

复方人参皂苷纳米乳的制备及其急性毒性研究

曹发昊^{1,2}, 欧阳五庆^{2*}, 王艳萍¹

(1. 运城学院生命科学系, 运城 044000; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 利用纳米化技术, 将人参皂苷和盐酸左旋咪唑组成复方人参皂苷纳米乳, 对其组成和急性毒性进行研究。利用伪三元相图筛选出用于制备复方人参皂苷纳米乳的空白纳米乳; 研究不同含药量纳米乳对免疫抑制小鼠脾 T 淋巴细胞增殖的影响, 根据免疫增强作用较强的含药纳米乳, 确定复方人参皂苷纳米乳的组成; 分别用透射电镜、激光粒度仪和小鼠灌胃试验对其形态、粒径和急性毒性进行研究。结果显示, 确定的复方人参皂苷纳米乳组成: Solutol[®] HS-15、甘油、PEG400、IPM、蒸馏水, 其质量比为 25.33 : 10.14 : 2.53 : 6 : 56, GS 和 LH 含量均为 30 mg · mL⁻¹; 它是黄色透明 O/W 纳米乳, 液滴呈球形, 平均粒径为 23.08 nm, 粒度分散指数为 0.237, 小鼠灌胃 LD₅₀ 为 402.85 mg · kg⁻¹。本试验成功制备了复方人参皂苷纳米乳, 为进一步开发纳米化免疫增强剂提供了依据。

关键词: 人参皂苷; 左旋咪唑; 纳米乳; 免疫增强

中图分类号: S859.53

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0666-06

Study on the Preparation and Acute Toxicity of Nanoemulsion Containing Ginsenoside and Levamisole Hydrochloride

CAO Fa-hao^{1,2}, OU YANG Wu-qing^{2*}, WANG Yan-ping¹

(1. Department of Life Sciences, Yuncheng University, Yuncheng 044000, China;

2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: By using nanotechnology, ginsenoside (GS) and levamisole hydrochloride (LH) were combined with the carrier nanoemulsion to prepare compound GS and LH nanoemulsion (GS-LH-NE). Then its composition and acute toxicity were evaluated. The optimum blank nanoemulsion, which was used to prepare GS-LH-NE, was screened out through pseudo-ternary phase diagram. The enhancement effect of nanoemulsion containing different content of drug on the immunologic function of immunosuppressive mice were studied through splenic lymphocytes proliferation test, and the nanoemulsion with a better immunologic enhancement effect was screened out for ascertaining the composition of GS-LH-NE. The morphology of GS-LH-NE was observed using transmission electron microscope; the particle size was measured using laser particle size analyzer; the gavage acute toxicity of GS-LH-NE was measured using mice. The ascertained composition of GS-LH-NE was Solutol[®] HS-15/glycerol/PEG400/IPM/distilled water (with the mass ratio of 25.33 : 10.14 : 2.53 : 6 : 56), in which the content of GS and LH were both 30 mg · mL⁻¹ and 30 mg · mL⁻¹, respectively. GS-LH-NE was a yellow transparent oil-in-water nanoemulsion, which had spherical droplets with the particle size of 23.08 nm and PDI of 0.237, and its gavage LD₅₀ was 402.85 mg · kg⁻¹. GS-LH-NE is successfully prepared and provides the possibility to develop immunologic enhancer through nanotechnology.

收稿日期: 2013-09-30

基金项目: 陕西省重大科技创新专项基金(K332020916); 运城学院院级科研项目(CY-2012005)

