

# 田蓯苁固体脂质纳米粒的优化及其在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运研究

谭梅娥<sup>1,3</sup>, 姜雯<sup>2</sup>, 曾诚<sup>2</sup>, 何承辉<sup>3</sup>, 邢建国<sup>3\*</sup>

1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832003

2. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830004

**摘要:** 目的 制备并优化田蓯苁固体脂质纳米粒 (T-SLNs), 对其理化性质及体外吸收和转运进行考察。方法 采用高剪切乳化超声法制备了 T-SLNs, 利用星点设计-效应面法 (CCD-RSM) 对其制备工艺进行了优化, 并对其平均粒径、多分散性指数 (PDI)、Zeta 电位、形态、包封率及体外释放等特性进行了考察, 使用 Caco-2 细胞模型模拟小肠上皮细胞, 对 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的吸收和转运进行了考察。结果 T-SLNs 的最佳制备工艺: 药脂比 (质量比) 0.11, 大豆卵磷脂与脂质质量比 1.26, 聚山梨酯-80 用量 50.5 mg/mL, 所制备的 T-SLNs 外观呈球形或类球形, 大小相近, 分散均匀, 平均粒径为  $(86.40 \pm 0.62)$  nm, PDI 为  $0.165 \pm 0.080$ , Zeta 电位为  $(-24.2 \pm 0.6)$  mV, 包封率为  $(89.81 \pm 1.07)\%$ , 在磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.8) 中 48 h 累积释放率为  $(98.72 \pm 1.57)\%$ 。T-SLNs 在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运均高于田蓯苁组。结论 高剪切乳化超声法制备 T-SLNs 的工艺稳定可行, 制备的 T-SLNs 具有较小的粒径和较高的包封率, 相同浓度下 T-SLNs 在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运均高于田蓯苁组。

**关键词:** 田蓯苁; 固体脂质纳米粒; 高剪切乳化超声法; 星点设计-效应面法; Caco-2 细胞; 吸收; 转运

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2051-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.020

## Optimization of tilianin loaded solid lipid nanoparticles and its absorption and transport study in Caco-2 cell model

TAN Mei-e<sup>1,3</sup>, JIANG Wen<sup>2</sup>, ZENG Cheng<sup>2</sup>, HE Cheng-hui<sup>3</sup>, XING Jian-guo<sup>3</sup>

1. Institute of pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China

2. Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China

3. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

**Abstract: Objective** To prepare and optimize tilianin loaded solid lipid nanoparticles (T-SLNs), and investigate the physicochemical properties, absorption and transport behaviour of T-SLNs *in vitro*. **Methods** T-SLNs were prepared by high shear homogenization followed by ultrasonication and optimized by central composite design and response surface methodology. In the study, the physicochemical properties of T-SLNs including size, polydispersity (PDI), Zeta potential, shape, entrapment efficiency and release profile *in vitro* were investigated, the absorption and transport behaviour of T-SLNs in Caco-2 cell model were also measured. **Results** The optimum formulation of T-SLNs consisted of: drug/lipid of 0.11, soy lecithin/lipid of 1.26, and content of tween-80 was 5.05%. The prepared T-SLNs were spherical and uniform with the mean particle diameter at  $(86.40 \pm 0.62)$  nm, PDI  $(0.165 \pm 0.080)$  and Zeta potential of  $(-24.2 \pm 0.6)$  mV, respectively. The average EE was  $(89.81 \pm 1.07)\%$ , and the release *in vitro* showed that tilianin was released about  $(98.72 \pm 1.57)\%$  in 48 h. Besides, the absorption and transport assays of T-SLNs in Caco-2 cells model indicated that T-SLNs had a higher absorption and transport than tilianin. **Conclusion** The method of high shear homogenization followed by ultrasonication is suitable for T-SLNs preparation. The optimal T-SLNs have a smaller particle size and high EE. Moreover, in the same concentration of tilianin, the absorption and transport amounts of T-SLNs in Caco-2 cell model were higher than tilianin.

**Key words:** tilianin; solid lipid nanoparticles; high shear homogenization followed by ultrasonication method; central composite design and response surface methodology; Caco-2 cell; absorption; transport

收稿日期: 2016-11-25

基金项目: 自治区高技术研究发展计划 (201517109); 自治区研究生科研创新项目 (XJGRI2015053)

作者简介: 谭梅娥, 女, 在读研究生, 研究方向为药物新制剂与新剂型。Tel: (0991) 2318172 E-mail: tanmeie258@163.com

\*通信作者 邢建国, 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为药物新制剂与新剂型。Tel: (0991) 2300682 E-mail: xjguodd@163.com

田蓟苣 (tilianin) 为唇形科青兰属植物香青兰的主要有效成分<sup>[1]</sup>, 研究表明, 香青兰具有治疗高血压、高血脂、抗动脉粥样硬化和保护心肌缺血/再灌注损伤等多种药理作用, 在心脑血管疾病的防治方面具有广阔的应用前景<sup>[2-5]</sup>。然而, 田蓟苣在生物药剂学分类系统 (BCS) 中属于第 4 类药物, 存在低溶解性、低渗透性、口服生物利用度差、有效血药浓度低等问题<sup>[6-8]</sup>, 这些缺点极大地限制了其疗效的发挥, 因此, 研究开发具有较高生物利用度的田蓟苣口服制剂具有重要的实用价值和应用前景。

固体脂质纳米粒<sup>[9]</sup> (solid lipid nanoparticles, SLNs) 是 20 世纪 90 年代发展起来的一种性能优异的新型纳米粒给药体系。与普通纳米制剂相比, SLNs 中的亲脂性固体脂质在提高药物的溶解度的同时增加了 SLNs 与生物膜的亲和性, 从而有效地提高了药物的口服生物利用度, 且 SLNs 对机体几乎没有毒副作用, 具有载药能力强, 缓控释及靶向作用, 利于大规模的生产, 提高药物的稳定性<sup>[10]</sup>等多种优点; 适合于 *iv*、*po*、皮肤、肺部、眼部、脑部等多种途径给药<sup>[11-12]</sup>; 其水分散系统可以进行高压灭菌, 从而使其具有长期的物理化学稳定性<sup>[13-14]</sup>; 这使得 SLNs 成为中药有效成分口服制剂研究的新技术。关于 SLNs 提高口服生物利用度的机制, 目前得到普遍认可的是脂质纳米粒通过脂解作用被小肠上皮细胞所吸收。SLNs 口服后并不是以完整的纳米粒被吸收, 而是先在胃肠道进行脂解, 脂解所得的单油酸甘油酯和脂肪酸与体内分泌的磷脂及胆汁盐形成混合胶束, 而包裹入纳米粒中的药物大部分则在脂解过程中通过不搅动的水层被转移至肠上皮细胞附近, 然后以形成的混合胶束或者游离分子的形式通过被动扩散方式被肠细胞所吸收, 从而促进了其口服吸收程度<sup>[15-18]</sup>。目前 SLNs 应用于田蓟苣的制剂未见报道。本实验制备田蓟苣 SLNs (T-SLNs), 并对其质量做了进一步的考察。

