

生物浸出系统中 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 对雄黄表面改性研究

陈朋^{1,2*} 李红玉² 晏磊³ 李素岳¹

(1. 甘肃省商业科技研究所 甘肃 兰州 730010)

(2. 兰州大学 药学院 甘肃 兰州 730020)

(3. 黑龙江八一农垦大学 黑龙江 大庆 163319)

摘要:【目的】研究 *Acidithiobacillus ferrooxidans* BY-3 对雄黄表面改性作用,为进一步研究雄黄的生物炮制技术提供实验基础与理论依据。【方法】在 4 组生物浸出体系中(每组包含 100 mL 无亚铁离子的 9K 培养基和 0.500 g 雄黄):第 1 组无添加;第 2 组添加 4.469 g 硫酸亚铁;第 3 组添加 0.100 g 硫粉;第 4 组加入 4.469 g 硫酸亚铁和 0.100 g 硫粉。在上述 4 组中使用 *A. ferrooxidans* BY-3 对雄黄进行生物浸出。浸出前后雄黄表面形貌及元素变化,使用扫描电镜(SEM)与能谱仪(EDS)、X-射线衍射(XRD)、拉曼光谱(Raman)、电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-AES)进行分析。【结果】4 组浸出体系均发现 *A. ferrooxidans* BY-3 粘附于雄黄表面以此来产生直接作用。含 Fe^{2+} 的浸出体系中雄黄表面产生非常明显的变化,含硫的浸出体系中雄黄表面变化不明显;只有 Fe^{2+} 存在的浸出体系中 As/S 比率增高,而其余 3 组浸出体系中 As/S 比率均明显下降;另外,改性雄黄的表面存在黄钾铁矾、硫、赤铁矿、针铁矿和磁铁矿等,但未检测到砷华(As_2O_3)与副雄黄(Pararealgar)。【结论】*A. ferrooxidans* 对雄黄改性具有重要作用。 Fe^{2+} 对雄黄的改性具有促进作用,而硫对雄黄的改性具有抑制作用。雄黄改性前后的物化分析结果证实了生物浸出技术可有效解决传统方法制备雄黄及贮存过程中氧化和光化问题。

关键词: 嗜酸氧化亚铁硫杆菌, 雄黄, 生物浸出, 表面改性

Surface alteration of realgar by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in bioleaching systems

CHEN Peng^{1,2*} LI Hong-Yu² YAN Lei³ LI Su-Yue¹

(1. Gansu Institute of Business & Technology, Lanzhou, Gansu 730010, China)

(2. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730020, China)

(3. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: [Objective] Surface alteration of realgar by *Acidithiobacillus ferrooxidans* BY-3 were

基金项目: 甘肃省杰出青年基金项目(No. 1308RJDA014); 陇原青年创新人才扶持计划项目(甘组通字[2014]4 号)

*通讯作者: Tel: 86-931-8551962; ✉: BlueSCI@126.com

收稿日期: 2013-10-12; 接受日期: 2013-12-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

investigated in this work. The fundamental knowledge derived from this study should provide an experimental and theoretical foundation for further investigation into the biotechnological applications in realgar extraction. **[Methods]** The bioleaching experiment was divided into four groups (each containing 100 mL of 9K medium without ferrous iron and 0.500 g of realgar): the first group had no additions; the second group had 4.469 g of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ added; the third group had 0.100 g of sulfur added; and the fourth group had 4.469 g of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.100 g of sulfur added. *A. ferrooxidans* BY-3 were used throughout the bioleaching experiments. Before and after bioleaching on the surface alteration and chemical properties of realgar were characterized by scanning electron microscopy (SEM), energy-dispersive spectroscopy (EDS), X-ray diffraction (XRD), Raman spectroscopy and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). **[Results]** All of bioleaching systems shown that *A. ferrooxidans* BY-3 cells were attached to the surface of the realgar particles. The results suggested that *A. ferrooxidans* BY-3 cells must be essentially attached so that the direct action occurs. Bioleaching systems in the presence of ferrous iron indicated that surface alteration of realgar was discernible change, whereas bioleaching systems with sulfur was the other way round. Compared to the other three bioleaching systems, there was a higher ratio of As/S by *A. ferrooxidans* in the medium with ferrous iron as the only substrate. In addition, the mineral composition found in the solid residues after bioleaching comprised jarosite, sulfur, hematite, gothite and magnetite, whereas As_2O_3 and pararealgar were not observed. **[Conclusion]** *A. ferrooxidans* has plays an important role in the alteration of realgar. The effect of ferrous irons could enhance the alteration of realgar by *A. ferrooxidans* BY-3, while sulfur plays a negative role in the bioleaching of realgar. This study shown that bioleaching technology can effectively solve the problems which oxidation and photochemistry of realgar due to the traditional preparation and the storage of realgar.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Realgar, Bioleaching, Surface alteration

雄黄为四硫化四砷含量超过 90%的天然砷化合物。在古代中国、印度等国家作为药物治疗疾病已有上千年的历史^[1]。近年来,雄黄有效治疗多种形式癌症的体内外实验得以证实^[2-3]。然而,传统方法制备的雄黄水溶性低、胃肠道吸收差、毒性高,以及生物利用度低的缺点严重限制了它的临床应用。这主要是由于雄黄的天然属性造成的。首先,雄黄是一种硫化矿物,很难溶于水,进入人体胃肠道也极难被吸收,也就很难有效地利用。其次,雄黄在光照条件下会形成副雄黄(Pararealgar),或称为拟雄黄^[4-5]。雄黄的这种光化现象导致其药效成分不足,品质下降。同时,雄黄在空气中极易氧化形成砷华(As_2O_3),导致雄黄毒性增加,造成机体中毒^[6]。综上所述,溶解作用是雄黄炮制的主要目的,光化作用直接关系到雄黄的品质与贮存,而减毒作用则对于雄黄的安全使用具有重要的影响。传统的雄黄炮制技术或

