

马来酸噻吗洛尔立方液晶纳米粒眼用制剂的制备和表征

王清清^{1*}, 陈明龙^{1,2}, 胡霞¹, 谢娜¹, 刘起夏¹, 孙锐¹, 朱娜¹, 吴传斌²

(1. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233030; 2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用高压均质法制备马来酸噻吗洛尔立方液晶纳米粒 (TM-LCNPs), 以粒径和包封率作为评价指标, 采用正交设计法确定最佳处方。使用马尔文粒度仪、偏光显微镜和差示扫描量热分析对立方液晶纳米粒进行表征, 以市售马来酸噻吗洛尔滴眼液为对照考察 TM-LCNPs 的体外释放和角膜渗透能力, 采用荧光成像技术观察罗丹明 B 立方液晶纳米粒 (RhB-LCNPs) 在家兔角膜的滞留情况。结果显示, TM-LCNPs 的最佳处方: 油水比例 7 : 3、均质压力 900 bar、均质次数 6 次, 载药量 1%, TM-LCNPs 角膜渗透能力明显高于市售滴眼液, 且在眼部的滞留时间较长, 具有一定的缓释效应。兔眼病理组织切片显示 TM-LCNPs 多次给药对眼部无明显损伤。

关键词: 马来酸噻吗洛尔; 立方液晶; 纳米粒; 眼部给药

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 11-1894-07

Preparation and characterization of timolol maleate cubic nanoparticles for ocular administration

WANG Qing-qing^{1*}, CHEN Ming-long^{1,2}, HU Xia¹, XIE Na¹, LIU Qi-xia¹, SUN Rui¹, ZHU Na¹, WU Chuan-bin²

(1. Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Timolol maleate cubic nanoparticles (TM-LCNPs) were prepared *via* fragmentation of a bulk GMO/poloxamer 407 cubic phase gel by high-pressure homogenization. The optimal prescription was selected based on particle size and entrapment efficiency by orthogonal design method. Malvern particle sizer, polarized light microscopy, and differential scanning calorimetry were used to characterize the cubic nanoparticles. Commercial eye drops were used as a control for the release and corneal permeation experiment *in vitro*. Fluorescence imaging was used to observe the retention of Rhodamine B cubic nanoparticles (RhB-LCNPs) in rabbit cornea. The results indicated that the optimal prescription and preparation of TM-LCNPs was oil-water ratio (7 : 3), homogenous pressure (900 bar), the number of homogenizations (6) and drug loading (1%). Corneal permeability of TM-LCNPs was significantly higher than that of commercially available eye drops. The residence time in eyes was longer which suggested a sustained release behavior. The pathology result of rabbit corneal after multiple administration of TM-LCNPs showed that there was no apparent damage.

Key words: timolol maleate; cubosome; nanoparticle; ocular administration

收稿日期: 2018-05-21; 修回日期: 2018-06-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81502994); 安徽省重点实验室工程中心 (蚌埠医学院) 开放课题计划 (BYKC140ZZD).

*通讯作者 Tel: 86-552-3175229, E-mail: Jeanaw@foxmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0475

马来酸噻吗洛尔^[1]是临床上治疗青光眼的一线药物, 作为 β -受体阻断剂, 通过抑制睫状突上皮环腺苷酸的产生, 从而减少房水生成, 降低眼压。常见的剂型是马来酸噻吗洛尔滴眼液, 其使用方便, 降压效果显著, 但眼表流失严重, 药效维持时间短, 生物利

