

基于“药辅合一”的甜菊素-隐丹参酮自胶束化固体分散体制备、表征及体内评价

尚丹¹, 张广辉¹, 李晓婷¹, 李娟¹, 李果¹, 房伟^{2*}

1. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451150

2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 制备甜菊素-隐丹参酮自胶束化固体分散体 (steviosin-cryptotanshinone self-micelle solid dispersion, Ste/Cry-SMSD), 考察其口服生物利用度和降血糖作用。方法 采用 Ste/Cry-SMSD 自组装胶束的包封率和载药量为考察指标, 使用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Ste/Cry-SMSD 处方工艺。X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法分析隐丹参酮在 Ste/Cry-SMSD 粉末中的晶型, 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 研究结合机制, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Ste/Cry-SMSD 自组装胶束的微观形貌, 透析袋法考察 Ste/Cry-SMSD 在模拟胃、肠液中释药情况。以隐丹参酮原料药为参考, 考察 Ste/Cry-SMSD 相对口服生物利用度。建立大鼠糖尿病模型, 以隐丹参酮原料药为参考, 评价 Ste/Cry-SMSD 降血糖药效和口服糖耐量。结果 Ste/Cry-SMSD 最佳处方: 甜菊素质量浓度为 2.70 mg/mL, 制备温度为 52.0 °C, 搅拌时间为 60.00 min。Ste/Cry-SMSD 自组装形成胶束的包封率为 (94.77±0.57)%, 载药量为 (8.11±0.06)%, 粒径为 (8.69±0.56) nm, ζ 电位为 (-16.19±0.92) mV。隐丹参酮和甜菊素可能以氢键结合在一起, 并以无定型形式存在于 Ste/Cry-SMSD 粉末中, Ste/Cry-SMSD 在模拟胃、肠液中释药行为符合 Weibull 模型。药动力学结果显示, Ste/Cry-SMSD 达峰浓度 (C_{max}) 为 (1 129.34±206.13) ng/mL, 半衰期 ($t_{1/2}$) 延长至 (4.15±0.82) h, 与隐丹参酮原料药相比相对口服吸收生物利用度提高至 6.11 倍。Ste/Cry-SMSD 显著增强了隐丹参酮降血糖药效、血糖调节能力及口服糖耐量。结论 Ste/Cry-SMSD 处方简单, 显著增加了隐丹参酮生物利用度, 并增强了其降血糖作用。

关键词: 隐丹参酮; 甜菊素; 自组装胶束; 药辅合一; Box-Behnken 设计-响应面法; 释药行为; 药动力学; 生物利用度; 降血糖作用

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)13-4621-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.007

Preparation, characteration and *in vivo* evaluation of steviosin-cryptotanshinone self-micellizing solid dispersions based on “combined drug-excipient” strategy

SHANG Dan¹, ZHANG Guanghui¹, LI Xiaoting¹, LI Juan¹, LI Guo¹, FANG Wei²

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To prepare steviosin-cryptotanshinone self-micelle solid dispersion (Ste/Cry-SMSD), and investigate oral bioavailability and hypoglycemic effects. **Methods** Encapsulation efficiency and drug loading of self-assembled micelles acted as evaluation indexes, the formulation of Ste/Cry-SMSD was optimized by Box-Behnken design-response surface method. Crystal form of cryptotanshinone in Ste/Cry-SMSD powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD), combining mechanism was studied by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), morphology of self-assembled micelles was observed by transmission electron microscopy (TEM) and drug release behaviors in simulated gastrointestinal fluid were also investigated by dialysis bag method. The relative oral bioavailability of Ste/Cry-SMSD was investigated in comparison with cryptotanshinone. Diabetic model was established,

收稿日期: 2025-01-22

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (24B310010); 河南省医学教育研究项目 (WJLX2024191); 教育部产学研合作协同育人项目 (230802175007047)

作者简介: 尚丹 (1983—), 汉族, 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向为临床药学与康复护理。E-mail: 25446795@qq.com

*通信作者: 房伟 (1980—), 汉族, 硕士, 副主任药师, 研究方向为医院药学及中药制剂新技术。E-mail: fw96909@126.com

and the glucose-decreasing effects and oral glucose tolerance of Ste/Cry-SMSD were compared with those of cryptotanshinone. **Results** Optimal formulation of Ste/Cry-SMSD: the steviosin concentration is 2.70 mg/mL, preparation temperature is 52.0 °C, and stirring time is 60.00 min. Encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of self-assembled micelles were $(94.77 \pm 0.57)\%$, $(8.11 \pm 0.06)\%$, (8.69 ± 0.56) nm and (-16.19 ± 0.92) mV, respectively. Cryptotanshinone and steviosin might be hydrogen-bonded and existed in the amorphous form in Ste/Cry-SMS powders. Drug release behaviors of Ste/Cry-SMSD in simulated gastrointestinal fluid were conformed to Weibull model. Pharmacokinetic results showed that C_{\max} of Ste/Cry-SMSD was increased to $(1\ 129.34 \pm 206.13)$ ng/mL, $t_{1/2}$ was prolonged to (4.15 ± 0.82) h. The relative bioavailability of Ste/Cry-SMSD was increased to 6.11-fold compared to cryptotanshinone. Ste/Cry-SMSD significantly enhanced glucose-decreasing effects, blood glucose regulation ability and oral glucose tolerance of cryptotanshinone. **Conclusion** Ste/Cry-SMSD prescription was simple, which significantly increased the relative oral bioavailability and enhanced the glucose-decreasing effects of cryptotanshinone.

Key words: cryptotanshinone; steviosin; self-assembled micelles; combined drug-excipient; Box-Behnken design-response surface method; drug release behavior; pharmacokinetic; bioavailability; hypoglycemic effects

隐丹参酮是从丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 中分离得到的一种二萜醌类化合物^[1], 外观呈橙红色结晶。研究证实隐丹参酮对降血糖、调血脂、降血压等心脑血管疾病以及中枢神经系统疾病均具有较强活性^[1-3], 具有较高的临床应用价值。课题组处方前研究发现, 隐丹参酮在 25 °C 水中的溶解度仅有 3.74 $\mu\text{g/mL}$, 极大地影响了其溶出度及体内吸收; 隐丹参酮油水分配系数为 3.44^[1], 属于生物药剂学分类系统中的 II 类药物, 在肠道内较易降解^[4], 大鼠口服吸收生物利用度仅有 2.01%^[5], 导致药效无法充分发挥。目前, 已报道的隐丹参酮新型制剂有纳米结构脂质载体^[6]、自微乳^[7]、滴丸^[8]等, 但纳米结构脂质载体和自微乳存在处方复杂、载药量低、含大量表面活性剂等缺陷; 滴丸口服后迅速崩解, 从而使药物暴露于肠道环境中, 可能会加剧隐丹参酮在肠道的降解。

固体分散体系使用亲水性材料为载体而制得的一种固体粉末^[9], 可极大增加药物溶解度、促进药物溶出、增加生物利用度等, 但固体分散体容易发生吸潮及老化现象, 可能影响药物体内吸收及药效。甜菊素主要存在于甜叶菊中, 属于天然表面活性剂, 使用安全性高。甜菊素不易吸潮^[10], 也可作为载体材料制备固体分散体^[11]。甜菊素结构中含亲水性的葡萄糖基和疏水性的萜糖苷配基, 甜菊素与药物形成固体分散体后继承了甜菊素两亲性特点, 在水中可自组装形成纳米胶束, 但目前鲜见采用甜菊素制备固体分散体的报道。另外甜菊素已被证实具有降血压、降血糖等活性^[12], 是一种典型的药辅两用材料。本研究结合甜菊素独特的物理特性和药理作用, 运用“药辅合一”理念^[13], 采用甜菊素作为载体, 将隐丹参酮制备成甜菊素-隐丹参酮自胶束化固体分散体(steviosin-cryptotanshinone self-micelle

solid dispersion, Ste/Cry-SMSD), 使用 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Ste/Cry-SMSD 处方工艺, 并对其溶解度、结合机制、晶型、口服吸收生物利用度及降血糖药效等进行评价, 期望为 Ste/Cry-SMSD 后续应用提供技术参考, 也为新型固体分散体研究提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国安捷伦公司; EV400 型旋转蒸发器, 北京莱伯泰科仪器股份有限公司; 85-2 型恒温磁力搅拌器, 上海达洛科学仪器有限公司; MSE125P-CE 型电子分析天平, 瑞士 Sartorius 仪器公司; Advance D8 型 X 粉末衍射仪, 瑞士 Bruker 仪器公司; GL-25MS 型高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; FIRXF100 型傅里叶红外光谱仪, 北京卓立汉光仪器有限公司; THZ-98A 型恒温振荡器, 上海一恒科学仪器有限公司; Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪, 英国 Malvern 公司; MDS-2008DS 型溶出仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; 12 号灌胃针, 北京索莱宝科技有限公司; DTU-2BN 型氮吹仪, 北京爱安姆科学仪器有限公司; 2EZ3-I 型血糖检测仪, 艾康生物技术有限公司。

