豆腐果苷–迷迭香酸共无定形体系及其协同增溶与助眠效应

陈 龙[1#], 王 皎[1#], 张 童[1], 柯 瑾[1], 刘 晨[2], 王文苹[1,3*]

(1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 宁夏医科大学总医院, 宁夏 银川 750000; 3. 云南省中药材加工与炮制重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: 豆腐果苷和迷迭香酸均有改善睡眠作用, 但水溶性差。本研究构建双药共载无定形体系, 用汉森溶解度参数和分子对接预测其相容性和作用力, 以共蒸发法制备共蒸发物, 经偏光、衍射、扫描量热分析确认形成单相二元共无定形体系。红外、紫外、核磁分析表明, 豆腐果苷芳香酮羰基与迷迭香酸羧基形成氢键, 芳香环π堆叠构成稳定分子间网络。共无定形化使两药在纯水中溶解度分别提高4.7倍和5.1倍, 体外溶出初期迅速但因凝胶化受限。所有动物实验均严格按照云南中医药大学动物实验伦理审查委员会的规定进行, 批准文号: YNUTCM-XMSS-G-20250059。斑马鱼失眠模型药效研究显示, 中低剂量共无定形组总睡眠时间延长, 睡眠回合次数、平均回合长度增加, 睡眠潜伏期缩短, 协同指数 < 0.7, 具协同助眠效应。溶剂共蒸发法制备共无定形物高效简便, 该体系在改善水溶性、协同助眠方面优势显著。

关键词: 豆腐果苷; 迷迭香酸; 共无定形; 溶解度; 斑马鱼模型

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)04-1389-09

Co-amorphous system of helicid - rosmarinic acid and its synergistic solubility enhancement and sleep-promoting effects

CHEN Long[1#], WANG Jiao[1#], ZHANG Tong[1], KE Jin[1], LIU Chen[2], WANG Wen-ping[1,3*]

(*1. College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750000, China; 3. Yunnan Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China*)

Abstract: Helicide and rosmarinic acid possess sleep-improving properties but suffer from poor aqueous solubility. This study aimed to construct a dual-drug co-loaded amorphous system. Compatibility and intermolecular interactions were predicted using Hansen solubility parameters and molecular docking. Co-evaporates were prepared *via* the solvent co-evaporation method. Polarized light microscopy, X-ray diffraction, and differential scanning calorimetry analyses confirmed the formation of a single-phase binary co-amorphous system. Fourier-transform infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, and nuclear magnetic resonance analyses revealed that hydrogen bonds formed between the aromatic ketone carbonyl group of helicide and the carboxylic acid group of rosmarinic acid, while π-π stacking interactions occurred between their aromatic rings, constituting a stable intermolecular network. Co-amorphization significantly enhanced the apparent solubility of both drugs in pure water by 4.7-fold and 5.1-fold, respectively. *In vitro* dissolution studies indicated an initial rapid release phase, followed by limitations due to gelation. All animal experiments were conducted in strict accordance with the regulations of the Animal Experiment Ethics Committee of Yunnan University of Chinese Medicine, with approval number:

收稿日期: 2025-07-15; 修回日期: 2025-11-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360778); 云南省教育厅科学研究基金项目 (205Y0590).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-871-6880581, E-mail: 784490228@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0818

YNUTCM-XMSS-G-20250059. Pharmacodynamic evaluation in a zebrafish insomnia model demonstrated that the co-amorphous system at low and medium doses prolonged total sleep time, increased the number of sleep bouts and average bout length, and shortened sleep latency compared to individual drugs or physical mixture. A combination index (CI) < 0.7 confirmed a synergistic sleep-promoting effect. The solvent co-evaporation method proved efficient and straightforward for preparing the co-amorphous system. This co-amorphous strategy demonstrates significant advantages in improving aqueous solubility and achieving synergistic hypnotic efficacy.

Key words: helicid; rosmarinic acid; co-amorphous; solubility; zebrafish model

无定形化是提升难溶性药物溶解度和生物利用度的有效策略[1]。相较于晶态, 无定形态自由能更高、分子活动性更强, 能快速形成过饱和状态、促进吸收。通常利用亲水聚合物制备无定形态的固体分散体[2], 但聚合物载体载药量有限, 导致体积/质量比较大, 制剂成本过高、患者依从性差[3]。此外, 水溶性聚合物可能增加配方吸湿性, 促进相分离和重结晶[4]。为了克服上述局限, 近年来由药物活性成分 (active pharmaceutical ingredient, API) 及小分子配体 (co-former, CF) 共同组成的共无定形物 (co-amorphous mixture, CAM) 逐渐成为前沿热点之一[3], 组分之间一般通过氢键、π-π堆叠和静电相互作用形成均相和单相系统。常选用适宜的小分子辅料作为CF, 如糖精[4]、氨基酸[5]、烟酰胺[6]、表面活性剂[7]等, 其中以另一种活性成分作为CF形成的药物−药物CAM具有独特价值, 潜在制剂和药效两方面的协同效应, 如他达拉非−达泊西汀[8]、利托那韦−吲哚美辛[9]、小檗碱−厚朴酚[10]等。这与中药复方强调通过“多成分协同、多靶点干预”发挥整体治疗效果的理念高度契合。基于共无定形技术构建中药活性多组分CAM, 既能改善理化性质和生物利用度, 又可望发挥复方增效减毒效应, 为创新中药制剂的设计研发提供技术思路和理论支持。

山龙眼科植物萝卜树属云南民族药[11], 其代表成分豆腐果苷 (helicid, HD, 图1) 具有镇痛、镇静、抗抑郁、抗炎等效应[12], 临床用于缓解神经官能症的头痛、头昏及睡眠障碍[13]。与可致发育期神经毒性的安定类药物[14]不同, 妊娠期暴露于50倍日用剂量的HD对大鼠仔代早期生理及神经发育无不良影响, 凸显其天然安全性优势[15]。其微溶于水, 但在氯仿、乙醚等溶剂中几乎不溶[16]。另一种天然酚酸——迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA, 图1) 广泛分布于肿节风、紫苏子、丹参等多种中药材[17], 具有显著的抗氧化、抗炎、抗肿瘤等活性[18-20]。近年研究[21-23]提示RA可通过激活γ-氨基丁酸能系统发挥镇静助眠作用, 低剂量下即可显著延长戊巴比妥诱导的睡眠时间、增加非快速眼动睡眠比例[22]。与传统苯二氮䓬类药物相比, RA不易产生耐受性、认知损伤及戒断反应[22,23], 体现了中药活性成分在改善睡眠质量与安全性方面的独特优势。