Caco-2 (the human colon adenocarcinoma cell lines) 细胞来源于人结肠腺癌细胞<sup>[19]</sup>, 体外培养一段时间后会分化成具有小肠上皮绒毛样的紧密连接的单层膜体系, 因其形态学和标志酶的表达和渗透类似于小肠上皮, 如药物的摄取方式、代谢机制、吸收、转运和消除等, 因而被广泛应用<sup>[20-21]</sup>。此外, Caco-2 细胞模型作为药物筛选工具既有生命力强, 同源性好, 省时等有点, 又有缺少肠壁黏液, 缺少部分代谢酶等缺陷<sup>[22-23]</sup>, 因此, 本实验为了考

察药物的吸收和转运, 采用 Caco-2 细胞模型来进行研究。为进一步改善田蓟苣的溶解度和吸收性能, 提高其疗效, 本研究选择体内可生物降解材料山嵛酸甘油酯为载体, 采用高剪切乳化超声法制备了 T-SLNs, 使用星点设计-效应面法<sup>[24]</sup> (CCD-RSM) 优化了其制备工艺。应用 Caco-2 细胞模型对其体外吸收和转运特性进行了考察。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

IKA® DS 磁力搅拌器, 德国艾卡仪器设备有限公司; D-500 Homogenizer, 德国维根斯有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波生物科技有限公司; 高效液相色谱仪, 美国安捷伦; JM21200EX 透射电镜, 日本电子公司; Microtrac S3500 激光粒度分析仪, 英国马尔文仪器有限公司; TGL-16K 高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 多功能酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; 倒置显微镜, 日本奥林尼克公司; CO<sub>2</sub> 恒温培养箱, 美国塞默菲公司; Millicell-ERS 电位仪, 美国密理博公司; 超净工作台, 日本安泰公司; Transwell 24 孔板, 美国康宁公司。

### 1.2 试剂

田蓟苣 (批号 20150825, 质量分数 ≥ 98%), 新疆维吾尔自治区药物研究所; 山嵛酸甘油酯 Compritol 888 ATO, 法国嘉法狮集团; 大豆卵磷脂, 上海艾维特医药科技有限公司; 聚山梨酯-80, 天津市科密欧化学试剂开发中心; 无水乙醇, 天津市风船化学试剂有限公司; DMEM 培养基、胰蛋白酶, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清、HBSS 缓冲液, 美国 Gibco 公司; DMSO, 北京化工厂; 维拉帕米 (批号 J1128A, 质量分数 > 99%), 大连美仑生物技术有限公司; 根皮苷 (批号 20151118, 质量分数 ≥ 98%), 上海基免实业有限公司; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 田蓟苣定量测定方法

**2.1.1 检测波长的选择** 称取田蓟苣、大豆卵磷脂、山嵛酸甘油酯和聚山梨酯-80 适量, 溶于 10 mL 量瓶中, 70%乙醇定容至刻度。以 70%乙醇为对照, 在波长 100~400 nm 进行扫描, 结果显示在 330 nm 波长处, 辅料对田蓟苣的测定无影响, 确定 330 nm 为检测波长。

**2.1.2 色谱条件** 色谱柱为 Reliasil C<sub>18</sub> 柱 (250

mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为 0.5%甲酸水溶液-乙腈 (30:70); 检测波长 330 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 田蓯苣苷保留时间为 11 min。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 精密称取田蓯苣苷对照品 5.00 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加入 70%乙醇溶液溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 制成含田蓯苣苷 200 μg/mL 的对照品储备液。

**2.1.4 供试品溶液的制备** 取 T-SLNs 溶液 1 mL, 加入甲醇溶液 3 mL 破乳, 超声破碎 30 min, 冷却, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即为供试品溶液。

**2.1.5 阴性供试品溶液的制备** 精密吸取空白 SLNs 溶液 1 mL, 加入 3 mL 甲醇破膜剂, 超声 30 min, 冷却, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得空白 SLNs 供试品溶液。

**2.1.6 专属性考察** 吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性供试品溶液各 10 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件考察辅料对田蓯苣苷峰面积的影响, 结果如图 1 所示, 结果表明辅料山萮酸甘油酯、大豆卵磷脂、聚山梨酯-80 对田蓯苣苷的出峰时间及峰面积没有影响。

**2.1.7 线性关系考察** 精密吸取对照品储备液分别稀释成质量浓度为 2.72、13.60、27.20、54.40、168.80 μg/mL 的田蓯苣苷系列对照品溶液。精密吸取田蓯苣苷对照品溶液 10 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得田蓯

苣苷回归方程分别为  $Y=24.122 X-81.406$ ,  $R^2=0.999 8$ , 结果表明田蓯苣苷在 2.72~168.80 μg/mL 线性关系良好。

**2.1.8 精密度试验** 精密吸取质量浓度分别为 27.20、54.40、168.80 μg/mL 的田蓯苣苷对照品溶液 10 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 测定对照品溶液中田蓯苣苷的峰面积值, 计算其 RSD 值。结果显示, 田蓯苣苷峰面积 RSD 分别为 0.65%、0.22%、0.21%。

**2.1.9 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 10 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件, 在 0~12 h 内每隔 2 h 测定供试品溶液中田蓯苣苷峰面积值并计算其 RSD 值, 共测定 6 次, 结果显示, 田蓯苣苷峰面积 RSD 为 0.61%, 表明该供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.1.10 重复性试验** 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液 6 份, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件测定, 记录田蓯苣苷峰面积并计算其质量浓度 RSD 值, 结果田蓯苣苷质量浓度的 RSD 为 0.48%, 结果表明该仪器重复性良好。

**2.1.11 加样回收率试验** 精密量取 0.5 mL 阴性供试品溶液 9 份, 依次加入质量浓度为 27.20、54.40、168.80 μg/mL 的田蓯苣苷对照品溶液 0.5 mL, 各 3 份, 按“2.1.2”项下色谱方法测定峰面积, 求算田蓯苣苷的量并计算其回收率, 结果显示, 田蓯苣苷平均回收率分别为 106.90%、101.90%、102.00%, RSD 分别为 1.08%、0.73%、1.33%。回收率结果表明该方法准确度良好。

## 2.2 SLNs 的制备

**2.2.1 T-SLNs 的制备** 将处方量田蓯苣苷、山萮酸甘油酯、大豆磷脂在高于脂质熔点 10 °C 以上熔融, 不断搅拌至透明澄清形成油相。将处方量的乳化剂聚山梨酯-80 溶于处方量的蒸馏水溶液中, 搅拌均匀, 加热至与油相相同的温度形成水相, 在磁力搅拌下将水相加入油相中混合均匀, 高速剪切 (12 000 r/min) 3 min 形成初乳, 初乳采用超声波细胞粉碎机进行探头超声 (功率 300 W) 5 min, 冷却至室温即得到 T-SLNs 分散液, 测得其平均粒径约 90 nm, 并具有较窄的粒径分布, 多分散性指数 (PDI) 为 0.165, 其胶体体系为澄清透明分散体。