1.2 材料

隐丹参酮对照品, 批号 110852-202206, 质量分数 98.0%, 中国食品药品检定研究院; 甜菊素 (药用辅料), 批号 YS20200517, 褚城市浩天药业有限公司; 隐丹参酮原料药, 批号 20220422, 质量分数 96.8%, 南京百慕达生物科技有限公司; 非诺贝特对照品, 批号 F129682, 质量分数 98.5%, 上海阿拉丁

化学生物试剂公司；葡萄糖（批号 20220516）、十二烷基磺酸钠（批号 20220512），国药集团化学试剂有限公司；溴化钾（光谱纯级，批号 P816702）、盐酸二甲双胍（批号 c10440628），上海麦克林生化科技有限公司；链脲佐菌素，批号 18896-74-2，北京博爱港生物技术有限公司。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠，雌雄兼具，体质量为（220±20）g，购自河南省动物实验中心，动物许可证号 SCXK（豫）2020-0001。动物实验遵循郑州工业应用技术学院有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则，伦理批准号为 DWLL-202403006。

2 方法与结果

2.1 Ste/Cry-SMSD 的制备

取隐丹参酮原料药，加入无水乙醇配制成质量浓度为 0.25 mg/mL 的隐丹参酮乙醇溶液，密封后备用。精密量取 20 mL 隐丹参酮乙醇溶液至茄形瓶中，加入一定量的甜菊素（药用辅料），于一定温度水浴中磁力搅拌一定时间（转速 600 r/min），即得澄清、透明的红色溶液。于温度为 50 °C 水浴中减压旋蒸除去无水乙醇，收集红色固体粉末，即得 Ste/Cry-SMSD。同法制备不含隐丹参酮的阴性样品（steviosin self-micelle solid dispersion, Ste-SMSD）。

2.2 隐丹参酮定量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 流动相为甲醇-0.2%甲酸水溶液（65：35）；体积流量为 1.0 mL/min；色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；检测波长为 270 nm；进样体积为 10 μL；柱温为 30 °C。理论塔板数以隐丹参酮峰计算不低于 6 500。

2.2.2 隐丹参酮对照品溶液的配制 精密称取隐丹参酮对照品适量，加甲醇配制成隐丹参酮质量浓度为 100.00 μg/mL 对照品溶液。

2.2.3 Ste/Cry-SMSD 供试品溶液的制备 精密称取 Ste/Cry-SMSD 粉末 10 mg，置于 100 mL 量瓶中，加甲醇溶解后稀释定容。精密吸取 1 mL 定容后溶液至 10 mL 量瓶中，加甲醇-0.2%甲酸水溶液（65：35）稀释定容即得 Ste/Cry-SMSD 供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 吸取适量“2.2.2”项下对照品溶液，采用甲醇稀释配制成质量浓度分别为 8.00、4.00、2.00、0.50、0.10、0.05 μg/mL 的系列隐丹参酮对照品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定各质量浓度（X）的峰面积（Y），进行线性回归，得隐丹参酮标准曲线的回归方程为 $Y=24.1179X+$

1.1586 ， $r=0.9999$ ，结果表明隐丹参酮在 0.05~8.00 μg/mL 存在良好的线性关系。

2.2.5 专属性考察 取阴性样品，按照“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液，另取 Ste/Cry-SMSD 供试品溶液和隐丹参酮对照品溶液，分别按照“2.2.1”项下色谱条件进样检测，结果见图 1，结果表明隐丹参酮色谱峰不受其他杂质干扰，专属性较高。

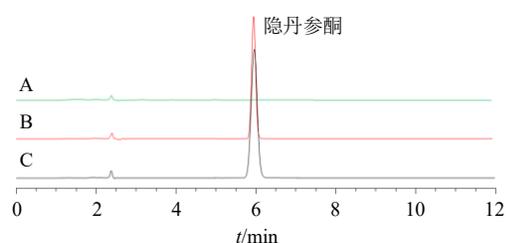


图 1 阴性样品溶液 (A)、Ste/Cry-SMSD 供试品溶液 (B) 和隐丹参酮对照品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of negative sample solution (A), Ste/Cry-SMSD sample solution (B) and cryptotanshinone reference substance solution (C)

2.2.6 精密度考察 分别取 8.00、2.00、0.05 μg/mL 隐丹参酮对照品溶液，分别连续测试 6 次，计算得隐丹参酮峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.60%、0.78%；各质量浓度每天测试 1 次，连续测试 6 d，计算得隐丹参酮峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.44%、0.28%；结果表明日内、日间精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 取 Ste/Cry-SMSD 供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定隐丹参酮峰面积，计算得其峰面积的 RSD 为 0.69%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性考察 取同一份 Ste/Cry-SMSD 粉末，按照“2.2.3”项下方法制备 Ste/Cry-SMSD 供试品溶液 6 份，进样测定隐丹参酮含量，计算得其质量分数的 RSD 为 1.07%，表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密称取 Ste/Cry-SMSD 粉末 5 mg，共 9 份，分别置于 9 个 100 mL 量瓶中，分为高、中、低 3 个水平组，按 Ste/Cry-SMSD 中的隐丹参酮含量 50%、100%、150% 加入隐丹参酮对照品，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，测定隐丹参酮含量，计算得隐丹参酮的平均加样回收率为 99.43%，RSD 为 1.40%，表明该方法可准确测定 Ste/Cry-SMSD 粉末中隐丹参酮含量。

2.3 Ste/Cry-SMSD 包封率和载药量的测定

隐丹参酮极难溶于水，而 Ste/Cry-SMSD 分散于水中后，可自组装形成纳米胶束混悬液，将混悬

液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，可除去未形成胶束的隐丹参酮，利用该性质来测定 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的包封率及载药量。取 Ste/Cry-SMSD 粉末分散于水中，过 0.22 μm 微孔滤膜除去隐丹参酮，测定续滤液中隐丹参酮质量 ($m_{\text{包封量}}$)，与隐丹参酮投药量 ($m_{\text{投药量}}$) 相比，计算 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的包封率。根据 Ste/Cry-SMSD 的总质量 ($m_{\text{总质量}}$)，计算 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的载药量。

$$\text{包封率} = m_{\text{包封量}} / m_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = m_{\text{包封量}} / m_{\text{总质量}}$$

2.4 单因素考察 Ste/Cry-SMSD 处方工艺

2.4.1 甜菊素质量浓度考察

固定隐丹参酮质量浓度为 0.25 mg/mL，制备温度为 50 °C，搅拌时间为 60 min 条件下，考察甜菊素质量浓度对 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的影响，结果见表 1。随着甜菊素质量浓度的增加，Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的包封率逐渐增加，可能是因为甜菊素质量浓度逐渐增加时，甜菊素用量也随之增加，为隐丹参酮提供了更多的结合位点^[14-15]，有利于甜菊素与隐丹参酮分子之间形成 Ste/Cry-SMSD，故其包封率增加。随着甜菊素质量浓度增加，Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的载药量呈逐渐下降趋势，可能是因为甜菊素用量达到一定程度后并不能使包封率进一步增加，继续增加甜菊素质量浓度，导致甜菊素用量过大，从而影响了载药量。Ste/Cry-SMSD 粒径随着甜菊素质量浓度增大而有所增大，但粒径均小于 10 nm。可见甜菊素质量浓度对 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的包封率和载药量影响较大，后续选择甜菊素质量浓度 2.0~3.0 mg/mL 进行优化。

2.4.2 制备温度考察

固定隐丹参酮质量浓度为 0.25 mg/mL，甜菊素质量浓度为 2.5 mg/mL，搅拌时间为 60 min 条件下对 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的影响，结果见表 2。随着制备温度的升高，Ste/Cry-

表 1 甜菊素质量浓度对 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of steviosin mass concentration on micellar formation of Ste/Cry-SMSD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甜菊素/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
1.5	72.89 ± 1.26	8.72 ± 0.24	7.86 ± 0.95
2.0	84.57 ± 1.40	8.54 ± 0.16	7.79 ± 1.11
2.5	95.69 ± 1.02	7.94 ± 0.19	8.06 ± 0.84
3.0	98.03 ± 0.95	6.96 ± 0.21	9.43 ± 0.93
3.5	99.74 ± 1.11	6.21 ± 0.13	9.69 ± 1.13