用度低 (1%~10%), 1 日给药两次, 药理峰谷现象突出, 不良反应较多, 如过敏反应、哮喘、心脏毒性等。

立方液晶^[2] (cubic liquid crystalline, cubic phase 或 cubosome) 是由三维延伸、双连续网络结构、独特的内部双水道构成, 能够包封不同极性和剂量的药物, 水溶性药物可以包封在立方液晶的水道中, 脂溶性药物能包封于立方液晶的脂质双层膜中, 提高药物的稳定性^[3]。立方液晶特殊的结构和性质使其成为极有潜力的药物载体, 被应用于各类给药系统的研究^[4, 5]。较好的生物黏附性也可以延长立方液晶在角膜的滞留时间^[6], 因而可作为眼部药物传递系统的载体^[7]。为了提高马来酸噻吗洛尔的生物利用度, 延长其角膜滞留时间, 降低不良反应, 本文以立方液晶纳米粒为载体, 包载马来酸噻吗洛尔, 通过正交设计法确定最佳处方, 并进行表征, 同时考察立方液晶纳米粒的体外释放、角膜渗透和眼部滞留情况。

材料与方法

主要仪器 LC-15AC 型二元高压梯度高效液相色谱仪 (岛津企业管理有限公司); JN-02HC 高压纳米均质机 (广州聚能生物科技有限公司); 研究型偏光显微镜 59XA-3; SDT 2960 热分析仪 (美国 TA 公司); 马尔文纳米粒度仪 (英国马尔文仪器有限公司); 小动物活体成像仪 (Kodak In-vivo Imaging System FX Pro, 美国柯达公司)。

药品与试剂 单油酸甘油酯 (GMO, 阿拉丁化学试剂有限公司); 泊洛沙姆 407 (F127, 德国 BASF 公司); 马来酸噻吗洛尔滴眼液 (辰欣佛都药业有限公司); 马来酸噻吗洛尔原料药 (TM, 天津市中央药业有限公司); 甲醇 (上海麦克林生化科技有限公司, 色谱纯); 水为超纯水; 其余所用试剂均为分析纯。

实验动物 健康新西兰白兔, 体重 2.5~3.0 kg, 雌雄各半, 许可证号: 201610773。所有动物实验均由蚌埠医学院动物实验委员会的伦理审查批准。

HPLC 测定 TM 方法学的建立

色谱条件 色谱柱: Intertsil ODS-3C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 中国华谱新创科技有限公司); 流动相: 甲醇-水-三乙胺 (50:50:0.1), 磷酸调节 pH 至 5.0, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 295 nm; 进样量 20 μL。

检测波长的确定 精密称取 TM、GMO 和 F127 适量, 按紫外分光光度法在 200~400 nm 内进行扫描。

标准曲线的建立 精密称取 TM 对照品适量, 配制成 0.78、1.56、3.12、6.25、12.5、25、50、100 和 200 μg·mL⁻¹ 对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 续滤液进样。以质量浓度 (C, μg·mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 进行回归方程。

精密度 称取 TM 适量, 分别配制质量浓度为 1.56、50 和 200 μg·mL⁻¹ 溶液, 每个浓度连续进样 3 次, 得日内精密度; 再连续 3 日进样测定, 得日间精密度。

立方液晶纳米粒的制备 采用高压均质法^[8]制备 TM 立方液晶纳米粒 (TM-LCNPs), 称取适量 GMO 和 F127, 置 67 °C 水浴加热至融化, 缓慢加入含适量 TM 的去离子水溶液, 于恒温磁力搅拌器上搅拌 5 min, 室温放置 1 周自发乳化, 加入去离子水后通过高压均质法得立方液晶纳米粒, 用甘油调节至生理等渗。

三元相图和正交设计法优化处方 采用不同比例的处方, 即 F127:GMO (1:9~9:1), 物理混合物 (F127+GMO):H₂O (1:9~9:1) 制备处方, 利用三元相图结合偏光检测初步确定立方液晶的处方。采用正交设计法, 以粒径和包封率作为评价指标, 根据前期单因素考察的结果, 选取对评价指标影响较大的 4 个因素作为考察因素, 即均质压力、均质次数、载药量和辅料比例, 每个因素选取了 3 个水平。以粒径和包封率为评价指标采用正交设计助手 V3.1 统计软件优化处方。