多或少存在上述问题,使得雄黄炮制迫切需要新的学科技术融入与交叉创新。近年来兴起的纳米技术的应用,一度使得高能球磨法制备纳米雄黄广受关注^[7-9],这一方法有效解决了雄黄难于溶解,机体吸收差,生物利用度低的关键问题,但是雄黄的机械化学改性使雄黄的光化作用及氧化作用加强,加速了副雄黄及 As_2O_3 的形成。同时,纳米雄黄极易团聚,难于贮存的问题也很难解决。因此,只有获得一种兼具助溶、减毒、增效的雄黄炮制新技术,才能使雄黄作为抗癌候选药物研发形成关键性突破。

微生物浸出技术是近年发展起来的一项湿法冶金技术,基于以上问题我们将这一技术与药用雄黄制备交叉融合,利用 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 对雄黄进行生物浸出^[10]。相比传统制备方法,雄黄的生物浸出能显著增强雄黄的可溶性和生物利用度,并且该方法具有效率高、环境友

好度高、低成本的特性^[11]。雄黄炮制过程的物化改性是判断一种炮制方法是否可行的重要研究参数。因此,研究微生物对雄黄表面的改性将有助于更好的优化生物炮制工艺。*A. ferrooxidans* 对于雄黄的表面改性过程,主要依赖于两种物质为微生物提供能源:亚铁离子与硫元素^[12]。最近的研究已证实雄黄在含 Fe^{2+} 的浸出系统中显示了较好的生物改性作用^[13]。是否硫元素也能起到同样的效果,或两种能源共同存在是否可以增强微生物对雄黄的生物改性作用,值得深入的研究与探讨。

有鉴于此,本文设计 4 组不同的雄黄表面改性实验,系统化研究 *A. ferrooxidans* BY-3 对雄黄表面改性前后变化。通过使用 SEM/EDS、XRD、拉曼光谱、ICP-AES 等分析雄黄表面形貌及元素变化,阐述雄黄生物改性过程中的物化特征,为雄黄的生物炮制工艺建立材料学研究基础。

1 材料与方法

1.1 雄黄

实验所用雄黄来源于中国湖南省石门镇,根据中国药典方法去毒处理制备^[14]。雄黄粉末经研磨后过 200 目筛,颗粒大小约为 75 μm 。使用粉末 X-衍射仪对雄黄的矿物学特征进行分析,结果显示雄黄中含有 97% 的雄黄(As_4S_4)和 3% 的砷华(As_2O_3)。ICP-AES 对样品的全元素分析表明:样品中主要元素为 As (68.0% ,质量比)和 S (31.01% ,质量比),其次是 Ca (0.011% ,质量比)和 Fe (0.040% ,质量比)。Mg、Hg、K、Se、Al 含量约为 0.002 9%–0.006 6%,而 Cd、Zn、Cu、Ba 元素约占 0.000 04%–0.000 28%^[12]。

1.2 微生物

菌株 *A. ferrooxidans* BY-3 (菌种保藏号: CCTCC-M203071)培养基为含有 44.69 g/L 硫酸亚铁的 9K 培养基^[15]。菌悬液的制备方法:将 *A. ferrooxidans* BY-3 悬浮在无铁离子的 9K 培养基中,悬浮细胞的浓度为 1.2×10^7 cells/mL,用来作

为接种物,以确保所有实验均为同一初始条件。

1.3 生化改性实验

所有实验在 250 mL 摇瓶、150 r/min 的 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中进行。实验根据处理方式不同分为 4 组,见表 1。

4 组改性实验(G1、G2、G3、G4)实验周期为 30 d,每隔 10 d 进行 1 次取样,使用 SEM/EDS 测定雄黄表面形貌以及表面元素含量变化;使用 XRD 分析未经改性以及改性后雄黄表面的物质变化。G2 组雄黄浸出液使用一系列的乙醇溶液(70%、85%、95%、100%)进行乙醇沉淀实验,真空干燥处理以挥发残存的乙醇及水分,醇沉样品使用 XRD,拉曼光谱进行分析。

1.4 分析过程

1.4.1 扫描电镜与能谱仪:样品的显微特征观测使用 SEM (JEOL JSM-5 600LV ,Japan) (20 kV) 与 EDS (Thermo Kevex , USA), EDS 分析使用完全标准模式,高分辨率下观测使用 FESEM (JEOL JSM-670 1F ,Japan) (5–10 kV)。SEM 样品的制备方法参考文献描述^[16]。

1.4.2 X-射线衍射: XRD 分析使用多功能 X-射线衍射系统(X'Pert Pro MPD , Philips , Netherlands) , Cu $\text{K}\alpha$ 射线($\lambda=0.154\ 06\ \text{nm}$) , 操作电压 40 kV , 40 mA。衍射模式为样品扫描 2 θ 间隔角度,范围 5.0 $^{\circ}$ –80.0 $^{\circ}$ 。数据分析及相位识别使用 X'Pert Highscore Plus 2.2 软件包(PANalytical B.V. , Almelo , Netherlands)。

表 1 <i>A. ferrooxidans</i> 生物浸出雄黄的改性实验设计 Table 1 The experimental design for modification of realgar by <i>A. ferrooxidans</i>				
Group	Realgar (g)	$\text{Fe}_2\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g)	S (g)	Free-Fe 9K medium (mL)
G1	0.500	0	0	100
G2	0.500	4.469	0	100
G3	0.500	0	0.100	100
G4	0.500	4.469	0.100	100

1.4.3 拉曼光谱: 雄黄改性前后的拉曼光谱分析使用激光共焦显微拉曼光谱仪(LabRAM HR 800, HORIBA Jobin Yvon)。激光器波长使用 532 nm; CCD 探测器 200–1 050 nm, InGaAs 探测器 800–1 700 nm; 拉曼光谱位移范围(可见 100–8 000 cm^{-1} , 紫外 250–4 000 cm^{-1}); 显微尺寸分辨率: 1 μm ; 光谱分辨率: 1 cm^{-1} 。拉曼光谱分析样品制备方