表 2 制备温度对 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of preparation temperature on micellar formation of Ste/Cry-SMSD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备温度/°C	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
30	43.56 ± 1.26	3.32 ± 0.11	8.99 ± 0.72
40	75.88 ± 1.40	6.22 ± 0.24	8.72 ± 0.85
50	96.13 ± 1.02	8.01 ± 0.17	7.84 ± 0.68
60	92.74 ± 0.95	7.61 ± 0.26	7.01 ± 1.34
70	88.45 ± 1.11	7.26 ± 0.19	6.48 ± 0.79

SMSD 中隐丹参酮的包封率和载药量均呈先增加后下降趋势，可能是因为隐丹参酮与甜菊素形成 Ste/Cry-SMSD 需要一定的温度环境^[11]，故温度较低时不利于 Ste/Cry-SMSD 的形成。制备温度过高时，可能导致隐丹参酮降解^[16]，同时高温也可能影响 Ste/Cry-SMSD 的结构稳定性^[11]，最终导致其包封率和载药量下降。不同制备温度下制备的 Ste/Cry-SMSD 粒径均小于 10 nm。可见制备温度对 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的包封率和载药量影响较大，后续选择制备温度 40~60 °C 进行优化。

2.4.3 搅拌时间考察

固定隐丹参酮质量浓度为 0.25 mg/mL，甜菊素质量浓度为 2.5 mg/mL，制备温度为 50 °C 条件下考察搅拌时间对 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的影响，结果见表 3。随着搅拌时间的增加，Ste/Cry-SMSD 包封率和载药量均呈先增加后下降趋势，可能是因为隐丹参酮与甜菊素形成 Ste/Cry-SMSD 需要一定的时间，但搅拌时间过长影响了隐丹参酮的稳定性^[17]，导致其含量下降，同时也可能对 Ste/Cry-SMSD 结构稳定性产生不利影响^[11]，进而导致其包封率和载药量下降。搅拌时间大于 35 min 时，Ste/Cry-SMSD 粒径均小于 10 nm，因此搅拌时间应控制在 35 min 以上。可见搅拌时间对 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的包封率和载药量有较大影响，故选择搅拌时间 35~85 min 继续优化。

表 3 搅拌时间对 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of stirring time on micellar formation of Ste/Cry-SMSD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10	36.98 ± 1.04	3.06 ± 0.13	10.19 ± 1.04
35	72.81 ± 0.95	6.02 ± 0.17	7.26 ± 0.72
60	94.96 ± 1.07	8.04 ± 0.25	7.14 ± 0.96
85	90.59 ± 0.82	7.48 ± 0.19	7.31 ± 0.85
110	86.07 ± 1.27	7.15 ± 0.18	7.23 ± 0.70

2.5 BBD-RSM 优化 Ste/Cry-SMSD 处方工艺

根据单因素考察结果,采用BBD-RSM优化Ste/Cry-SMSD 处方工艺。

2.5.1 试验设计方案 在隐丹参酮质量浓度为 0.25 mg/mL 的前提下,发现甜菊素质量浓度、制备温度和搅拌时间对 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮的形成胶束包封率和载药量影响较大,故分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 ,根据“2.4”项下考察结果, X_1 、 X_2 、 X_3 水平设置见表 4。由于 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的粒径一般小于 10 nm,故不再将粒径纳入优化指标,选择包封率和载药量 2 个指标分别作为因变量 Y_1 和 Y_2 。为了使 Ste/Cry-SMSD 形成的胶束同时具有较高的包封率和载药量,本研究采用综合评分法对 Ste/Cry-SMSD 处方工艺进行优化,由于包封率和载药量同等重要,权重系数均设置为 0.5,则综合评分=包封率/最大包封率 \times 0.5+载药量/最大载药

量 \times 0.5。

2.5.2 数学模型建立及方差分析 17 个试验组合及测试结果见表 4,综合评分方差分析结果见表 5。采用 Design Expert V13.0.1.1 版本软件建立综合评分的数学模型,综合评分二次多元回归方程为 $Y=0.980-0.051 X_1+0.033 X_2+9.875 \times 10^{-3} X_3+8.000 \times 10^{-3} X_1 X_2+0.039 X_1 X_3+1.500 \times 10^{-3} X_2 X_3-0.065 X_1^2-0.091 X_2^2-0.081 X_3^2$,数学模型 $P<0.000 1$,表明建立的综合评分数学模型存在极显著性意义;模型失拟项 $P=0.161 5$,无显著性差异 ($P>0.05$),表明未知干扰因素对数学模型结果的影响很小。综合评分的 R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.990 8 和 0.979 0,表明建立的综合评分数学模型可用于 Ste/Cry-SMSD 处方工艺优化。根据表 5 方差分析结果,综合评分数学模型中 X_1 、 X_2 、 $X_1 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异 ($P<0.01$)。

表 4 BBD-RSM 试验因素水平、试验设计及结果 ($n=3$)

Table 4 Factor levels, test design and results of BBD-RSM test ($n=3$)

试验号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2 /°C	X_3 /min	Y_1 /%	Y_2 /%	综合评分	试验号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2 /°C	X_3 /min	Y_1 /%	Y_2 /%	综合评分
1	2.5 (0)	40 (-1)	85 (+1)	77.38	6.44	0.796	10	2.5	60	85	84.32	6.79	0.852
2	2.0 (-1)	50 (0)	85	76.41	7.57	0.860	11	2.5	60	35	80.16	6.63	0.821
3	2.5	50	60 (0)	96.82	7.98	0.990	12	2.5	40	35	75.25	6.22	0.771
4	2.0	60 (+1)	60	80.17	7.94	0.902	13	2.0	40	60	74.94	7.36	0.839
5	3.0 (+1)	50	85	86.89	6.10	0.824	14	3.0	40	60	77.83	5.41	0.734
6	2.5	50	60	95.90	7.91	0.981	15	2.5	50	60	96.22	8.02	0.990
7	3.0	60	60	87.13	6.17	0.829	16	2.0	50	35	82.76	8.14	0.927
8	2.5	50	60	95.59	7.89	0.979	17	2.5	50	60	95.28	7.74	0.967
9	3.0	50	35 (-1)	77.65	5.42	0.734							

表 5 综合评分方差分析

Table 5 Analysis of variance of comprehensive score

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.13	9	0.01	84.03	<0.000 1	X_1^2	0.02	1	0.02	105.91	<0.000 1
X_1	0.02	1	0.02	124.90	<0.000 1	X_2^2	0.04	1	0.04	209.52	<0.000 1
X_2	8.71×10^{-3}	1	8.71×10^{-3}	52.55	0.000 2	X_3^2	0.03	1	0.03	164.90	<0.000 1
X_3	7.80×10^{-4}	1	7.80×10^{-4}	4.71	0.066 7	残差	1.16×10^{-3}	7	1.66×10^{-4}		
$X_1 X_2$	2.56×10^{-4}	1	2.56×10^{-4}	1.54	0.254 0	失拟相	7.99×10^{-4}	3	2.66×10^{-4}	2.95	0.161 5
$X_1 X_3$	6.16×10^{-3}	1	6.16×10^{-3}	37.17	0.000 5	总偏差	3.61×10^{-4}	4	9.03×10^{-5}		
$X_2 X_3$	9.00×10^{-6}	1	9.00×10^{-6}	0.05	0.822 4	总离差	0.13	16			

2.5.3 响应面优化及处方工艺确定 绘制自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 与综合评分的响应面图,结果见图 2。当固定某一因素时,Ste/Cry-SMSD 综合评分均随着另外 2 因素的增加呈先增加后下降趋势,Ste/Cry-SMSD 综合评分存在最大值,表明采用 BBD-RSM 法对 Ste/Cry-SMSD 处方工艺进行优化是可行的。

设置综合评分为望大值,区间为 0.7~1.0,得 Ste/Cry-SMSD 最佳处方工艺为甜菊素质量浓度 2.70 mg/mL (经过修正,修正幅度小于 1%),制备温度 52.00 °C,搅拌时间 60.00 min (经过修正,修正幅度小于 1%),预测综合评分 0.998。