粒径和电位 取制备的 TM-LCNPs 50 μL, 用去离子水稀释适当倍数后用 Malvern 粒度测试仪测定粒径大小及其分布和电位。

偏光检测 将制备的样品涂于玻璃载玻片上, 加盖玻片减少水分挥发, 置于偏光显微镜下观察, 并获取玻片纹理照片。

差示扫描量热 (DSC) 分析 在氮气保护下, 采用 SDT 2960 热分析仪进行热重分析, 从室温至 300 °C, 升温速率为每分钟 3 °C。

包封率 采用超滤法^[9]测定药物包封率, 精密量取等浓度 TM-LCNPs 1mL 于超滤管上部, 超滤管下部放 10 mL 甲醇。在 3 500 r·min⁻¹ 条件下, 离心 20 min。纳米粒被截留, 游离药物进入超滤管下部, 取下部液体进行含量测定, 计算包封率 (EE):

$$EE (\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100\%$$

其中, W_i 为药物初始加入量; W_f 为测得的游离药物含量。

体外释放 用透析袋法^[10]比较相同浓度的 TM-LCNPs 和 TM 水溶液的释放行为。先活化透析袋,精密量取 1 mL 相同浓度的 TM-LCNPs 和 TM 水溶液加入透析袋中,用细绳系紧透析袋两端,将透析袋悬浮于 50 mL 人工泪液中,恒温磁力搅拌,分别于 0.5、1、2、3、4、5 和 6 h 取样 1 mL,每次取样后立即补充等量预热释放介质,取出的溶液用 0.22 μm 滤膜过滤,按色谱条件测定 TM 浓度,计算 TM 的累积释放量,考察立方液晶纳米粒的释药性能。

TM-LCNPs 离体角膜渗透实验^[11] 静脉注射 (iv) 乌拉坦处死新西兰兔后取角膜置于 GRB 溶液中,将角膜放在 Franz 扩散池中,角膜凸面朝向供体室,凹面朝向接收室。37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温磁力搅拌。用 TM-LCNPs 和市售滴眼液对照,平行实验 3 次。分别于不同时间点吸取接收室中样品,过滤后用 HPLC 法测定 TM 含量。

活体成像法测定 TM-LCNPs 在家兔角膜滞留时间 采用小动物活体成像技术^[12, 13]研究罗丹明 B-LCNPs (RhB-LCNPs) 在家兔角膜滞留情况。将罗丹明 B 载于空白立方液晶纳米粒中,按立方液晶纳米粒制备方法,制备浓度为 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ RhB-LCNPs。称取适量罗丹明 B 溶于预热的去离子水,缓慢滴加到熔融 GMO 和 F127 中,于恒温磁力搅拌器搅拌 5 min,避光放置 1 周后,经高压均质得 RhB-LCNPs。同法操作制备罗丹明 B 水溶液。20% 乌拉坦 (5 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, iv) 麻醉家兔后,分别取 8 μL RhB-LCNPs 和罗丹明 B 水溶液滴至家兔左眼结膜囊中,闭合 10 s 后于 0、30、60、90、120、150 和 180 min 进行荧光成像。以时间为横坐标,荧光强度百分比为纵坐标绘制荧光强度曲线,通过荧光强度变化评价两种剂型在眼部滞留情况: $R=(A-B)/C\times 100\%$, 其中, A: 不同时间点的荧光强度; B: 空白背景荧光强度; C: 0 min 荧光强度^[9]。

TM-LCNPs 眼部刺激实验 实验前进行家兔眼部检查,确保无眼疾及眼损伤。进行兔眼病理组织切片考察^[14]。选取健康新西兰兔 12 只,随机分为 3 组,雌雄各半,左眼均滴生理盐水 50 μL ,右眼分别滴 50 μL Blank-LCNPs、TM-LCNPs 和 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液。每天给药 4 次,连续给药 7 天,乌拉坦 (iv) 处死家兔,取下角膜进行病理组织切片。

