

현탁된 고형지질나노입자 내로 친수성 약물의 봉입률을 증대시키기 위한 w/o/w 에멀션 가온용융유화법의 평가

이병무 · 최성업 · 이재휘 · 최영욱[†]

중앙대학교 약학대학

(2004년 12월 18일 접수 · 2005년 1월 3일 승인)

A Hot Melt w/o/w Emulsion Technique Suitable for Improved Loading of Hydrophilic Drugs into Solid Lipid Nanoparticles

Byoung Moo Lee, Sung-Up Choi, Jaehwi Lee and Young Wook Choi[†]

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received December 18, 2004 · Accepted January 3, 2005)

ABSTRACT—Recently increasing attention has been focused on solid lipid nanoparticles (SLN) as a parenteral drug carrier due to its numerous advantages that can come from both polymeric particle and fat emulsions, together with the possibility of controlled release and increasing drug stability. Lipophilic drugs such as paclitaxel, cyclosporin A, and all-trans retinoic acid have been successfully entrapped in SLN but the incorporation of hydrophilic drugs in SLN is very limited because of their very low affinity to the lipid. Therefore, as a new approach to improve the loading of hydrophilic drugs, a w/o/w emulsion technique has been developed. The primary objective of the current study was to improve the loading efficiency of a model hydrophilic drug, glycine (Log P = -3.44) into SLN. The proposed preparation process is as follows: A heated aqueous phase consisting of 0.1 ml of glycine solution in water (100 mg/ml), and poloxamer 188 (5 mg) were then added to a molten oil phase containing precircol (100 mg) and lecithin (5 mg). This mixture was dispersed by sonicator, leading to a w/o emulsion. A double emulsion (w/o/w) was formed after the addition of 2% poloxamer solution to the above dispersed system. After cooling the double emulsion, solid lipid nanosuspensions were successfully formed. The lipid nanoparticles had the mean particle size of 441.25 nm, and the average zeta potential of -20.98 mV. The drug loading efficiency was measured to be 8.54% and the drug loading amount was measured to be 0.92%. The w/o/w emulsion method showed an increased loading efficiency compared to conventional o/w emulsion method.

Key words—Solid lipid nanoparticles, hydrophilic drugs, w/o/w emulsion, o/w emulsion, Glycine

정맥주사를 통해 약물을 체내로 전달할 때 전달효율을 높이기 위해 에멀션,¹⁾ 리포솜,²⁾ 미셀,³⁾ 사이클로덱스트린 포접체,⁴⁾ 고분자성 입자⁵⁾ 및 고형지질나노입자 (solid lipid nanoparticles, SLN)⁶⁾ 등의 수송체에 약물을 봉입시켜 주사제를 개발하고자 하는 연구들이 많이 보고되어 왔다. 이들 중 1991년 Lucks 등⁷⁾에 의해서 도입된 SLN은 기존의 콜로이드성 약물 운반체들이 지닌 단점들을 배제하고 장점들을 취합한 새로운 약물 운반체로서 각광을 받고 있다.⁸⁾ SLN은 형태적인 측면에서 마이크로스피어 보다 더욱 작은 미세한 크기의 입자로 보통 100 nm 정도 또는 그 이하의 입자도를 가지며 리포솜이나 에멀션계와는 달리 매트릭스 형태로 존재한다. 본질적으로 수용성 약물 보다는 지용성 약

물에 더욱 적합한 수송체로 특히 난용성 약물의 가용화와 함께 표적지향성의 약물 수송체로서 활발히 연구 되어지고 있다. 이런 SLN은 생체적합성 고형지질을 약물수송의 플랫폼으로 사용하므로 생체에 대한 독성이 낮고 또한 제조과정 중에 유기용매를 사용하지 않으므로 유기용매에 의한 잔류독성에 대한 염려도 없다.⁷⁾