2.5.4 Ste/Cry-SMSD 处方工艺验证 按照“2.5.3”

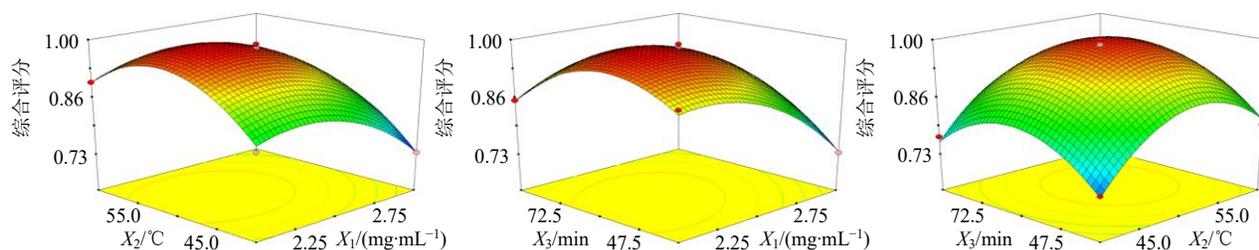


图2 不同因素对综合评分的响应面

Fig. 2 Response surfaces of different factors on comprehensive score

项下确定的处方工艺平行制备3批 Ste/Cry-SMSD, 分别测定 Ste/Cry-SMSD 自组装形成胶束的包封率和载药量, 结果见表6。以预测综合评分0.998为参考, 计算得实际综合评分相对偏差为-1.10%, 表明建立的数学模型指导意义较强。按照“2.2.3”项下方法制备 Ste/Cry-SMSD 供试品溶液, 测得 Ste/Cry-SMSD 中隐丹参酮质量分数为(8.38±0.17)%。

表6 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	包封率/%	载药量/%	综合评分
1	94.16	8.06	0.981
2	94.87	8.17	0.992
3	95.29	8.09	0.989
平均值	94.77±0.57	8.11±0.06	0.987±0.006

2.6 Ste/Cry-SMSD 理化性质研究

2.6.1 X 粉末射线衍射 (XRPD) 分析 取隐丹参酮、甜菊素、物理混合物(比例同 Ste/Cry-SMSD)和 Ste/Cry-SMSD 粉末适量约10 mg, 置于X粉末衍射仪器上进行测试, 测试条件: 电流10 mA, 扫描速度和范围分别为4°/min 和 2θ3°~45°, 靶材为Cu。结果见图3, 隐丹参酮原料药在4.0°、5.6°、10.4°、17.6°和23.9°等处出现特征晶型峰, 在物理混合物XRPD图谱中仍可观察到隐丹参酮特征晶型

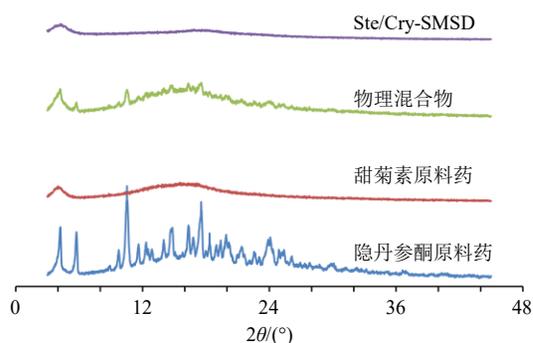


图3 Ste/Cry-SMSD、物理混合物、甜菊素原料药和隐丹参酮原料药的 XRPD 结果

Fig. 3 XRPD results of Ste/Cry-SMSD, physical mixture, steviosin bulk drug and cryptotanshinone bulk drug

峰, 表明隐丹参酮与甜菊素简单物理混合后, 并不能对隐丹参酮晶型状态产生影响。Ste/Cry-SMSD 的XRPD 中未见隐丹参酮特征晶型峰, 表明隐丹参酮可能由晶型状态转变为无定形状态, 同时也表明 Ste/Cry-SMSD 是一种不同于物理混合物的物质。

2.6.2 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析 分别取隐丹参酮原料药、甜菊素原料药、物理混合物(比例同 Ste/Cry-SMSD)和 Ste/Cry-SMSD 粉末适量, 加入溴化钾(质量比1:100)将两者研磨均匀, 压片后测试, 测试条件: 空扫2次, 样品扫描16次, 光阑为100.0, 分辨率为4.0。结果见图4, 在甜菊素原料药的 FT-IR 中, 3 344.76 cm⁻¹ 为其结构式上-OH 伸缩振动峰, 但在 Ste/Cry-SMSD 的 FT-IR 中移动至 3 360.6 cm⁻¹, 表明甜菊素结构式上-OH 可能与隐丹参酮发生了作用。在隐丹参酮原料药的 FT-IR 中, 1 647.52 cm⁻¹ 为其结构式上 C=O 的伸缩振动峰, 1 618.99 cm⁻¹ 为苯环骨架振动峰, 在物理混合物中基本未发生明显变化, 分别对应 1 647.56、1 618.94 cm⁻¹, 但在 Ste/Cry-SMSD 的 FT-IR 中, 分别移动至 1 650.37、1 621.84 cm⁻¹。因此, 推测隐丹参酮结构式中 C=O 和苯环可能与甜菊素结构上-OH 发生了氢键作用, 从而形成了 Ste/Cry-SMSD。

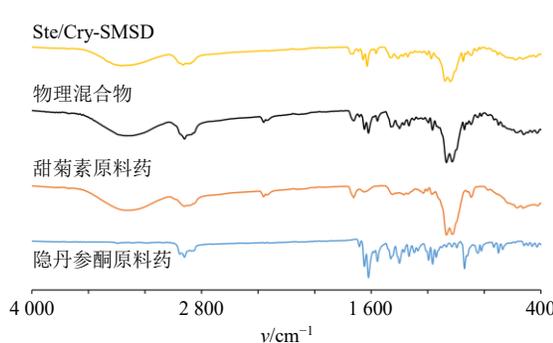


图4 Ste/Cry-SMSD、物理混合物、甜菊素原料药和隐丹参酮原料药的 FT-IR 结果

Fig. 4 FT-IR results of Ste/Cry-SMSD, physical mixture, steviosin bulk drug and cryptotanshinone bulk drug

2.6.3 溶解度测定 取过量的隐丹参酮原料药分别置于 pH 2.0、4.0、5.5、6.8、7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 及纯化水中, 超声 15 min 后固定于 25 °C 震荡器中, 120 r/min 转速下震荡 3 d, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后, 测定隐丹参酮质量浓度。同法测定物理混合物 (隐丹参酮和甜菊素比例同 Ste/Cry-SMSD) 和 Ste/Cry-SMSD 的溶解度, 结果见表 7。隐丹参酮

原料药在不同介质中的溶解度均低于 4 μg/mL。物理混合物和 Ste/Cry-SMSD 均提高了隐丹参酮在不同介质中的溶解度, 均具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 可能与甜菊素增溶作用有关^[11]。Ste/Cry-SMSD 对隐丹参酮溶解度提高作用远高于物理混合物, 可能与 Ste/Cry-SMSD 改变了隐丹参酮晶型^[9]、降低了隐丹参酮粒度^[6]以及甜菊素增溶作用等因素有关。

表 7 Ste/Cry-SMSD、物理混合物和隐丹参酮原料药在不同 pH 值介质中溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Solubility determination results of Ste/Cry-SMSD, physical mixture and cryptotanshinone bulk drug in different pH media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

介质	溶解度/(μg·mL ⁻¹)					
	pH 2.0 PBS	pH 4.0 PBS	pH 5.5 PBS	pH 6.8 PBS	pH 7.4 PBS	纯化水
隐丹参酮	3.58±0.07	2.75±0.05	3.71±0.08	2.93±0.09	3.81±0.05	3.74±0.07
物理混合物	33.64±0.87**	36.16±0.95**	35.77±0.72**	31.04±0.43**	35.75±0.80**	35.58±0.69**
Ste/Cry-SMSD	315.68±11.14***	304.14±15.22***	411.92±13.82***	370.98±10.76***	532.16±18.17***	389.77±10.84***

与隐丹参酮比较: ** $P < 0.01$; 与物理混合物比较: *** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs cryptotanshinone; *** $P < 0.01$ vs physical mixture.