统计学分析 实验数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学检验,考察结果差异有无统计学意义。

* $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

结果与讨论

1 TM 含量测定方法学考察

1.1 检测波长的确定 经紫外扫描, TM 在 200~400 nm 之间最大吸收峰为 295 nm。因此, 295 nm 作为检测波长,且辅料在此处几乎无吸收。

1.2 标准曲线的建立 在本色谱条件下, 1~200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内峰面积与测定浓度线性关系良好。回归方程为: $A=24\ 906\ C+21\ 469$ ($r=0.999\ 5$)。

1.3 精密度 低、中、高浓度的日内精密度分别为 1.10%、2.89% 和 0.71%, 低、中、高浓度的日间精密度分别为 4.6%、2.5% 和 2.4%, 精密度良好。

2 处方优化

改变 F127、GMO 和水的比例,利用偏光分别对不同的处方进行检测,利用三元相图对所得到的结果进行分析,在偏振光下,层状液晶和反向六角液晶有双折射现象,层状液晶的偏光纹理为十字花纹或条痕状;六角液晶为堆砌纹理;立方液晶无偏振光现象,呈黑色背景^[15]。结果如图 1 所示,采用不同的比例可制备得到立方液晶和层状液晶,当 GMO 含量在 20%~90% (w/w)、水含量在 12%~80%、F127 含量在 10%~20% 时,能形成立方液晶;层状液晶出现在 GMO 含量在 10%~90%、水含量在 10%~90%、F127 含量在 0~10%。在此基础上,利用正交试验进行处方优化,结果如表 1 所示,根据正交分析可知,对 TM-LCNPs 包封率和粒径的主要影响因素:均质压力>辅料比例>均质次数>载药量,其中均质压力和辅料比例对 TM-LCNPs 的粒径和包封率影响较大,故可以通过选择合适的均质压力和辅料比例制备处方。最终确定 GMO/F127 为 9:1,均质压力为 900 bar,均质次数为 6 次,载药量为 1%,TM-LCNPs 粒径为 (201.3 \pm 1.9) nm,包封率约为 66.2%。

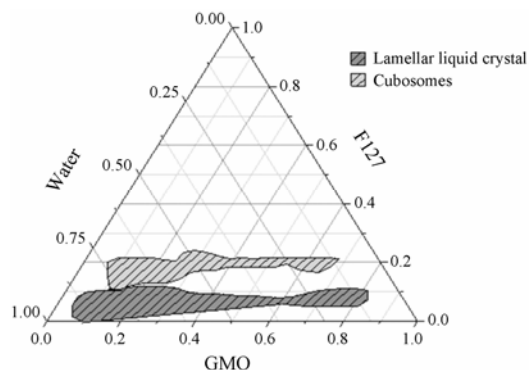


Figure 1 The ternary phase diagram composed of different proportions of poloxamer 127 (F127), monoolein (GMO) and water

Table 1 The orthogonal design and result of the experiment

Number	Bar	Time	Drug loading/%	GMO/F127	Size/nm	Encapsulation efficiency/%
1	300	3	0.5	9:1	254.9	55.3
2	300	6	1	8:2	265.3	49.6
3	300	9	1.5	7:3	260.1	50.1
4	600	3	0.5	7:3	255.6	45.6
5	600	6	1	9:1	249	61
6	600	9	1.5	8:2	250.4	59.3
7	900	3	0.5	8:2	220.9	64.2
8	900	6	1	7:3	231.3	58.7
9	900	9	1.5	9:1	207.2	66.9
K_1	260.66	244.00	246.00	237.66		
K_2	251.33	248.33	242.33	245.00		
K_3	219.33	239.00	243.00	248.66		
R_j	41.33	9.33	3.66	11.00		
K_1	51.66	55.03	57.76	61.06		
K_2	55.30	56.43	54.03	57.70		
K_3	63.26	58.76	58.43	51.46		
R_i	11.60	3.73	4.40	9.60		

