6): 672-676.
- [11] 陈苏丹, 崔运启, 李秀珍, 等. 款冬叶片总黄酮提取工艺优化及抗氧化活性研究 [J]. 北方园艺, 2021(1): 108-115.
- [12] Zhang T R, Yang S, Lu J J, et al. Low-molecular-weight organic acids constraints on the divergent weathering and lead mobilization of sulfidic minerals [J]. *Environ Pollut*, 2026, 399: 128151.
- [13] Zhao W Z, Lu X, Yuan Y, et al. Effect of size and processing method on the cytotoxicity of *Realgar*

- nanoparticles in cancer cell lines [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6: 1569-1577.
- [14] 鲁丽萍, 陈昕, 李玖强, 等. 特殊物性 La_2O_3 制备技术研究进展 [J/OL]. 中国稀土学报, (2025-11-19) [2026-04-02]. <https://link.cnki.net/urlid/11.2365.tg.20251118.1641.002>.
- [15] 王会东, 刘学超, 杨素华, 等. 介孔复合材料 $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3@ \text{TiO}_2$ 的制备及其吸附性能研究 [J]. 化工新型材料, 2026, 54(4): 197-203.
- [16] 邓雪, 谢娟, 王莉容, 等. 食品中砷形态分析及检测方法研究进展 [J]. 分析仪器, 2025(5): 6-10.
- [17] 万滔. 液相色谱-原子荧光联用仪 (LC-AFS) 测试方法探讨 [J]. 计量与测试技术, 2018, 45(8): 80-81.
- [18] 孙媛媛. 几种钝化剂对土壤砷生物有效性的影响与机理 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [19] 刘嘉榆. 天然胆汁酸 TUDCA 通过靶向 HSP90 维持蛋白稳态延长健康寿命的作用机制研究 [D]. 北京: 军事科学院, 2025.
- [20] Kiyama Y, Miyahara K, Ohshima Y. Active uptake of artificial particles in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Exp Biol*, 2012, 215(Pt 7): 1178-1183.
- [21] 王莹. 基于秀丽线虫模型研究配伍对雄黄所致神经毒性的减低作用及机制 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2025.
- [22] 李丹清, 金司仪, 胡倩, 等. 不同粒径朱砂对秀丽隐杆线虫的毒性作用 [J]. 中成药, 2021, 43(9): 2558-2562.
- [23] 仇莲胤, 阙华发, 屈可伸, 等. 黄芪提取液对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -Catenin 信号通路调控表皮干细胞增殖分化的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(7): 2522-2530.
- [24] 陈晓东, 吕瑞林, 吴伯瑜, 等. 芦荟提取物对大鼠深 II 度烫伤创面组织中炎症介质释放的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2007, 23(8): 769-771.
- [25] 孙毅, 黄韶炜, 毛亚郎, 等. 近壁面超声空化微射流对微细颗粒的破碎作用 [J]. 中国机械工程, 2019, 30(24): 2953-2960.

[责任编辑 郑礼胜]