2.7 Ste/Cry-SMSD 自组装胶束的表征

2.7.1 自组装胶束混悬液外观及 TEM 观察 取适量 Ste/Cry-SMSD 粉末, 分散于纯化水中, 震荡即得自组装胶束混悬液, 外观见图 5, 隐丹参酮悬浮或沉淀于水中, 而 Ste/Cry-SMSD 可形成均一透明混悬液。



图 5 隐丹参酮 (A) 和 Ste/Cry-SMSD 粉末 (B) 在水中的分散情况

Fig. 5 Dispersibility of cryptotanshinone (A) and Ste/Cry-SMSD powders (B) in water

取适量自组装胶束混悬液滴在铜网上, 加磷钨酸钠溶液 (质量浓度为 1.5%) 染色, 晾干后于 TEM 下观察自组装胶束形貌。测试条件: 点分辨率为 0.19 nm, 加速电压为 200 kV, 放大倍数为 18 000。结果见图 6, Ste/Cry-SMSD 在水相中可自组装形成近似球形纳米胶束, 这可能是由于 Ste/Cry-SMSD 继承了甜菊素的两亲性特性所致^[15]。

2.7.2 Ste/Cry-SMSD 自组装胶束粒径和 ζ 电位测定

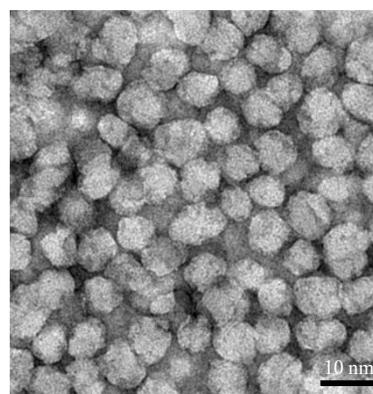


图 6 Ste/Cry-SMSD 分散于水中形成胶束的 TEM 图
Fig. 6 TEM diagram of micelles after Ste/Cry-SMSD dispersed in water

取 Ste/Cry-SMSD 自组装胶束混悬液, 置于粒度分析仪上测定粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位, 结果见图 7。Ste/Cry-SMSD 形成胶束的平均粒径为 (8.69±0.56) nm, 与 TEM 观察到的结果基本一致。Ste/Cry-SMSD 的 PDI 为 0.009±0.002, 表明粒径均一性良好。Ste/Cry-SMSD 的 ζ 电位为 (-16.19±0.92) mV, 表明自组装纳米胶束表面带一定量的负电荷。

2.8 体外释药行为及释药机制研究

取隐丹参酮原料药、物理混合物 (隐丹参酮和甜菊素比例同 Ste/Cry-SMSD) 和 Ste/Cry-SMSD 粉末适量 (使隐丹参酮含量均为 20 mg), 置于透析袋中 (截留相对分子质量 8 000), 加入 pH 2.0 的模拟

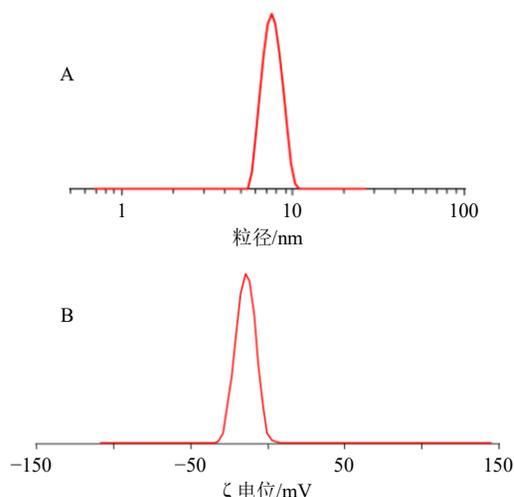


图7 Ste/Cry-SMSD 在水中的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)
Fig. 7 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Ste/Cry-SMSD dispersed in water

胃液 (含胃蛋白酶和含 0.8% 聚山梨酯 80), 扎紧。采用 37 °C 的模拟胃液 1000 mL 作为介质, 转速为 75 r/min。于 0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、12.0 h 分别取样 5 mL, 后立即补加同温同体积 pH 2.0 的模拟胃液 (含胃蛋白酶和含 0.8% 聚山梨酯 80), 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后测定隐丹参酮含量。同法考察隐丹参酮原料药、物理混合物 (隐丹参酮和甜菊素比例同 Ste/Cry-SMSD) 和 Ste/Cry-SMSD 粉末在 pH 7.4 模拟肠液 (含胰蛋白酶和含 0.8% 聚山梨酯 80) 中的释药行为, 结果见图 8。隐丹参酮原料药在模拟胃、肠液中释放度均较低, 主要与隐丹参酮溶解度低、疏水性强有关^[6]。物理混合物在一定程度上提高了隐丹参酮在模拟胃、肠液中的释放度, 但提高幅度远低于 Ste/Cry-SMSD。

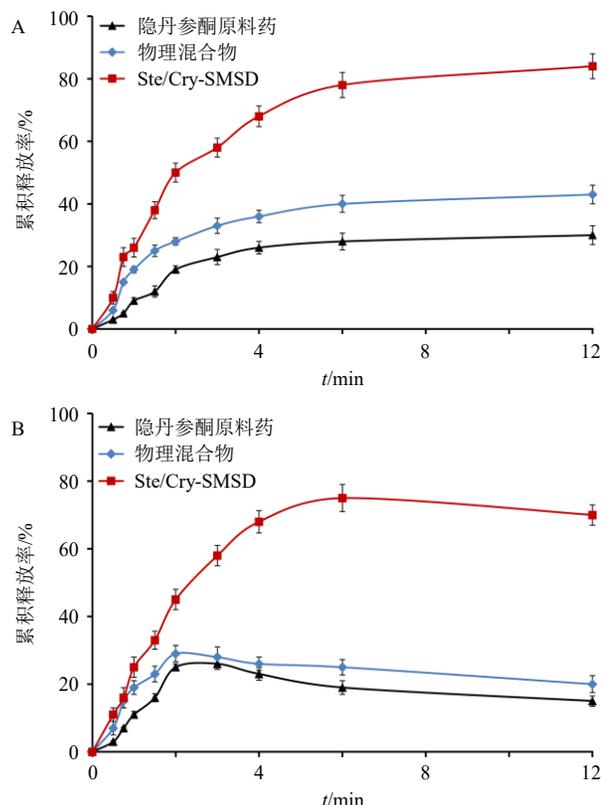


图8 隐丹参酮原料药、物理混合物、Ste/Cry-SMSD 在模拟胃液 (A) 和模拟肠液 (B) 中释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 8 Release curves of cryptotanshinone bulk drug, physical mixture, Ste/Cry-SMSD in simulated gastric fluid (A) and simulated intestinal fluid (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Ste/Cry-SMSD 在模拟胃、肠液中释放度均得到明显增加, 分别为 84.69% 和 70.16%。

Ste/Cry-SMSD 释药模型的拟合结果见表 8, 根据 r 大小可知, Ste/Cry-SMSD 在模拟胃、肠液中释药均符合 Weibull 模型。

表 8 Ste/Cry-SMSD 在模拟胃液和模拟肠液中释药模型

Table 8 Drug release models of Ste/Cry-SMSD in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid

释药介质	模型	拟合方程	r	释药介质	模型	拟合方程	r
模拟胃液	一级	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.1502t - 0.2895$	0.8735	模拟肠液	一级	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.1017t - 0.3433$	0.6255
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.2795t^{1/2} - 0.0198$	0.9089		Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.2508t^{1/2} - 0.0284$	0.8831
	Weibull	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.8746 \ln t - 1.2116$	0.9874		Weibull	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.8243 \ln t - 1.3046$	0.9573

t 代表时间, M_t 和 M_∞ 分别为 t 和 ∞ 时的累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

t was time; M_t and M_∞ were cumulative release degrees at time t and ∞ , respectively; M_t/M_∞ was cumulative release percentage at t .

2.9 Ste/Cry-SMSD 粉末含水量测定及稳定性考察

取 Ste/Cry-SMSD 粉末约 5 g, 精密称定, 平铺于干燥至恒定质量的称量瓶中, 粉末厚度不大于 5 mm, 置于 105 °C 烘箱中干燥 5 h, 盖上瓶盖后置于干燥器冷却至室温, 精密称定。继续于相同条件下干燥 1 h, 同法操作, 直至 2 次称量结果差异小于 5

mg, 计算 Ste/Cry-SMSD 粉末含水量。

取 Ste/Cry-SMSD 粉末密封于药用塑料瓶中, 置于恒温恒湿箱 (温度和相对湿度分别为 40 °C 和 70%) 中, 分别于 0、1、2、3、6 个月取样, 测试 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的包封率、含水量、粒径、 ζ 电位值和在水中的饱和溶解度。结果见表 9, 加速

表9 稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Results of stability investigation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/月	含水量/%	包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
0	1.14±0.04	94.97±1.07	8.44±0.92	-16.57±1.02	390.16±10.14
1	1.18±0.09	95.12±1.18	8.84±0.63	-16.43±0.92	390.79±8.16
2	1.13±0.08	94.93±0.92	8.29±0.77	-16.09±1.20	391.56±9.84
3	1.24±0.08	95.20±0.87	8.61±0.78	-16.27±0.84	389.40±10.95
6	1.33±0.11	93.88±1.03	8.75±0.84	-15.94±1.17	387.99±8.73

条件下考察6个月发现, Ste/Cry-SMSD包封率仍大于90%;含水量仍小于1.5%,可能与甜菊素本身不易吸潮有关^[10];自组装形成胶束后粒径仍小于10 nm; ζ 电位和溶解度均未发生明显变化,表明 Ste/Cry-SMSD粉末稳定性良好。