法见文献[17]。

2 结果与讨论

2.1 SEM 分析

在图 1 显示雄黄与 *A. ferrooxidans* BY-3 相互作用的扫描电镜分析。在第 10 天浸出实验雄黄的 SEM 观测中(图 1A), G1 组改性雄黄与未经改性的雄黄相比, 形貌未发生明显变化; 而图 1B 中

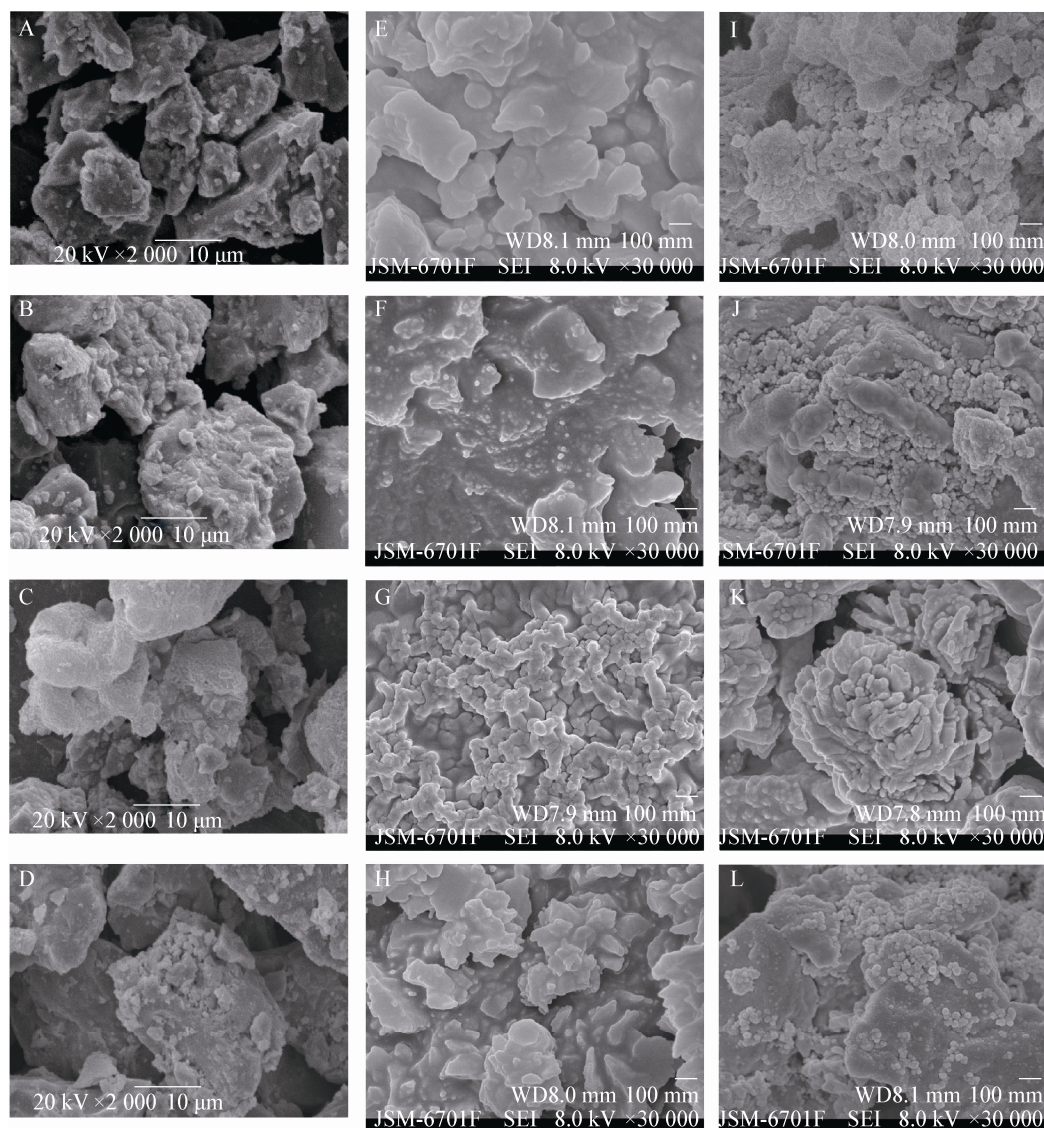


图 1 *A. ferrooxidans* BY-3 生物浸出雄黄的 SEM 图

Figure 1 SEM image of the surface of the realgar reacted with *A. ferrooxidans* BY-3

注: 10 d 后: A: G1; B: G2; C: G3; D: G4 (比例尺=10 μm)。20 d 后: E: G1; F: G2; G: G3; H: G4 (比例尺=100 nm)。30 d 后: I: G1; J: G2; K: G3; L: G4 (比例尺=100 nm)。

Note: After 10 days: A: G1; B: G2; C: G3; D: G4 (Scale bar=10 μm). After 20 days: E: G1; F: G2; G: G3; H: G4 (Scale bar=100 nm). After 30 days: I: G1; J: G2; K: G3; L: G4 (Scale bar=100 nm).

显示 G2 组雄黄表面形貌形成覆被层, 这是由于 Fe(II) 氧化形成 Fe(III) 之后, Fe(III) 具有强氧化作用使得雄黄表面形成氧化层, 促使雄黄表面溶解。 *A. ferrooxidans* BY-3 利用其胞外多聚物(EPS)来增强菌株的氧化作用, 同时 EPS 的形成也扩大了菌株的作用半径, 增加了菌株处理范围^[18-19]; 图 1C 中显示 G3 组部分硫层包覆于雄黄表面, 阻碍了细菌的直接作用, 但是它的形成也有利于游离细菌粘附于矿物表面, 从而移除硫层。 *A. ferrooxidans* BY-3 虽然是铁氧化细菌, 但是它也能通过移除雄黄颗粒表面的硫层来增加硫化矿的溶解速率^[20]; 图 1D 显示 G4 组中既存在少量黄钾铁矾表面沉淀, 同时还有部分雄黄表面附着硫层, 这与浸出系统中存在的两种元素有关。