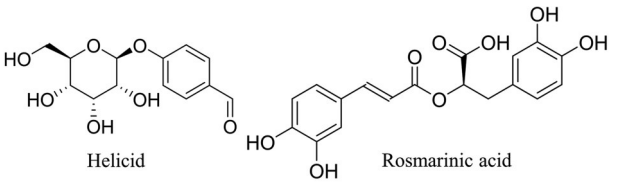


Figure 1 Chemical structures of helicid (HD) and rosmarinic acid (RA)

本研究通过共蒸发法制备豆腐果苷−迷迭香酸共无定形物, 系统表征其形态结构、分子互作及溶解特性, 并利用斑马鱼行为模型初步评价其协同助眠潜力, 为基于中药有效成分的复方新制剂开发奠定实践基础。

材料与方法

实验动物 4月龄野生型AB系斑马鱼成鱼由杭州环特生物科技有限公司提供。云南中医药大学动物实验伦理审查委员会批准了动物实验。所有动物实验均严格按照云南中医药大学动物实验伦理审查委员会的规定进行, 批准文号: YNUTCM-XMSS-G-20250059。斑马鱼成鱼在黑暗10 h/照明14 h, 28 ± 0.5 ℃条件下饲养, 每天定时定量喂食丰年虾。选用健康斑马鱼雌雄比例2∶1于产卵缸中配对产卵, 收集受精卵用于后续实验。

药品及试剂 豆腐果苷、迷迭香酸 (KV375807、L2405571, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 褪黑素、咖啡因 (AFBG151、AFDL2401, 成都埃法生物科技有限公司); 甲醇 (20240601, 天津市致远化学试剂有限公司); 实验用水自制。

仪器 超声清洗器 (THZ-100, 宁波新芝生物科技有限公司); 高效液相色谱仪、紫外可见分光光度计 (Agilent1220、Cary 60, 美国安捷伦科技有限公司); 纯水机 (EU-KI-20TF, 南京欧凯环境科技); 溶出仪 (RC-6, 天津市新天光分析仪器技术有限公司); 恒温振荡器 (THZ-100, 上海一恒科学仪器); 偏光显微镜 (MXP-260, 北京精密仪器有限公司); 恒温培养箱 (SN-DH-60B, 尚仪科学仪器有限公司); 扫描电子显微镜 (Phenom Pro,

荷兰 Phenom World); 台式衍射仪 (Miniflex 600, 日本理学株式会社); 差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析仪 (DSC3500, 德国耐驰); 傅立叶变换红外光谱仪 (Great20, 天津中科瑞捷科技); 核磁共振波谱仪 (Bruker Avance III HD 400 MHz, 美国布鲁克科技有限公司); 斑马鱼行为分析系统 (ZebraBox 5.33, 法国 ViewPoint 公司)。

汉森溶解度参数 (Hansen solubility parameters, HSP)　通过 PubChem 数据库获取丁香酸与罗通定的 SMILES 式, 利用 HSPiP5.1.03 软件 DIY 模块中的 Reactions 功能, 输入上式获得色散溶解度参数 (δ_d)、极性溶解度参数 (δ_p)、氢键溶解度参数 (δ_h) 和总溶解度参数 (δ_t)。按下列公式分别计算总溶解度差异参数 ($\Delta\delta t$)、三维差异参数 ($\Delta\bar{\delta}$) 及相对能量差参数 (R_a)。

$$\delta_t = \left(\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2\right)^{0.5} \tag{1}$$

$$\Delta\delta_t = \left|\delta_2 - \delta_1\right| \tag{2}$$

$$\Delta\bar{\delta} = \left[\left(\delta_{d2} - \delta_{d1}\right)^2 + \left(\delta_{p2} - \delta_{p1}\right)^2 + \left(\delta_{h2} - \delta_{h1}\right)^2\right]^{0.5} \tag{3}$$

$$R_a = \left[4\left(\Delta\delta_d\right)^2 + \left(\Delta\delta_p\right)^2 + \left(\Delta\delta_h\right)^2\right]^{0.5} \tag{4}$$

分子对接　从 PubChem 数据库获取 HD、RA 的三维结 SDF 格式文件, 利用 OpenBabel 将其转换为 mol2 格式。为全面探究 HD 与 RA 之间的相互作用, 本研究采用双向对接策略: 分别将 HD 与 RA 依次设定为受体和配体进行分子对接。在 AutoDock-Tools 中, 对每个对接方案中的配体分子进行可扭转键与扭转中心的检测, 并将处理后的受体与配体保存为 pdbqt 格式。随后, 利用 AutoDockTools-1.5.7 进行对接计算, 通过“Grid Box”将整个受体分子覆盖, 每个方向的对接运算均设置为 50 次, 选取结合能最低者导入 PyMOL-2.6.2 进行可视化分析。

溶剂挥发法制备蒸发物　按摩尔比精密称取适量 HD 与 RA, 加适量甲醇使完全溶解, 转入培养皿中覆膜, 置通风橱内自然挥干, 即得 HD∶RA (X∶Y) 共蒸发物。同法制备 HD 或 RA 的重结晶物, 作为对照样品。

研磨法制备物理混合物　按摩尔比称取适量 HD 与 RA 置于玛瑙研钵中轻轻研磨至完全混匀, 即得物理混合物 (physical mixture, PM)。

形态学观察　上述样品分别经光学显微镜和偏光显微镜检测; 并对镀金样品进行扫描电子显微镜分析。

粉末 X-射线衍射分析　分别测试 HD、RA、PM-1∶2 (PM 中 HD∶RA 为 1∶2) 及 CAM-1∶2 (CAM 中 HD∶RA 为 1∶2) 的 X-射线衍射 (powder X-ray diffraction, PXRD) 图谱, 采用 Cu Kα 辐射 (λ = 1.541 8 Å), 数据 2θ 范围为 5°～90°, 步长 0.02°, 扫描速率 5°·min^{-1}。