作者简介: 曹发昊(1981-), 男, 河南辉县人, 博士, 主要从事纳米药物和天然活性成分研究, E-mail: fahaocao@163.com

* 通信作者: 欧阳五庆(1960-), 教授, 主要从事纳米生物技术和新兽药开发研究

Key words: ginsenoside; levamisole; nanoemulsion; immunologic enhancement

免疫增强剂能提高机体的免疫功能,增强机体对抗原的免疫反应。人参皂苷(ginsenoside,GS)已被证实是很好的免疫增强剂,能提高免疫细胞的活性,调节NK细胞-IFN-IL-2免疫网络系统,增强机体的免疫力^[1-2]。左旋咪唑是人工合成的化学物,常用其盐酸盐或磷酸盐,不仅能驱虫,还有很好的调节免疫力的功效^[3-4]。人们对畜产品的安全问题越来越重视,如果在保证或者提高药物免疫增强效果的同时,通过一些手段尽量减少化学药物的使用量,降低其毒副作用和药物残留,不失为使用化药的一种可取方式。复方制剂和药物合用可能会改变原来药物的作用性质和强度,在临床上得到广泛应用。因此,本研究拟将GS和盐酸左旋咪唑(levamisole hydrochloride,LH)组合成复方制剂。但是GS在溶液中不稳定,容易发生水解;GS口服后在胃肠道容易降解;GS有许多单体,不同单体的极性可能有一定的差异,导致其在水溶液中的溶解性不同。LH溶液的pH值随着时间的延长会逐渐下降。因此,如何提高GS和LH在溶液中的稳定性是一个需要解决的问题。

纳米乳(nanoemulsion,NE)是由表面活性剂、助表面活性剂、水相和油相在适宜配比下形成的一种稳定透明的胶体分散体系,粒径介于10~100 nm。作为药物载体,纳米乳在药物传递方面具有许多优势,如增溶、提高稳定性和生物利用度、降低毒副作用等^[5-7]。纳米乳作为药物载体能使药物存在于其内相中,减少药物与外相的接触机会,可以在一定程度上提高药物的稳定性,并且纳米乳中的表面活性剂和助表面活性也能起到稳定药物的作用。GS有亲水基团和疏水基团,有表面活性的性质,具有形成类似免疫刺激复合物ISCOMs纳米结构的可能性^[8-9]。LH能溶于水,可作为纳米乳的水相成分。因此,本研究以纳米乳作为载体,将GS和LH组合成复方人参皂苷纳米乳(GS-LH-NE),对其组成和急性毒性进行研究,为进一步开发纳米化免疫增强剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和药品 GS(含量80%),陕西浩洋生物科技有限公司产品;LH,山东弘扬兽药原料有

限公司产品;Solutol® HS-15、Cremophor EL-40、PEG400,德国BASF生产;Span80,上海帝科精细化工有限公司产品;Tween80,上海索莱宝生物科技有限公司产品;甘油,西安三浦精细化工厂产品;异丙醇,上海陵尔化工有限公司生产;肉豆蔻酸异丙酯(IPM),浙江物美化学品有限公司生产;RPMI-1640培养基,美国Gibco公司产品;ConA,Sigma公司产品;MTS,Promega公司产品。

1.1.2 仪器 JEM1230透射电镜,日本JEOL公司产品;Zetasizer Nano ZS激光粒度分析仪,英国Malvern Instrument公司产品;酶标仪,Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 药用空白纳米乳的筛选 室温下,将表面活性剂和助表面活性剂按一定质量比混合,再将其和油相按质量比1:9~9:1混合,然后边搅拌边滴加水相,记录体系的变化,用Origin7.5绘制伪三元相图,确定O/W纳米乳区。伪三元相图中,其中1个顶点代表表面活性剂和助表面活性剂组成的混合表面活性剂(S_{mix}),另外2个顶点分别代表油相(Oil)和水相(Water)。在伪三元相图考察纳米乳形成的基础上,筛选出纳米乳区较大、稳定性较好的药用空白纳米乳,考察其对药物的增溶能力,最终确定用于制备GS-LH-NE的药用空白纳米乳的组成。

1.2.2 GS-LH-NE的筛选 为了确定GS-LH-NE中2种药物的配比关系,通过考察不同含药量纳米乳对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖的影响,根据免疫增强作用较好的含药纳米乳,来确定GS-LH-NE的组成。

将LH溶解于蒸馏水中作为水相,将GS加到Solutol® HS-15、甘油、PEG400和IPM组成的混合物中混合,然后边搅拌边滴加含LH的水相,制备含不同药量的纳米乳NE1、NE2和NE3。NE1中GS和LH的含量分别为30和90 mg·mL⁻¹;NE2中GS和LH的含量分别为30和30 mg·mL⁻¹;NE3中GS和LH的含量分别为30和10 mg·mL⁻¹。