在第 20 天浸出实验的 SEM 观测中(图 1E), G1 组雄黄表面形成云朵状片层, 片层间存在大量的间隙; 图 1F 中, G2 组雄黄表面形成较大的裂隙或孔径, 分散有大量的黄钾铁矾及衍生物; 图 1G 中显示 G3 组雄黄表面与未经改性的雄黄相比, 蛇形隆起大量积聚, 如大量麻花状褶皱, 雄黄表面无其它杂质; 图 1H 显示 G4 组雄黄表面形成碎块, 间隙被大量硫溶胶所填充, 并有少量黄钾铁矾沉淀分布于其上。

在第 30 天的浸出实验雄黄的 SEM 观测中(图 1I), G1 组块状的雄黄基本不可见, 形成了如珊瑚状, 具有大量孔洞的疏松形貌, 是 4 组浸出体系中, 雄黄表面结构改观最大的一组; 图 1J 中, G2 组雄黄表面有大量 *A. ferrooxidans* BY-3 菌细胞侵蚀后形成的沟壑, 这些沟壑被大量的黄钾铁矾沉淀物填充, 隆起的部分裸露出雄黄; 图 1K 中, G3 组雄黄表面有大量 *A. ferrooxidans* BY-3 侵蚀后形成的沟壑, 这些沟壑无任何物质填充, 形成大量深浅不一的形貌特征; 图 1L 中, G4 组雄黄表面菱角已不可见, 但是与其他 3 组相比, 雄黄表面无明显侵蚀形成的沟壑, 裂隙等, 基本完整的雄黄表面附着大量的黄钾铁矾沉淀。

综上所述, 生物浸出雄黄的过程中 *A. fer-*

rooxidans BY-3 对于雄黄的表面改性作用是非常明显的, 这一结果与 Jones R. A. 等使用 *A. ferrooxidans* 对毒砂(FeAsS)表面改性研究结果是一致的^[21]。所有浸出体系均有 *A. ferrooxidans* BY-3 直接作用的现象。Devasia P. 等认为当存在固体底物(如黄铁矿、黄铜矿)时, 浸矿细菌必须粘附于矿物表面生长, 而存在可溶性底物(如 9K 液体培养基)时, 浸矿细菌生长不需要粘附作用^[22]。因此雄黄存在的所有浸出体系中, 均有 *A. ferrooxidans* 直接作用的参与, 产生细菌的改性作用。G2 和 G4 组中改性雄黄在细菌的直接作用与高铁氧化物的间接作用下, 雄黄表面改性的作用更为明显。

2.2 EDS 分析

在图 2 中显示了雄黄的电镜能谱图, 从图中可以看出 4 组改性处理的雄黄(G1-G4 组)与未经改性的雄黄(G0 组)能谱分析结果相比, 雄黄中主要元素砷和硫的含量发生了不同的变化。雄黄浸出过程中, 砷和硫元素的比率变化见表 2。在浸出第 20 天, G1、G2、G3 和 G4 组 As/S 比率分别为 0.40、0.41、0.16 和 0.26, 而 G0 组的 As/S 比率为 0.44, 因此 4 组浸出实验 As/S 比率均下降。G1 组和 G2 组的只是略微下降, 而 G3 和 G4 组则是由于浸出体系中添加了额外的单质硫, 在雄黄表面形成硫层或硫溶胶, 因此 As/S 比率明显低于前两组。另外, 从浸出液中硫元素的含量变化来看, 4 组浸出体系虽然不同, 但是可溶性的硫在组间的变化差异不大, 而造成 G3、G4 与前两组 As/S 差异的主要原因, 就是由于不溶性的单质硫或其它硫的形式附着于雄黄表面造成雄黄溶解困难。EDS 分析结果也证实了单质硫抑制雄黄表面改性。

在浸出第 30 天, G1、G2、G3 和 G4 组 As/S 比率分别为 0.46、0.38、0.33 和 0.27。从最终的 As/S 比率来看, G1 组较 G0 组的 As/S 比率增加, 说明在浸出后期雄黄中硫的溶出速度要比砷的溶出速度慢, 这与硫在溶液中的浓度显著减少有关,

(图 3B), 而砷在溶液中稍有增加(图 3A), 因此 As/S 比率(0.46)略高于浸出前的雄黄 As/S 比率(0.44); G2 组中 As/S 比率下降至 0.38, 虽然砷的释放从 121.95 mg/L 下降到了 59 mg/L, 下降大约 50%左右, 而硫的释放则从 57.250 mg/L 下降到了

15.805 mg/L, 降幅达到了 72% (见图 3)。因此, 雄黄中硫的含量释放速度比砷的释放速度要慢很多, 造成 As/S 比率(0.38)略低于浸出前的雄黄 As/S 比率(0.44); 与 G1 和 G2 组不同, G3 和 G4 组中砷释放到溶液中在浸出后期(15–30 d 之间)明