DSC 分析　分别取少量样品 (3～5 mg) 考察热力学行为。以空白坩埚为参比, 升温速率 10 ℃·min^{-1}, 测试温度范围 25～300 ℃, 氮气吹扫与保护流速分别为 40、60 mL·min^{-1}。

傅里叶变换红外光谱分析　分别取粉末样品与适量溴化钾混合均匀压片, 在 4 000～400 cm^{-1} 范围扫描。

紫外可见光谱分析　精密称取适量样品置 10 mL 量瓶中。加水溶解并定容, 取适量稀释至合适浓度, 在 200～500 nm 范围内扫描。

^{1}H NMR 分析　将约 10 mg 样品溶于 0.6 mL CD_3OD 中, 在 298 K 下记录 ^{1}H NMR 谱图, 扫描 32 次, 光谱宽度 12 ppm, 弛豫延迟时间 1.0 秒。利用 MestReNova 15.0 软件 (Mestrelab Research) 处理数据, 化学位移以 TMS 残余溶剂信号 0 ppm 为参考。

摇瓶法测定平衡溶解度　分别测定原料药、物理混合物、共无定形物中 HD 和 RA 在水、pH 5.8 和 6.8 PBS 中的饱和溶解度。取介质置 5 mL EP 管中, 加入过量粉末样品, 密封后置 37 ℃、120 r·min^{-1} 恒温振荡箱内持续振摇 72 h; 取出后离心 (4 000 r·min^{-1}, 10 min), 立即取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 适当稀释, 以 HPLC 法测定药物含量, 计算溶解度并进行比较。

桨法测定体外溶出度　参照《中华人民共和国药典》2020 版四部溶出度与释放度法进行试验。控制温度 37 ℃、转速 50 r·min^{-1}。分别在 1、3、5、10、15、20、25、30、60 min 时取 2 mL 样液, 并及时补充等温等量空白溶出介质。样液立即用 0.22 μm 滤膜滤过, 以 HPLC 测定浓度, 计算累计溶出率。

粉末引湿性的测定　取干燥西林瓶精密称定重量 (m_1), 加入粉末样品后再次精密称定重量 (m_2); 室温条件下敞口置于相对湿度 (75 ± 1)%的干燥器中 (饱和氯化钠溶液), 于第 10 天精密称定重量 (m_3)。引湿率 = $(m_3 - m_2)/(m_2 - m_1) \times 100\%$, 并据此判断吸湿特性: 潮解 (吸收足量水分形成液体), 极具引湿性 (≥ 15%), 有引湿性 (> 2% 且< 15%), 略有引湿性 (> 0.2% 且< 2%), 无或几乎无引湿性 (< 0.2%)[24]。

斑马鱼助眠药效及药物协同作用研究　斑马鱼失眠模型的建立及最大耐受浓度 (maximum tolerance concentration, MTC) 的确定。

分组及给药　选取发育正常的 5 dpf 斑马鱼分组处理如下: 空白组 (blank) 以不含药物的胚胎培养液正常饲养; 模型组 (model) 以 20 μmol·L^{-1} 咖啡因溶液处理 24 h; 褪黑素组 (melatonin, MT) 在模型组的基础上同时给予 40 μmol·L^{-1} 褪黑素溶液处理 24 h; 给药组分为高

(40 μg·mL^{-1} CAM、11.32 μg·mL^{-1} HD、28.68 μg·mL^{-1} RA)、中 (20 μg·mL^{-1} CAM、5.66 μg·mL^{-1} HD、14.34 μg·mL^{-1} RA)、低 (10 μg·mL^{-1} CAM、2.83 μg·mL^{-1} HD、7.17 μg·mL^{-1} RA) 3个浓度。

行为学指标测试 选取处理24 h后的斑马鱼 (6 dpf) 逐一放入96孔板中, 每孔1尾, 每组10尾。置于行为学暗箱中, 光照 (10%) 适应1 h, 在安静环境下通过行为仪采集数据。实验时间持续6 h, 白昼3 h (光照10%) 和黑夜3 h (黑暗) 交替、3 min线性过渡, 每隔15 s统计1次数据。

数据统计 睡眠行为检测结束后, 以TSV格式导出原始数据, 手动转换为Excel格式, 保留编号、时间序列、光照刺激条件及行为学检测9项指标[25], 运用R语言进行数据再处理。15 s内均为慢速运动或运动时间不超过0.1 s认定为睡眠状态[26]。

协同药效评估 以觉醒活动量作为评估睡眠改善的指标, 根据公式 (5) 计算改善睡眠有效率 (effective rate, ER, %)[27]。并借助Compusyn1.0软件计算协同指数 (combination index, CI) 值评估协同效应[28,29]。

$$ER = (D_0 - D_1)/D_0 \times 100\% \quad (5)$$

其中, D_0和D_1分别指模型组和药物处理组的斑马鱼觉醒活动量。

统计学方法 采用GraphPad Prism 9.5对数据进行统计分析, 采用one-way ANOVA分析组间差异, $P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

结果与讨论

1 豆腐果苷与迷迭香酸分子间的潜在相互作用预测

1.1 HSP解析 表1显示, HD与RA在色散力 (δ_d) 上的差异极小, 在极性作用 (δ_p) 和氢键作用 (δ_h) 上虽存在一定差距, 但整体总溶解度参数 (δ_t) 接近。两者之间的总参数距离 ($\Delta\delta_t$) 小于7 Mpa$^{0.5}$[30], 而三维汉森距离 (R_a) 小于10 Mpa$^{0.5}$[31], 表明二者在分子层面具有一定的相容性。

1.2 潜在分子间相互作用力 如图2所示, RA的两个苯环与HD芳香环之间呈现π-π堆叠 (深色虚线), 这种非共价的疏水性芳香相互作用常有助于形成稳定的复合体系; RA酚羟基与HD羟基之间形成氢键 (浅色虚线), 属于典型的极性作用力。上述两类相互作用可能在分子层面上增强两药的互溶性, 促进复合体系形成并维护其结构稳定性。

