

## 케토프로펜을 함유하는 고행 지질 나노파티클의 제조 및 평가

백명기 · 이상영 · 지웅길<sup>†</sup>

충남대학교 약학대학  
(1996년 8월 19일 접수)

### Preparation and Evaluation of Ketoprofen-incorporated Solid Lipid Nanoparticles (SLN)

Myoung Ki Baek, Sang Young Lee and Ung Kil Jee<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea

(Received August 19, 1996)

Solid lipid nanoparticles (SLN) have been developed as a new drug delivery system. Although many particulate drug carriers, such as microsphere, liposome, niosome, emulsion, etc. have been introduced, they have some disadvantage: low efficiency of incorporation and stability, lack of reproducibility, and so on. Meanwhile, SLN as a new drug delivery system is known to entrap drugs with a high efficiency and a good reproducibility. Moreover, small size SLN can circulate in blood for a prolonged time. Although many preparation methods were introduced, microfluidization method is recommended to be the most useful. This study was attempted to prepare and evaluate ketoprofen-incorporated SLNs (keto-SLN), which were prepared by two methods, ultrasonication and microfluidization. Keto-SLN was evaluated by measurement of particle size and zeta potential, efficacy of entrapment, sedimentation volume, in vitro release pattern. The mean particle size was about 0.1  $\mu\text{m}$ , and the size was dependent on the type and the amount of emulsifier. Zeta potential was negative, -9~-13mV and entrapment efficacy was very high and stability was good for at least 60 days in the respect of particle size and sedimentation volume ratio. Analgesic effect was also determined as well as pharmacokinetic parameters. The former was comparable to that of that of ketoprofen loaded suspension (keto-sus) and the latter revealed that consistent with the delayed release of keto-SLN.  $T_{\text{max}}$  was longer than keto-sus. Therefore, keto-SLN was favourable dosage forms in the field of drug delivery system such as anti-cancer, analgesics and anti-inflammatory agents.

**Keywords**—Solid lipid nanoparticles (SLN), Ketoprofen, Trilaurin, Poloxamer 188

지질이나 고분자 매트릭스등을 이용한 미립자성 약물 운반체에 대한 연구가 근래에 많이 보고되고 있다. 미립자성 운반체란 약물송달체의 개념으로 약물을 수송하는 입자성 물질로 구성된 제형이며 크기가 매우 작고 균일하며 그 구성 성분에 따라 여러 형태가 있다. 일반적으로는 구성 성분과 입자의 형태에 따라 구분하는데, 지질을 주성분으로 하며 소포체의 형태로 이루어지는 예와 매트릭스형태를 갖으며 고분자물질로 구성되는 고분자 매트릭스형태로 나누어 볼 수 있다. 지질을 주요 원료로 사용하는 소포체로의 예는 리포솜,<sup>1)</sup>

에멀션,<sup>2)</sup> 리피드마이크로스피어<sup>3)</sup>와 니오솜<sup>4)</sup>등이 있으며 고분자매트릭스로는 마이크로스피어가 있다.

고형 지질 나노파티클(solid lipid nanoparticle, SLN)<sup>5)</sup>은 리피드 마이크로스피어에서 유래된 것으로 그 형태나 제법 등도 매우 유사한 면이 많다. 대두유를 사용하여 지용성 약물을 함유시키는 리피드 마이크로스피어가 유체성 에멀션(fluid type emulsion)으로 분류된다면 SLN은 고행 에멀션(solid emulsion)이라 할 수 있겠다. 이때 사용되는 지질은 대두유를 유상으로 하여 분산시키는 리피드 마이크로스피어와 달리 지방산알코올류, 지방산 유도체와 trilaurin, tripalmitin같은 triglyceride류를 사용하고 유화제로 레시틴

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

이나 합성 유화제를 사용한다는 점등에서 차이를 들 수 있다. 또한 형태적인 측면에서는 마이크로스피어보다 더욱 작고 미세한 크기의 입자로 일반적으로는 100 nm 정도 또는 그 이하의 크기를 갖고 있으며 리포솜이나 에멀션계와는 달리 매트릭스 형태로 존재한다. 또한 수용성 약물보다는 지용성 약물에 더욱 적합한 제형으로 난용성 약물로 특히 지용성이 큰 약물의 가용화와 함께 표적지향성의 약물송달체 측면에서도 많은 장점을 가질 수 있다. 리포솜이나 에멀션에 비해 약물을 봉입하는 효율이 월등히 높으며 안정성도 매우 좋은 제형으로서 파티클의 표면 수식이나 코팅을 통해 약물의 방출 양상과 물리화학적 특성의 조절이 가능하다.<sup>6)</sup>

SLN의 제조에 사용된 약물로서 비스테로이드 소염진통제인 케토프로펜을 모델약물로 하였고 유화제로는 주사제로 사용이 가능한 Pluronic F-68 (Poloxamer 188)<sup>7)</sup>을 사용하였으며 Gasco의 제조방법<sup>8)</sup>을 응용하여 제법을 정립하였고, Bunjes<sup>9)</sup> 등의 실험내용을 기초로 마이크로플루이다이저를 이용하여 제조한 SLN과 실험실적으로 초음파분쇄기를 이용한 SLN 제제와 비교하였다.

제조된 SLN의 물리화학적 특징을 파악하기 위해 약물의 봉입율, 입자 크기 및 분포와 제타포텐셜을 측정하고, 안정성의 척도로 입자크기 및 탁도의 경시변화와 침강용적을 60일간 측정하였고, in vitro 용출실험을 하였다. SLN을 케토프로펜 자체와 비교하여 mouse로 화학적 자극에 통한 진통효과실험을 하였으며 rat에 근육투여한 후 혈중에서 약물의 동태를 실험하였다.

## 실험방법

### 재료 및 기기

Ketoprofen은 Rhone-Poulence Co.의 제품을 사용하였고 Poloxamer 188은 BASF Korea의 제품을 사용하였으며, trilaurin과 반투막 (M.W. cut off 12,000, benzoylated dialysis sack Sigma Diagnostics<sup>®</sup>은 Sigma Chemical Co., USA의 제품을 사용하였고 membrane filter (Milipore 0.45  $\mu$ m, U.S.A.), ultrafiltration membrane filter(Daflo, XM300, 62 mm, Amikon U.S.A.)을 사용하고 기타 시약은 모두 일급 또는 특급을 사용하였다.

사용한 기기로는 Biomixer(Ultra Turrax T25, Original Ika Co. Japan), 자외부 흡광광도계(Uvikon 860, Kontron Instruments Co., Zürich, Switzer-

land), 용출시험기(SOTAXAT7, CH4008 Basel, Switzerland), 초음파분쇄기(Vibra Cell, Sonic & Materials Co., USA), Microfluidizer(Microfluidizer<sup>™</sup> 110Y, Microfluidics Co., Massachusetts, USA), Laser light scattering(He-Ne laser Model 127, Lexel Laser, Inc. Analysis Software: BI-8000AT Digital Correlator), High Performance Liquid Chromatography( SPD 10A UV-Vis Detector, LC-10AD Liquid Chromatograph, C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japan), Zeta potential analyser(Zeta Plus<sup>®</sup>, Brookhaven Inc., U.S.A.)등을 사용하였다.