2.10 Ste/Cry-SMSD口服药动力学研究

2.10.1 ig溶液的配制 取隐丹参酮原料药、物理混合物(隐丹参酮和甜菊素比例同 Ste/Cry-SMSD)和 Ste/Cry-SMSD粉末适量,采用0.5% CMC-Na溶液配制ig液,使得隐丹参酮质量浓度均为25.0 mg/mL。取12只禁食12 h的SD大鼠(期间可自由饮用生理盐水),随机分为隐丹参酮原料药组和 Ste/Cry-SMSD组,分别按75 mg/kg ig后计时,于0.25、0.50、1.00、1.25、1.50、2.00、3.00、4.00、8.00、12.00 h将SD大鼠使用乙醚进行麻醉,立即眼眶后静脉丛采血约0.25 mL(20 s完成采血),置于肝素浸润的离心管中,3 000 r/min离心3 min(离心半径6.4 cm),移液枪吸取上层血浆,密封后保存于-20 °C冰箱。

2.10.2 内标溶液的配制及血浆样品的处理 取非诺贝特对照品适量,加甲醇配制成质量浓度为600 μg/L,作为内标溶液。取血浆样品置于37 °C水浴中解冻,精密取100 μL至含50 μL内标溶液的离心管中,加乙腈2 mL后密封,涡旋30 s,6 000 r/min离心10 min(离心半径6.4 cm)。取上层有机相至空白离心管中,置于氮吹仪中通氮气缓慢吹干。加入100 μL乙腈溶解残渣,再次6 000 r/min离心10 min,待测。

2.10.3 线性关系考察 取健康SD大鼠,ip戊巴比妥钠(50 mg/kg),麻醉后心脏取血,置于肝素浸润的离心管中,并将大鼠颈椎脱臼处死。将血浆3 000 r/min离心3 min(离心半径6.4 cm),即得空白血浆。取“2.2.2”项下隐丹参酮对照品溶液,采用甲醇稀释制成质量浓度为1 600.00、800.00、400.00、200.00、100.00、33.33 μg/L的隐丹参酮对照品溶液,

分别精密吸取100 μL,置于氮吹仪中通氮气缓慢吹干,加入100 μL空白血浆密封涡旋5 min,后续按照“2.10.2”项下方法处理,即得1 600.00、800.00、400.00、200.00、100.00、33.33 μg/L隐丹参酮血浆对照品溶液。按照“2.2.1”项下色谱条件测定隐丹参酮和非诺贝特峰面积,以隐丹参酮质量浓度为横坐标(X),隐丹参酮和非诺贝特峰面积之比为纵坐标(Y),线性回归得标准曲线方程为 $Y=0.0617X+0.005$, $r=0.9972$,因此隐丹参酮在33.33~1 600.00 μg/L呈良好的线性关系。

2.10.4 专属性考察 取空白血浆按照“2.10.2”项下方法处理,得空白血浆溶液,另取隐丹参酮质量浓度为33.33 μg/L血浆对照品溶液和隐丹参酮原料药ig 12 h的血浆样品溶液,分别按照“2.2.1”项下色谱条件进样测试,记录HPLC图,结果见图9。

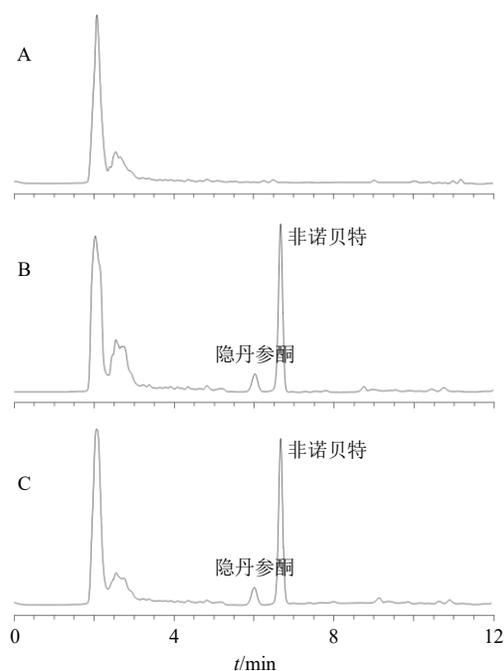


图9 空白血浆(A)、血浆样品(B)和隐丹参酮+空白血浆(C)的HPLC图

Fig. 9 HPLC chromatograms of blank plasma (A), plasma sample (B) and cryptotanshinone + blank plasma (C)

隐丹参酮和非诺贝特色谱峰分离度良好，且不受内源性物质不干扰，专属性高。

2.10.5 日内、日间精密度考察 取 1 600.00、400.00、33.33 μg/L 隐丹参酮血浆对照品溶液，按照“2.2.1”项下色谱条件于 1 d 内重复测试 6 次，计算得日内精密度 RSD 分别为 2.69%、3.26%、3.98%；连续测试 6 d，每天测试 1 次，计算得日间精密度 RSD 分别为 7.15%、5.73%、6.34%。

2.10.6 稳定性考察 取隐丹参酮原料药 ig 1 h 的血浆样品溶液，置于室温，分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定隐丹参酮和非诺贝特峰面积，计算得两者峰面积比值变化的 RSD 分别为 6.91%，表明血浆样品溶液稳定性良好。

2.10.7 加样回收率考察 取空白血浆 9 份，配制质量浓度为 1 600.00、400.00、33.33 μg/L 血浆样品溶液各 3 份，按照“2.10.2”项下方法处理后测定隐丹参酮和非诺贝特峰面积，计算隐丹参酮质量浓度和绝对回收率。结果显示，隐丹参酮的平均加样回收率为 96.19%，RSD 为 5.17%，结果表明该实验准确度高。

2.10.8 检测限和定量限 取隐丹参酮质量浓度为 100.00 μg/L 血浆对照品溶液，逐步稀释后测试，信

噪比约为 3 : 1 和 10 : 1 分别作为检测限和定量限。测定结果显示，隐丹参酮的检测限和定量限分别为 5.0、2.0 μg/L。

2.10.9 药动学考察结果 根据取血点及其血药浓度分别绘制隐丹参酮原料药、物理混合物和 Ste/Cry-SMSD 的药-时曲线，结果见图 10。采用 3P97 程序统计矩模型计算主要药动学参数，显著性检验采用 SPSS 19.0 软件，结果见表 10。

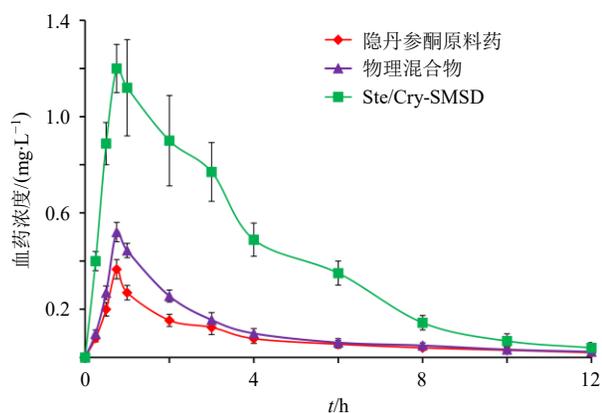


图 10 隐丹参酮原料药、物理混合物和 Ste/Cry-SMSD 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Concentration-time curves of cryptotanshinone bulk drug, physical mixture and Ste/Cry-SMSD ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 10 隐丹参酮原料药、物理混合物和 Ste/Cry-SMSD 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 10 Main pharmacokinetic parameters of cryptotanshinone bulk drug, physical mixture and Ste/Cry-SMSD ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	隐丹参酮原料药	物理混合物	Ste/Cry-SMSD
t_{max}	h	0.72 ± 0.21	0.68 ± 0.19	0.83 ± 0.47
$t_{1/2}$	h	2.24 ± 0.46	2.18 ± 0.44	4.15 ± 0.82***
C_{max}	ng·mL ⁻¹	366.19 ± 64.82	523.62 ± 80.05*	1 129.34 ± 206.13***
MRT	h	3.75 ± 0.67	3.99 ± 0.71	6.28 ± 1.48***
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	816.94 ± 180.43	1 024.69 ± 236.78*	4 993.08 ± 692.16***
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	841.07 ± 188.15	1 068.37 ± 278.83*	5 307.77 ± 731.19***

与隐丹参酮原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与物理混合物比较: *** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs cryptotanshinone bulk drug; *** $P < 0.01$ vs physical mixture.

