

황련유래 단백질이 함유된 나노리포솜의 제조 및 특성

오승룡 · 이상봉 · 조계민 · 최문재* · 진병석** · 한용문*** · 이영무**** · 심진기†

한국생산기술연구원, *(주)네비온, **동덕여자대학교 응용화학과, ***동덕여자대학교 약학대학, ****한양대학교 화학공학과
(2005년 9월 9일 접수, 2005년 12월 12일 채택)

Preparation and Characterization of Nano-sized Liposome Containing Proteins Derived from *Coptidis rhizoma*

Seng Ryong Oh, Sang Bong Lee, Kye Min Cho, Moon Jae Choi*, Byung Suk Jin**, Yong Moon Han***,
Young Moo Lee****, and Jin Kie Shim†

Korea Institute of Industrial Technology, Chongwang, Shihung, Gyeonggi-do 101-1BL, Korea

*Nabion Corporation, Sangdaewon-dong, Sungnam, Gyeonggi-do 462-120, Korea

**Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

***College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

****School of Chemical Engineering, College of Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received September 9, 2005; accepted December 12, 2005)

천연 항진균 물질인 황련(*Coptidis Rhizoma*)은 감염성 피부염을 유발시키는 주 원인균인 *Candida albicans*에 항세균 작용이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 황련유래 단백질(Proteins derived from *Coptidis Rhizoma*, CRP)의 유효 성분을 추출하여 안정성 도모 및 피부 세포 내에 안정하게 흡수시키는 물질 전달체로서 리포솜을 제조하였다. 황련유래 단백질을 함유한 리포솜 입자의 평균 크기는 187 nm, 표면전하는 3.337 mV이며 포집효율은 33%이었다. 온도, 저장시간에 따른 CRP의 방출 거동을 확인하였으며, 리포솜의 안정성을 증가시키기 위하여 리포솜을 poly(vinyl alcohol) (PVA)로 코팅하였다. 코팅된 리포솜은 코팅 안된 리포솜에 비하여 낮은 방출율을 나타내었다. 또한, 리포솜에 함유된 CRP의 항켄디다 효과는 50 °C 또는 자외선(UV)으로 24 h 처리한 후에도 지속됨을 확인하였다.

Coptidis Rhizoma, an antimicrobial agent from natural source, is known to have the antiviral effect on the *Candida albicans* that causes the infectious dermatitis. The valuable protein was extracted from the *Coptidis Rhizoma*. To prevent denaturalization from external stimulus and improve adsorption onto the skin, the nano-sized liposomes were prepared as a carrier. The CPR-containing liposomes showed an average diameter of 187 nm, surface charge of 3.337 mV and 33% encapsulation efficiency. The release behavior of CRP from the liposome was investigated with various temperature and releasing time. The PVA solution was coated on the surface of liposome to improve the stability. The coated liposome showed slow release behavior in comparison with the non-coated liposome. The CRP in the liposome maintained the effect on the *Candida albicans* after treating it at 50 and with ultraviolet for 24 h.

Keywords: *coptidis rhizoma*, *candida albicans*, liposome, surface coating

1. 서 론

감염성 피부염을 유발시키는 주 원인균인 *Candida albicans*는 다형태성(Polymorphic) 진균으로 병원성 진균 중에서 사람에게 많은 문제를 일으킨다[1]. 이와 같은 켈디다증(Candidiasis) 치료에는 화학요법제, 백신개발, 그리고 선천성 면역을 통한 antimicrobial peptides 개발이 있다[2,3].

생약인 황련은 이미 항켄디다증에 작용이 있다고 보고되어 있으며[4,5], 생약으로부터 추출물은 기존의 화학적 항생물질과는 그 성상

이 다르고 천연에서 생산되는 물질로 부작용이 없고 예방적 피부보호(prophylactic skin care) 효과라는 측면에서 중요하다 할 수 있다. 그러나, 추출물의 안정성, 피부 투과율 증대 및 약리작용을 제어하기 위해서는 적당한 리포솜의 개발이 필요하다. 특히, 운반물질이 단백질 성분의 경우 변성방지를 통한 안정성의 확보를 위해 적당한 리포솜의 개발이 더욱 절실히 요구된다. 리포솜 내에 수용성 또는 지용성 약물을 봉입시켜 생체에 적용할 수 있는 약물전달시스템을 개발하기 위한 노력은 그 동안 끊임없었으며, 특히 근래에는 효소, 항암제, 항염증스테로이드, 펩타이드 약물의 전달시스템으로서 리포솜을 응용한 예가 광범위하게 보고되고 있다[5,8].