### 케토프로펜의 물리화학적 성질 측정

#### 용해도 측정

일정 광량의 케토프로펜(300 mg)을 pH 4.0, 5.5, 6.8, 7.4의 완충액 100 ml에 각각 넣고 37.5 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C에서 15시간 동안 200 rpm으로 진탕시켰다. 이 용액을 평형에 이르도록 2시간 동안 실온에 방치한 다음 5 ml를 취하여 0.45  $\mu$ m의 membrane filter로 여과 한 후 그 여액을 케토프로펜의 흡수 극대 파장인 268 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성된 검량선 식을 통해 용해되어 있는 약물량을 계산하여 각 pH의 완충액에서 케토프로펜의 용해도를 구하였다.

#### 유수분배계수의 측정

유상으로는 실험 전에 수상으로 미리 충분히 포화시킨 n-옥탄올과 클로로포름을 사용하였고, 수상으로는 유상으로 미리 포화시킨 pH 4.0초산·초산나트륨과 완충액과 pH 7.4인 산염완충액을 사용하였다. 약물의 농도는 메탄올에 용해시켜 1 $\times$ 10<sup>-3</sup>M로 조제한 표준 시료 원액을 1 ml씩 첨가하여 전체 농도를 1 $\times$ 10<sup>-4</sup>M로 맞추어 실험하였다.

Kakemi<sup>10)</sup>등의 방법에 따라 마개 달린 시험관에 유상과 수상을 각각 10 ml씩 넣고 37.5 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 200 rpm으로 진탕시켜 평형에 도달시킨 다음 1시간 동안 방치하였다. 수상을 분취하여 268 nm에서 흡광도를 측정하여 아래의 식을 통해 유수분배계수를 구하였다.

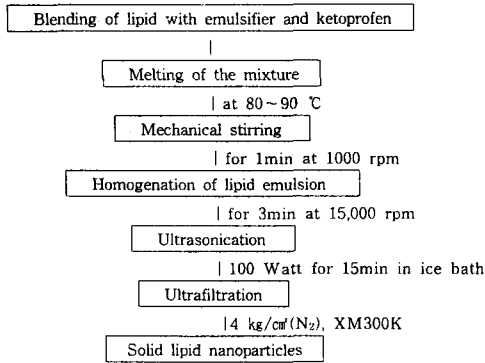
$$K_{(o/w)} = \frac{C_o - C_c}{C_c} = \frac{A_o - A_c}{A_c}$$

C<sub>o</sub>: 수상의 초농도      C<sub>c</sub>: 수상의 평형농도

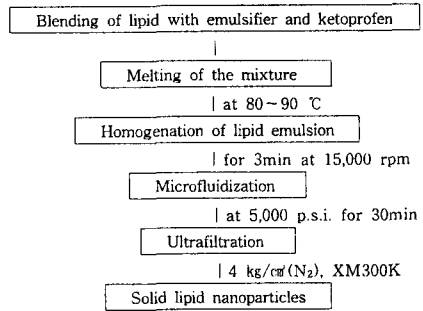
A<sub>o</sub>: 수상의 초기흡광도    A<sub>c</sub>: 수상의 평형시 흡광도

#### pKa 측정

Hasegawa<sup>11)</sup>등의 liquid-liquid partition method



**Scheme 1**—Schematic diagram for the preparation of SLN by ultrasonication method



**Scheme 2**—Schematic diagram for the preparation of SLN with Microfluidizer

에 따라 pH 4.0과 7.4의 완충액에 약물을  $1 \times 10^{-4}$  M로 용해시킨 용액 10ml를 마개 달린 시험관에 넣어 수상으로 하고 n-옥탄올 10 ml를 유상으로 하여 37.5°C에서 1시간 동안 200 rpm으로 진탕하였다. 1시간 동안 충분히 진탕하여 평형에 도달시킨 후 다시 1시간 동안 방치하고 수상을 분리한 다음 흡광도를 측정하여 아래의 식을 통해 pKa값을 구하였다.

$$pKa = pH + \frac{P_{app}}{P_m - P_{app}}$$

$P_m$  : true partition coefficient

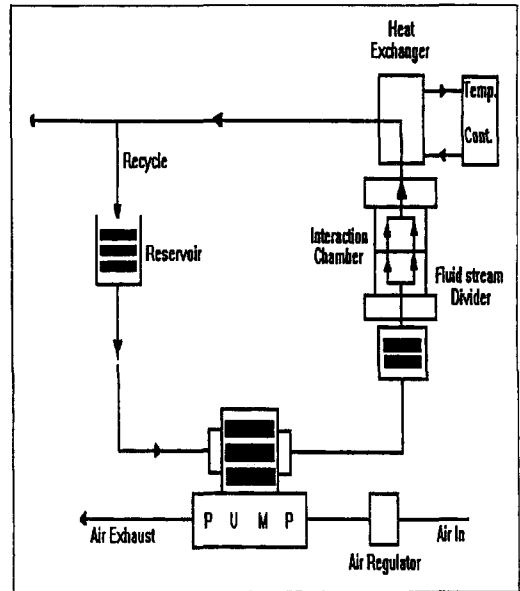
$P_{app}$  : apparent partition coefficient

**SLN의 제조**

**SLN의 제조**

**Ultrasonicated SLN**—Trilaurin 2 g, poloxamer 188(F 68) 0.2 g과 케토프로펜 0.2 g을 정확히 칭량하여 500 ml의 마개 달린 시험관에 넣고 80-90°C에 이르도록 수욕상에서 가온하였다. 수욕상에서 각 조성물이 모두 용용되면 교반기로 1분간 100 rpm으로 교반하여 혼합한 후 80°C의 증류수를 가해 전체 부피가 20 ml가 되도록 하였다. 이렇게 증류수를 가한 다음 온도를 80-90°C로 유지하면서 3분간 추가로 교반하여 에멀션 상태를 균일하게 하였다. 이 에멀션을 수욕상에서 온도를 유지하면서 Biomixer를 이용하여 15,000 rpm에서 3분간 격렬히 혼합한 후 ultrasonicator로 15분간 처리하였으며 이때 ultrasonicator의 출력은 100와트로 하였다. 초음파처리를 마친 에멀션을 냉수욕에서 교반하면서 바로 냉각시켜 SLN을 제조하였다 (Scheme 1).

**Microfluidized SLN**—지질로 사용한 trilaurin 10 g,



**Figure 1**—Schematic flow chart of the microfluidizer as used for solid lipid nanoparticles.

유화제인 Poloxamer 188(F 68) 1 g과 케토프로펜 1 g을 각각 정확히 칭량하여 200 ml의 비이커에 넣고 80-90°C정도로 유지되는 수욕에서 용용 혼합하였다. 조성물이 모두 용용되면 교반기로 교반하면서 80°C의 증류수를 가해 100 ml로 하여 에멀션 형태로 만들었다. 이를 Biomixer로 3분간 15,000 rpm에서 격렬히 혼합하여 균일한 에멀션을 만든 다음 마이크로플루다이저의 시료 저장기(reservoir)에 넣고 500 p.s.i에서 230 l/min의 유속으로 30분간 처리하였다(Scheme 2).