**2.2.2 空白 SLNs 的制备** 将处方量山萮酸甘油酯、大豆磷脂在高于脂质熔点 10 °C 以上熔融, 不断搅拌至透明澄清形成油相。将处方量的聚山梨酯-80 溶于处方量的蒸馏水溶液中, 搅拌均匀, 加热至

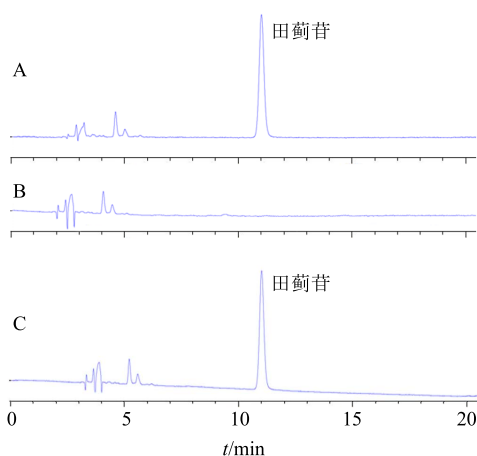


图 1 田蓯苣苷对照品溶液 (A)、阴性供试品溶液 (B) 和 T-SLNs 供试品溶液 (C) HPLC 图

Fig. 1 HPLC of tilianin reference substance (A), negative control (B), and T-SLNs samples (C)

与油相相同的温度形成水相,在磁力搅拌下将水相加入油相中混合均匀,高速剪切(12 000 r/min)3 min 形成初乳,初乳采用超声波细胞粉碎机进行探头超声(功率 300 W)5 min,冷却至室温即得到空白 SLNs 分散液。

### 2.3 包封率及载药量的测定

采用超滤离心法测定 T-SLNs 的包封率。取 T-SLNs 0.5 mL 加入超滤离心管中(截留相对分子质量 30 000),在 10 000 r/min 的条件下离心 30 min,吸取下层溶液,过 0.22 μm 滤膜,按“2.1.2”项下色谱条件测定田蓟苷的量,即为溶液中游离药物量( $W_{游}$ );同时精密移取 T-SLNs 0.5 mL,3 倍甲醇破乳,超声 30 min,8 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,按“2.1.2”项下色谱条件测定田蓟苷的量,即为 T-SLNs 中总药物的量( $W_{总}$ )。利用公式计算田蓟苷在 T-SLNs 中的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_{总} - W_{游}) / W_{总}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{包封的药物}} / (W_{\text{脂质材料}} + W_{\text{包封的药物}})$$

$W_{\text{包封的药物}}$ 为包在纳米粒中的田蓟苷的质量, $W_{\text{脂质材料}}$ 为脂质材料的质量

测定结果表明,T-SLNs 的包封率为(89.81±1.07)%,载药量为(8.03±1.83)%。

### 2.4 单因素试验考察 T-SLNs 处方

**2.4.1 脂质山嵛酸甘油酯用量的考察** 采用“2.2”项下制备工艺制备 T-SLNs,固定处方中田蓟苷 10 mg,大豆卵磷脂 100 mg,聚山梨酯-80 为 50 mg/mL,考察脂质山嵛酸甘油酯用量为 50、100、150、200 mg 时对 T-SLNs 平均粒径及包封率的影响,结果见表 1。结果表明随着脂质用量的增加粒径增大,包封率先增大后减小,脂质用量为 150 mg 时综合评分最高,因此暂定脂质用量为 150 mg。

**2.4.2 乳化剂聚山梨酯-80 用量的考察** 采用“2.2”项下制备工艺制备 T-SLNs,固定处方中田蓟苷 10 mg,山嵛酸甘油酯 100 mg,大豆卵磷脂 100 mg,考察聚山梨酯-80 用量为 10、20、40、80 mg/mL 时

对 T-SLNs 平均粒径及包封率的影响,结果见表 2。结果表明随着乳化剂用量的增加粒径增大,包封率先增大后减小,乳化剂用量为 4.0 mg/mL 时综合评分最高,因此暂定乳化剂用量为 4.0 mg/mL。

表 2 乳化剂用量的考察

Table 2 Study on dosage of emulsifier

| 乳化剂用量/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 平均粒径/nm     | 包封率/%      |
|------------------------------|-------------|------------|
| 10                           | 108.32±1.13 | 76.91±0.91 |
| 20                           | 90.51±1.74  | 83.24±1.44 |
| 40                           | 81.28±1.08  | 87.12±0.96 |
| 60                           | 87.36±0.40  | 85.11±0.78 |

**2.4.3 大豆卵磷脂用量的考察** 采用“2.2”项下制备工艺制备 T-SLNs,固定处方中田蓟苷 10 mg,山嵛酸甘油酯 100 mg,聚山梨酯-80 用量为 50 mg/mL,考察大豆卵磷脂与脂质的比例为 0.5:1、1.0:1、2.0:1 时对 T-SLNs 平均粒径及包封率的影响,结果见表 3。结果表明,随着大豆卵磷脂与脂质比例的增大粒径先减小后增大,包封率逐渐增大,大豆卵磷脂与脂质比为 1.0:1 时综合评分最高,因此暂定大豆卵磷脂与脂质比为 1.0:1。

表 3 大豆卵磷脂与脂质比例的考察

Table 3 Study on dosage of soybean lecithin

| 大豆卵磷脂与脂质比例 | 平均粒径/nm     | 包封率/%      |
|------------|-------------|------------|
| 0.5:1      | 103.71±0.61 | 80.56±1.44 |
| 1.0:1      | 87.66±0.92  | 86.17±0.90 |
| 2.0:1      | 117.39±1.14 | 89.32±0.57 |

### 2.5 CCD-RSM 优化 T-SLNs 处方

**2.5.1 因素水平的确定** 综合单因素试验的结果以及其他所涉及的影响因素,选用对 T-SLNs 平均粒径、PDI 和包封率影响较为显著的脂质山嵛酸甘油酯用量( $X_1$ )、大豆卵磷脂与脂质质量比( $X_2$ )、聚山梨酯-80 用量( $X_3$ )为因素,平均粒径( $Y_1$ )、PDI( $Y_2$ )、包封率( $Y_3$ )为评价指标进行星点设计,因素与水平见表 4。

**2.5.2 模型拟合** 以各因素为自变量,3 个考察指标为因变量,应用 Expert Design 8.05 统计学处理软件进行多元线性回归和 2 项式拟合,以拟合优度( $R^2$ )和  $P$  值作为模型判定标准。

所得多元线性回归方程如下: $Y_1 = 108.28 + 9.24 X_1 + 2.18 X_2 - 0.12 X_3$ ,  $R^2 = 0.15$ ,  $P = 0.44$ ;  $Y_2 = 0.26 + 0.021 X_1 + 7.705 \times 10^{-3} X_2 + 0.045 X_3$ ,  $R^2 =$