유전 공학의 발전으로 새로운 펩티드, 단백질, DNA 및 ribozyme 등이 여러 질환에 있어서 새로운 치료제로 사용되기 위해 의약품으로서의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 이들 약물들은 대부분 고가의 그리고 친수성 물질들이고 주로 반복적인 정맥주사를 통해 체내로 전달되지만 낮은 생체이용률로 인해 임상적 사용이 제한되고 있다. 이들 약물들의 생체이용률을 증대시키기 위해 지속성의 주사제로 제제화할 경우 SLN의 사용을 우선적으로 검토해 볼 수 있다.⁷⁾ 그러나 친수성인 이들 약물의 SLN 내로의 봉입은 고형지질의

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

물성으로 인해 극히 제한적이다. 그러므로 SLN의 장점은 유지하면서 고가의 친수성인 약물을 봉입할 수 있는 새로운 봉입방법의 개발은 매우 중요하다고 할 수 있다.

현재는 지질을 가온하여 용융시킨 후 이것을 수상에 분산시켜 o/w 에멀션을 만들고 이것을 냉각시켜 SLN을 제조하는 가온용융유화법에 의해 SLN을 제조할 수 있으나 친수성 약물을 봉입 하기에는 내상이 유상으로 되어있어 우수한 봉입률을 기대 할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 글리신을 친수성 모델 약물로 하여 새로운 SLN 제조방법을 검토하였다. 즉, 친수성 약물을 유상의 내부에 함유시키기 위해 1차로 w/o 에멀션을 형성 시키고 이 일차 유제를 다시 수상에 분산시킴으로써 SLN을 제조하여 보다 많은 양의 친수성 약물이 SLN 내로 봉입될 수 있는지 o/w 에멀션을 이용한 방법과 비교 검토하였다. 또한, w/o/w 이중유제를 만들 때 가온용융에 의해 지질을 녹여 유상으로 사용하는 방법과 유기용매인 디클로로메탄에 지질을 용해시킨 후 이를 유상으로 사용하는 방법이 제조된 SLN에 미치는 영향도 평가하였다. 제조된 SLN의 물리화학적 특성을 파악하기 위해 입자의 크기 및 입도분포, 제타포텐셜 그리고 모델 약물의 봉입률을 측정하였다.

실험 방법

시약

글리신 (순도 99%) 및 L- α -lecithin은 Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. 폴록사머 188은 BASF사 (서울, 한국) 제품이고 Precirol ATO 5는 Gattefosse사 (Paris, 프랑스)로부터 입수하였다. Dialysis membrane (Spectra/Por, MWCO=12,000-14,000)은 Spectrum Laboratories (New York, USA)의 제품을 이용하였고 기타 사용된 시약들은 모두 시판 일급 또는 특급품을 사용하였다.

글리신 함유 SLN의 제조

약물함유 SLN은 Garcia-Fuentes 등⁹⁾의 방법을 참고로 하여 제조하였다. SLN의 고형지질로는 Precirol ATO 5 (glyceryl palmitostearate)¹⁰⁾를 사용하였다. 유화제로는 L- α -lecithin (L- α -phosphatidylcholine)과 폴록사머 188을 사용하였다. 유화제로 lecithin만을 사용하고 co-surfactant인 폴록사머 188을 첨가하지 않을 경우, 불순물로 존재하는 phosphatidylethanolamine의 영향을 받아 안정한 에멀션을 제조할 수 없는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ Precirol 100 mg과 lecithin 5 mg을 60°C의 수욕상에서 가온, 용융하고, 동일 온도에서 가온된 폴

록사머 188 (5%)와 글리신 10 mg을 함유하는 수상을 유상에 가하여 w/o의 조에멀션 상태를 만들고 약 30초간 초음파 유화를 시켰다. 이것을 최외상인 폴록사머 188 2% 수용액 2 ml에 가하고 다시 1분간 초음파 유화한 후 형성된 w/o/w 에멀션을 상온으로 냉각하여 고�형지질나노입자의 현탁액을 제조하였다.