**함유되지 않은 유리 약물의 제거**

유리 약물은 Roberta Cavalli<sup>12)</sup>등이 사용한 한외여과법(ultrafiltration method)을 이용하여 제거하였다. 제조된 SLN 20 ml를 한외여과장치에 넣고 자

석교반기를 이용하여 교반하면서 질소를  $4 \text{ kg/cm}^2$ 의 압력으로 가해서 막여과지를 통해 여과하였다. 이때 사용한 여과막은 분자량 300 kDa의 여과에 사용되는 막여과지를 사용하였다. 여과된 SLN은  $4^\circ\text{C}$ 로 냉장 보관하였고 여액은 별도로 봉입을 측정등의 실험에 사용되었다.

### 고형 지질 나노파티클의 평가

#### 약물 봉입율 측정

한외여과법을 이용하여 유리 약물을 제거할 때 여과된 액을 취하여 여액속의 약물량을 케토프로펜의 흡수 극대 파장 268 nm에서 흡광도를 측정 후 미리 작성한 검량선식을 통해 정량하였다. Microfluidizer를 이용하여 제조한 SLN은 HPLC를 이용하여 봉입효율을 측정하였는데 위의 경우와 마찬가지로 한외여과된 여액을 적당히 희석하여 HPLC로 정량하였고 또한 여과하지 않은 SLN을 메탄올로 용해한 다음 적당히 희석하여 HPLC로 정량하였다. 여액에서의 약물 농도와 여과되지 않은 SLN 자체에서의 약물농도를 통해 봉입된 약물량을 계산하였다. 또한 유리 약물이 제거된 SLN을 같은 방법으로 처리하여 보정하였다.

#### 평균 입자 크기 및 분포도 측정

제조된 SLN의 입자 크기는 동적광산란법(dynamic light scattering method)을 이용하여 측정하였다. 광원으로는 He-Ne laser를 사용하였고, 측정 파장은 632.8 nm를 선택하였다. 산란 각도는  $90^\circ$ 로 설정하였고 시료의 온도는  $25^\circ\text{C}$ 로 하였으며, cell vat 내의 오일은 toluene을 사용하였다. 직경 12 mm의 원통형 cell에 5 ml의 시료를 넣은 후 vat 내의 oil bath에 장치했으며 검출기의 pinhole 크기는  $200 \mu\text{m}$ 로 선택하였다.

광산란을 통한 평균 입자 크기에 대한 결과 처리는 전용 program인 Brookhaven model BI-8000AT을 통해 얻었다. 측정시에 sample time은  $10 \mu\text{sec}$ , delay time mode는 1:2로 하였고, duration은  $6 \times 10^7 \mu\text{sec}$ 로 조건을 설정하여 측정하였다.

#### in vitro 방출 실험

SLN 5 ml를 정확히 취하여 EDTA · 2Na과  $\text{NaHCO}_3$ 로 미리 활성화시킨 dialysis sac에 넣고 양 끝을 반투막 클립으로 단단히 막고 증류수로 반투막과 클립의 표면을 깨끗이 세척하여 외부에 묻어 있는 현탁액이 없도록 한 다음 용출실험기의 용출조내에 있는 회전교반기에 고정시켰다. 방출 용매는 pH 7.4 phosphate buffered saline(PBS)을 사용하였으며 온도는  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 하였다. 시간대별로 방출되어 나오는 케

토프로펜의 양을 268 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선식을 통해 방출된 케토프로펜의 양을 계산하였다.

마이크로플루이디저를 이용해 제조한 SLN은 HPLC로 258 nm에서 정량한 다음 미리 작성된 검량선식에 따라 방출된 약물량을 산출하였다.

#### 제타 포텐셜 측정

제타포텐셜은 BrookHeaven사의 Zeta Plus<sup>®</sup>를 이용하여 측정하였다. 시료를 5 ml 취하여 3차 증류수를 가해 전체가 1%용액이 되도록 희석하였다. 희석된 용액을 자석교반기로 2분간 교반하여 균일하게 한 다음 polyacrylate cuvette에 3 ml를 넣고 전극이 달린 마개로 막았다. cuvette를 Zeta Plus의 내부에 있는 holder에 넣고 전극을 연결하고 cover를 닫아 외부로부터 빛의 유입을 차단하였으며 각 시료당 3회이상 측정하였다. 측정 조건은 온도를  $25^\circ\text{C}$ , 시료 용액의 점도는 0.89 cp, pH는 5.68, 농도는 1%로 하고 refractive index는 1.333으로 설정하였다.

#### 안정성 실험

제조된 SLN을 일정한 시간 간격으로 평균 입자 크기와 분포를 측정하고 탁도(turbidity), 침강 용적(sedimentation volume)을 각각 측정하여 안정성 평가에 이용하였다.

#### 입자 크기의 변화

제조된 SLN을 마개 달린 시험관에 50 ml씩 넣고 실온에서 10일 간격으로 60일 동안 2 ml씩을 취하여 적당히 희석하여 제조 직후에 측정된 방법과 같은 방법으로 동적광산란법을 이용하여 입자의 평균 직경과 그 분포도를 측정하였으며 이를 통해 경시적으로 일어나는 평균 입자 크기의 변화를 관찰하였다.

#### 탁도 측정

제조된 SLN 40  $\mu\text{l}$ 를 정확히 취하여 증류수를 가해 전체를 4 ml로 하여 가시부 영역인 540 nm의 파장에서 광선의 투과도(Transmittance, %)를 측정하여 탁도(turbidity)로 하였다. 또한 각 처방의 SLN을 위와 같은 비율로 희석하여 4 ml를 4.5 ml polystyrene cuvette에 넣어 실온에서 보관하면서 60일 동안 10일 간격으로 탁도를 측정하여 탁도의 경시변화를 관찰하였다.

#### 침강용적의 측정

SLN을 눈금 있는 마개 달린 메스실린더에 10 ml씩을 넣고 실온에 방치한 다음 60일 후에 침강된 용적을 측정하여 Matthew<sup>13)</sup> 등의 방법에 따라 아래의 식을 통해 침강용적을 산출하였다.

$$\text{Sedimentation volume} = \frac{H_u}{H_o}$$

$H_u$  : ultimate settled height

$H_o$  : original height

**동물실험**

**진통효과 실험**

ICR계 마우스 7마리를 하나의 군으로 하여 체중 20~25g의 건강한 수컷을 사용하였다. 실험 전에 24시간 동안 절식시키고 물은 자유로이 먹도록 하였다. 0.1% CMC-Sod. 용액에 현탁시킨 케토프로펜 현탁액과 케토프로펜을 함유하는 SLN을 케토프로펜으로 50 mg/kg의 농도로 근육주사한 후 30분 후에 0.7% 초산 용액을 복강 내로 0.1 ml/10g의 단위로 투여하고 5분에서 10분 사이와 10분에서 20분 사이에 일어나는 stretching의 수를 측정하였다. 이때 초기 5분에서 10분까지를 phase I, 이후 10분에서 20분 사이의 시간을 phase II로 구분하여 측정하였다. 대조군으로는 약물을 투여하지 않은 mouse에 0.7% 초산 용액을 0.1 ml/10g의 용량으로 복강내 주사한 다음 5분경과 후부터 10분까지 그리고 10분 후부터 20분 경과되기까지에 일어나는 stretching수를 측정하여 진통의 억제 효과를 산출하였다.