表 1 脂质用量的考察

Table 1 Study of lipid content

| 脂质用量/mg | 平均粒径/nm     | 包封率/%      |
|---------|-------------|------------|
| 50      | 77.18±1.20  | 75.83±0.87 |
| 100     | 80.43±1.36  | 86.31±1.84 |
| 150     | 91.27±0.99  | 90.27±1.61 |
| 250     | 108.97±0.80 | 83.01±0.71 |



表 4 星点试验设计及结果

Table 4 Central composite design and response surface

| 试验号 | $X_1/\text{mg}$   | $X_2$              | $X_3/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $Y_1/\text{nm}$ | $Y_2$ | $Y_3/\%$ | 试验号 | $X_1/\text{mg}$  | $X_2$              | $X_3/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$ | $Y_1/\text{nm}$ | $Y_2$ | $Y_3/\%$ |
|-----|-------------------|--------------------|--------------------------------------|-----------------|-------|----------|-----|------------------|--------------------|--------------------------------------|-----------------|-------|----------|
| 1   | 170 (+1)          | 1.70 (+1)          | 67.8 (+1)                            | 108.66          | 0.390 | 78.08    | 11  | 125              | 2.00 (+ $\alpha$ ) | 50.0                                 | 139.70          | 0.230 | 88.79    |
| 2   | 80 (-1)           | 1.70               | 67.8                                 | 113.90          | 0.340 | 75.38    | 12  | 80               | 1.70               | 32.2 (-1)                            | 129.18          | 0.295 | 66.30    |
| 3   | 125 (0)           | 1.25 (0)           | 20.0 (- $\alpha$ )                   | 97.90           | 0.208 | 73.00    | 13  | 125              | 1.25               | 50.0                                 | 84.29           | 0.172 | 89.76    |
| 4   | 125               | 1.25               | 50.0 (0)                             | 110.20          | 0.171 | 89.80    | 14  | 80               | 0.80               | 32.2                                 | 119.04          | 0.296 | 57.18    |
| 5   | 125               | 1.25               | 50.0                                 | 84.30           | 0.173 | 89.88    | 15  | 125              | 1.25               | 50.0                                 | 84.25           | 0.175 | 89.79    |
| 6   | 125               | 1.25               | 80.0 (+ $\alpha$ )                   | 118.00          | 0.482 | 83.08    | 16  | 170              | 0.80               | 32.2                                 | 116.18          | 0.336 | 51.95    |
| 7   | 170               | 0.80 (-1)          | 67.8                                 | 133.12          | 0.370 | 73.70    | 17  | 50 (- $\alpha$ ) | 1.25               | 50.0                                 | 69.70           | 0.149 | 52.27    |
| 8   | 125               | 1.25               | 50.0                                 | 84.33           | 0.170 | 89.81    | 18  | 125              | 1.25               | 50.0                                 | 84.36           | 0.178 | 89.81    |
| 9   | 200 (+ $\alpha$ ) | 1.25               | 50.0                                 | 131.30          | 0.212 | 47.13    | 19  | 170              | 1.70               | 32.2                                 | 127.94          | 0.336 | 61.63    |
| 10  | 125               | 0.50 (- $\alpha$ ) | 50.0                                 | 128.00          | 0.193 | 56.07    | 20  | 80               | 0.80               | 67.8                                 | 101.20          | 0.319 | 78.81    |

0.20,  $P=0.29$ ;  $Y_3=76.67-1.53 X_1+5.48 X_2+6.29 X_3$ ,  $R^2=0.16$ ,  $P=0.42$ 。

2 项式方程如下:  $Y_1=88.54+9.24 X_1+2.18 X_2-0.12 X_3-4.44 X_1X_2+3.85 X_1X_3-4.21 X_2X_3+4.83 X_1^2+16.62 X_2^2+7.46 X_3^2$ ,  $R^2=0.76$ ,  $P=0.03$ ;  $Y_2=0.17+0.021 X_1+7.705\times 10^{-3} X_2+0.045 X_3-3.750\times 10^{-4} X_1X_2+2.125\times 10^{-3} X_1X_3+5.625\times 10^{-3} X_2X_3+0.021 X_1^2+0.032 X_2^2+0.080 X_3^2$ ,  $R^2=0.79$ ,  $P=0.01$ ;  $Y_3=89.73-1.53 X_1+5.48 X_2+6.29 X_3+1.05 X_1X_2+0.94 X_1X_3-2.23 X_2X_3-13.64 X_1^2-5.61 X_2^2-3.62 X_3^2$ ,  $R^2=0.95$ ,  $P=0.001$ 。

从  $R^2$  和  $P$  值可以看出, 3 个指标均采用 2 项式方程拟合效果较好。

**2.5.3 星点设计-效应面图** 根据拟合的方程, 以考察指标为纵坐标, 3 个因素中的 2 个因素为横坐标, 采用 Expert Design 8.0.5 分析软件分别绘制各指标与其影响因素的三维效应面图, 结果见图 2。

(1) 各因素对粒径 ( $Y_1$ ) 的影响: 根据 Expert Design 8.05 软件方差分析可得粒径大小受  $X_2$  (大豆卵磷脂与脂质质量比) 和  $X_3$  (聚山梨酯-80 用量) 的影响较为显著, 随着  $X_2$  和  $X_3$  的增大粒径先减小后增大 ( $P<0.05$ )。

(2) 各因素对 PDI ( $Y_2$ ) 的影响: 根据 Expert Design 8.05 软件方差分析可得 PDI 大小受  $X_1$  (药脂比) 和  $X_2$  (大豆卵磷脂与脂质质量比) 的影响较为显著, 随着  $X_1$  和  $X_2$  的增大 PDI 先减小后增大, 增大趋势较为明显 ( $P<0.05$ )。

(3) 各因素对包封率 ( $Y_3$ ) 的影响: 根据 Expert Design 8.05 软件方差分析可以看出包封率同时受

$X_1$  (药脂比)、 $X_2$  (大豆卵磷脂/脂质) 和  $X_3$  (聚山梨酯-80 用量) 的影响。随着  $X_1$  的增加, 包封率先增大后显著减小 ( $P<0.001$ ); 随着  $X_2$  和  $X_3$  的增加, 包封率先显著增加随后变化较小 ( $P<0.001$ )。

**2.5.4 验证试验** 根据最优工艺条件按“2.2”项下方法制备 3 批 T-SLNs 进行验证试验, 测定其平均粒径、PDI 及包封率, 取其平均值与拟合方程预测值进行比较, 并计算其偏差值, 结果如表 5 所示。

偏差=(预测值-实测值)/预测值

## 2.6 平均粒径和 Zeta 电位测定

将 T-SLNs 胶体溶液稀释 20 倍, 盛装于比色皿中, 置于激光粒度分析仪中, 测量温度 25 °C, 激光入射角度 90°, 进行粒度测定; 同样的样品加入带电极的比色皿中进行 Zeta 电位测定, 结果见图 3。所得结果是 3 次测定的平均值。在纳米制剂中, PDI 值范围 0~0.5 被认为是单分散和均匀的, 超过 0.5 表明不均匀和多分散性, 而 PDI 值小于 0.3 即为可接受的 SLNs<sup>[25-26]</sup>。Zeta 电位表示颗粒的表面电荷现象, 能够预测胶体分散体系的稳定性, 高 Zeta 电位时粒子不易发生聚集。Zeta 电位受诸多因素的影响, 如使用空间稳定剂或稀释 SLN 分散体时, Zeta 电位均下降。通常 Zeta 电位值为  $\pm 20$  mV 被认为是足以使 SLNs 稳定的。本实验制得的 T-SLNs 平均粒径为  $(86.40\pm 0.62)$  nm, PDI 为  $0.165\pm 0.080$ , Zeta 电位为  $(-24.2\pm 0.6)$  mV, 表明 T-SLNs 的稳定性较好。