小鼠随机分为6组,雌雄各半,每组10只。正常对照组和CTX对照组:灌胃蒸馏水;空白纳米乳(blank nanoemulsion, blank NE)组:灌胃不含药物空白纳米乳;NE1组:以33.33 mg·kg⁻¹药物剂量灌胃NE1;NE2组:以50 mg·kg⁻¹药物剂量灌胃

NE2; NE3 组: 以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 药物剂量灌胃 NE3。NE1、NE2 和 NE3 的药物剂量均以 GS 和 LH 用量之和计算。各组小鼠的灌胃量均为 0.4 mL , 每天给 1 次药, 连续用药 15 d。除正常对照组外, 其余各组小鼠分别于第 3、6、9 天腹腔注射环磷酰胺 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。末次给药 12 h 后, 无菌取脾, 制成 $5 \times 10^6 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脾细胞悬液^[10]。

于 96 孔培养板中每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 脾细胞悬液, 然后每孔再加入含 ConA(终浓度 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 RPMI-1640 培养液, 每孔总体积为 $200 \mu\text{L}$ 。同时设阴性对照组(细胞和 RPMI-1640 培养液)和空白对照组(RPMI-1640 培养液)。将细胞于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 44 h 后, 掺入 MTS, 继续培养 4 h 后, 酶标仪于 490 nm 测其 OD 值, 计算增殖刺激指数 $SI = \frac{OD_1}{OD_2}$ (式中, OD_1 和 OD_2 分别为加有丝分裂原培养物和不加有丝分裂原培养物的 OD 值)。

1.2.3 GS-LH-NE 形态观察和粒径测定 透射电镜观察其形态。激光粒度仪测其粒径和粒度分散指数 (particle dispersion index, PDI)。

1.2.4 急性毒性试验 试验分为 3 组: 生理盐水对照组、空白纳米乳组和 GS-LH-NE 组。通过预试验, 找出药物引起小鼠 100% 和 0% 死亡的剂量范围 (药物剂量以 GS 和 LH 用量之和计算)。在正式试

验中, 各给药组分别设 6 个剂量组, 每个剂量组 10 只小鼠, 雌雄各半, 计算相邻 2 个剂量组的比值 $r = \sqrt[n-1]{\frac{A}{B}}$ (式中, A 和 B 分别为最高致死量和最低致死量, n 为组数), 以此一系列剂量组对小鼠灌胃, 灌胃量均为 0.4 mL , 给药后连续观察 14 d, 记录各组小鼠的中毒和死亡情况, 计算半数致死量 LD_{50} 。

2 结果

2.1 药用空白纳米乳的筛选

预试验, 发现 IPM 作为油相的纳米乳的乳区大小和稳定性要优于花生油和辛酸-癸酸甘油三酯的纳米乳, 故本研究选用 IPM 作为油相, 来进一步筛选纳米乳的组成。

2.1.1 表面活性剂对纳米乳形成的影响 考察了 3 种非离子表面活性剂对甘油/PEG400/IPM/蒸馏水(甘油/PEG400 质量比 4 : 1, $K_m = 2 : 1$) 纳米乳体系的影响, 见图 1。图中黑色部分即为 O/W 纳米乳区(以下伪三元相图相同)。纳米乳区大小如下: Solutol® HS-15 > Cremophor EL-40 > Tween80/Span 80 (质量比 4 : 1), 并且 Solutol® HS-15 纳米乳的稳定性优于其他 2 种表面活性剂的。故优选 Solutol® HS-15。