Table 1 HSP data related to HD and RA

Parameter	HD	RA
δ_d	18.2	18.1
δ_p	11.5	4.4
δ_h	15.3	8.9
δ_t	26.4	20.6
$\Delta\delta_t$	5.8	
$\Delta\bar{\delta}$	9.6	
R_a	9.6	

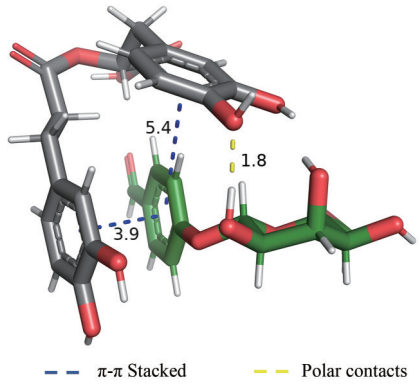


Figure 2 Types and locations of potential intermolecular interaction forces between HD and RA

2 形态结构

图3表明, HD原料呈块状晶体, 经甲醇重结晶后转变为针棒状晶体簇; RA则为细小的不规则状, 重结晶后转变为片状; 二者在PLM下均可见明显双折射现象[32], 其物理混合物PM-1∶2保留了部分原晶体外形及双折射特征。CAM为黄棕色、显微镜下呈透明块片状, 未见显著双折射信号, SEM下呈层片状堆叠态。

3 粉末固态表征

3.1 粉末X-射线衍射图 如图4A所示, RA (2θ = 12.54°、13.66°、14.98°、19.52°、20.14°、26.62°) 和HD (2θ = 12.38°、17.34°、18.02°、20.32°、22.62°、32.18°) 原料均有多处特征衍射峰, 其峰强度在物理混合物中显著减弱, 而在蒸发物中则完全消失、仅余一个宽化的弥散衍射环[33]。结合上述PLM结果, 可判定该共蒸发物为无定形态。

3.2 差示扫描量热图 如图4B, RA和HD分别在176.4、204.8 ℃显示尖锐的吸热熔融峰, 符合其晶体特性; 其在物理混合物中减弱、展宽并向低温位移, 表明加热过程可能存在分子间相互作用; 而在共蒸发物中则完全消失, 仅在40.7 ℃处观察到一个单一的玻璃化转变温度。综合上述PXRD结果, 确认所得共蒸发物为单相的二元共无定形体系[34]。

3.3 傅里叶变换红外光谱 与原料药相比, CAM谱图 (图4C) 存在显著变化: RA和HD位于1 606和1 602 cm^{-1}的苯环骨架νC=C振动峰发生红移, 合并出现在1 601 cm^{-1}处; HD芳香酮的νC=O振动峰由1 670移至1 679 cm^{-1}, 而RA羧基的νC=O振动峰则由1 705红移至1 679 cm^{-1}, 同时, HD的羟基βO-H面内弯曲振

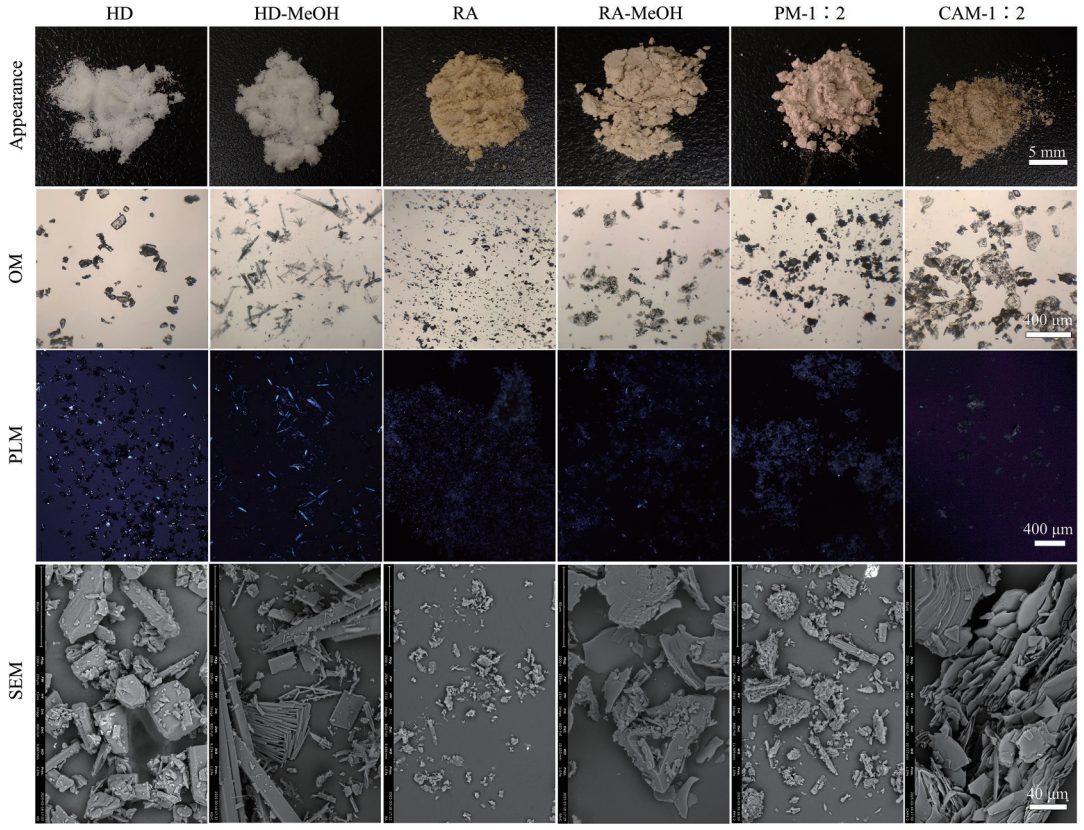


Figure 3　Appearance, optical microscopy (OM), polarized light microscopy (PLM) and scanning electron microscopy (SEM) images of HD, RA, PM and CAM. HD-MeOH: Helicid methanol-recrystallized forms; RA-MeOH: Rosmarinic acid methanol-recrystallized forms; PM: Physical mixture; CAM: Co-amorphous mixture