隐丹参酮制备成 Ste/Cry-SMSD 后， t_{max} 延后至 (0.83 ± 0.47) h，但无显著性差异 ($P > 0.05$)； $t_{1/2}$ 由 (2.24 ± 0.46) h 极显著延长至 (4.15 ± 0.82) h ($P < 0.01$)， C_{max} 和 AUC_{0-t} 分别增加至 3.08 倍和 6.11 倍，表明 Ste/Cry-SMSD 极大地改变了隐丹参酮的药动学行为，促进了隐丹参酮体内吸收，提高了其生物利用度。物理混合物的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 等参数，具有显著性差异 ($P < 0.05$)，表明甜菊素具有一定的促吸收作用，但生物利用度提高幅度远低于 Ste/Cry-SMSD ($P < 0.01$)。

2.11 Ste/Cry-SMSD 降血糖作用研究

2.11.1 糖尿病模型的建立 取 4 周龄雄性 SD 大鼠，于温度和湿度分别为 25 °C 和 50% 的实验室环境下饲养 1 周。按 100 mg/kg 剂量 ip 质量浓度为 2.0 g/mL 链脲佐菌素溶液，注射完成 3 d 后，尾静脉取血，采用血糖仪测定空腹血糖值，选取空腹血糖值大于 11.2 mmol/L 的大鼠作为糖尿病模型^[18]。

2.11.2 实验方案 取 64 只糖尿病模型大鼠随机分为模型组、阳性药二甲双胍组 (200 mg/kg)、隐丹参酮原料药组 (150 mg/kg)、甜菊素原料药组 (同

Ste/Cry-SMSD 高剂量组中甜菊素用量, 即 1 600 mg/kg)、物理混合物组(隐丹参酮和甜菊素用量同 Ste/Cry-SMSD 高剂量组, 分别为 150、1 600 mg/kg)、Ste/Cry-SMSD 低剂量组(50 mg/kg, 以隐丹参酮计)、Ste/Cry-SMSD 中剂量组(100 mg/kg, 以隐丹参酮计)和 Ste/Cry-SMSD 高剂量组(150 mg/kg, 以隐丹参酮计)。另取 8 只正常大鼠作为对照组, 对照组和模型组大鼠均 ig 同体积的生理盐水。每天给药 1 次, 连续给药 4 周, 每周记录 1 次大鼠血糖值。

2.11.3 降血糖作用实验结果 结果见表 11。与对照组相比, 模型组血糖值具有极显著性差异($P < 0.01$),

表明糖尿病模型建立成功。随着治疗时间的延长隐丹参酮原料药组和甜菊素原料药组大鼠的血糖值逐步降低, 表明隐丹参酮和甜菊素均具有降血糖作用, 与相关研究报道一致^[2,12]。随着 Ste/Cry-SMSD 给药剂量的增大降血糖作用越明显, 表现出一定的剂量相关性。与隐丹参酮原料药组(150 mg/kg)相比, Ste/Cry-SMSD 高剂量组(150 mg/kg)血糖值在第 1 周有显著性下降($P < 0.05$), 在第 2、3、4 周有极显著性下降($P < 0.01$), 表明 Ste/Cry-SMSD 增强了隐丹参酮的降血糖药效, 可能与 Ste/Cry-SMSD 促进了隐丹参酮体内吸收有关。

表 11 各组实验动物在不同时间点的血糖值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 11 Blood glucose values of experimental animals in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)				
		第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照	-	4.6±0.8	4.6±0.9	4.9±0.6	4.5±0.8	4.3±0.5
模型	-	18.9±2.6**	20.1±2.4**	21.6±1.8**	22.3±2.1**	23.5±2.3**
二甲双胍	200	19.4±2.1	17.0±1.9 ^{##}	13.8±1.8 ^{##}	10.9±1.3 ^{##}	8.2±0.9 ^{##}
隐丹参酮原料药	150	20.2±2.8	19.5±2.3	18.1±1.9 [#]	16.3±1.1 ^{##}	14.4±0.7 ^{##}
甜菊素原料药	1 600	20.7±2.4	19.8±2.2	18.5±2.0 [#]	17.0±1.8 [#]	14.5±1.1 ^{##}
物理混合物	150+1 600	21.1±2.5	19.2±2.3	17.2±1.2 ^{##}	15.3±1.5 ^{##}	13.4±1.1 ^{##}
Ste/Cry-SMSD	50	21.3±1.9	20.0±1.7	19.2±1.8	18.4±1.1 ^{##}	16.3±0.9 ^{##}
	100	20.6±2.7	18.2±2.0	16.2±1.6 ^{##}	14.5±1.3 ^{##}	13.0±1.2 ^{##}
	150	20.9±2.3	17.4±2.0 ^{#Δ}	14.8±1.6 ^{##ΔΔ}	11.7±1.5 ^{##ΔΔ}	10.5±1.0 ^{##ΔΔ}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与隐丹参酮原料药组比较: ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$; 表 12 同。

^{**} $P < 0.01$ vs normal group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs cryptotanshinone bulk drug; same as table 12.

2.11.4 口服糖耐量研究 按照“2.11.2”项下完成血糖值测定后, 各组大鼠分别按 2 g/kg 剂量 ig 给予葡萄糖溶液, 于 0、30、60、120 min 尾静脉取血, 采用血糖仪测定空腹血糖值, 结果见表 12。模型组大鼠在 30、60、120 min 血糖值均大于 28 mmol/L, 表明模型组大鼠血糖调节能力较差^[19]。与模型组相比, 各给药组在 30、60、120 min 血糖值均大幅下降($P < 0.01$), 表明血糖调节能力得到增强。与隐丹参酮原料药组(150 mg/kg)相比, Ste/Cry-SMSD 高剂量组(150 mg/kg)在 30、60、120 min 的血糖值均极显著性下降($P < 0.01$), 表明 Ste/Cry-SMSD 进一步增强了隐丹参酮的血糖调节能力。

梯形法计算各组大鼠的血糖曲线下面积 (area under the curve, AUC), 结果见表 12。模型组 AUC 值极显著性高于对照组($P < 0.01$), 表明建模成功。与模型组 AUC 值相比, 阳性组、隐丹参酮原料药组、甜菊素原料药组、物理混合物组和 Ste/Cry-SMSD 各剂量组的 AUC 值均极显著性低于模型组

($P < 0.01$), 表明各给药组均可有效降低血糖。与隐丹参酮组(150 mg/kg)相比, Ste/Cry-SMSD 高剂量组(150 mg/kg) AUC 值极显著下降($P < 0.01$), 表明 Ste/Cry-SMSD 增强了隐丹参酮改善糖耐量异常的作用。

3 讨论

自胶束化的固体分散体与传统固体分散体最大区别在于分散于水相后药物的存在形式, 自胶束化的固体分散体中药物被包裹进入两亲性载体形成的疏水性空间, 因而可减少胃肠液 pH 值、消化酶等对药物稳定性的影响; 而传统固体分散体分散于水相后药物在亲水性载体的影响下直接溶于水相中^[9,20], 容易受到胃肠液 pH 值、消化酶等降解作用, 因而自胶束化固体分散体比传统固体分散体更研究价值及推广意义^[21]。Ste/Cry-SMSD 粉末中隐丹参酮质量分数, 略高于 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的载药量, 这是由于 Ste/Cry-SMSD 分散至水相中时, 少部分隐丹参酮可溶于水相中, 因而测得载药量略低。

表 12 大鼠口服糖耐量实验结果和大鼠血糖 AUC ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 12 Results of oral glucose tolerance test and blood glucose AUC in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)				AUC/ (mmol·min·L ⁻¹)
		0 min	30 min	60 min	120 min	
对照	-	4.4±0.5	11.8±0.8	8.7±1.1	5.2±0.7	981.16±63.81
模型	-	7.9±1.4**	35.5±3.9**	32.4±3.6**	28.2±3.1**	3 517.84±256.14**
二甲双胍	200	6.8±1.3	17.7±2.2##	12.8±1.8##	5.7±0.8##	1 402.77±129.58##
隐丹参酮	150	6.5±0.6	25.4±2.3##	18.1±2.2##	10.7±1.5##	1 987.79±149.22##
甜菊素	1 600	6.8±0.4	26.3±2.8##	19.4±2.4##	12.0±1.3##	2 118.90±166.71##
物理混合物	150+1 600	7.0±1.3	23.7±2.3##	17.5±1.8##	9.8±1.5##	1 899.46±146.05##
Ste/Cry-SMSD	50	7.4±1.1	29.8±2.7##	22.2±2.3##	14.4±1.6##	2 422.63±207.85##
	100	7.3±1.5	27.3±2.6##	20.8±1.9##	10.3±1.2##	2 187.08±189.17##
	150	6.9±1.7	20.5±2.6## $\Delta\Delta$	14.5±1.8## $\Delta\Delta$	6.7±0.9## $\Delta\Delta$	1 529.15±133.46## $\Delta\Delta$