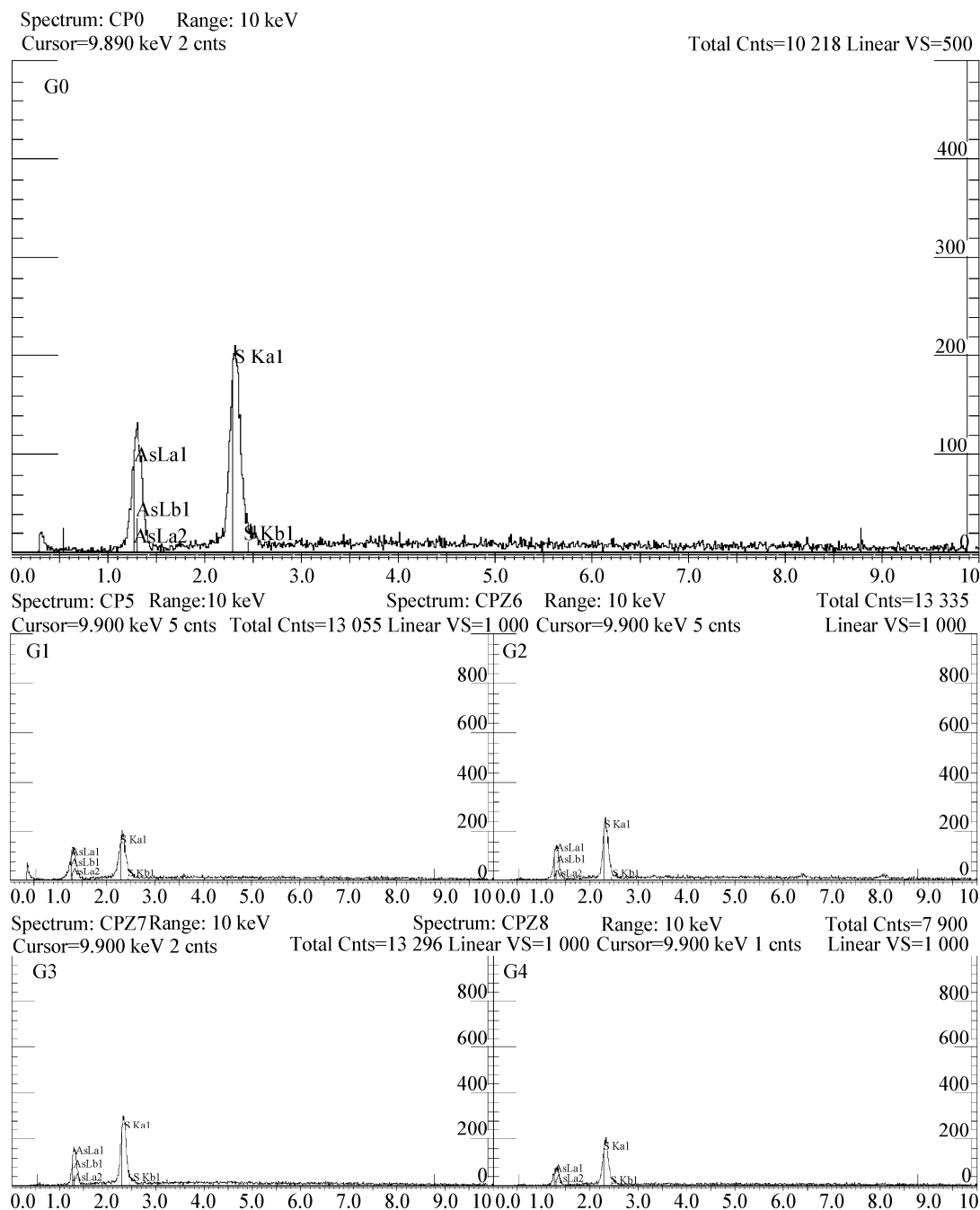


图 2 雄黄的电镜能谱图
Figure 2 The EDS pattern of realgar

表 2 电镜能谱分析雄黄中砷/硫元素比率 Table 2 The EDS analysis of the arsenic and sulfur ratio of realgar							
Sample	Times (d)	Element	Weight Conc. (%)	Atom Conc. (%)	Ratio As/S	Stoichiometric As/S	References
G0	0	As	50.44	30.34	0.44	As _{0.44} S	This study
G1	20	S	49.56	69.66	0.40	As _{0.40} S	This study
		As	48.18	28.47			
		S	51.82	71.53			
		As	51.84	31.54			
G2	30	S	48.16	68.46	0.46	As _{0.46} S	[13]
		As	48.95	29.10			
		S	51.05	70.90			
		As	46.85	27.39			
G3	20	S	53.15	72.61	0.38	As _{0.38} S	This study
		As	26.53	13.39			
		S	73.47	86.61			
		As	43.39	24.70			
G4	30	S	56.61	75.30	0.33	As _{0.33} S	This study
		As	37.67	20.55			
		S	62.33	79.45			
		As	38.95	21.45			
G4	30	S	61.05	78.55	0.27	As _{0.27} S	This study
		S	61.05	78.55			

显变化不大(图 3A);但是硫的释放速度却大幅下降(图 3B)。因此,在 G3 和 G4 组雄黄中砷和硫的释放速度减慢,造成 As/S 比率无明显变化,这一结果与这两组 SEM 分析的结果相符。

从 EDS 的分析结果中可以看出:只有亚铁离子存在的 G2 组中,As/S 比率是增高的,而其余各组浸出体系中 As/S 比率均是明显下降。同时,这也说明 G2 组中,无论是细菌的直接作用,还是高价铁的氧化作用,对于雄黄改性的影响比其它各浸出体系要显著。这一方面为生物浸出雄黄的技术优化提供了参考,另一方面,也为以主观测定和描述为手段的 SEM 分析提供了科学数据的支撑。EDS 分析结果表明雄黄浸出后 As/S 比率增加,其浸出液中砷的含量将随之增加,相反雄黄浸出后 As/S 比率较之前减少,其浸出液中砷的

含量将随之减少,这也就为生物浸出雄黄提供了一个重要的质控参数。

2.3 XRD 分析

图 4 中显示了雄黄改性前后 XRD 的分析结果:未经改性雄黄粗粉(G0)中主要包含雄黄(97%,As₄S₄)与三氧化二砷(3%,As₂O₃);G1 组改性雄黄粗粉含有雄黄(61%,As₄S₄)和硫砷矿(39%,As₄S₃);G2 组中含有雄黄(43%,As₄S₄)、硫砷矿(23%,As₄S₃)、磁铁矿(6%,Fe₃O₄)和黄钾铁矾(28%,Jarosite);G3 组含有雄黄(57%,As₄S₄)和硫(43%,S);G4 组中含有雄黄(23%,As₄S₄)、硫砷矿(27%,As₄S₃)、硫(25%,S)、磁铁矿(3%,Fe₃O₄)和黄钾铁矾(22%,Jarosite)。XRD 测定了雄黄经生物浸出后残存物质的半定量数据,这些结果与 SEM/EDS 的分析结果相符合,证实了不同浸出