상기의 w/o/w 에멀션 방법에 의해 제조된 글리신의 고�형지질나노입자와 비교를 위해 기존의 o/w 에멀션 방법으로도 시료를 제조하였다. Precirol 100 mg과 lecithin 5 mg을 60°C의 수욕상에서 가온, 용융하고, 동일 온도로 가온된 약물 (10 mg) 및 폴록사머 188 2%가 함유된 수상에 가하여 조에멀션을 형성시키고 microfluidizer (10,000 psi, 10 cycles)로 처리한 후 상온으로 냉각시켜 글리신 함유 SLN 현탁액을 얻었다.

또한 가온용융에 의해 고�형지질을 함유하는 유상을 제조하지 않고 디클로로메탄을 사용하여 유상을 제조하고 이것으로 w/o/w 에멀션, 그리고 이 w/o/w 에멀션 으로부터 고�형지질나노입자를 제조하여 위의 시료들과 비교를 하였다. 디클로로메탄 1 ml에 Precirol 100 mg과 lecithin 5 mg을 넣고 녹였다. 폴록사머 188 5%와 글리신 10 mg을 함유하는 수상을 유상에 가하여 w/o 조에멀션 상태를 만들기 위해 1차 유화로 약 30초간 초음파 유화 시켰다. 이것을 폴록사머 188 2% 수용액 8 ml에 가하여 w/o/w 에멀션을 형성시킨 후 1차 유화와 같은 강도로 30초간 초음파 유화하였다. 이 유제를 1 일간에 걸쳐 실온에서 교반하여 서서히 디클로로메탄을 휘발시킨 후 고�형지질나노입자 현탁액을 제조하였다.

글리신의 정량

글리신의 함량 및 *in vitro* 약물방출시험에서의 약물농도는 Hitachi HPLC (Hitachi, Tokyo, 일본)를 사용하여 분석하였다.¹²⁾ Hitach L-7110 펌프, L-4200H UV/Vis 검출기를 이용하였으며, 이동상은 증류수를 사용하였고, 유속은 1 ml/min, 파장은 205 nm, 컬럼은 Waters사의 Spherisorb® (4.6 × 250 mm, Waters, 미국)을 사용하였다.

글리신의 봉입률 측정

제조한 글리신 함유 고�형지질나노입자의 현탁액을 Centrikon T-1170 초원심분리기 (Kontron, Milano, Italy)를 이용하여 100,000 g에서 4°C를 유지한 상태에서 1시간 동안 초원심분리를 하였다. 상정액을 제거한 후 침전물에 메탄올 수용액 (5%w/v) 10 ml를 가하여 Water를 부어서 가온하여 녹인 후 -20°C에서 30분간 보관한다. 이 냉각된 용액을 3,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 지질성분을 제거한 다

음 상징액 중의 글리신 농도를 HPLC로 정량하였다. 얻어진 결과를 아래의 식에 대입하여 약물의 봉입률과 봉입효율을 산출하였다.

$$\text{Drug loading amount} = \frac{\text{Mass of drug}}{\text{Total mass of lipid and drug}} \times 100$$

$$\text{Drug loading efficiency} = \frac{\text{Mass of drug remained in SLN}}{\text{Total mass of drug initially added}} \times 100$$

입자도 및 입자분포 측정

제조된 각 시료들의 평균 입자도 및 제타전위 값은 photon correlation spectroscopy에 의해서 측정하였고 여기에 사용된 기기는 Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, 영국)를 사용하였다. 측정시 한 시료마다 5회 반복하여 측정하였다.