**생체내 약물 동태 실험**

**표준 혈장 용액의 조제 및 HPLC분석 조건**

케토프로펜 50 mg을 정확히 칭량하여 메탄올 50 ml에서 용해시켜 1 mg/ml의 약물 표준 원액을 조제한 다음 메탄올로 희석하여 50, 25, 12.5, 10, 5, 2.5 µg/ml의 표준 용액을 조제하였다.

HPLC의 분석 조건은 아래와 같이 하였다.

column :  $C_{18}$ (300×3.9 nm) particle size : 10 µm  
mobile phase : 0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)  
: acetonitrile=81:19 mixture

flow rate : 1.0 ml/min

AUFS : 0.0005

detection : UV 258 nm

injection volume : 20 µl

chart speed : 1.5 cm/min

**시료의 투여와 혈액 채취 및 검체의 전처리**

케토프로펜을 1% CMC-Sod.용액에 현탁시킨 액과 SLN제제를 각각 5 mg/kg의 농도로 rat의 좌측 뒷다리에 근육주사를 통해 투여하였다. 이때 사용한 rat은 체중이 180~200 g내외의 것으로 건강한 수컷을 사용

하였으며 실험전 24시간은 절식시킨 채로 물만을 자유로이 먹을 수 있도록 하였다.

혈액의 채혈은 0, 5, 10, 20, 30, 45분, 1, 2, 3, 4, 6시간으로 하였으며 마취된 rat의 심장으로부터 direct heart puncture방법으로 1회용 주사기로 채혈하였다. 채혈된 혈액은 100 I.U./ml의 헤파린 처리된 시험관에 넣고 잘 흔들어 준 다음 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈장을 얻었으며 분석할 때까지는 냉동 보관을 하였다.

**약물속도론적 파라메타의 산출**

Rat 혈장에서의 케토프로펜의 농도는 one-compartment open model을 이용하여 Damping Gauss-Newton법으로 계산하였으며 소실 속도 상수(elimination rate constant,  $K_{el}$ ), 흡수 속도 상수(absorption rate constant,  $K_{a}$ ) 및 분포 용적(volume of distribution,  $V_d$ )을 각각 산출하였다.

실험 결과로 부터 혈장중 약물농도 대 시간의 곡선을 그리고  $C_{max}$ 와  $T_{max}$ 는 이 곡선에서 직접 구하였으며  $AUC_{0-t}$ 는 trapezoidal rule에 의하여 구하였고  $AUC_{t-\infty}$ 는  $C_l/K$ 로 구하였다.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + AUC_{t-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_l}{k}$$

여기에서 k는 terminal phase의 직선 부분의 직선 회귀선으로부터 얻은 겉보기 소실 속도 상수 값의 미하여 이 terminal phase에서의 겉보기 반감기(apparent terminal half-life,  $t_{1/2}$ )도 계산하였다. 전신 clearance(the time-averaged total body clearance, CL), 혈장중 약물농도 대 시간의 1차 모멘트 곡선하면적(area under the first moment of the plasma concentration-time curve, AUMC) 및 평균 체류시간(mean residence time, MRT)등은 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$CL = \frac{\text{dose}}{AUC}$$

$$AUMC = \int_0^{\infty} t \cdot C_p dt$$

여기에서  $C_p$ 는 시간 t일 때의 혈장중 케토프로펜의 농도이다.

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

$$V_{ss} = CL \times MRT$$

## 실험결과 및 고찰

### 케토프로펜의 물리화학적 성질

#### 용해도

케토프로펜의 용해도는 pH 4.0 5.5, 6.8, 7.4의 완충 용액에서 각각 측정된 흡광도를 검량선식에 대입하여 구하였다(Table I).

Propionic acid 유도체인 케토프로펜은 pH 4.0에서는 0.297 mg/ml로 7.4에서는 7.523 mg/ml로 측정되었으며 이는 pH가 낮은 산성에서는 용해도가 작고 pH가 높아짐에 따라 용해도가 증가되는 현상은 다른 약산성 약물에서와 같았다.

#### 유수분배계수 및 pKa

유상으로 클로로포름과 n-옥탄올을 사용하고 pH 4.0의 초산염 완충액과 pH 7.4의 인산염 완충액을 각각 수상으로 사용하여 케토프로펜의 유수분배계수와 pKa 값을 구하여 Table II에 나타내었다. 산성인 pH 4.0의 완충액에서는 유수분배계수가 n-옥탄올의 경우나 클로로포름의 두 경우에서 17.66과 47.59로 모두 크게 나타났으며 두 경우의 비교에서는 클로로포름이 n-옥탄올보다 크게 측정되었다. 이는 앞선 용해도 실험에서 pH 4.0에서 낮은 용해도를 보인 것과 연관지어 볼 때 유상으로의 이행성이 큰 것으로 생각된다. 반대로 중성인 pH 7.4 완충액에서는 0.36과 0.99로 모두 작은 값을 갖는 것으로 측정되었다.

pKa 값에 있어서는 유상인 n-옥탄올과 클로로포름의 두 경우에서 각각 4.02와 4.01로 비슷하였다.

**Table I**—Solubility of Ketoprofen in the Buffers of Various pHs at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . (Mean  $\pm$  S.D., n=5)

pH	solubility(mg/ml)
4.0	0.297 $\pm$ 0.022
5.5	1.674 $\pm$ 0.076
6.8	4.915 $\pm$ 0.646
7.4	7.523 $\pm$ 0.255

**Table II**—Lipid-water Partition Coefficient and pKa Value of Ketoprofen at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (Mean  $\pm$  S.D., n=5)

oil phase	n-octanol		chlorform	
	pH 4.0	pH 7.4	pH 4.0	pH 7.4
aqueous phase				
partition coefficient	17.66 $\pm$ 2.98	0.36 $\pm$ 0.10	47.59 $\pm$ 3.82	0.99 $\pm$ 0.06
pKa	4.02 $\pm$ 0.06		4.01 $\pm$ 0.03	

### SLN의 평가

#### SLN의 평균 입자 크기 및 분포

제조된 SLN의 평균 입자 크기는 제조 방법과 사용하는 유화제 종류와 농도에 따라서 달라진다.

이 실험에서 사용한 두 가지 제법을 비교해 볼 때 ultrasonication법으로 제조한 경우는 약 00~500 nm의 크기를 갖는 것으로 측정이 되었고, Microfluidizer를 이용하는 경우는 100~150 nm로 측정되었으며 polydispersity index도 Microfluidizer를 이용한 경우 0.1에서 0.3으로 ultrasonication으로 제조한 SLN보다 작은 값을 갖는 것으로 측정되어 분산이 보다 좁은 범위를 가지므로 고른 입자 크기를 갖는다. Ketoprofen을 1% 함유하고 지질로 사용한 trilaurin을 10% 함유하며 Poloxamer 188을 5% 함유하는 SLN을 두 가지 제법으로 제조하였을 때의 입자의 크기와 분포도는 Table III과 같다.