3 立方液晶纳米粒的表征

3.1 粒径和电位 经高压均质后形成的 TM-LCNPs 的粒径和电位分布情况如图 2 所示。结果显示, blank-LCNPs 的粒径为 (199.7 ± 1.8) nm, TM-LCNPs 的粒径为 (201.3 ± 1.9) nm, 分布较均匀, zeta 电位为 (-18.0 ± 0.2) mV。

3.2 偏光检测 利用偏光显微镜可分层状液晶、立方液晶和六角液晶。图 3 为处方优化过程中所选取处方的偏光结果。A 为空白液晶、B 和 C 为载药液晶。可以看出, A 和 B 呈暗视野, C 呈十字花纹或油状, 初步判断 A 和 B 为立方液晶。C 为层状液晶。

3.3 差示扫描量热 (DSC) 分析 由 GMO、F127、

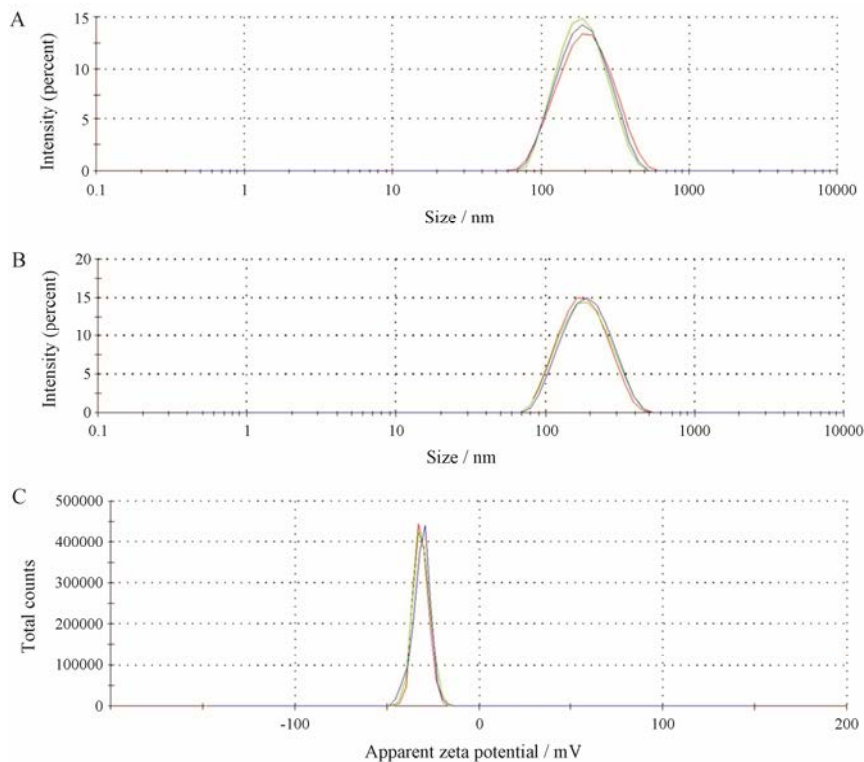


Figure 2 Particle size distribution of timolol maleate cubic nanoparticles (TM-LCNPs). A: Blank-LCNPs; B: TM-LCNPs; C: Potential distribution

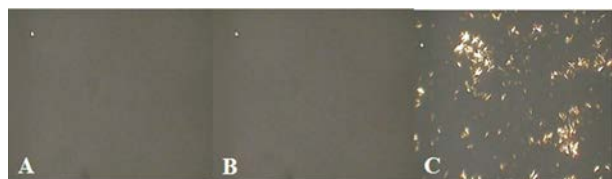


Figure 3 Polarized light texture of TM-LCNPs. A: Blank-LCNPs; B: TM-LCNPs; C: Lamellar liquid crystal

TM、物理混合物 (GMO、F127、TM、水) 和 TM-LCNPs 形成的 DSC 谱图见图 4, 由图可知, GMO 在 30~220 °C 内不产生特征衍射峰; F127 在 68 °C 出现特征衍射峰; TM 在 206 °C 出现特征衍射峰, 物理混合物中在 68 °C 和 206 °C 依然可见 TM 和 F127 的特征衍射峰, 但 TM-LCNPs 中物理混合物的特征衍射峰消失, 结合偏光检测结果, 进一步表明 TM 与辅料经处方工艺形成立方液晶纳米粒。