In Vitro 약물 방출 실험

제조한 글리신 함유 고형지질나노입자 현탁액 일정량을 투석막 bag (MWCO 12,000-14,000, Spectra/Por®, Spectrum Laboratories사, 미국)에 넣고 확산투석법으로 진탕배양기 (37 °C, 150 rpm)를 이용하여 일정 시간 간격으로 시료를 취한 후 공시험액으로 보정하였다. 이렇게 얻은 각 시간대별 시료 중 글리신의 농도를 HPLC를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

글리신이 봉입된 SLN의 입자 크기 및 제타포텐셜

W/o/w 에멀션 가온용융유화법으로 제조한 SLN의 평균 입자경은 441.25 nm, 0.39의 polydispersity index, 그리고 -20.98 mV의 제타전위값을 갖는 콜로이드성 입자이었다. (Table I). 또한 o/w 에멀션 가온용융유화법에 따라 제조한

SLN의 평균 입자경은 516.22 nm, 0.37의 polydispersity index 및 -28.79의 제타전위값을 나타내었다. 디클로로메탄을 사용하여 제조된 SLN의 평균 입자경의 경우, 평균입자도, polydispersity index 및 제타전위값은 각각 362.74 nm, 0.41, -31.89 mV였다. 제조된 SLN의 평균 입자도 및 분포로 판단할 때 주사제로 사용이 가능한 것으로 판단되었다. 또한 제타전위값 역시 물리적인 안정성을 확보하기에 충분할 것으로 판단 되었다.¹³⁾

글리신의 봉입률

봉입률 및 봉입효율 - 친수성 약물인 글리신의 봉입을 증대시키기 위해 w/o/w 에멀션 가온용융유화법으로 SLN을 제조하여 글리신의 봉입정도를 측정된 결과 글리신의 봉입효율은 8.54% 그리고 봉입률은 0.92%가 나왔다 (Table II). 가온용융유화법 중 o/w 에멀션을 사용해 제조한 SLN 중의 글리신 봉입정도를 측정된 결과 1.85%의 봉입효율 및 0.15%의 봉입률을 보여주어 w/o/w 에멀션을 이용한 경우에 비해 봉입률과 봉입효율이 상당히 줄어든 것으로 나타났다. 이는 가온용융유화법에서 o/w 에멀션을 사용한 경우, 친수성 약물인 글리신이 외상으로 투입 됨으로서 친유성인 용융된 지질 내로 글리신의 분배 또는 침투가 용이하지 않았던 반면, w/o/w 에멀션을 사용한 경우에는 글리신이 유상 내에 내상의 형태로 존재하게되어 o/w 에멀션에 비해 친수성 약물의 지질내 봉입을 높일 수 있었다. 이는 결국 o/w 에멀션 가온용융유화법이 지용성 약물의 봉입에는 적합하지만 친수성 약물의 봉입에는 적합하지 않은 방법임을 나타낸다.¹⁴⁾ 가온용융이 아닌, 디클로로메탄을 이용하여 지질을 녹여 형성시킨 w/o/w 에멀션으로부터 제조한 SLN 내부로의 약물봉입효율과 봉입률은 각각 약 10.89%와 1.78%인 것으로 나타났다 (Table II). 이는 같은 w/o/w 에멀션 방법이지만 디클로로메탄을 사용하지 않은 경우의 결과와 비교하였을 때 약 2배

Table I—The Average Particle Size and Zetapotential Value of Solid Lipid Nanodispersions of Glycine Prepared from Hot Melted w/o/w Emulsion Technique (Mean±SD, n=5)

Preparation methods	Particle size (nm)	Polydispersity index	Zetapotential (mV)
W/o/w emulsion, hot melted	441.25±37.45	0.39	-20.98±5.43
O/w emulsion, hot melted	516.22±42.31	0.37	-28.79±3.25
W/o/w emulsion, solvent melted	362.74±39.68	0.41	-31.89±3.56

Table II—Glycine Loading Amount and Glycine Loading Efficiency of Solid Lipid Nanodispersions of Glycine (Mean±SD, n=5)

Preparation methods	Drug loading amount (%)	Drug loading efficiency (%)
W/o/w emulsion, hot melted	0.92±0.13	8.54±0.79
O/w emulsion, hot melted	0.15±0.07	1.85±0.94
W/o/w emulsion, solvent melted	1.78±0.21	10.89±0.86

Table III—Influence of Water Amount of Far Outer Aqueous Phase of w/o/w Emulsion on Glycine Loading Amount and Glycine Loading Efficiency (Mean±SD, n=5).