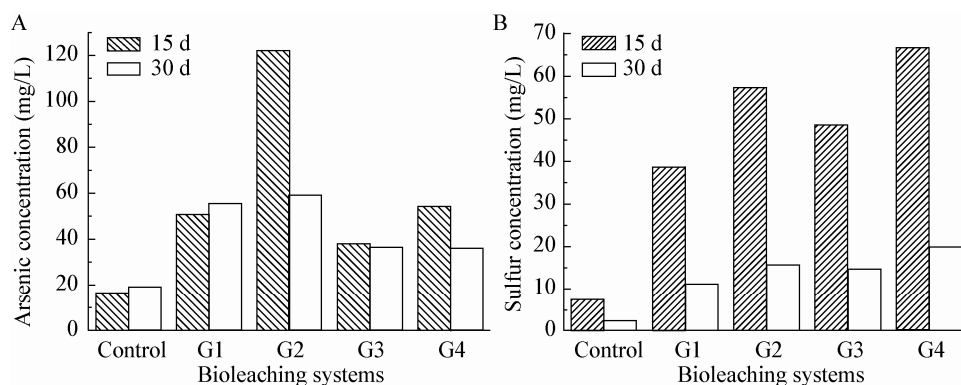


图3 雄黄浸出液中的砷和硫的浓度变化

Figure 3 The arsenic and sulfur concentration from realgar by bioleaching

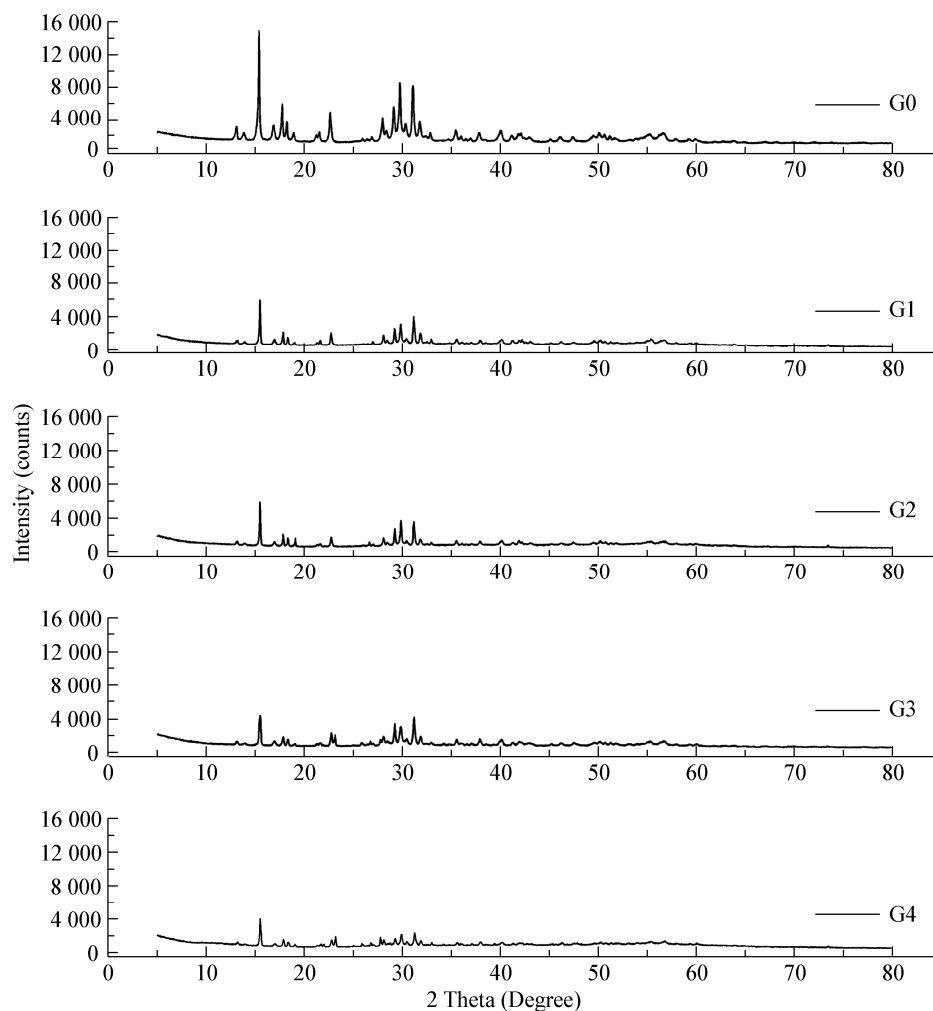


图4 雄黄及改性雄黄的XRD分析

Figure 4 XRD patterns of realgar and modified realgar

注：G0：未经改性雄黄粗粉(75 μm)；浸出 30 d 之后：G1：G1 组浸出结束后的残渣；G2：G2 组浸出结束后的残渣；G3：G3 组浸出结束后的残渣；G4：G4 组浸出结束后的残渣。

Note: G0: Without modified realgar powder (75 μm); After 30 days: G1: Residual realgar from *A. ferrooxidans* cultures in medium; G2: Residual realgar from *A. ferrooxidans* cultures in medium with ferrous sulfate; G3: Residual realgar from *A. ferrooxidans* cultures in medium with sulfur; G4: Residual realgar from *A. ferrooxidans* cultures in medium with ferrous sulfate and sulfur.