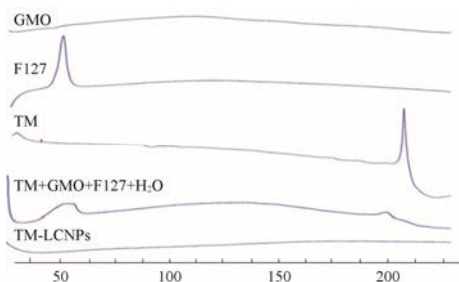


Figure 4 Differential scanning calorimeter (DSC) of TM-LCNPs

4 TM-LCNPs 体外释放

TM-LCNPs 的体外释放结果见图 5。由图可知, TM 水溶液在 5 min 左右释放量达 50%; 50 min 左右累积释放了总药量的 80%。TM-LCNPs 在 5 min 释放量为 10%; 50 min 累积释放量达 60%, TM 水溶液和 TM-LCNPs 体外释放结果表明, 立方液晶纳米粒的特殊立体空间结构, 可以有效避免药物因突释而随泪滴大量消除, 延缓 TM 释放, 这种缓释作用结合制剂在眼部的长时间滞留, 可以有效增加药物在眼部的保留时间。推测可能是由于立方液晶内部独特的双水道结构与药物相互作用, 从而降低了药物释放速率。

5 TM-LCNPs 离体角膜渗透实验

立方液晶纳米粒具有两亲性和生物黏附性^[8], 且与角膜上皮细胞具有相似的结构特征^[16], 更易在角膜上皮细胞聚集并透过角膜到达病灶。因此, 将药物包载于立方液晶纳米粒中可以在一定程度上提高药物在角膜的渗透能力。由图 6 所示, TM-LCNPs 和市售的 TM 滴眼液角膜渗透性存在明显差异, 前 4 h 两者药物累计透过量相近, 4 h 后 TM-LCNPs 的角膜累积透过量明显高于市售滴眼液, 结果表明, TM-LCNPs

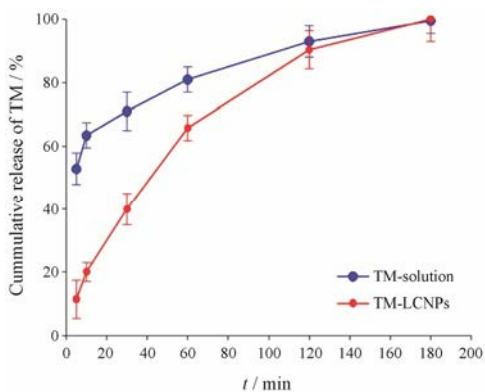


Figure 5 *In vitro* release profiles of TM solution and TM-LCNPs at 37 °C in simulated tear fluid (STF) ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

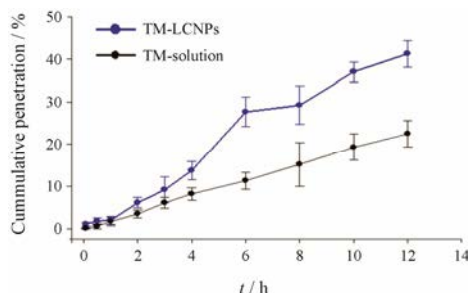


Figure 6 *In vitro* corneal penetration test with TM-LCNPs and TM solution ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

能够提高水溶性药物 TM 的角膜渗透能力, 有效减少药物从眼表流失, 提高生物利用度。

6 活体成像法测定 TM-LCNPs 在家兔角膜滞留时间

RhB-LCNPs 和罗丹明 B 水溶液在家兔角膜荧光强度随时间变化情况分别见图 7a, b。RhB-LCNPs 和 RhB 水溶液在家兔角膜滞留情况见图 8。以自身 0 min 荧光强度为 100%, 通过比较在相同时间内两者的荧光强度百分比, 可以看出 RhB-LCNPs 的荧光强度较 RhB 水溶液强, 角膜清除速率较慢, 且药物通过鼻泪管流失较少。分析原因可能是由于立方液晶具有闭合脂质双分子层构成蜂窝状结构, 其两亲性可以延长药物在角膜的滞留时间, 有效降低药物的清除率。