SLN의 제조에서 가장 중요한 부분의 하나인 유화제의 선택은 제조되는 SLN의 크기와 분포를 통해 결정하였다. Table IV에 나타난 바와 같이 Ketoprofen을 모두 일정하게 1%로 함유하고 Tween 80과 레시친, Poloxamer 188, 407을 이용하여 제조한 경우 Poloxamer류는 안정하고 작고 균일하게 제조된 반면에 Tween 80은 입자의 크기가 비교적 크며 분포 또한 넓은 것으로 측정되었다. 레시친을 유화제로 이용한 경우는 입자 크기도 매우 크고 분산 상태도 양호하지 못하였다. 따라서 이 실험의 제조에서는 분산 상태도 양

**Table III**—The Mean Particle Size and Distribution of Different Preparation Methods.

preparation method	mean size (nm)	distribution (nm)	*P.I.
ultrasonication	348	103~637	0.62
Microfluidization	121	99~204	0.10

\* Polydispersity Index

**Table IV**—The Mean Particle Size and Size Distribution of Ketoprofen Incorporated Solid Lipid Nanoparticles with Various Emulsifiers.

emulsifier	mean size (nm)	distribution (nm)	*P.I.
Poloxamer 188	188.3	58~362	0.10
Poloxamer 407	192.5	96~423	0.21
lecithin	650.8	361~2350	0.83
Tween 80	365.5	206~720	0.45

\* P.I. : Polydispersity Index

**Table V**—Mean Particle Size and Size Distribution of Ketoprofen Incorporated Solid Lipid Nanoparticles with Various Contents of Poloxamer 188.

emulsifier content(%)	mean size (nm)	distribution (nm)	P. I.
3	158.6	79~316	0.19
7	141.9	113~201	0.13
10	124.6	110~196	0.22
15	99.6	29~212	0.23

**Table VI**—Turbidity of Ketoprofen-incorporated Solid Lipid Nanoparticles at 25°C. (Mean±S.D. n=5)

lipid content(%)	turbidity(%-T)
3	75.32
7	71.22
10	62.14
15	61.37

호하며 입자 크기도 작은 Poloxamer류를 사용하여 제조하였는데 USP 23개정에 수재되어있는 Poloxamer 188(Pluronic F-68)<sup>7,14)</sup>을 사용하였다.

Ketoprofen이 함량을 1%로 고정하고 Poloxamer 188의 농도를 달리하여 제조하였을 경우 Table V에서와 같이 유화제의 농도가 높아짐에 따라 입자 크기는 작아지는 경향을 보였으며 분산 상태도 안정하였다. Siekmann<sup>15)</sup>의 연구에서와 같이 입자 크기는 100 nm정도의 수준으로 나타났다.

**지질 함량에 따른 탁도 및 침강용적**

탁도는 540 nm의 가시부영역에서의 빛의 투과도를 이용하여 제조된 SLN의 분산 상태를 파악하는 하나의 척도로서 이용하였다(Table VI).

탁도는 지질의 함량이 증가하면서 높아졌는데 이는 같은 부피의 SLN 제제에서 지질의 농도가 높아지면서 빛의 투과도는 감소하기 때문이다.

침강용적은 Matthews<sup>13)</sup> 등의 방법에 따라 측정하였으며 제조 직후의 침강물의 높이를 측정하고 60일 이후의 침강물의 침강높이를 측정하여 침강용적을 구하고 이를 가지고 SLN의 안정성으로 검토하였다(Table VII).

침강용적을 통하여 두 제법을 비교해 보면 앞에서 입자의 크기와 분포에서 Microfluidizer를 이용하여 제조한 경우는 매우 안정하여 60일 이후에도 침강물이 전혀 생기지 않았고, ultrasonication method나 cool stirring method<sup>16)</sup>로 제조한 것은 침강용적이 크게 나타났다. 이는 Microfluidizer를 이용하는 방법이 보다 좋은

**Table VII**—Sedimentation Volume Ratio of Solid Lipid Nanoparticles after 60 days at Room Temperature

SLN(lipid : drug)	sedimentation volume ratio(H <sub>u</sub> /H <sub>0</sub> )
3:1*(S)	0.061
5:1(S)	0.090
7:1(S)	0.083
10:1(S)	0.106
15:1(S)	0.206
3:1**(M)	1
5:1(M)	1
7:1(M)	1
10:1(M)	1
15:1(M)	1

\* (S) : ultrasonicated SLN, \*\* (M) : microfluidized SLN  
3:1, 5:1, 7:1, 10:1, 15:1 : the ratio of lipid to drug

**Table VIII**—Entrapment Efficiency of Ketoprofen Incorporated Solid Lipid Nanoparticles

lipid content(%)	entrapment efficiency
3	97.30
7	95.07
10	96.84
15	98.31

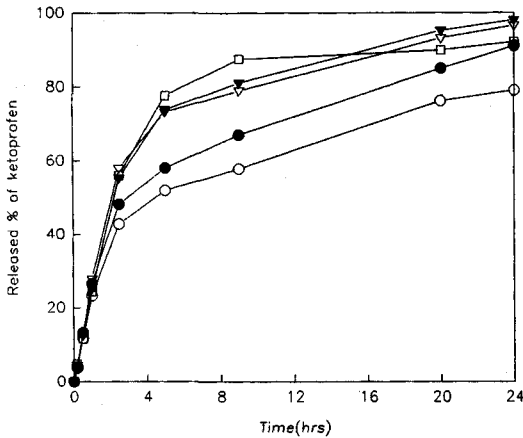
분산 상태를 갖는 SLN을 제조할 수 있는 방법임을 보여준다.

**약물 봉입 효율**

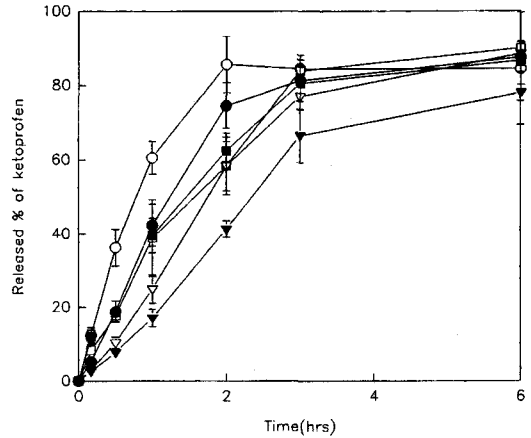
다른 입자성 약물수송체에 비하여 SLN의 봉입율은 매우 높은 것이 특징이다. 이 실험에서 제조된 케토프로펜을 1% 함유하는 SLN도 약물 봉입효율이 90% 이상으로 측정이 되었다(Table IV). Gasco,<sup>17)</sup> Mizushima<sup>18)</sup> 등의 연구에서 약물과 지질의 비율을 달리하면서 나노파티클을 제조하였을 경우에 약물에 대한 지질의 비율이 높아질수록 봉입효율이 증가하는 것으로 보고되어 있다. 높은 봉입율은 케토프로펜의 유수분배계수가 클로로포름을 유상으로 사용하였을 때 pH 4.0에서 47.59로 크게 측정되었는데, 제조된 SLN 현탁액의 pH가 5부근으로 측정되었으므로 SLN 현탁액에서 지질로의 이행율이 크게 따라서 봉입효율이 높은 것으로 생각된다. SLN은 리포솜이나 니오솜등의 제형에서 나타나는 낮은 봉입효율과 재현성이 없는 단점과 비교하여 볼 때 높은 봉입율과 재현성이 있는 제법으로 제조가 가능하였다.