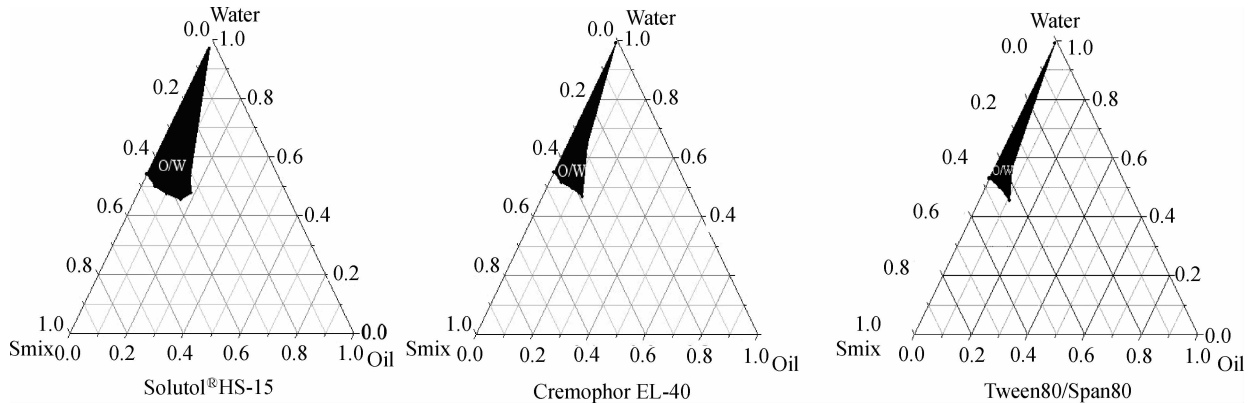


图 1 非离子表面活性剂对甘油/PEG400/IPM/蒸馏水(甘油/PEG400 质量比 4 : 1, $K_m = 2 : 1$) 纳米乳体系的影响
Fig. 1 Effect of nonionic surfactant on the nanoemulsion system consisting of glycerol/PEG400/IPM/distilled water (the mass ratio of glycerol/PEG400 = 4 : 1, $K_m = 2 : 1$)

2.1.2 助表面活性剂对纳米乳形成的影响 考察了助表面活性剂对 Solutol® HS-15/IPM/蒸馏水 ($K_m = 2 : 1$) 纳米乳体系的影响, 见图 2。纳米乳区大小如下: 甘油/PEG400 混合物(质量比 4 : 1) > 异丙醇。故优选甘油/PEG400 混合物(质量比 4 : 1)。

2.1.3 K_m 对纳米乳形成的影响 考察了 K_m

(表面活性剂/助表面活性剂质量比) 对 Solutol® HS-15/甘油/PEG400/IPM/蒸馏水(甘油/PEG400 质量比 4 : 1) 纳米乳体系的影响, 见图 3。纳米乳区大小如下: $K_m = 2 : 1 > K_m = 4 : 1 > K_m = 1 : 1$, 并且 $K_m = 2 : 1$ 纳米乳的稳定性优于其他两个比例的。故优选 $K_m = 2 : 1$ 。

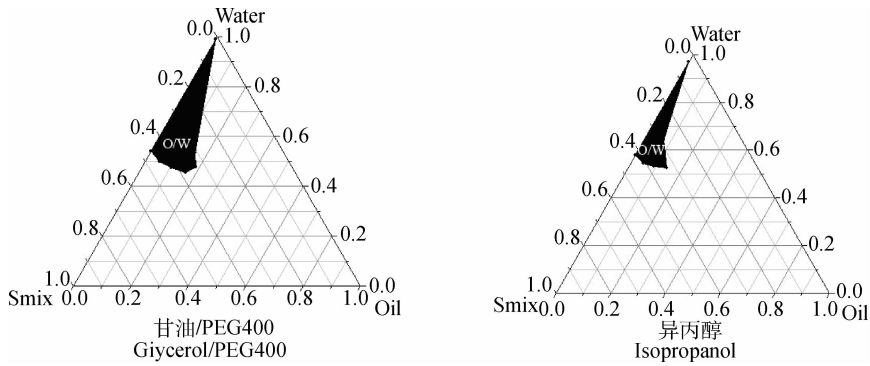


图 2 助表面活性剂对 Solutol[®] HS-15/IPM/蒸馏水($K_m=2:1$)纳米乳体系的影响

Fig. 2 Effect of co-surfactant on the nanoemulsion system consisting of Solutol[®] HS-15/IPM/distilled water($K_m=2:1$)