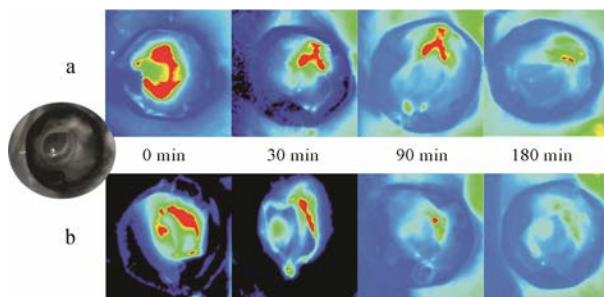


Figure 7 Observation of Rhodamine B cubic liquid crystal nanoparticles (RhB-LCNPs, a) and Rhodamine B solution (RhB-solution, b) in rabbit cornea retention by fluorescence imaging

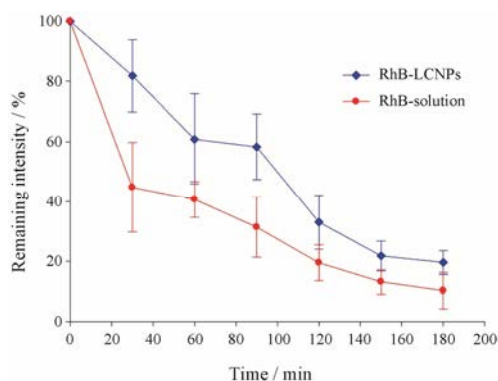


Figure 8 RhB-LCNPs and RhB-solution in rabbit corneal retention ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

7 TM-LCNPs 的眼部刺激性

分别给予家兔眼滴生理盐水 (NS)、SDS 和 TM-LCNPs, 观察动物的眨眼情况, 时间为 10 min, 结果如表 2 所示。与 NS 和 TM-LCNPs 组相比, 滴加 0.1% SDS 溶液的兔子眨眼次数明显增多, 经过后续观察眼角有类似分泌物的硬痂, 可能是出现了炎症反应。结果表明 TM-LCNPs 对家兔眼部没有明显的刺激。

Table 2 Number of eye blinks in rabbits. $n=5$, $\bar{x} \pm s$. NS: Physiological saline; SDS: Sodium dodecyl sulfate. ** $P < 0.01$ vs SDS group

Group	Average blink number
NS	$2 \pm 1^{**}$
SDS	15 ± 2
TM-LCNPs	$4 \pm 1^{**}$

给药后的家兔角膜病理切片如图 9 所示。结果可见, SDS 组的角膜上皮细胞间隙变大, 细胞排列较松散, 出现明显的病理组织变化; NS 和 TM-LCNPs 组的角膜上皮细胞都较为完整, 细胞排列紧密, 基质无明显损伤, 未引起病理组织改变, 结果表明 TM-LCNPs 对家兔角膜上皮细胞无明显损伤, 较为安全。

结论

本实验将治疗青光眼药物 TM 作为模型药物载于新型药物载体立方液晶纳米粒中, 用于评价该制剂在眼部给药中的优势和前景。经处方筛选、制备方法和工艺优化等相关方面的研究, 制备了 TM-LCNPs。制剂表征、体外释放性能及眼部刺激性的评价研究表明, TM-LCNPs 用于眼部给药, 与市售滴眼液相比, 可以延长药物在眼表滞留时间, 减少给药次数, 增加药物角膜透过性, 同时不会对眼部产生刺激和损伤, 有临床应用价值。