的改性雄黄表面化合物的差异, 如黄钾铁矾沉淀只存在于 G2 和 G4 组中, 而硫只存在于 G3 和 G4 组中。另外, 赤铁矿、针铁矿和磁铁矿对溶液中的砷都有移除作用^[23], 这类物质的存在会造成溶液中可溶性砷的量减少。

2.4 拉曼光谱分析

图 5 显示雄黄的拉曼光谱图, 图 5A 中雄黄粗粉的拉曼光谱图显示了 5 个特征峰, 其中 189.1 cm^{-1} 和 203.637 cm^{-1} 属于 As-As 伸缩振动峰 274.162 cm^{-1} 属于 As-S-As 弯曲振动峰; 349.495 cm^{-1} 和 361.988 cm^{-1} 属于 As-S 伸缩振动峰。在室温、低激光功率下, 雄黄的拉曼光谱没有发现变化。在图 5B 中, 生物浸出改性后雄黄振动峰发生变化: 属于 As-As 伸缩振动峰叠加形成 188.734 cm^{-1} , 拉曼光谱相对强度逐渐增强; 属于 As-S-As 弯曲振动峰 234.081 cm^{-1} ; 属于 As-S 伸缩振动峰 270.195 cm^{-1} 和 350.919 cm^{-1} 。Valli M. 等测定了雄黄中最短 S-S 键的距离为 3.295, 表明雄黄的 S-S 键易氧化形成较强的硫氧化离子, 加速 As-As 键的断裂^[24]。Kyono A. 研究结果表明 As_4S_4 拉曼光谱相位特征峰在接近 230 cm^{-1} 和 340 cm^{-1} 位置, 这

与我们在图 5A 中所观测的结果一致^[17]。虽然一些研究报道副雄黄也存在同样的相位特征^[5,25], 但是副雄黄在 228 、 235 、 331 和 344 cm^{-1} 处会出现新的拉曼光谱峰, 而这些峰没有出现在图 5B 中, 因此雄黄光化反应在生物浸出过程也没有发现。雄黄置于空气中所受到氧化与光化的双重作用, 在生物浸出制备过程中未发现, 显然该方法将这两种不利因素规避了。

图 6 显示了雄黄浸出液中乙醇沉淀物及拉曼光谱图。图 6A 是 95%乙醇沉淀过程中浸出液表面析出的四方形结晶形态; 图 6B 是乙醇沉淀物拉曼光谱图, 雄黄的拉曼光谱相位特征峰在 230 cm^{-1} 和 340 cm^{-1} 未见, 只在 $1\ 000\text{ cm}^{-1}$ 振动峰存在较强的拉曼光谱相对强度。在乙醇沉淀物 XRD 分析结果中, 显示主要存在硫砷矿(Dimorphite)、硫化砷(Arsenic sulfide)、四方硫铁矿(Mackinawite)、磁铁矿(Magnetite)、黄钾铁矾及衍生物(Jarosite, Hydroniumjarosite、Ammoniojarosite)、砷酸钾(Potassium arsenate)和砷酸钠(Sodium arsenite)。这些结果显示浸出液中存在悬浮的砷类物质, 以及对砷有较强吸附作用的高铁吸附剂^[26]。

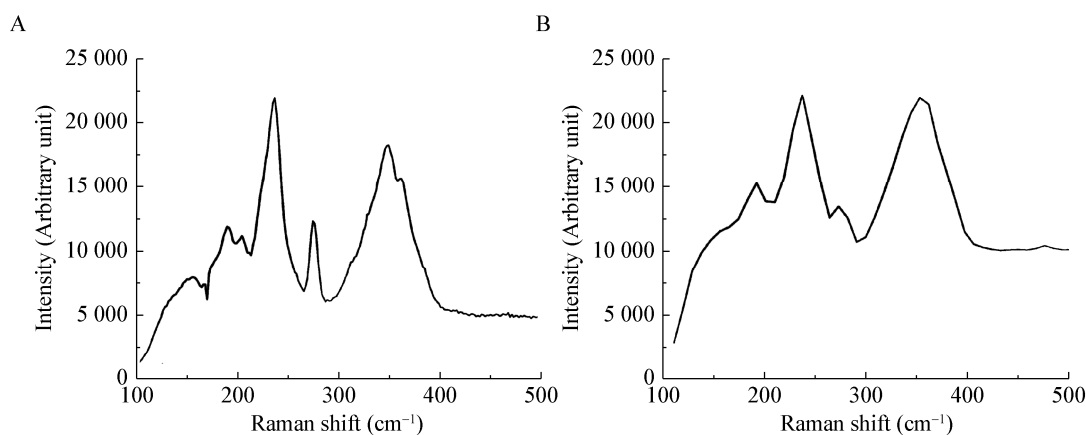


图 5 雄黄的拉曼光谱图

Figure 5 Raman spectrum of realgar

注: A: 雄黄粗粉; B: 生物浸出后的雄黄残渣。

Note: A: Powder of realgar; B: Residual realgar after bioleaching.

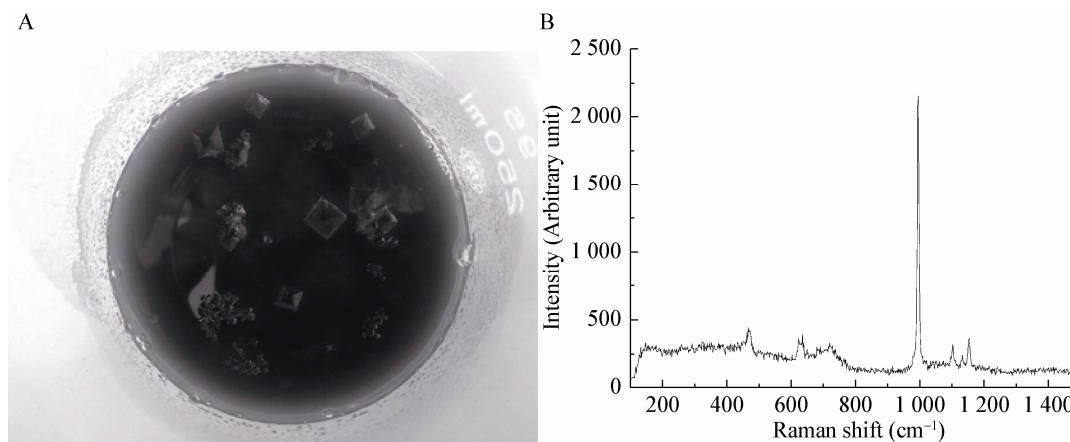


图6 雄黄浸出液中乙醇沉淀物及拉曼光谱图

Figure 6 Raman spectrum of leachate precipitated using ethanol

注：A：乙醇沉淀后的结晶；B：乙醇沉淀物拉曼光谱。

Note: A: The crystal from ethanol precipitation; B: Raman spectrum of ethanol precipitation.