由于隐丹参酮质量分数和 Ste/Cry-SMSD 形成胶束的载药量较为接近, 因此推测 Ste/Cry-SMSD 分散至水相时药物主要以胶束形式存在。

体外释药结果显示, 隐丹参酮在模拟胃、肠液环境中累积溶出率较低, 且在模拟肠液中 4 h 后累积释放率出现下降情况, 表明隐丹参酮较低的溶出度及较差的肠道稳定性可能是其生物利用度低下的原因^[4]。Ste/Cry-SMSD 极大地提高了隐丹参酮在模拟胃、肠液环境中累积释放率, 主要与 Ste/Cry-SMSD 改善了隐丹参酮亲水性、增加溶解度、改变晶型状态、增加药物在肠液中稳定性等原因有关^[21], 有利于增加药物吸收程度。Ste/Cry-SMSD 中药物释放分为快速释药和缓慢释药阶段, 快速释药阶段有利于药物迅速吸收、缩短达峰时间、快速起效等, 而缓慢释药阶段利于维持体内血药浓度, 从而为增加其生物利用度、增强药效奠定基础。

非诺贝特与隐丹参酮的溶解性质相近, 在血浆样品的处理时可使两者均得到充分提取, 且在 HPLC 图上两者分离度较高, 有利于提高检测准确性, 故确定非诺贝特作为内标。由于 Ste/Cry-SMSD 在水相中可自组装形成粒径小于 10 nm 的胶束, 有利于药物顺利穿透胃肠道黏液层, 从而快速吸收, 从而使 Ste/Cry-SMSD 的 t_{max} 无显著性变化。Ste/Cry-SMSD 的 $t_{1/2}$ 得到极显著性延长, 这可能是由于隐丹参酮在肠道中容易降解, Ste/Cry-SMSD 载药后在水相中可自组装形成纳米胶束, 可降低肠道 pH 值、消化酶等对隐丹参酮的破坏, 从而增加了药物在肠道的吸收量; 自组装形成的胶束粒径很小, 容易黏附于黏液层中^[22], 减弱了胃肠道蠕动对药物的清除, 增加了药物在体内的血药浓度水平, 从而使

Ste/Cry-SMSD 的 $t_{1/2}$ 得到极显著性延长, 有利于提高隐丹参酮的吸收程度^[22-23]。Ste/Cry-SMSD 的 C_{max} 和 AUC_{0-t} 分别增加至 3.08 倍和 6.11 倍, 可能是由于 Ste/Cry-SMSD 在水相自组装形成胶束后使药物与胃肠道充分接触, 利于透膜吸收^[24-25]; Ste/Cry-SMSD 改变了隐丹参酮晶型状态, 转变为无定形状态后有利于药物吸收^[25-26]; Ste/Cry-SMSD 极大地提高了隐丹参酮的溶解度和溶出度, 解决了吸收瓶颈; Ste/Cry-SMSD 自组装形成的胶束增加了隐丹参酮在肠道中的稳定性及吸收量^[27-28], 最终极大地提高了隐丹参酮的相对生物利用度, 也为增强其降血糖药效奠定了基础。

降血糖试验研究表明, 在隐丹参酮原料药和 Ste/Cry-SMSD 给药剂量均为 150 mg/kg 条件下, Ste/Cry-SMSD 进一步提高了隐丹参酮的降血糖药效、增强了血糖调节及改善糖耐量异常能力。可能是由于 Ste/Cry-SMSD 极大地提高了隐丹参酮体内吸收, 从而使隐丹参酮药效得以充分发挥; 另外甜菊素本身也具有降血糖药效^[12], 可与隐丹参酮协同发挥降血糖药效。综上, 本研究以天然来源的甜菊素为载体, 将隐丹参酮制备成 Ste/Cry-SMSD, 具有辅料安全可靠、处方种类少、载药量高等优势, 储存稳定性好, 口服后极大促进了隐丹参酮体内吸收, 并增强了降血糖药效, 本研究为评价 Ste/Cry-SMSD 成药性提供了研究数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李佳莉, 张利, 辛佳芸, 等. 隐丹参酮药理作用及其新型制剂技术的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(14): 4930-4938.

- [2] Song M, Chen L, Zhang L S, *et al.* Cryptotanshinone enhances wound healing in type 2 diabetes with modulatory effects on inflammation, angiogenesis and extracellular matrix remodelling [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 845-853.
- [3] 王蕾, 陈沫, 王翻红, 等. 丹参酮防治中枢神经系统疾病的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(11): 2988-2995.
- [4] 廖昔威. 丹参饮有效成分在大鼠体内药动学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [5] Zhang J, Huang M, Guan S, *et al.* A mechanistic study of the intestinal absorption of cryptotanshinone, the major active constituent of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(3): 1285-1294.
- [6] 郝海军, 屈战果, 范明松. 隐丹参酮纳米结构脂质载体的制备及药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(4): 831-835.
- [7] Wang Y H, Hu R, Guo Y L, *et al.* Preparation, evaluation, and *in vitro* release of chitosan-alginate tanshinone self-microemulsifying sustained-release microcapsules [J]. *Technol Health Care*, 2021, 29(4): 687-695.
- [8] 马霄, 颜国华, 王世广, 等. 隐丹参酮滴丸制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2023, 45(9): 2809-2815.
- [9] 刘方方, 王婷婷. 尼达尼布乙磺酸盐固体分散体的制备和性能研究 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(1): 88-93.
- [10] 马浩文, 赵琳, 董昊, 等. 锦灯笼果实泡腾片制备工艺研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(2): 65-69.
- [11] 王凡. 甜菊糖苷对根皮素的增溶研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- [12] Barakat H, Al-Roug K, Algonaiman R, *et al.* Biological assessment of stevioside and sucralose as sucrose substitutes for diabetics on STZ-induced diabetes in rats [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 940.
- [13] 邱菁, 徐纯艺, 周玮玲, 等. 基于“药辅合一”理念的当归精油纳米乳递药系统的构建、表征及评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(6): 1783-1792.
- [14] 陈怡健, 程晓敬, 邓琬亭, 等. 基于分子模拟的黄芩苷/多糖纳米复合物载体筛选及其制备和评价 [J]. *中草药*, 2024, 55(19): 6529-6545.
- [15] Kämäräinen T, Kadota K, Arima-Osonoi H, *et al.* Tailoring the self-assembly of steviol glycoside nanocarriers with steroidal amphiphiles [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2023, 9(10): 5747-5760.
- [16] 卢明悦, 刘谦, 张永清, 等. 丹参产地趁鲜切片研究现状 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19(25): 43-46.
- [17] 梁艳, 蔡路昀, 侯东园, 等. 负载多酚的纳米复合物制备方法及其结构表征 [J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(2): 188-195.
- [18] 李鑫, 朱明微, 李瑞楚, 等. 复方桦树茸降糖片的制备及其对2型糖尿病小鼠降血糖作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(11): 2239-2246.
- [19] 张琪婧, 耿振甲, 李敏, 等. 覆盆子总黄酮的酶辅助闪式提取及其抗氧化、降血糖和降血脂活性分析 [J]. *粮食与油脂*, 2025, 38(1): 115-120.
- [20] 喻冬秀, 梁英琪, 钟建军. 咪唑类离子液体与茶皂素复配体系 CMC 的探究 [J]. *化学研究与应用*, 2023, 35(9): 2139-2147.
- [21] 张亚林, 郭志刚, 王丹凤, 等. 鞣花酸自胶束化固体分散体制备及口服药动学行为研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(13): 4350-4360.
- [22] 杨璞, 李晓, 宋亚琼, 等. 二氢杨梅素混合胶束的制备、表征及药动学研究 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(10): 2351-2360.
- [23] 凌延文, 白丹妮, 胡艳秋, 等. 负载胡桃醌的白及多糖-维生素 E 琥珀酸酯聚合物胶束的制备及表征 [J]. *中草药*, 2024, 55(11): 3668-3678.
- [24] Dai Z Q, Song J F, Chen Y, *et al.* Study on the bioavailability of stevioside-encapsulized lutein and its mechanism [J]. *Food Chem*, 2021, 354: 129528.
- [25] 董亚楠, 任书强, 柳超, 等. 蒙花苷疏基化纳米胶束的制备、表征及其口服吸收生物利用度评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(23): 7776-7787.
- [26] 李禄辉, 郭允, 侯先巧, 等. 包载三苯基膦-阿霉素和槲皮素的还原敏感性抗肿瘤耐药纳米混合胶束的制备及评价 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(7): 1563-1571.
- [27] Zhu D B, Zhang Q Q, Chen Y F, *et al.* Mechanochemical preparation of triptolide-loaded self-micelle solid dispersion with enhanced oral bioavailability and improved anti-tumor activity [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 1398-1408.
- [28] 孙丽, 李瑞华, 吉媛媛, 等. 高良姜素自胶束化固体分散体的制备、口服药动学和降血糖作用评价 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(1): 143-156.

[责任编辑 郑礼胜]