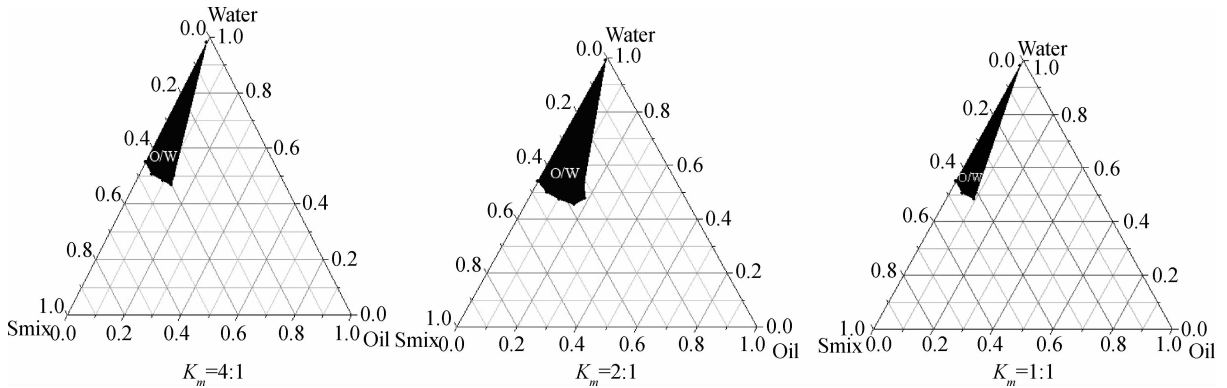


图 3 K_m 对 Solutol[®] HS-15/甘油/PEG400/IPM/蒸馏水(甘油/PEG400 质量比 4:1)纳米乳体系的影响

Fig. 3 Effect of K_m on the nanoemulsion system consisting of Solutol[®] HS-15/glycerol/PEG400/IPM/distilled water (the mass ratio of glycerol/PEG400=4:1)

2.2 GS-LH-NE 组成的确定

在利用伪三元相图考察纳米乳形成的基础上,筛选出纳米乳区较大、稳定性较好的空白纳米乳 Solutol[®] HS-15/甘油/PEG400/IPM/蒸馏水,其质量比为 25.33:10.14:2.53:6:56,溶解 GS 和 LH 最大量分别为 30.82 和 96.65 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

为了确定 GS-LH-NE 中 2 种药物的配比关系,通过考察含不同药量的纳米乳 NE1、NE2 和 NE3 对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖的影响,结果见表 1。与 CTX 对照组比较,空白纳米乳组 SI 值变化不显著($P>0.05$),表明空白纳米乳对脾淋巴细胞的增殖活性无明显影响。NE2 组 SI 值较 NE1 组显著升高($P<0.05$);较 NE3 组有所升高,差异不显著($P>0.05$)。可见,NE2 的免疫增强效果较好,故根据 NE2 确定 GS-LH-NE 组成如下:Solutol[®] HS-15/甘油/PEG400/IPM/蒸馏水(质量比为 25.33:10.14:2.53:6:56),GS 和 LH 含量均为 30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 GS-LH-NE 形态和粒径

透射电镜和粒度仪结果分别见图 4、5。GS-LH-NE 乳滴呈球形,平均粒径为 23.08 nm,PDI 为 0.237。

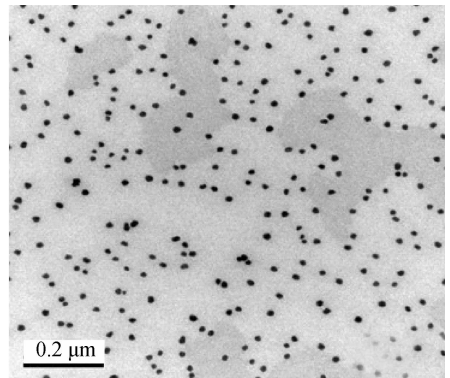


图 4 GS-LH-NE 透射电镜照片

Fig. 4 Morphology of GS-LH-NE under transmission electron microscope

2.4 急性毒性试验

本研究将空白纳米乳用原液按体重以灌胃量

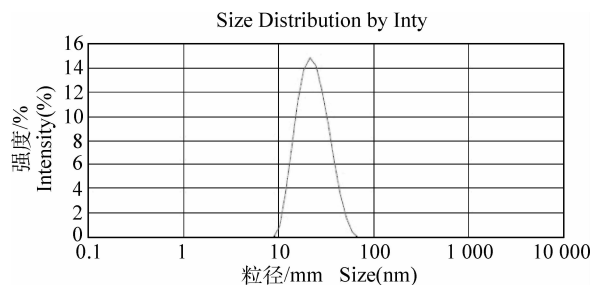


图5 GS-LH-NE的粒径分布

Fig. 5 Particle size distribution of GS-LH-NE

表1 脾淋巴细胞增殖试验结果($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Test result of splenic lymphocytes proliferation