3 结论

为了探索菌株 *A. ferrooxidans* BY-3 对雄黄的生化改性作用，本研究利用 SEM/EDS、XRD 和拉曼光谱对雄黄及生物浸出处理后的雄黄矿物表面特征进行系统的分析。通过不同生物浸出体系的处理，证实了 *A. ferrooxidans* BY-3 对雄黄生物炮制的重要作用机制。雄黄暴露于空气中表面氧化产生 As_2O_3 以及形成副雄黄，而生物浸出过程雄黄的炮制都是在溶液中进行，不与外界空气进行直接接触，对雄黄的炮制过程都由耐砷菌株 *A. ferrooxidans* BY-3 来完成的，生物氧化过程不仅不会产生 As_2O_3 ，而且粗品雄黄中所含有的少量 As_2O_3 也会溶解在浸出液中，被菌株 *A. ferrooxidans* BY-3 转化为低毒性的砷形态。本研究中雄黄粗品中所含有的 3% As_2O_3 在 4 组浸出完成后，XRD 中均未检测到，表明生物浸出过程有雄黄脱毒的作用。同时，改性前后均未发现副雄黄的光谱，也证实生物浸出过程不存在雄黄的光化现象。证实生物浸出技术可以有效解决传统方法在雄黄制备过程及贮存所面临的两大难题：氧化与光化。综上所述，从材料学研究角度来看，雄黄的表面改性具有新型雄黄生物炮制技术的有效

性与实用性，未来将有极好的应用前景。

参考文献

- [1] Wu JZ, Shao YB, Liu JL, et al. The medicinal use of realgar (As_4S_4) and its recent development as an anticancer agent[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 135(3): 595-602.
- [2] Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the pml-rara oncoprotein by directly binding PML[J]. Science, 2010, 328(5975): 240-243.
- [3] Mao JH, Sun XY, Liu JX, et al. As_4S_4 targets RING-type E3 ligase c-CBL to induce degradation of BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2010, 107(50): 21683-21688.
- [4] Xu JL, Xu XX, Zhou XY, et al. Microscopic raman imaging spectra of realgar and light-induced degradation products in realgar[J]. Spectrosc Spectral Analysis, 2007, 27(3): 577-580.
- [5] Trentelman K, Stodulski L, Pavlosky M. Characterization of pararealgar and other light-induced transformation products from realgar by Raman microspectroscopy[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(10): 1755-1761.
- [6] Baláz P, Choi WS, and Dutková E. Mechanochemical modification of properties and reactivity of nanosized arsenic sulphide As_4S_4 [J]. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2007, 68(5/6): 1178-1183.
- [7] Zhao QH, Zhang Y, Liu Y, et al. Anticancer effect of realgar nanoparticles on mouse melanoma skin cancer *in vivo* via transdermal drug delivery[J]. Medical Oncology, 2010, 27(2): 203-212.
- [8] Baláz P, Sedláč J. Arsenic in cancer treatment: challenges for application of realgar nanoparticles (a minireview)[J]. Toxins, 2010, 2(6): 1568-1581.
- [9] Ye HQ, Gan L, Yang XL, et al. Membrane toxicity

- accounts for apoptosis induced by realgar nanoparticles in promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. Biological Trace Element Research, 2005, 103(2): 117-132.
- [10] Chen P, Yan L, Yue X, et al. Optimal parameters for bioleaching of realgar using *Acidithiobacillus ferrooxidans* under different growth conditions and mathematical analysis[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2013, 31(1): 33-41.
- [11] Chen P, Yan L, Wang Q, et al. Arsenic precipitation in the bioleaching of realgar using *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Applied Chemistry, 2013(2013): 1-5.
- [12] Chen P, Yan L, Leng F, et al. Bioleaching of realgar by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using ferrous iron and elemental sulfur as the sole and mixed energy sources[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(3): 3260-3267.
- [13] Chen P, Yan L, Wang Q, et al. Surface alteration of realgar (As_4S_4) by *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. International Microbiology, 2012, 15(1): 9-15.
- [14] Chinese pharmacopoeia committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China People's Press, 2010: 316.
- [15] Silverman M, Lundgren DG. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields[J]. Journal of Bacteriology, 1959, 77(5): 642-647.
- [16] Ozturk SN, Aslim B, Suludere Z. Cadmium (II) sequestration characteristics by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(24): 9742-9748.
- [17] Kyono A. Growth and Raman spectroscopic characterization of As_4S_4 (II) single crystals[J]. Journal of Crystal Growth, 2010, 312(23): 3490-3492.
- [18] Sand W, Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria[J]. Research Microbiology, 2006, 157(1): 49-56.
- [19] Gehrke T, Hallmann R, Kinzler K, et al. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* — a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology[J]. Water Science and Technology, 2001, 43(6): 159-167.
- [20] Fowler TA, Crundwell FK. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions[J]. Applied and Environment Microbiology, 1999, 65(12): 5285-5292.
- [21] Jones RA, Koval SF, Nesbitt HW. Surface alteration of arsenopyrite (FeAsS) by *Thiobacillus ferrooxidans*[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2003, 67(5): 955-965.
- [22] Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN, et al. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(12): 4051-4055.
- [23] Gim NJ, Mart NMA, De PJ, et al. Arsenic sorption onto natural hematite, magnetite, and goethite[J]. Journal of Hazardous Materials, 2007, 141(3): 575-580.
- [24] Valli M, Malmensten B, Persson I. Interactions between sulphide minerals and alkylxanthates 9. A vibration spectroscopic study of the interaction between arsenopyrite, millerite, molybdenite, orpiment and realgar and ethylxanthate and decylxanthate ions in aqueous solution[J]. Colloid Surface Physicochem Eng Aspect, 1994, 83(3): 219-225.
- [25] Douglass DL, Shing CC, Wang G. The light-induced alteration of realgar to pararealgar[J]. American Mineralogist, 1992, 77: 1266-1274.
- [26] Márquez M, Gaspar J, Bessler KE, et al. Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine (Brasil)[J]. Hydrometallurgy, 2006, 83(1/4): 114-123.