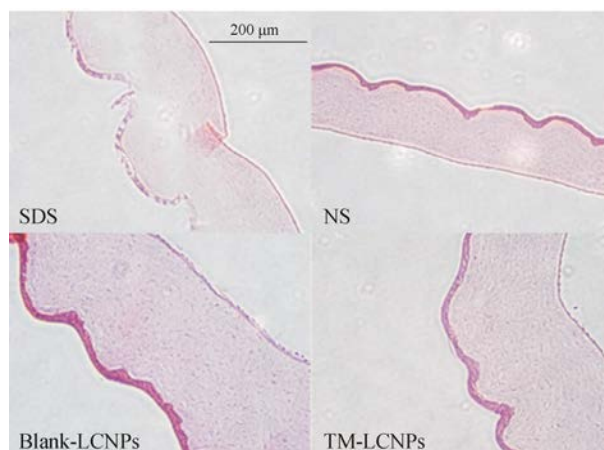


Figure 9 Pathological section of rabbit cornea under microscope

References

- [1] Holló G, Katsanos A. Safety and tolerability of the tafluprost/timolol fixed combination for the treatment of glaucoma [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2015, 14: 609–617.
- [2] Karami Z, Hamidi M. Cubosomes: remarkable drug delivery potential [J]. *Drug Discov Today*, 2016, 21: 789–801.
- [3] Han S, Shen JQ, Gan Y, et al. Novel vehicle based on cubosomes for ophthalmic delivery of flurbiprofen with low irritancy and high bioavailability [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 990–998.
- [4] Wu HB, Huo DF, Jiang XG. Advances in the study of lipid-based cubic liquid crystalline nanoparticles as drug delivery system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 450–455.
- [5] Chen YL, Gui SY, Liang X, et al. Preparation and evaluation of intra-articular injectable sinomenine hydrochloride-loaded *in situ* liquid crystals [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 132–139.
- [6] Gan L, Han S, Shen J, et al. Self-assembled liquid crystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: improving precorneal retention and ocular bioavailability [J]. *Int J Pharm*, 2010, 396: 179–187.
- [7] Hartnett TE, O'Connor AJ, Ladewig K. Cubosomes and other potential ocular drug delivery vehicles for macromolecular therapeutics [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, 12: 1513–1526.
- [8] Gózdź WT. Cubosome topologies at various particle sizes and crystallographic symmetries [J]. *Langmuir*, 2015, 31: 13321–13326.
- [9] Boyd BJ. Characterisation of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method [J]. *Int J Pharm*, 2003, 260: 239–247.
- [10] Fu JW, Tu YS, Sun DM, et al. Entrapment efficiency of

- curcumin and piperine in compound curcumin lipid-based liquid crystalline nanoparticles [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2013, 24: 200–205.
- [11] Kojarunchitt T, Baldursdottir S, Dong YD, et al. Modified thermoresponsive Poloxamer 407 and chitosan sol-gels as potential sustained-release vaccine delivery systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 89: 74–81.
- [12] Biffi S, Andolfi L, Caltagirone C, et al. Cubosomes for *in vivo* fluorescence lifetime imaging [J]. *Nanotechnology*, 2017, 28: 055102.
- [13] Mulet X, Boyd BJ, Drummond CJ. Advances in drug delivery and medical imaging using colloidal lyotropic liquid crystalline dispersions [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2013, 393: 1–20.
- [14] Huang J, Peng T, Li Y, et al. Ocular cubosome drug delivery system for timolol maleate: preparation, characterization, cytotoxicity, *ex vivo*, and *in vivo* evaluation [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18: 2919–2926.
- [15] Rizwan SB, Boyd BJ. Cubosomes: Structure, Preparation and Use as an Antigen Delivery System [M]//Foged C, Foged T, Foged Y, et al. *Subunit Vaccine Delivery*. New York: Springer, 2015: 125–140.
- [16] Murgia S, Falchi AM, Meli V, et al. Cubosome formulations stabilized by a dansyl-conjugated block copolymer for possible nanomedicine applications [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 129: 87–94.