## 2.7 透射电镜测定

取 1 mL 上述制备的 T-SLNs 胶体溶液, 稀释 10 倍, 滴于铜网上, 2% 磷钨酸负染, 室温静置 30 min

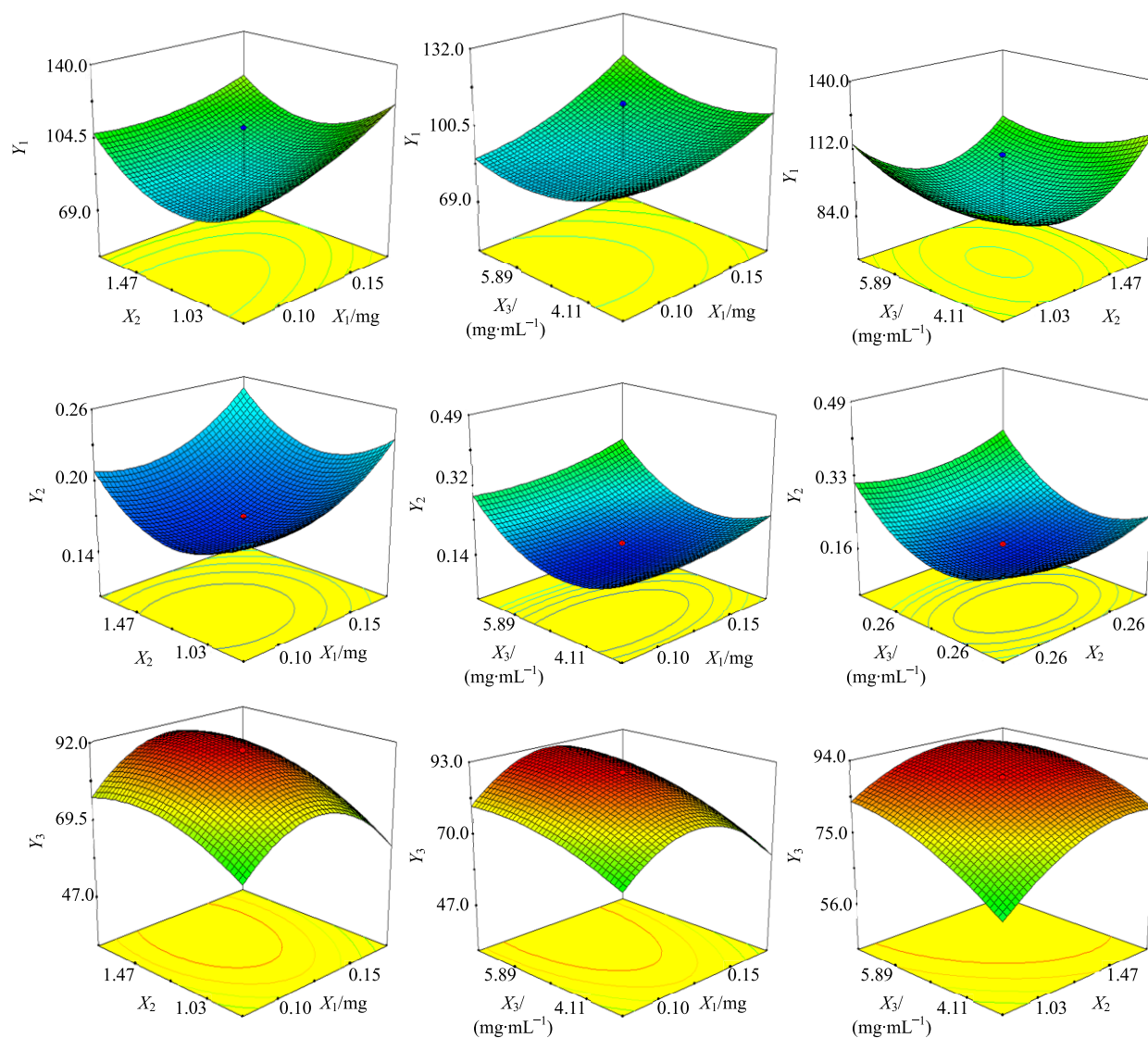


图 2 星点设计-效应面图

Fig. 2 Response-surface plots

表 5 实测值与预测值比较

Table 5 Comparison of measured and predicted values

| 测定值  | 平均粒径/nm    | PDI         | 包封率/%      |
|------|------------|-------------|------------|
| 预测值  | 86.18±1.13 | 0.160±0.150 | 89.58±1.69 |
| 实测值  | 86.40±0.62 | 0.165±0.080 | 89.81±1.07 |
| 偏差/% | 0.25       | 3.12        | 0.26       |

晾干,透射电镜下观察 T-SLNs 形态,结果如图 4 所示。由图 4 可看出,T-SLNs 呈球形或类球形,大小相近,分布均匀。

## 2.8 体外药物释放

**2.8.1 释放介质的筛选** 模拟体内条件,常常选择生理盐水或磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.8, PBS) 作为释放介质。本实验选取 PBS 作为释放介质。

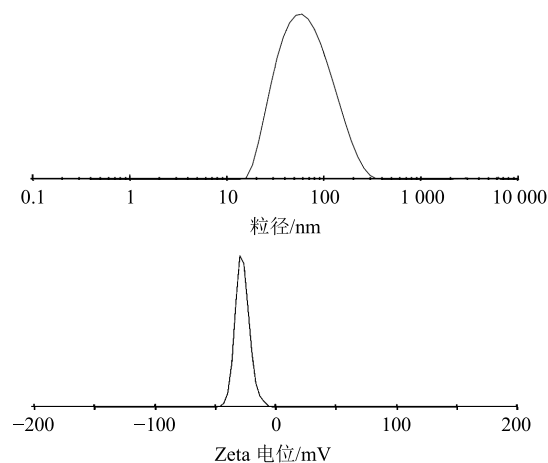


图 3 T-SLNs 粒径分布及 Zeta 电位图

Fig. 3 Particle size and Zeta potential of T-SLNs

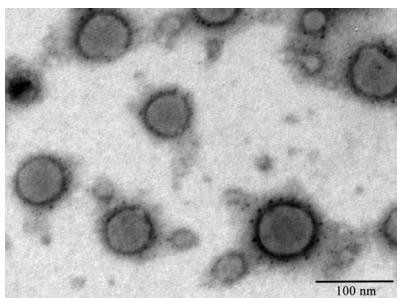


图 4 T-SLNs 的透射电镜图

Fig. 4 TEM image of T-SLNs

**2.8.2 体外释药曲线** 分别精密量取田蓟苷原料药溶液和 T-SLNs 胶体溶液 5 mL 于透析袋中(相对分子质量为 8 000~12 000),密封两端,置于 100 mL 的锥形瓶中,加入 50 mL 释放介质,将锥形瓶放入(37.0±0.5)℃恒温振荡器中,90 r/min 震荡,分别在溶出 0.5、1、2、5、7、9、11、15、19、24、28、32、36、48、72 h 取释放液 200 μL(同时补加 200 μL 孵育至 37℃新鲜释放介质),12 000 r/min,离心 10 min,取上清液,采用 HPLC 法按“2.1.2”项下色谱条件测定释放介质中田蓟苷的量,以纳米粒中田蓟苷的量为 100%计算累积释放率,同时测定原料药的累积释药率,绘制释药曲线图(图 5)。