**in vitro 약물 방출율**

반투막을 이용한 in vitro 약물 방출 실험은 약물과 지질의 비율과 지질의 농도 변화에 대한 방출율을 각



**Figure 2**—Dissolution profile of ketoprofen-incorporated SLNs prepared using ultrasonication. (ratio of lipid to drug : ○— : 20:1, ●— : 15:1, ▽— : 10:1, ▼— : 5:1, □— : 3:1)



**Figure 3**—Dissolution profile of ketoprofen-incorporated SLNs prepared using microfluidizer. (lipid contents : ○— : 3%, ●— : 7%, ▽— : 10%, ▼— : 15%, □— : suspension, ■— : solution)

각 측정된 결과 약물과 지질의 비율에 있어서는 약물의 함량이 많을수록 방출 속도가 크게 나타났다.

지질과 약물의 비율이 20:1과 10:1의 제제는 4시간 후에 약 40~50%정도가 용출된 반면 3:1로 제조한 경우는 80%에 가깝게 용출이 되었다. 이는 SLN 자체가 매트릭스 형태로 제조되었기 때문에 제조된 SLN과 혼합되어 있는 케토프로펜이 외부의 용매와 접촉할 수 있는 확률이 증가하기 때문으로 생각된다. 또한 약물의 농도가 너무 높아지면 효과적으로 약물을 봉입시키기 어려워 SLN 현탁액에 봉입되지 않고 유리된 약물이 혼재할 가능성도 있다. 이 실험에서 사용한 3:1의 처방제제로 ultrasonication 방법으로 제조한 SLN은 실온에서 보관중 지질에 봉입되지 않은 약물 입자가 침전되었다.

마이크로플루다이를 이용하여 제조한 SLN을 지질과 약물의 중량비로서 10:1로하여 분산 용액에 대한 지질의 농도를 3%, 7%, 10%, 15%로 증가시켰을 때의 약물 방출 실험의 결과가 Figure 3에 있다. 케토프로펜을 1% CMC-Sod, 현탁액과 polyethylene glycol 400의 50%용액에 각각 용해시킨 용액과 함께 비교하였는데 이때 현탁액이나 용액은 비슷한 약물 방출을 보였다. 지질의 농도가 작은 3%와 7%, 즉 10% 미만의 처방제제의 경우는 현탁액이나 용액의 경우보다 오히려 빠른 방출 속도를 나타내었다. 이는 약물 자체의 용출에 사용된 유화제의 영향, 그리고 사용된 지질인 trilaurin이 구조적으로 계면활성을 갖고 있으므로 이런 계면활성의 영향과 작은 입자 크기의 비표면적 증가 효과가 유리 약물의 용출보다 약간 빠른 용출

을 보이는 이유로 사료된다. Brita<sup>19)</sup>의 보고에서 나타난 다음의 식을 통해 이와 같은 현상을 고찰할 수 있는데 이는 입자 크기에 의존적인 물질의 화학적 전위 (chemical potential)때문이다.

$$\mu - \mu_0 = 4\sigma VD$$

이때  $\mu_0$ 는 물질의 큰 입자 상태의 화학적 전위값이고,  $\sigma$ 는 표면 또는 계면장력이다. V는 물 부피이며 D는 입자의 직경을 나타낸다. 단, 이 경우 입자는 구형이라는 가정이 필요한데 SLN은 일반적으로 구형으로 제조되는 것으로 되어 있다. 따라서 약물의 화학적 전위는 작은 입자에서 더욱 크게 나타나며 이는 결국 약물이 입자로부터 주변 외상으로 약물의 이행을 증가시키는 역할을 하게 되어 작은 입자 크기의 SLN의 빠른 방출 속도를 설명한다.

10%와 15%로 지질의 농도가 증가되면서는 방출 속도가 감소하는 경향이 보였으며 15%정도가 되었을 때는 유리 약물에 비하여 방출 속도가 감소하였다.

**제타 포텐셜**

측정된 제타포텐셜은 음의 값을 갖는 것으로 측정되었다(Table IX). 지질을 10% 함유하며 유화제로 사용한 Poloxamer 188의 양을 3%에서 20%까지 달리 하여 ultrasonication method로 제조한 후 측정된 제타포텐셜 data graph를 도시하였다(Figure 4). 유화제의 양이 증가함에 따라서 감소하는 경향이 나타났다. 측정된 입자의 크기는 270 nm에서 120 nm로 유화제의 농도가 증가하면서 입자 크기도 작아졌다.



Table IX—Zeta-potential Analysis Data of Solid Lipid Nanoparticles with Various Concentration of Poloxamer 188 at

conc. of poloxamer(%)	mobility (μm/s/V/cm)	shifted power spectrum(Hz)	conductance (μs)	zeta potential (mV)
3	-1.04	-9.58	55.2	-13.3
5	-1.07	-12.9	32.4	-13.7
7	-0.72	-6.63	44.3	-9.21
10	-0.7	-7.66	35.6	-8.96
20	-0.91	-9.56	37.7	-11.6

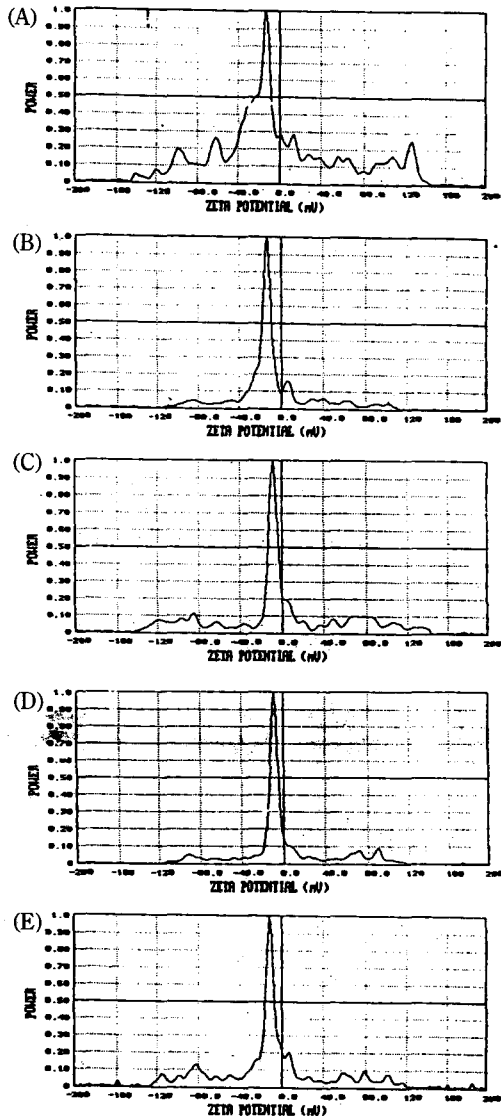


Figure 4—Zeta-potential analysis diagram of solid lipid nanoparticles with various emulsifier content. Key : A) : 3%, B) : 5%, C) : 7%, D) : 10%, E) : 20%

안정성 평가

평균 입자 크기의 탁도의 변화

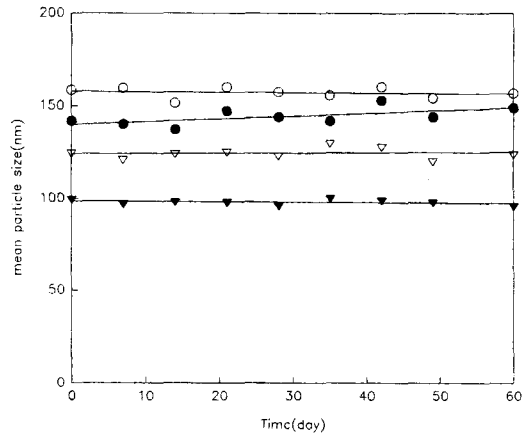


Figure 5—The change of mean particle size of ketoprofen-entrapped solid lipid nanoparticles with various lipid contents for 60 days  
Key : -○- : 3%, -●- : 7%, -▽- : 10%, -▼- : 15%