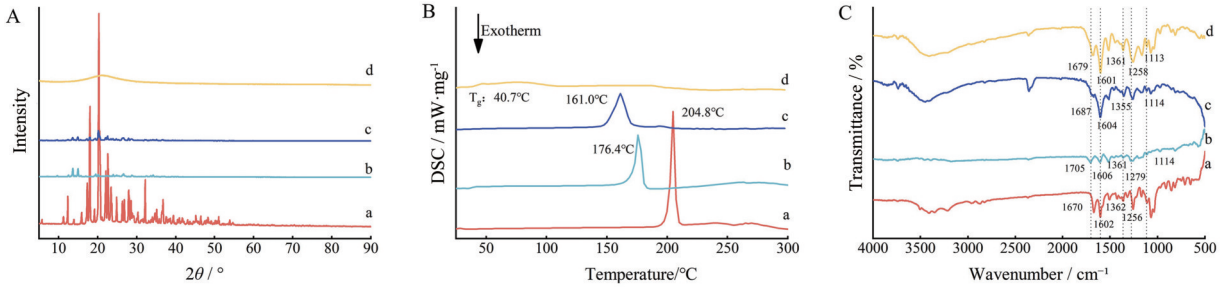


Figure 4　Solid-state characterization of the pure compounds, their PM, and CAM. A: PXRD patterns; B: DSC thermograms; C: Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) spectra. a: HD; b: RA; c: PM; d: CAM

动峰也从1 362红移至1 361 cm^{-1}。根据苯环振动峰的红移合并、两组分羰基峰 (HD νC=O蓝移, RA νC=O红移) 向相近波数的趋近, 以及羟基振动峰的红移, 可推测CAM中的HD芳香酮羰基与RA羧基之间可能形成分子间氢键, 同时两药苯环间可能存在π-π堆积。

4　液态表征

4.1　紫外可见光谱　如图5A, RA在333 nm处呈酚羟基苯环与共轭羧酸系统之间的长程$\pi\rightarrow\pi^*$跃迁吸收, 其在CAM中轻微红移至334 nm、伴随谱带显著展宽, 表明形成更广泛电子离域体系; HD在269 nm处呈芳香酮骨架的$\pi\rightarrow\pi^*$跃迁特征, 在CAM中则未见。结合红外光谱分析, 推测HD芳香酮羰基与RA羧基间存在氢键作用, 表现为羰基振动峰位移一致; 同时两者苯环结构可能形成π-π堆积, 增强了电子离域程度, 导致跃迁能级整体下降。

4.2　核磁氢谱　如图5B, HD于δ = 9.76处呈现一尖锐单峰 (s, 1H), 归属为芳香酮羰基氢 (-CHO); 在δ = 7.78和7.14处可见对位取代苯环的芳香氢信号 (各2H, d, J = 8.8 Hz)。上述信号在CAM的谱图中完全消失或显著减弱, 提示其芳香氢可能参与分子间π-π堆

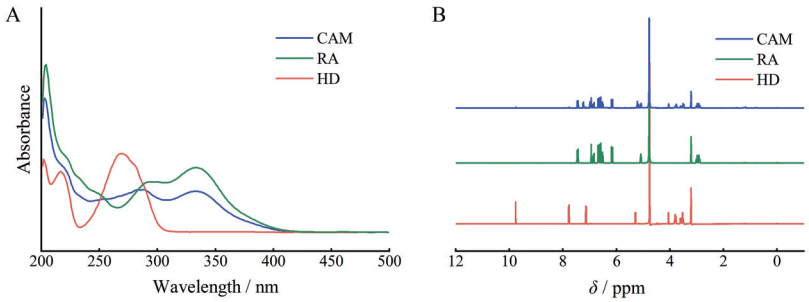


Figure 5 Liquid-state spectroscopic characterization of HD, RA and CAM. A: Ultraviolet-visible spectroscopy absorption spectra; B: ^{1}H NMR spectra

积, 或被包埋于共混分子网络中。尽管RA芳香氢信号 (δ 6.5～7.5) 得以保留, 但峰形展宽且部分重叠, 反映其氢环境亦受到显著扰动。HD中羰基氢信号的消失, 可能参与了与RA羧基或酚羟基的分子间氢键形成这些变化证实在CAM体系中HD与RA通过π-π堆积和氢键作用协同实现分子间稳定化, 为共无定形体系的形成提供了分子层面的直接实验证据。

5 平衡溶解度

如表2所示, 微溶 (HD) 和略溶 (RA) 原料在不同水性介质中的溶解度均较低, 与文献一致[16,35]; 在纯水中, CAM体系HD和RA溶解度分别提高了4.7倍 (6.18→28.93 μg·mL^{-1}) 和5.1倍 (10.21→52.18 μg·mL^{-1}), PM则影响不明显。表明共无定形策略能够有效破坏原料晶格能, 提高体系分子间的自由度, 从而形成热力学上更稳定的过饱和溶液状态[36]。两个药物分子间氢键和π-π堆积可抑制重结晶, 维持较高的溶解度水平。

Table 2 Equilibrium solubility of each sample. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^*P$ < 0.05 *vs* HD or RA; $^\#P$ < 0.05 *vs* HD or RA in PM

Sample		Solubility/μg·mL^{-1}		
		Water	PBS (pH 6.8)	PBS (pH 5.8)
HD		6.18 ± 0.20	7.67 ± 0.05	7.50 ± 0.01
RA		10.21 ± 1.00	13.41 ± 0.11	12.29 ± 0.72
PM	HD	11.69 ± 0.01	12.23 ± 0.03	9.30 ± 0.01
	RA	8.12 ± 0.30	15.83 ± 0.26	15.26 ± 0.81
CAM	HD	28.93 ± 0.06$^{*\#}$	27.81 ± 0.08$^{*\#}$	27.47 ± 0.02$^{*\#}$
	RA	52.18 ± 0.07$^{*\#}$	65.20 ± 2.13$^{*\#}$	56.49 ± 0.21$^{*\#}$