† 주 저자(e-mail: jkshim@kitech.re.kr)

기 발표된 논문[4-6]에서는 황련단백질에 포함된 여러 활성성분 중 알칼로이드 성분인 베르베린의 항균효과에 대해 연구하였다. 본 연구자들은 기존연구에서 황련에서 알칼로이드 성분이 아닌 단백질 활성 성분을 추출하여 항균탄다증 효과를 규명하였다[7]. 그러나, 단백질 활성성분의 경우 열에 대한 안정성이 낮아 리포솜과 같은 베시클형태로의 응용이 요구되고 있으며, 이러한 황련유래 단백질의 리포솜으로의 포집 및 방출거동에 대한 연구가 필요하다.

리포솜이 가지는 장점을 열거하면 인지질이라는 생체 구성성분으로 이루어져 생체 내에서 분해가 가능하고 독성이 없고 수용성 또는 지용성 성분 모두를 리포솜 내로 포집할 수 있다. 또한 리포솜의 제조방법, 표면전하, 지질 조성 등에 따라 크기 및 형태 특성 등을 조사하여 다양하게 만들 수 있고 포집물질과 리포솜 사이에 화학적 결합 없이 쉽게 제조가 가능하다. 포집물질이 약물일 경우 특정 조직에 표적이 가능하여 약물의 치료 효과를 높이고 약물을 거의 모든 경로(경구, 피하, 정맥, 근육 주사 또는 복강 주사)로 투여할 수 있는 등의 많은 장점이 있다[9,10]. 또한, 리포솜을 화장품에 이용할 경우에는 생체막을 비롯하여 피부의 주요 구성성분인 인지질이 피부세포와 상호 작용하여 세포막의 유동성을 증가시키면서 피부의 신진대사를 보다 원활히 하여 생리활성 성분의 피부세포내의 흡수를 촉진시키는 작용을 한다[11-14].

본 실험은 황련으로부터 단백질을 추출하여 추출된 황련유래 단백질(*Coptidis Rhizoma* protein, CRP)의 정성 및 정량분석을 수행하였다. 또한, 황련유래 단백질의 유효성분 안정성을 위하여 수용액상의 내부물질 감싸는 나노리포솜을 제조하였다[11,12]. 제조된 리포솜의 입자크기 및 표면전하를 살펴보고 포집율 및 열적 성질과 단백질 방출거동에 대해 조사하였다[15-19]. 리포솜 방출거동은 리포솜 내부에 황련단백질을 포집시킨 후 여러 조건에 따른 방출량을 측정함으로써 판단하였다. 리포솜 막의 안정성을 향상시키기 위해 집중제로 화장품에 흔히 쓰이는 생체 친화적인 수용성 고분자 poly(vinyl alcohol) (PVA)를 이용하여 리포솜 막 코팅을 시도하였다. 막 코팅 효과를 살펴보기 위해 온도 조건을 달리한 황련유래 단백질 방출량을 비교함으로써 막 코팅이 리포솜의 안정성 향상에 얼마큼 기여할 수 있는지 실험하였다[20-24].

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

보건복지부 허가 규격품(원료의약품 제조허가 대구 9호)으로 대한약전 및 생약 규격집에 준하는 양질의 황련(중국산 일황련)을 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 레시틴 성분으로 hydrogenated phosphatidyl choline (HPC)을 Lucas Meyer (PC 95%, Emulmetik 950, London)에서 구입하였고, 코팅제로는 Sigma에서 판매하는 PVA (Mw 85000~146000)를 사용하였다. 용매로 에탄올(99%, Daejung co. Ltd, Korea), 메탄올(99%, Duchsan co. Ltd, Korea) 그리고 계면활성제로 Triton[®] X-100 (Sigma Chemical co. Ltd, USA)를 구입하여 사용하였고, bovine serum albumin (BSA, 99%, USA)은 Pierce사에서 구매하여 사용하였다. 그 외의 일반시약은 특급 및 1급 시약을 정제 없이 그대로 사용하였다.