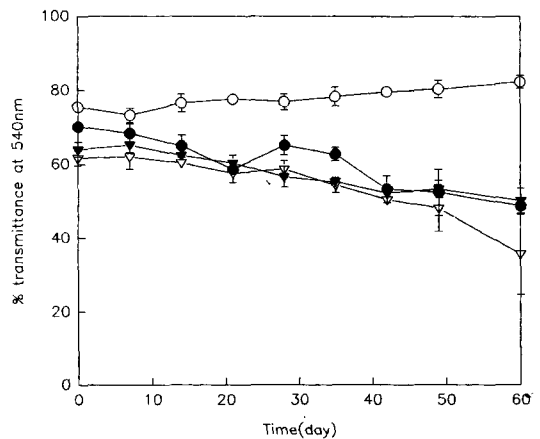


Figure 6—The change of turbidity of solid lipid nanoparticles with different concentration of lipid at room temperature  
Key : -○- : 3%, -●- : 7%, -▽- : 10%, -▼- : 15%

안정성 평가는 평균 입자 크기의 변화와 탁도의 변화를 측정하여 평가하였으며 Microfluidizer를 이용한 SLN은 60일간 100 nm전후로 안정하였고 탁도의 변화도 3%에서는 변화가 없고, 7, 10, 15%에서는 10%

정도 감소하였다.

**동물실험 결과**

**진통 억제 효과**

케토프로펜 현탁액과 SLN을 각각 투여한 두 군간의 진통 효과를 비교하였다. 두 제제 각각을 케토프로펜으로서 50 mg/kg의 용량으로 근육주사한 후 30분 후에 복강에 0.7% 초산 용액을 투여하였다. 초산을 투여한 후 최초 stretching이 일어나는 시간은 평균 2.74분이었으며 Table VIII에서와 같이 진통효과는 케토프로펜 현탁액과 SLN을 비교해볼때 초산투여후 5분에서 10분까지인 phase I에서는 현탁액이 15~20%가량 높게 측정되었다. 그러나 이후 10분부터 20분까지의 phase II에서는 같은 억제율을 보이며, 오히려 지질과 약물의 비율을 10:1로 제조한 SLN은 억제율이 더 크게 나타났다. 이와같은 억제 효과를 phase I과 phase II를통해 고찰해 보면 현탁액의 경우는 효과가 점차 감소하는 경향이 보이고 SLN은 효과가 증가하는 양상을 보였다. 이는 현탁액으로 투여된 케토프로펜의 대사 속도가 SLN으로 투여한 것보다 빠르기 때문에 나타나는 현상으로 생각된다.

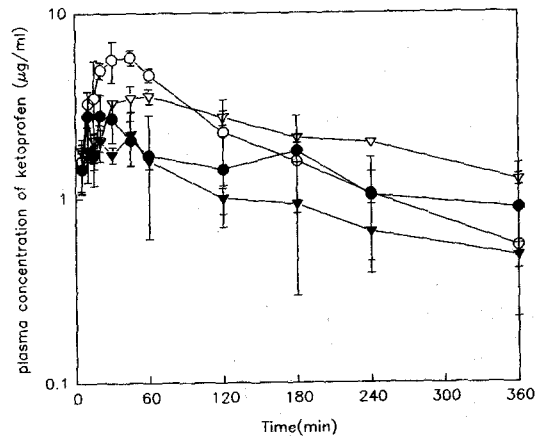
**생체내 약물 동태**

케토프로펜 현탁액과 SLN을 각각 5 mg/kg의 용량으로 근육주사한 후 각 시간에서 약물의 혈중농도를

HPLC로 정량하여 혈중농도의 동태를 측정한 결과 SLN으로 투여한 모두에 있어서 최고 혈중농도 도달 시간이 약간 증가하였으며 지질의 비율이 증가하면서 비례적인 양상을 보여주었다. 최고 혈중농도는 현탁액에 비하여 SLN은 50%정도로 낮게 나타났다. 이러한 결과를 AUC를 통해 생체이용율을 평가하기는 어렵지만 6시간까지의 AUC값은 현탁액의 경우가 2배 이상 높게 나타났으나 무한 시간으로 산출한 값은 별차이가 없는 것으로 현탁제보다는 SLN으로 투여한 경우 작용 지속호의 목적에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

**결 론**

입자성 약물 수송체로서 기존의 리포솜이나 마이크로스피어 등의 여러 장점을 가지고 있는 SLN을 이용하



**Figure 7**—Plasma concentration-time profiles of ketoprofen suspension and ketoprofen-incorporated solid lipid nanoparticles after intramuscular injection to rat(mean±S.D.)  
Key : -○- : suspension, -●- : SLN(5:1), -▽- : SLN(10:1), -▼- : SLN(20:1)

**Table X**—Analgesic Effect of Ketoprofen Suspension and Solid Lipid Nanoparticles

type	drug conc. lipid : drug	Inhibition %	
		phase I	Phase II
suspension	1%	51.33±7.23	43.50±6.89
solid lipid	5:1	34.77± 6.84	43.50±8.30
nanoparticles	10:1	39.16± 8.85	49.71±5.67
	20:1	30.47±12.36	42.13±3.73

**Table XI**—Pharmacokinetic Parameters of Ketoprofen Incorporated Solid Lipid Nanoparticles and Suspension after Intramuscular Injection with 5 mg/kg as Ketoprofen to Rats(Mean±S.D. n=5)

	t <sub>1/2</sub> (min)	AUC <sub>0-6hr</sub> (µg · min/ml)	AUC <sub>0-∞</sub> (µg · min/ml)	MAT (min)
suspension	79.95±4.22	659.40±45.94	840.79±54.19	120.54± 6.10
SLN(5:1)	81.60±5.54	375.46±72.62	818.89±68.07	117.75± 8.0
SLN(10:1)	80.51±8.72	282.91±22.19	829.93±44.93	116.18±12.57
SLN(20:1)	74.43±4.98	289.12±46.17	825.89±47.7	114.22±7.19
suspension	5.89±0.58	31.00± 8.94	1.12± 0.10	134.94± 6.50
SLN(5:1)	2.82±0.47	33.25±19.69	2.84± 0.55	335.54±75.93
SLN(10:1)	3.48±0.39	35.20±13.69	3.506 ± 0.41	407.86±66.16
SLN(20:1)	2.24±0.60	37.23±16.81	4.53± 0.29	518.22±57.13

여 케토프로펜의 SLN제제를 제조하였다. 기존의 나노파티클제법을 응용하여 ultrasonication과 microfluidizer를 이용하여 제조하였으며 제조한 SLN의 약물 봉입효율과 입자의 평균 크기 등을 측정하였고, 생체내 조건과 유사한 pH 7.4, 37°C에서 방출 실험을 하였으며 안정성 실험으로 입자 크기와 탁도의 경시변화의 유무를 측정하였으며, 침강용적을 측정하였다.