Water amount (ml)	Drug loading amount (%)	Drug loading efficiency (%)
2	0.92±0.13	8.54±0.79
4	0.48±0.05	4.88±0.37
6	0.35±0.02	3.01±0.29

봉입률 증대를 보여준 것을 알 수 있었다. 그러나 디클로로메탄을 사용한 경우가 봉입률의 증대에는 유리하지만 남은 유기용매가 없을 때까지 장시간 교반을 하여야 하는 단점을 갖는다. 이러한 장시간의 교반은 결국에 약물의 안정성 및 봉입률에도 영향을 미칠 것으로 예측되며 따라서 교반이 아닌 다른 방법에 의해 단시간에 유기용매를 제거하여야 처음의 봉입률을 유지할 것으로 생각된다.

최외상 수상의 양에 따른 글리신의 봉입률 변화 - Table III에 나타낸 바와 같이 w/o/w 에멀션으로 가온용융유화법에 따라 글리신의 SLN을 제조할 때, 최외상인 수상의 양을 2, 4 및 6 ml로 달리하여 제조한 경우에 글리신의 봉입률 및 효율에 있어서 차이를 보였다. 최외상의 양을 2 ml로 한 경우 봉입 효율과 봉입률은 각각 8.54%와 0.92%였다. 최외상을 4 ml로 한 경우에는 봉입효율과 봉입률이 각각 4.88%와 0.48%로 감소되었다. 최외상의 양을 6 ml로 더욱 증대시킨 경우 봉입효율과 봉입률은 각각 3.01%와 0.35%로 더욱 감소하였다. 이는 SLN 내부에 봉입된 약물이 수용성 이기 때문에 최외상 수상의 양이 증가함에 따라 유상에 존재하는 약물들이 외부수상으로의 확산이 증가하기 때문으로 사료된다.^{15,16)}

글리신 함량의 증가에 따른 봉입률의 변화 - 일정량의 지질에 대한 글리신 비율의 변화에 따른 봉입률의 변화를 확인하기 위해서 약물의 함량을 달리하여 실험을 진행하였다. 지질 대비 약물의 사용량을 각각 5, 10 및 15% (w/w)로 하였다. 그 결과 입자 내부에 봉입된 약물량은 지질 대비 약물의 사용량이 10%일 때 가장 높은 수치를 보였다 (Table IV). 글리신 봉입률의 경우 지질 대비 약물의 양이 5, 10, 15% 일

Table IV—Influence of Initial Glycine Amount on Glycine Loading Amount and Glycine Loading Efficiency (Mean±SD, n=5).

Initial glycine amount (w/w % to lipid)	Drug loading amount (%)	Drug loading efficiency (%)
5	0.49±0.04	4.92±0.51
10	0.92±0.13	8.54±0.79
15	0.82±0.05	7.29±0.43

때 각각 0.49%, 0.92%, 0.82%인 것으로 나타났다. 봉입효율의 경우 각각 4.92%, 8.54%, 7.29%의 값을 보여주었다. 이러한 결과는 글리신의 함량이 증가함에 따라 입자 내부에 봉입되는 글리신의 봉입률이 증가하다가 일정 비율 이상이 되면 지질 매트릭스 입자 내부에 봉입된 친수성 약물에 의한 수성채널이 증가하게 되어 이를 통해서 약물이 외부의 수상으로 더 쉽게 빠져 나오게 되는 것으로 사료된다.¹⁷⁾ 그리고 또한, 지질입자 내부의 약물농도가 증가함에 따라 외상과의 삼투압의 차이가 생겨서 내부의 약물이 외상으로 빠져나가는 경향이 증가하는 것도 한가지 원인으로 사료된다.¹⁸⁾