$$Q_n = C_n \times V_0 + (C_1 + C_2 + C_3 + \dots + C_{n-1}) \times V$$

$Q_n$  第  $n$  个取样点的累积释药量,  $C_n$  第  $n$  个取样点的质量浓度,  $V_0$  释放介质体积,  $V$  每次的取样体积

通过 T-SLNs 和田蓟苷原料药在体外释药规律的研究发现,田蓟苷原料药在释放初期存在一定量的突释现象,前 8 h 累积释放量即达 83%。与原料药相比 T-SLNs 胶体溶液在 48 h 内持续缓慢地释放,这是由于药物在释放过程中载体材料溶解,使药物缓慢地释放出来,在保证稳定药物浓度的情况下进行缓慢持续地释放,48 h 累积释放率达(98.72±1.57)%。

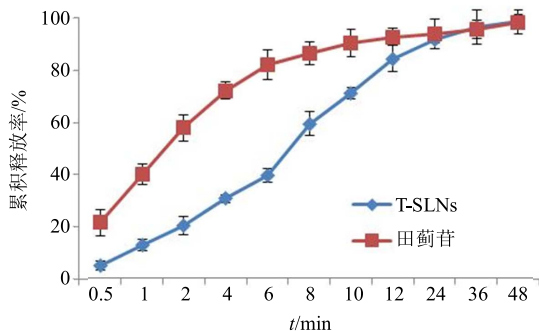


图 5 T-SLNs 的体外释放 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 5 In vitro drug release of T-SLNs ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

## 2.9 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的吸收和转运

**2.9.1 溶液配制** 精密量取 T-SLNs 溶液 5 mL,用 HBSS 缓冲溶液分别稀释至质量浓度为 5、25、50 μg/mL 溶液。精密称取田蓟苷原料药,用含 0.1% DMSO 的 HBSS 缓冲溶液配制成质量浓度为 5、25、50 μg/mL 的田蓟苷溶液,精密称取维拉帕米、根皮苷分别配制成质量浓度为 0.1、0.5 mmol/L,备用。

**2.9.2 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的吸收** 正常培养的 Caco-2 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,计数,配制成浓度为  $8 \times 10^4$  个/mL 的细胞悬液,按 1 mL/孔接种于 12 孔细胞培养板中,于 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育,24 h 后更换新的培养液,第 1 周隔天换液,第 2 周每天换液,培养 14 d 后,弃去培养液,用孵育至 37℃的 HBSS 溶液洗涤 3 次,第 3 次置于细胞培养相中孵育 30 min,目的是清除细胞表面对药物吸收测定有干扰的物质。分别加入不同浓度的田蓟苷和 T-SLNs 溶液于细胞表面,置于 37℃CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育。考察了田蓟苷和 T-SLNs 在不同质量浓度(5、25、50 μg/mL),不同时间(15、30、60 min)以及给药质量浓度为 25 μg/mL 时抑制剂(维拉帕米、根皮苷)对吸收的影响。给药相应的时间后,弃去培养液,收集细胞,使用探头超声细胞破碎仪破碎细胞,使用 HPLC 按“2.1.2”项下的色谱条件测定 Caco-2 细胞中田蓟苷的量。

(1) 培养时间对 Caco-2 细胞摄取田蓟苷的影响:田蓟苷和 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的吸收随着培养时间的增加而增加,在前 30 min 具有较明显的增加趋势,30 min 后趋于饱和,增加程度降低,因此,选用 30 min 作为其他影响因素的取样时间,该结论与前期研究结果相符<sup>[8]</sup>。

(2) 田蓟苷质量浓度对 Caco-2 细胞摄取田蓟苷的影响:田蓟苷和 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的吸收呈浓度依赖性,随着质量浓度的增加,田蓟苷和 T-SLNs 在细胞中的吸收也增加,对两组实验 3 个不同给药质量浓度下的吸收质量浓度结果进行  $t$  检验,结果表明在 3 个不同给药质量浓度时 Caco-2 细胞对 T-SLNs 的摄取量显著高于田蓟苷组(低质量浓度  $P<0.05$ ,中质量浓度  $P<0.001$ ,高质量浓度  $P<0.001$ )。结果见图 6。

(3) 抑制剂对 Caco-2 细胞摄取田蓟苷的影响:研究表明,田蓟苷在 Caco-2 细胞中的吸收受 P-糖蛋白及小肠肠壁上皮细胞膜的 Na<sup>+</sup>依赖葡萄糖转运载体 1 (SGLT1) 的调节<sup>[8,27]</sup>,在 P-糖蛋白抑制剂维

拉帕米和 SGLT1 的底物根皮苷的存在的情况下, 维拉帕米组田蓊苷和 T-SLNs 的吸收明显高于对照组 ( $P<0.001$ ), 根皮苷组田蓊苷和 T-SLNs 的吸收低于对照组 ( $P<0.001$ ), 且 T-SLNs 的变化趋势大于田蓊苷组。结果见表 6。

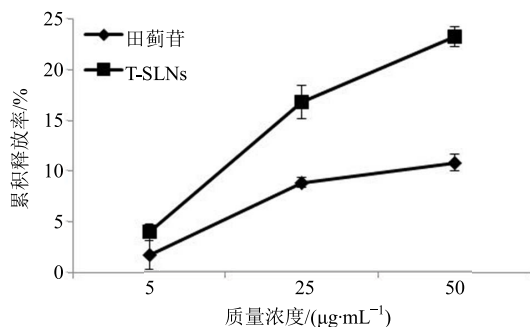


图 6 质量浓度对 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中吸收的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 6 Effects of concentration on absorption of T-SLNs in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

表 6 抑制剂对 Caco-2 细胞摄取田蓊苷的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 6 Effects of inhibitors on absorption of T-SLNs in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 抑制剂  | 质量浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> ) |                           |
|------|-----------------------------|---------------------------|
|      | 田蓊苷                         | T-SLNs                    |
| 对照   | 8.28±0.61                   | 15.74±0.85                |
| 维拉帕米 | 11.56±1.56 <sup>###</sup>   | 20.37±0.70 <sup>***</sup> |
| 根皮苷  | 5.87±0.81 <sup>###</sup>    | 12.47±0.96 <sup>***</sup> |