케토프로펜을 함유하는 SLN의 생체내동태를 약물 동력학적인 고찰을 통해 시간대별 혈중 약물 농도의 추이를 측정하였으며, SLN과 현탁제로 한 제제를 각각 근육투여를 통해 진통 효과 실험을 하였다.

이러한 실험 결과를 바탕으로 케토프로펜을 봉입한 SLN의 새로운 약물수송체로서의 가능성을 검토, 고찰하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 케토프로펜은 약산성 약물로 산성의 pH 4.0 완충 용액에서는 용해도가 0.297 mg/ml로 매우 낮고 유수 분배계수는 크며, pH가 증가함에 따라 용해도도 증가하여 pH 7.4에서는 7.523 mg/ml로 측정되고 pKa 값은 4.02였다.

2. SLN의 평균 입자 크기는 제법과 유향제의 종류에 따라 다르게 나타났는데, ultrasonication method로 제조한 경우는 약 200~300 nm로 측정되었으며 microfluidizer로 제조한 경우는 100 nm내외로 측정되었고 polydispersity index도 0.1로 매우 좁은 분포 범위를 갖는 것으로 측정되었다.

3. SLN의 약물 봉입율은 모든 제제처방의 경우 95% 이상을 나타내었으며, 입자크기의 경시변화와 탁도의 변화, 그리고 침강용적을 측정한 결과 Microfluidizer로 제조된 SLN은 60일간의 실온 방치 기간 동안 매우 안정하였다.

4. Microfluidizer로 제조하는 방법이 ultrasonication method로 제조한 경우보다 더욱 안정한 분산계를 제조하는 것을 입자의 분포, 침강용적 실험 등을 통해 확인되었다.

5. 유향제는 SLN이 o/w형의 분산계를 갖고 있으므로 HLB값이 27 정도 되는 Poloxamer 188, 407이 유향제의 효과가 Tween류나 레시친에 비하여 분산 상태가 양호하였으며 Poloxamer 188을 이용하여 제조한 SLN에서 Poloxamer 188의 양이 증가함에 따라 평균 입자크기가 감소하는 경향을 보였다.

6. 지질로 trilaurin을 사용하고 유향제로 Poloxamer 188을 이용하여 제조된 solid lipid nanoparticles의 제타포텐셜을 측정 한 결과 -9~-13mV의 제타

포텐셜을 갖는 것으로 측정되었다.

7. 지질의 농도가 높아짐에 따라 약물의 방출 속도는 다소 감소하는 경향이 있었으며 3~5% 정도에서는 비교군으로 한 케토프로펜 현탁제보다도 빠른 용출속도를 나타내었고 15% 이상의 농도에서는 다소 지연되었다.

8. 진통 억제 효과 실험에서 SLN의 초기에는 현탁제의 51.3%에 비하여 낮은 35~40%의 억제율을 보였으나 추산투여 한 뒤 10분 이후 20분 사이에서는 같은 억제율을 보여 현탁제에 비해 SLN이 지속적인 진통 억제 효과를 갖는 것으로 추정된다.

이상의 실험에서 얻어진 결론으로는 고품질의 입자성 분산을 이룰 수 있는 triglyceride류를 이용하여 제조한 SLN은 마이크로플루이다라이저를 사용하여 제조하면 매우 작고 균일한 입자의 분산과 보다 나은 물리적 안정성을 가지고 있다. 약물의 방출도 지질의 농도와 유향제의 종류 및 노도 등에 따라서 조절이 가능하다. 따라서 이 실험에서는 소염진통제의 하나인 케토프로펜을 모델약물로서 실험을 하였지만 SLN은 소염진통제뿐 아니라 항암제를 비롯한 많은 약물에 입자성 약물수송체로 응용 및 개발 가능성이 매우 높다고 사료된다.

## 문 헌

- 1) A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkis, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238~252(1965).
- 2) T. Ohwaki, K. Nitta, H. Ozawa, Y. Kawashima, T. Hino, H. Takeuchi and T. Niwa, Improvement of the formation percentage of water-in-oil-in-water multiple emulsion by the addition of surfactants in the internal aqueous phase of the emulsion, *Int. J. Pharm.*, **85**, 19~28(1992).
- 3) Y. Shoji, Y. Mizushima, A. Yanagawa, T. Shiba, H. Takei, M. Fujii and M. Amino, Enhancement of anti-inflammatory effect of biphenylacetic acid by its incorporation into lipid microspheres, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 118~121(1986).
- 4) A. J. Baille, G. H. Coombs and J. Laurie, Non-ionic surfactant vesicles, niosomes, as a delivery system for the anti-leishmanial drug, sodium stibogluconate, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 502~505(1986).
- 5) C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks and R.

- H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization *J. control. Rel.*, **30**, 83~96(1994).
- 6) M. Akbarieh, H. Heiati and R. Tawashi, Coated solid lipid nanoparticles, A new strategy in drug delivery and targeting, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact Mater.*, **21**, 218~219(1994).
  - 7) A.V. Prancan, B. Ecanow, R.J. Bernardoni and M.S. Sadove, Poloxamer 188 as vehicle for injectable Diazepam, *J. Pharm. Sci.*, **69**(8), 970~971(1980).
  - 8) M. R. Gasco, R. Cavalli and O. Caputo, Doxorubicine lipospheres from microemulsions, *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, **19**, 391~392(1992).
  - 9) H. Bunje and K. Westesen, Preparation of solid lipid nanoparticles by two different methods-A comparison, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **40**(Supl.), 39S(1994).
  - 10) K. Kakemi, T. Arita, R. Hori and R. Konishi, Absorption and excretion of drugs XXX. Absorption of barbituric acid derivatives from rat stomach, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**(10), 1534~1539(1967).
  - 11) J. Hasegawa, T. Fujita, Y. Hayashi, K. Iwamoto and J. Watanabe, pKa determination of verapamil by lipid-lipid partition, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 442(1984).
  - 12) R. Cavalli, O. Caputo and M.R. Gasco, Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin, *Int. J. Pharm.*, **89**, R9~R12(1993).
  - 13) B.A. Matthews and C.T. Rhodes, Some studies of flocculation phenomena in pharmaceutical suspension, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 569~573(1968).
  - 14) The United States Pharmacopeia 23, The National Formulary 18, 2279~2280(1995).
  - 15) B. Siekmann and K. Westesen, Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsion, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **40**(Supl.), 16S(1994).
  - 16) M.R. Gasco, Lungo Po, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, US patent 5,250, 236(1991).
  - 17) M.R. Gasco, S. Morel, M. Trotta and I. Viano, Doxorubicine englobed in polybutyl cyanoacrylate nanocapsules: Behavior in vitro and in vivo, *Pharm. Acta. Helv.*, **6**(2), 47~49(1991).
  - 18) Y. Mizushima, Y. Wada, Y. Etho and K. Watanabe, Anti-inflammatory effects of indomethacin ester incorporated in a lipid microsphere, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 398~399(1983).
  - 19) Brita Sjöström, Bengt Kronberg and Johan Carlfors, A method for the preparation of submicron particles of sparingly water-soluble drugs by preparation in oil-in-water emulsions I. Influence of emulsification and surfactant concentration, *J. Pharm. Sci.*, **82**(6), 579~583(1993).