최외상의 수상의 폴록사머 함량변화에 봉입률 변화 - 고흥지질나노입자 현탁액의 물리적 안정성을 높이기 위하여 친수성 고분자이며 주사제의 첨가제로 사용이 가능한 폴록사머 188을 사용하였다. 진행된 실험에서 최외상 수상에 1, 2, 그리고 3%의 폴록사머 188을 첨가한 경우, 글리신의 봉입률은 0.81%, 0.92%, 1.01%인 것으로 나타났다. 그리고 봉입효율은 각각 8.14%, 8.54%, 10.23%를 나타내었다 (Table V). 이는 폴록사머의 농도가 증가함에 따라 최외상 수상으로 빠져나가는 수용성 약물인 글리신을 유상과 수상의 계면에 머무르게 함으로서 결과적으로 글리신의 봉입을 증대시킨 것으로 사료된다.

Table V—Influence of Poloxamer 188 Concentrations Contained in the Far Outer Aqueous Phase of w/o/w Emulsion on Glycine Loading Amount and Glycine Loading Efficiency (Mean±SD, n=5).

Poloxamer 188 concentration (%)	Drug loading amount (%)	Drug loading efficiency (%)
1	0.81±0.11	8.14±0.93
2	0.92±0.13	8.54±0.79
3	1.01±0.08	10.23±0.65

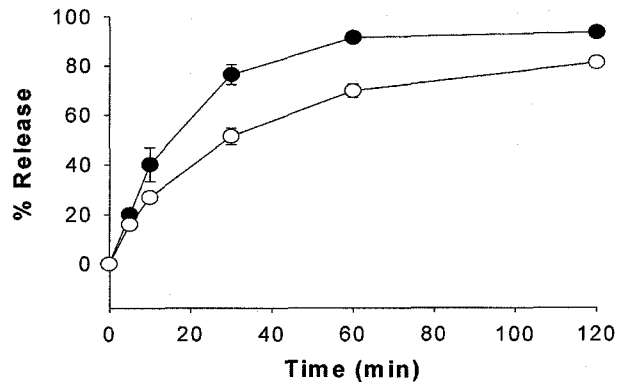


Figure 1—In vitro release profile of glycine from glycine bulk powder (●) and solid lipid nanosuspensions (○) prepared from hot melt w/o/w emulsion technique (Mean±SD, n=5).

In vitro 글리신 방출 시험

글리신이 봉입된 SLN과 글리신의 조분말 (bulk powder)로부터 글리신의 방출 양상 결과를 Figure 1에 나타내었다. 제조한 고형지질나노입자로부터 글리신의 방출속도는 글리신의 조분말로부터의 방출에 비해 다소 지연되었고 이것은 글리신을 감싸고 있는 지질이 수용성인 글리신의 방출을 억제했기 때문으로 생각된다.¹⁹⁾ 또한 본 실험 조건에서 모델 약물인 글리신의 용해성을 고려해 볼 때 충분히 sink condition이 유지되었다고 할 수 있다. 따라서 고형지질입자로부터 용출된 글리신이 투석막 내부에서 충분히 녹아 나올 수 있으며, 용해된 글리신은 곧바로 투석막을 통과하여 신속히 방출 매질로 확산되었다고 생각된다. 한편 1시간이 지난 시점부터 글리신의 방출속도가 느려지는데 이는 고형지질입자 내에 봉입된 약물의 방출이 거의 완료되어 투석막 내부와 외부 양쪽이 농도평형을 이루었기 때문으로 생각된다. 전체적으로 SLN 및 글리신의 조분말로부터 글리신의 방출양상이 큰 차이가 나지 않는 것은 수용성인 글리신이 충분히 SLN 내로 봉입되지 않았기 때문으로 사료되며 차후에 본 연구에서 제시된 봉입법을 개선할 필요가 있는 것으로 사료된다.