与田蓊苷对照组比较: <sup>###</sup> $P<0.001$ ; 与 T-SLNs 对照组比较:

<sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$

<sup>###</sup> $P<0.001$  vs tilianin control group; <sup>\*\*\*</sup> $P<0.001$  vs T-SLNs control group

**2.9.3 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的转运** 正常培养的 Caco-2 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 计数, 配制浓度为  $8 \times 10^4$  个/mL 的混悬液, 按 1 mL/孔接种于 Transwell 12 孔细胞培养板中的小室中, 于 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育, 24 h 后更换新的培养液, 第 1 周隔天换液, 第 1 周后每天换液, 培养过程中用电位仪定期测定小室中的电位, 培养 21 d 后, 取符合要求的 Transwell 板, 弃去培养液, 用孵育至 37 °C 的 HBSS 溶液洗涤 3 次, 第 3 次置于细胞培养相中孵育 30 min。在 Transwell 板中小室的肠腔侧 (apical, A) 或基底侧 (basolateral, B) 加入 1 mL 用 HBSS 溶液配制的田蓊苷和 T-SLNs 溶液作为供给池, 在其对应的 B 侧或 A 侧加入空白 HBSS 溶液 2 mL 作为接收池。分别于 15、30、60 min 吸取接

收池溶液 200 μL, 同时补加相同体积的预热至 37 °C 的新鲜 HBSS 溶液, 样品用 HPLC 按 “2.1.2” 项下色谱条件进行测定并记录峰面积, 按下式计算田蓊苷的表现渗透系数 ( $P_{app}$ )。

$$P_{app} = (dQ/dt) / (A \times C_0)$$

$dQ/dt$  为单位时间内田蓊苷的转运量 [ $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ],  $A$  为转运膜的面积 ( $0.33 \text{ cm}^2$ ),  $C_0$  为田蓊苷的初始质量浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

由表 7 可知, T-SLNs 在 Caco-2 细胞中的转运的  $P_{app}$  明显高于田蓊苷组, 其中田蓊苷组的 AP-BL 侧的  $P_{app}$  是 BL-AP 侧的 1.24 倍; T-SLNs 组 AP-BL 侧的  $P_{app}$  是 BL-AP 侧的 1.33 倍, 且 T-SLNs 组中的田蓊苷转运量优于田蓊苷组, 两者都介于 1.0~1.5 倍, 这可能是由于田蓊苷在 Caco-2 细胞中的转运存在载体介导作用。

表 7 田蓊苷和 T-SLNs 在 Caco-2 细胞中转运的渗透系数 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7  $P_{app}$  value of tilianin and T-SLNs in the transportation in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别     | 转移方向         | $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$ |                          |
|--------|--------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------|
|        |              | 15 min                                                    | 30 min                   |
| 田蓊苷    | A→B          | 3.59±0.70                                                 | 4.48±0.53                |
|        | B→A          | 3.87±0.55                                                 | 5.42±1.10                |
|        | $P_{app}$ 比值 | 1.07                                                      | 1.21                     |
| T-SLNs | A→B          | 8.68±0.72 <sup>***</sup>                                  | 10.27±1.25 <sup>**</sup> |
|        | B→A          | 11.32±1.90 <sup>**</sup>                                  | 13.50±1.30 <sup>**</sup> |
|        | $P_{app}$ 比值 | 1.31                                                      | 1.32                     |

与田蓊苷对照组比较: <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  <sup>\*\*</sup> $P<0.001$

<sup>\*\*</sup> $P<0.01$  <sup>\*\*</sup> $P<0.001$  vs tilianin control group

### 3 讨论

SLNs 具有较小的粒径和较窄的粒径分布, 由于其优良的理化特性和性质在临床应用中具有重要应用。田蓊苷在水中的平衡溶解度为  $1.57 \mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>[7]</sup>, T-SLNs 的高包封率和高载药量克服了其水溶性差的问题。

很多因素会影响 SLNs 的形成。其中, 脂质对 SLNs 的影响极其复杂, 脂质分子链越长, 油相黏度越高, 得到的 SLNs 粒径相应越大。复合脂质材料所制得的 SLNs 载药量更高。山嵛酸甘油酯是由山嵛酸和甘油酯化而得, 由山嵛酸单甘油酯、山嵛酸双甘油酯、山嵛酸三甘油酯组成, 由于其高熔点, 两亲性, 以固体粉末形式存在, 更易引入制剂, 有良好的润滑、乳化、骨架缓释功能, 且由于其是 3

种甘油酯的混合物,易形成有无序的晶格结构,作为载体材料对药物有更高的相容性和包裹效果<sup>[28]</sup>此外,乳化剂可影响 SLNs 的表面性质,降低表面张力,促进粒子分离,减少粒子聚集而达到稳定 SLNs 的作用<sup>[29-30]</sup>。乳化剂分子可插入脂质晶格中,影响晶格有序度,延缓晶型转变,从而增加纳米粒稳定性。与单一乳化剂相比,使用混合乳化剂可明显降低纳米粒的粒径,提高其稳定性<sup>[31-32]</sup>。磷脂和聚山梨酯-80 是常用的乳化剂,聚山梨酯-80 为常用的乳化剂、稳定剂和透明剂,磷脂作为乳化剂,制得纳米粒的粒径小,载药量高,稳定性良好。且处方中磷脂的用量越高,药物的包封率越大,这是因为磷脂可增加膜强度而利于药物的包裹。此外,磷脂的应用更有助于提高 SLNs 的安全性和降低可能因药物引起的过敏反应。

SLNs 的制备方法主要有高压乳匀法<sup>[33]</sup>、微乳法<sup>[34]</sup>、溶剂乳化蒸发法<sup>[35]</sup>、薄膜-超声分散法<sup>[36]</sup>、热熔乳化超声法和高剪切乳化超声法<sup>[37]</sup>。为了提高实验效率、节省材料的用量,本实验使用高剪切乳化超声法,制备的 SLNs 为澄清透明胶体,稳定性良好。高剪切乳化超声法是将高速剪切和探头超声相结合的制备方法,其中高速剪切用于制备和优化 SLNs 可以使粒子的粒径达到纳米级,但由于其较高的剪切力会产生大量的气泡和雾化,而探头超声形成的空穴力和机械力不仅可以使纳米粒均匀分散还可以克服高速剪切的缺点<sup>[38]</sup>,因此将高速剪切和超声相结合进行 T-SLNs 的制备,得到的 T-SLNs 粒呈球形或类球形,分布均匀,稳定性良好。