分组 Groups	剂量 Dosage ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	SI
正常对照组 Normal control group	—	1.88 ± 0.30^b
CTX 对照组 CTX control group	—	1.05 ± 0.29^{ac}
空白纳米乳组 Blank NE group	—	1.07 ± 0.26^{ac}
NE1 组 NE1 group	33.33	1.47 ± 0.32^{ABC}
NE2 组 NE2 group	50	1.92 ± 0.40^b
NE3 组 NE3 group	100	1.73 ± 0.31^b

与正常对照组比较,肩标^A和^a分别表示差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。与CTX对照组比较,肩标^B和^b分别表示差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。与NE2组比较,肩标^C和^c分别表示差异显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)。Compared with normal control group, the shoulder characters ^A and ^a mean significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$), respectively. Compared with CTX control group, the shoulder characters ^B and ^b mean significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$), respectively. Compared with NE2 group, the shoulder characters ^C and ^c mean significant difference ($P < 0.05$) and extremely significant difference ($P < 0.01$), respectively.

$0.5 \text{ mL} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$ 对小鼠灌胃,结果发现小鼠均未死亡。预试验确定的GS-LH-NE组中相邻2个剂量组的比值 $r \approx 1.21$,正式试验的剂量分组及其毒性试验结果见表2。采用Bliss软件对表2的毒性结果进行处理可得:GS-LH-NE的急性毒性试验回归方程为 $y(\text{Probit}) = 10.265 \log(D) - 21.741$ (其中 D 为累计剂量, y 为累计死亡率概率单位),半致死剂

量 LD_{50} 为 $402.85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, LD_{50} (Feiller校正)95%的可信限为 $362.72 \sim 447.86 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表2 GS-LH-NE对小鼠灌胃的急性毒性试验结果

Table 2 Gavage acute toxicity result of GS-LH-NE in mice

剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$ Dose	动物数/只 Number	死亡数/只 Death number
245.00	10	0
296.45	10	1
358.70	10	3
434.03	10	7
525.18	10	8
635.47	10	10

3 讨论

纳米乳制备的关键是选择合适的表面活性剂、助表面活性剂、油相、水相及其间的配比关系。表面活性剂是纳米乳的必需成分,在医药领域,使用较多的是非离子型表面活性剂^[11-12]。本研究用的非离子表面活性剂Solutol® HS-15、Tween80/Span 80混合物和Cremophor EL-40,在无助表面活性剂的条件下也可以形成纳米乳,然而助表面活性剂的加入既有利于纳米乳的形成,又提高了稳定性和减少表面活性剂的用量,甚至还能对药物起到助溶作用。Solutol® HS-15是一种新型高效能、极低毒性的表面活性剂,具有较高的生理耐受性、高增溶能力等优点,现已被收录于德国药典^[13-14]。在助表面活性剂甘油/PEG400的作用下,与Tween80和Cremophor EL-40相比,Solutol® HS-15纳米乳区较大,稳定性较好,并且能在较大范围内被水相稀释到水相顶点,可以在一定程度上减少表面活性剂和助表面活性剂的用量;这可能是由于甘油/PEG400混合物更容易和Solutol® HS-15作用,降低界面膜的表面张力,增加其流动性,提高膜的稳定性。另外,通过调节 K_m 值也可以在一定程度上减少表面活性剂的用量,调节体系的黏度,利于体系的分散和乳化,加快纳米乳的形成。当 K_m 由1:1增大到4:1时,纳米乳区先增大后减小。当 $K_m = 2:1$ 时,可能是在此比例下助表面活性剂分子能更好地插入到表面活性剂分子间,降低界面张力,提高膜的流动性和稳定性,使界面膜扩展形成较大的增溶空间,加大纳米乳区。

纳米乳常需要足够量(助)表面活性剂来保持其结构的稳定性,但大量的(助)表面活性剂可能会有一定的副作用,应尽量减少纳米乳中(助)表面活性剂的用量^[15]。故本研究利用伪三元相图,考察表面活性剂、助表面活性剂以及 K_m 对纳米乳形成的影响,确定了制备 GS-LH-NE 的药用空白纳米乳的组成,其能溶解 GS 和 LH 的最大量分别为 30.82 和 96.65 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