결 론

정맥주사를 위한 약물의 콜로이드성 운반체로서, 리포솜과 고분자성 나노입자 수송체의 장점만을 선택적으로 가지고 있는 SLN을 선택하여 수용성 모델 약물인 글리신을 봉입한 SLN의 현탁액을 제조하였다. 기존의 o/w 유제를 사용하는 가온용융유화법을 친수성 약물의 봉입에 유리하도록 w/o/w 유제를 사용하는 가온용융유화법으로 변형하여 SLN을 제조한 결과 친수성 약물의 봉입률 증대를 관찰 할 수 있었다. 특히, 디클로로메탄을 이용하여 지질을 녹여서 형성시킨 w/o/w 에멀션으로 SLN을 제조한 경우 그 봉입률이 지질을 용융시켜 제조한 경우보다 월등히 개선된 봉입률 값을 보였다. 하지만 유기용매의 사용이라는 단점을 가지고 있기 때문에 잔류하는 유기용매가 신속히 그리고 완전히 제거 되도록 제조방법을 개선할 필요성이 있다. 제조 된 고형지질 나노입자 현탁액의 분산상태도 나노입자로서 물리적 안정성을 확보하기에 충분한 결과를 보여 주었다.

문 헌

1) B. Tarr., T. Sambandan and S. Yalkowsky, A new parenteral emulsion for the administration of Taxol, *Pharm. Res.*, **4**, 162-165 (1987).
 2) P. Crosasso, M. Ceruti, P. Brusa, S. Arpicco, F. Dosio and

L. Cattel, Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes, *J. Controlled Rel.*, **63**, 19-30 (2000).
 3) H. Alkan-Onyuksel, S. Ramakrishnan, H. Chai and J. Pezzuto, A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of Taxol, *Pharm. Res.*, **11**, 206-212 (1994).
 4) U. Sharma, S. Balasubramanian and R. Straubinger, Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1223-1230 (1995).
 5) L. Mu and S. Feng, Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers, *J. Controlled Rel.*, **76**, 239-254 (2001).
 6) R. Cavalli, O. Caputo and M. Gasco, Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **10**, 305-309 (2000).
 7) J. S. Lucks, R. H. Müller and B. König, Solid lipid nanoparticle (SLN)-an alternative parenteral drug carrier system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **38**, 33S (1992).
 8) 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. Controlled Rel.*, **30**, 83-96 (1994).
 9) M. Garcia-Fuentes, D. Torres and M.J. Alonso, Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, **27**, 159-168 (2002).
 10) K. Westesen, H. Bunjes and M. H. J. Koch, Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential, *J. Controlled. Rel.*, **48**, 223-236 (1997).
 11) B. Sjoström and B. Bergenstahl, Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized O/W emulsions I. Model studies of the preparation of cholesteryl acetate, *Int. J. Pharm.*, **88**, 53-62 (1992).
 12) I. Hamrnikova, I. Miksik, M. Uhrova and Z. Deyl, Ultraviolet detector response of glycine and alanine homopeptide: Some specific features in capillary electrophoresis, *Analy. Chim. Acta*, **372**, 257-272 (1998).
 13) C. Freitas and R.H. Müller, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions, *Int. J. Pharm.*, **168**, 221-229 (1998).
 14) F.Q. Hu, Y. Hong and H. Yuan, Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide, *Int. J. Pharm.*, **273**, 29-35 (2004).
 15) J. Herrmann and R. Bodmeier, Somatostatin containing biodegradable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W-multiple emulsions, *Int. J. Pharm.*, **126**, 129-138 (1995).
 16) T. Freytag, A. Dashevsky, L. Tillman, G.E. Hardee and R.

- Bodmeier, Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres, *J. Controlled. Rel.*, **69**, 197-207 (2000).
- 17) C. Witschi and E. Doelker, Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing, *Int. J. Pharm.*, **51**, 327-341 (1998).
- 18) A. Lamprecht, N. Ubrich, P.M. Hombreo, C.-M. Lehr, M. Hoffman and P. Maincent, Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emission pressure homogenization technique, *Int. J. Pharm.*, **196**, 177-182 (2000).
- 19) R. H. Müller, A. Lippacher and S. Gohla, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) as a Carrier System for the Controlled Release of Drugs, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, **Chapter 19**, 377-391 (2000).