Caco-2 细胞模型被广泛用于药物体外吸收研究,是一种快速的药物筛选工具,可以阐明药物的吸收和转运机制。T-SLNs 作为一种纳米给药体系,其高亲脂性提高了其与生物膜的相容性,从而提高了其渗透性,且其较小的粒径不仅可以避免吞噬细胞的吞噬作用且使得其更易穿过细胞之间的间隙而被细胞吸收。本实验利用 Caco-2 细胞模型模拟小肠上皮对 T-SLNs 提高田蓟苷的细胞渗透性进行了相关研究,结果表明田蓟苷在 Caco-2 细胞中的吸收呈浓度依赖性,可能与被动扩散有关。此外,田蓟苷在 Caco-2 细胞中的吸收受到 P-糖蛋白的抑制,加入其抑制剂后田蓟苷的吸收增加;同时,存在于小肠肠壁上皮细胞膜的 Na<sup>+</sup>依赖葡萄糖转运载体 1 (SGLT1) 参与田蓟苷的吸收,其底物可竞争性抑制田蓟苷的吸收<sup>[8]</sup>。

志谢:新疆维吾尔自治区药物研究所药剂室和中国医学科学院药物研究所制剂室为本实验提供的实验平台和技术支持。

#### 参考文献

- [1] Najafi M, Ghasemian E, Fathiazad F, *et al.* Effects of total extract of *Dracocephalum moldavica* on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and infarct size in the isolated rat heart [J]. *Iran J Bas Med Sci*, 2009, 11(4): 229-235.
- [2] 袁 勇,邢建国,王新春,等. 香青兰黄酮类化合物的大鼠在体肠吸收 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(20): 1667-1670.
- [3] 姜 雯,彭克军,陈 强,等. 香青兰总黄酮对小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞形成的影响及其机制 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3432-3435.
- [4] 康小龙,邢建国,何承辉,等. 香青兰有效部位滴丸对心肌缺血大鼠血栓形成的影响 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(19): 1867-1870.
- [5] 樊鑫梅,曹文江,邢建国,等. 田蓟苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1625-1629.
- [6] 曾 诚,马丽月,于 宁,等. 香青兰提取物基本理化性质研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3817-3823.
- [7] 曾 诚,杨晓艺,帕伊曼·亥米提,等. 田蓟苷在不同介质中的平衡溶解度及油水分配系数 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 84-87.
- [8] 黄志巧,邢建国,王新春,等. 田蓟苷在 Caco-2 细胞模型中的吸收特性研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1315-1318.
- [9] 姚艳胜,季 鹏,刘 畅,等. 柚皮素固体脂质纳米粒冻干粉的制备及其大鼠肺部给药药动力学研究 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 591-598.
- [10] Üner M, Yener G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives [J]. *Int J Nanomed*, 2007, 2(3): 289-300.
- [11] Üner M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems [J]. *Pharmazie*, 2006, 61(5): 375-386.
- [12] 吴先闯,郝海军,宋晓勇,等. 白藜芦醇固体脂质纳米粒缓释凝胶骨架片的研制 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1303-1308.
- [13] Wissing S A, Kayser O, Müller R H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(9): 1257-1272.
- [14] 孙敏捷,盛 星,胡 一. Caco-2 细胞单层模型的建立



- 与验证 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(18): 1431-1434.
- [15] Hu X, Fan W, Yu Z, *et al.* Evidence does not support absorption of intact solid lipid nanoparticles via oral delivery [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(13): 7024-7035.
- [16] Hu X W, Zhang J, Yu Z, *et al.* Environment-responsive aza-BODIPY dyes quenching in water as potential probes to visualize the *in vivo* fate of lipid-based nanocarriers [J]. *Nanomedicine: NBM*, 2015, 11(8): 1939-1948.
- [17] Shangguan M Z, Qi J P, Lu Y, *et al.* Comparison of the oral bioavailability of silymarin-loaded lipid nanoparticles with their artificial lipolysate counterparts: implications on the contribution of integral structure [J]. *Int J Pharm*, 2015, 489(1/2): 195-202.
- [18] Porter C J H, Trevaskis N L, Charman W N. Lipids and lipid-based formulation: Optimizing the oral delivery of lipophilic drugs [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(3): 231-248.
- [19] 关 溯, 陈 孝, 黄 民. Caco-2 细胞模型-药物吸收研究的有效“工具” [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 609-614.
- [20] 毛小琴, 贾雄飞. Caco-2 细胞单层模型的建立和评估 [J]. 四川医学, 2013, 34(1): 7-9.
- [21] 杨海涛, 王广基. Caco-2 单层细胞模型及其在药学中的应用 [J]. 药学学报, 2000, 35(10): 797-800.
- [22] 高 坤, 孙 进, 何仲贵. Caco-2 细胞模型在口服药物吸收研究中的应用 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(6): 469-474.
- [23] 杨秀伟, 杨晓达, 王 莹, 等. 中药化学成分肠吸收研究中 Caco-2 细胞模型和标准操作规程的建立 [J]. 中西医结合学报, 2007, 5(6): 634-641.
- [24] 吕 莎, 张梦雅, 罗晓云, 等. 星点设计-效应面法优化牛樟芝总三萜提取工艺及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 3990-3996.
- [25] Mukherjee B, Santra K, Pattnaik G, *et al.* Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers [J]. *Int J Nanomed*, 2008, 3(4): 487-496.
- [26] Yoon G, Park J W, Yoon I S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): Recent advances in drug delivery [J]. *J Pharm Invest*, 2013, 43(5): 353-362.
- [27] 袁 勇, 王新春, 陈卫军, 等. 田菊苷微乳在 Caco-2 细胞模型吸收动力学的研究 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(12): 1775-1776.
- [28] Siddiqui A, Alayoubi A, El-Malah Y, *et al.* Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM) [J]. *Pharm Dev Technol*, 2014, 19(3): 342-346.
- [29] Rowe R C, Sheskey P J, Quinn M E. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* [M]. 6<sup>th</sup>ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.
- [30] Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, *et al.* Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effect on size, physical stability and particle matrix structure [J]. *Int J Pharm*, 2011, 406(1/2): 163-172.
- [31] Kullavadee K O, Uracha R, Smith S M, *et al.* Effect of surfactant on characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN) [J]. *Adv Mat Res*, 2012, 364: 313-316.
- [32] Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles-production, characterization and applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(2/3): 165-196.
- [33] Genç L, Dikmen G. Preparation and characterization of nocodazole-loaded solid lipid nanoparticles [J]. *Pharm Dev Technol*, 2014, 19(6): 671-676.
- [34] Shah R M, Malherbe F, Eldridge D, *et al.* Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2014, 428: 286-294.
- [35] Pandita D, Kumar S, Poonia N, *et al.* Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol [J]. *Food Res Int*, 2014, 62(62): 1165-1174.
- [36] Li W F, Li H N, Yao H, *et al.* Pharmacokinetic and anti-inflammatory effects of sanguinarine solid lipid nanoparticles [J]. *Inflammation*, 2014, 37(2): 632-638.
- [37] Ramalingam P, Ko Y T. Enhanced oral delivery of curcumin from *n*-trimethyl chitosan surface-modified solid lipid nanoparticles: Pharmacokinetic and brain distribution evaluations [J]. *Pharm Res*, 2015, 32(2): 389-402.
- [38] Mishra D K, Dhote V, Bhatnagar P, *et al.* Engineering solid lipid nanoparticles for improved drug delivery: Promises and challenges of translational research [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2012, 2(4): 238-253.