6 体外溶出行为

如图6所示, HD或RA在3种介质中快速逐步溶出, 10 min累计溶出率超过90%; 而CAM仅在第1 min内溶出略高于原料药, 此后趋于平缓且最终溶出量显著低于原料药。值得注意的是, 在溶出过程中CAM出现了明显的“凝胶化现象”(插图中黄色团块), 这与近期研究类似[37]。HD与RA分子在CAM中通过强烈的氢键和π-π堆积相互作用形成了致密的非晶态网络; 当接触水性介质时, 水的增塑作用显著降低了体系玻璃化转变温度 (T_g), 促使其进入过冷液态, 进而形成高黏弹性的凝胶层[37]。该凝胶层充当扩散屏障, 阻碍水分子向药物内部渗透和药物有效分散, 导致药物在介质表面聚集, 严重限制了内部药物的持续释放与水化; 导致CAM虽初始阶段表层药物可快速溶出, 但最终整体溶出度反而低于其晶态原料药。此结果揭示了强烈的分子间相互作用在提升热力学溶解度的同时, 可能通过诱导凝胶化而损害药物在溶出过程中的动力学释放性能。

7 吸湿性

如表3所示, HD几乎无引湿性, RA与CAM均具有引湿性但差异不显著, CAM吸湿性略高可能源于其晶格结构的破坏使其更易吸附水分子。

Table 3 Investigation results of hygroscopicity of each sample. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^*P$ < 0.05 *vs* CAM; ns: No significant difference

Sample	Moisture absorption rate/%	Hygroscopicity
HD	0.09 ± 0.21*	Non-hygroscopic
RA	3.36 ± 0.08^{ns}	Hygroscopic
CAM	3.60 ± 0.25	Hygroscopic

8 对斑马鱼模型的协同助眠效应

在斑马鱼睡眠行为模型中, 总睡眠时间与活动量是衡量睡眠质量与药物干预效果的关键指标[38]。如图7所示, 与空白组相比, 模型组睡眠总时间显著减少 (图7A)、觉醒活动量显著升高 (图7B), 说明成功诱导出类似失眠的行为特征。褪黑素处理可显著提高总睡眠时间和睡眠回合长度 (图7A、C), 同时显著降低觉醒活动量 (图7B), 体现出促眠与巩固睡眠结构的双重作用。单独使用HD或RA在测试浓度下均未显著改善睡眠时长或活动量, 提示其单独使用缺乏有效的睡眠促进作用。

CAM与褪黑素组比较无显著差异, 且睡眠潜伏期呈下降趋势 (图7D), 提示其助眠效果可与褪黑素相当, 且联用HD与RA潜在增强助眠效果。由图8可知, 当CAM处于中剂量和低剂量时CI值均小于0.7, 提示

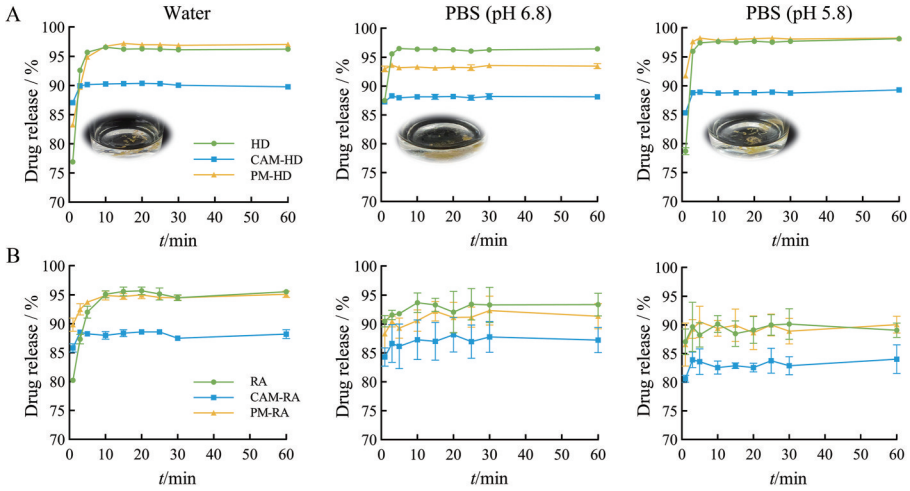


Figure 6　*In vitro* dissolution profiles of the pure compounds, their PM, and CAM in various media. A: Dissolution profile of HD; B: Dissolution profile of RA. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