不同 GS/LH 质量比可能会影响其免疫增强作用,因此需要进一步确定纳米乳中 GS/LH 质量比。GS 主要存在于纳米乳的内相中,而 LH 主要存在于外相中,本研究根据药用空白纳米乳中 GS 和 LH 达到最大含量时的质量比,并且本着纳米乳实现增溶 GS 的目的,通过固定纳米乳中 GS 含量为 30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,改变 LH 量,制备了 NE1、NE2 和 NE3 三个含药纳米乳,其中 GS/LH 质量比分别为 1:3、1:1 和 3:1。ConA 是能刺激 T 淋巴细胞增殖的有丝分裂原,常用来考察药物对 T 淋巴细胞的作用。通过考察不同含药量的纳米乳对免疫抑制小鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响,根据免疫增强作用较好的含药纳米乳 NE2,来确定 GS-LH-NE 的组成。

今后需要进一步考察 GS-LH-NE 在改善药物的稳定性和免疫增强作用,为进一步开发纳米化免疫增强剂提供依据。

4 结 论

以纳米乳作为药物载体,成功将 GS 和 LH 组合成 GS-LH-NE,确定了其组成:Soluto[®] HS-15:甘油:PEG400:IPM:蒸馏水=25.33:10.14:2.53:6:56,GS 和 LH 含量均为 30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,平均粒径为 23.08 nm,小鼠灌胃 LD₅₀为 402.85 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

参考文献:

[1] SONG X M, HU S H. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs [J]. *Vaccine*, 2009, 27(36):4883-4890.

[2] QI L W, WANG C Z, YUAN C S. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(8):689-699.

[3] SADIGH-ETEGHAD S, KHAYAT-NURI H, ABADI N, et al. Synergetic effects of oral administration of levamisole and Echinacea purpurea on immune response in Wistar rat [J]. *Res Vet Sci*, 2011, 91(1):82-85.

[4] WANG X, JIN H L, DU X G, et al. The protective ef-

ficacy against *Schistosoma japonicum* infection by immunization with DNA vaccine and levamisole as adjuvant in mice [J]. *Vaccine*, 2008, 26(15):1832-1845.

- [5] GAO F, ZHANG Z, BU H H, et al. Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: Performance and mechanism [J]. *J Control Release*, 2011, 149(2):168-174.
- [6] RAGELLE H, CRAUSTE-MANCIET S, SEGUIN J, et al. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice [J]. *Int J Pharm*, 2012, 427(2):452-459.
- [7] LI Y, ZHENG J K, XIAO H, et al. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization [J]. *Food Hydrocoll*, 2012, 27(2):517-528.
- [8] SUN H X, XIE Y, YE Y P. ISCOMs and ISCOMATRIX[™] [J]. *Vaccine*, 2009, 27(33):4388-4401.
- [9] PHAMA H L, ROSS B P, MCGEARY R P, et al. Synthesis of cationic derivatives of Quil A and the preparation of cationic immune-stimulating complexes (ISCOMs) [J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(1-2):123-133.
- [10] SONG X M, ZANG L M, HU S H. Amplified immune response by ginsenoside-based nanoparticles (ginsomes) [J]. *Vaccine*, 2009, 27(17):2306-2311.
- [11] KUMAR G P, RAJESHWARRAO P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery-an overview [J]. *Acta pharm Sinica B*, 2011, 1(4):208-219.
- [12] JIAO J. Polyoxyethylated nonionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(15):1663-1673.
- [13] KALHAPURE R S, AKAMANCHI K G. Oleic acid based heterolipid synthesis, characterization and application in self-microemulsifying drug delivery system [J]. *Int J Pharm*, 2012, 425(1-2):9-18.
- [14] ELKORDY A A, JATTO A, ESSA E. In situ controlled crystallization as a tool to improve the dissolution of Glibenclamide [J]. *Int J Pharm*, 2012, 428(1-2):118-120.
- [15] GHOSH V, MUKHERJEE A, CHANDRASEKARAN N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity [J]. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(1):338-344.