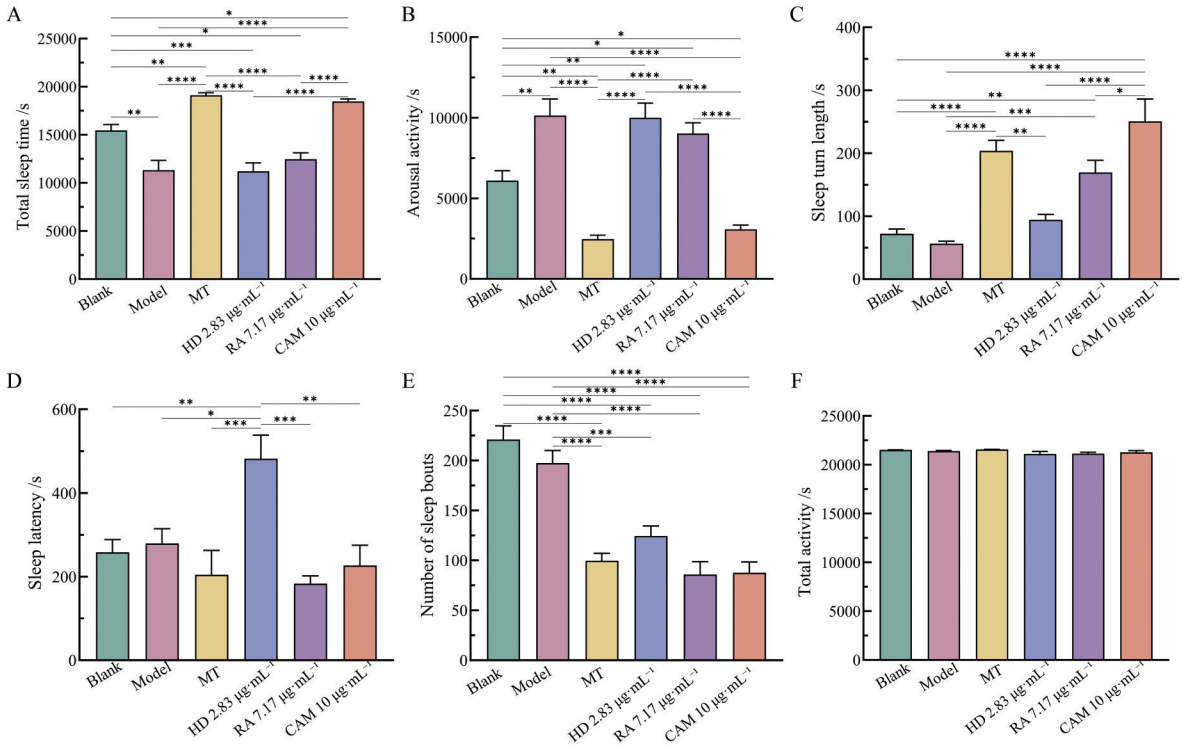


Figure 7　The improvement effect of drug treatments on sleep behaviors in zebrafish. A: Total sleep time; B: Arousal activity; C: Sleep turn length; D: Sleep latency; E: Number of sleep bouts; F: Total activity. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

确有协同效应; 而高剂量40 μg·mL^{-1}时CI值为1.284, 则属中度拮抗[28]。提示临床宜控制小剂量联用, 在提高促眠功效、改善患者顺应性的同时, 有利于避免高剂量潜在的毒副作用。

结论

本研究采用溶剂挥发法制得HD-RA共蒸发物并确认为无定形态, 理论计算与实验分析均表明二者存在分子间氢键和π-π堆积。共无定形体系的形成显著提高了两组分的水溶性, 但因“自凝胶化”效应而溶出受阻; 中低剂量的CAM在斑马鱼模型中显示协同助眠效应, 提示其具有一定的应用潜力。然而, 本研究仍存在以下局限: 一方面, 未系统考察共无定形体系的长期物理稳定性; 另一方面, 缺乏体内药代动力学研究, 未能验证其生物利用度是否提升。基于此, 后续研究将重点围绕处方工艺优化、加速稳定性评价, 以及在大

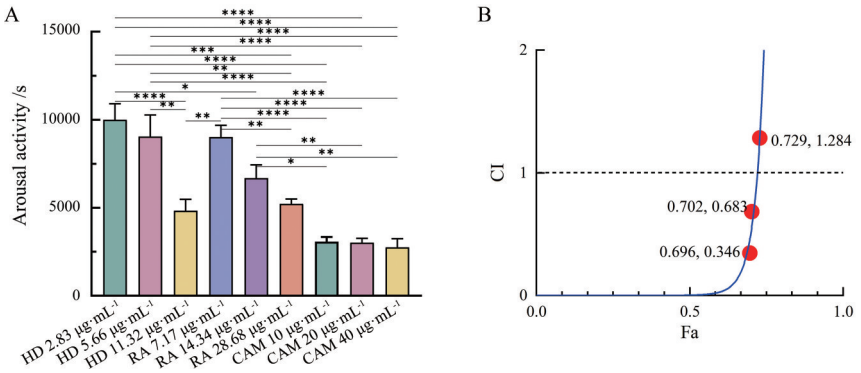


Figure 8 Analysis of arousal activity and synergistic interaction in zebrafish treated with HD, RA, and CAM. A: Arousal activity across different treatment groups; B: Combination index (CI) plot quantifying the synergistic effect of the CAM combination. n = 10, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P <$ 0.01, $^{****}P <$ 0.000 1

鼠等哺乳动物失眠模型中的体内药效与药动学综合评价展开, 以推动该体系向临床应用转化。本研究为药物–药物共无定形技术的深入研究和拓展应用提供了支持, 也为同时改善中药难溶性组分的体内外性能提供了思路, 对创新中药复方制剂的研发具有参考价值。

作者贡献: 陈龙负责方法论、数据分析及初稿撰写; 王皎负责数据分析、方法论; 张童负责分子对接、初稿撰写; 柯瑾负责文献检索与督导工作; 刘晨负责修改、校对, 方法学; 王文苹负责概念化设计、资金筹措、撰写及审校。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Wang R, Han J, Jiang A, et al. Involvement of metabolism-permeability in enhancing the oral bioavailability of curcumin in excipient-free solid dispersions co-formed with piperine [J]. Int J Pharm, 2019, 561: 9-18.

[2] Zhang J, Guo M, Luo M, et al. Advances in the development of amorphous solid dispersions: The role of polymeric carriers [J]. Asian J Pharm Sci, 2023, 18: 100834.

[3] Chavan RB, Thipparaboina R, Kumar D, et al. Co amorphous systems: A product development perspective [J]. Int J Pharm, 2016, 515: 403-415.

[4] Chen H, Pui Y, Liu C, et al. Moisture-induced amorphous phase separation of amorphous solid dispersions: Molecular mechanism, microstructure, and its impact on dissolution performance [J]. J Pharm Sci, 2018, 107: 317-326.

[5] Kasten G, Lobo L, Dengale S, et al. *In vitro* and *in vivo* comparison between crystalline and co-amorphous salts of naproxen-arginine [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2018, 132: 192-199.

[6] Wu XJ, Pang ZT, Yang ST, et al. Improvement of water solubility and solubilization mechanism of puerarin by co-amorphous technology [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 585-592.

[7] Chen J, Ormes JD, Higgins JD, et al. Impact of surfactants on the crystallization of aqueous suspensions of celecoxib amorphous solid dispersion spray dried particles [J]. Mol Pharm, 2015, 12: 533-541.

[8] Shen YJ, Qin L, Heng WL, et al. Formation of tadalafil-dapoxetine co-amorphous system and evaluation of its dissolution and stability [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2018, 53: 1162-1168.

[9] Dengale SJ, Ranjan OP, Hussen SS, et al. Preparation and characterization of co-amorphous ritonavir-indomethacin systems by solvent evaporation technique: Improved dissolution behavior and physical stability without evidence of intermolecular interactions [J]. Eur J Pharm Sci, 2014, 62: 57-64.

[10] Wang J, Zhang C, Wang XY, et al. Preparation, characterization and antibacterial activity evaluation of berberine-magnolol co-amorphous system [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2024, 44: 2620-2627.

[11] Yang S, Su ZT, Yang M. Determination of helicid in *Helicia erratica* Hook. f. by HPLC [J]. Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术), 2010, 5: 305-307.

[12] Wen H, Lin C, Que L, et al. Synthesis and biological evaluation of helicid analogues as novel acetylcholinesterase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2008, 43: 166-173.

[13] Zhang WM, Li LJ, Tao J, et al. Anti-thrombotic effect of helicid and its role in reducing inflammatory factors in brain [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2021, 30: 14-17.

[14] Brull R, Hadzic A, Reina MA, et al. Pathophysiology and etiology of nerve injury following peripheral nerve blockade [J]. Reg Anesth Pain Med, 2015, 40: 479-490.

[15] Liu PG, Li J, Na DQ, et al. Early neurobehavioral toxicity of helicid on offspring of rats [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2002, 04: 38-40.

[16] He JC, Lang LW, Zhang Q, et al. Determination of physico-chemical constants of helicid [J]. China Pharm (中国药房), 2010, 21: 23-25.

[17] Liu H, Yang S, Chen L. Research progress on antitumor effect of

rosmarinic acid and its mechanism [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2025, 47: 155-162.

[18] Baek J, Lee MG. Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology [J]. Redox Rep, 2016, 21: 164-169.

[19] Long MM, Cheng X, Zhao ZD, et al. Research progress on pharmacological effects and delivery systems of rosmarinic acid [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2023, 54: 3715-3724.

[20] Cai K, Huang SR, Gao FF, et al. Research progress on the mechanism of rosmarinic acid in the prevention and treatment of cardiovascular diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 12-21.

[21] Zhou C, Hu YF, Zhang Y, et al. Study on chemical characterization and sleep-improvement function of *Prunella vulgaris* L. based on the functional components [J]. Food Res Int, 2024, 192: 114737.

[22] Kwon YO, Hong JT, Oh KW. Rosmarinic acid potentiates pentobarbital-induced sleep behaviors and non-rapid eye movement (NREM) sleep through the activation of GABA(A)-ergic systems [J]. Biomol Ther (Seoul), 2017, 25: 105-111.

[23] Hu Z, Oh S, Ha TW, et al. Sleep-aids derived from natural products [J]. Biomol Ther (Seoul), 2018, 26: 343-349.

[24] Zeng HL, Jiang QY, Zhao GW, et al. Improvement of physical stability and dissolution of baicalin by co-amorphous technology with puerarin and its mechanism [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 6423-6430.

[25] Liang XM. Study on the Effect of Guigan Longmu Decoction and Its Analogous Prescriptions on Sleep Rhythm in Zebrafish Insomnia Model Based on Model Organism Platform (基于模式生物平台研究桂甘龙牡汤类方对斑马鱼失眠模型睡眠节律的影响) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021.

[26] He RJ, He D, Zhang AQ, et al. Study on the mechanism of Ganoderma lucidum extract improving sleep in zebrafish [J]. J Zhejiang Univ Technol (浙江工业大学学报), 2023, 51: 572-580.

[27] Yu X, Zhao ZQ, Wu HQ, et al. Sleep-promoting effect of Wa medicine *Polygala tenuifolia* Willd. alcohol extract on zebrafish [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2023, 39: 89-94.

[28] Checkmahomed L, Padey B, Pizzorno A, et al. *In vitro* combinations of baloxavir acid and other inhibitors against seasonal influenza A viruses [J]. Viruses, 2020, 12: 1139.

[29] Ren YC, Yang BY, Wang J, et al. Research and development progress in combination therapy with anti-influenza virus drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 884-894.

[30] Mohammad MA, Alhalaweh A, Velaga SP. Hansen solubility parameter as a tool to predict cocrystal formation [J]. Int J Pharm, 2011, 407: 63-71.

[31] Greenhalgh DJ, Williams AC, Timmins P, et al. Solubility parameters as predictors of miscibility in solid dispersions [J]. J Pharm Sci, 1999, 88: 1182-1190.

[32] Li W, Song J, Li J, et al. Co-amorphization of atorvastatin by lisinopril as a co-former for solubility improvement [J]. Int J Pharm, 2021, 607: 120971.

[33] Myślińska M, Stocker MW, Ferguson S, et al. A comparison of spray-drying and co-precipitation for the generation of amorphous solid dispersions (ASDs) of hydrochlorothiazide and simvastatin [J]. J Pharm Sci, 2023, 112: 2097-2114.

[34] Chen X, Li D, Zhang H, et al. Co-amorphous systems of sinomenine with nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A strategy for solubility improvement, sustained release, and drug combination therapy against rheumatoid arthritis [J]. Int J Pharm, 2021, 606: 120894.

[35] Chen XY. Characterization of the Overall Pharmaceutical Properties of Salvianolic Acid Components and Establishment of Their Drug Delivery Units (丹酚酸组分整体药剂学性质的表征及其释药单元的建立) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2014.

[36] Chen J, Li H, Li X, et al. Co-amorphous systems using epigallocatechin-3-gallate as a co-former: Stability, *in vitro* dissolution, *in vivo* bioavailability and underlying molecular mechanisms [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2022, 178: 82-93.

[37] Han J, Li L, Yu Q, et al. Self-gelation involved in the transformation of resveratrol and piperine from a co-amorphous system into a co-crystal system [J]. CrystEngComm, 2022, 24: 5733-5747.

[38] Yao C, Wang Z, Jiang H, et al. Ganoderma lucidum promotes sleep through a gut microbiota-dependent and serotonin-involved pathway in mice [J]. Sci Rep, 2021, 11: 13660.