실험에서 황련 단백질의 항진균 효과를 알아보기 위하여 *Candida albicans*를 균주로 선택하였으며, *Candida albicans*는 GYEP (Glucose, Yeast extract and pepton) 액체배지에서 37 °C에서 24 h씩 3회 계대 배양한 culture를 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 황련단백질 추출 및 단백질 확인

황련분말(10 g)을 80% 메탄올 수용액(40 mL)에 넣고 상온에서 3일간 추출하였다. 추출물을 filter paper (#2, 110 mm, Whatman, USA)로 여과한 후 여액을 rotary vacuum evaporator (N-1000, Eyela co. Ltd, Japan)을 이용하여 40 °C에서 감압증류 하여 메탄올을 제거하였다. 농축액을 dialysis membrane (MWCO 3.5, 8 KDa, Spectra/Por, USA)에 넣고 4 °C에서 5일 투석 후 동결건조 하여 얻었다.

황련에서 추출한 단백질의 확인은 bichinchoninic acid assay (BCA)방법을 이용하였다[25]. 즉, 시료를 well에 넣고 BCA시약을 첨가한 후 정색반응을 ELISA Reader (562 nm, Bio-Tek Instrument, USA)로 측정하였다. Standard curve는 BSA를 사용하여 단백질 함량을 정량하였다. CRP의 분자량을 확인하기 위해 전기영동장치(Hoffer 602, Amershambiosciences co. Ltd, Netherlands)를 사용하였다. 전기영동 조건은 15% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel-electrophoresis (PAGE)를 사용하였으며 형성된 bands는 Molecular marker (Coomassie brilliant blue, Bio-rad, USA)와 비교하여 분자량을 측정하였다.

2.2.2. 나노리포솜 제조

레시틴(1 g)과 에탄올(1 mL)을 플라스크에 넣고 70 °C로 유지되는 항온조에서 용융시켜 지질 용액을 만든 후 여기에 황련유래 추출물 1 mg을 넣어 3 min 동안 교반시키면 수화 액정(hydrated liquid crystal)이 형성된다. PBS용액 60 mL를 첨가한 수화 액정은 나노 크기의 리포솜 입자로 분산된다. 플라스크를 다시 얼음물에 넣고 약 30 min 교반시키면서 냉각시킨다. 리포솜 현탁액을 3500 × g로 20 min 동안 원심 분리 후(MF 550, Haniil co. Ltd, Korea) 상층액을 제거하면 최종적으로 나노리포솜 입자가 얻어졌다[11,12].

리포솜의 막안정성을 증대하기 위하여 PVA코팅을 시행하였다. 1 (wt/wt)% PVA 수용액을 상기 제조한 리포솜과 동일 부피로 섞은 후 상온에서 2 h 동안 교반시킨다. 코팅된 리포솜 현탁액을 3500 × g로 20 min 동안 원심 분리한 후 상층액을 제거하면 PVA 코팅된 리포솜이 얻어졌다[12-24].

2.2.3. 입도분포 및 표면전하 측정

제조된 리포솜의 입자크기는 laser particle analyzer (Nano-ZS, Malvern co. Ltd, Germany)를 이용하여 phosphate buffered saline (PBS) 용액에서 나노입자 크기와 분포도를 측정하였고, 표면전하는 zeta potential meter (Nano-ZS, Malvern co. Ltd, Germany)를 사용하여 측정하였다[24].

2.2.4. 포집효율 및 방출을 측정

리포솜 내에 포집된 CRP의 양을 측정하기 위해서 3% Triton[®] X-100를 이용하여 리포솜을 파괴한 후 포집되었던 CRP의 양을 분광광도계를 사용하여 BCA법(562 nm)으로 포집효율을 측정하였다[26, 27].

포집효율은 아래와 같은 식으로 계산되었다.

$$\text{포집율(\%)} = \frac{\text{리포솜에 포집된 CRP 양}}{\text{초기에 넣어준 CRP 양}} \times 100(\%)$$

시간, 온도 및 코팅에 따른 CRP의 방출을 실험을 실시하였다. 리

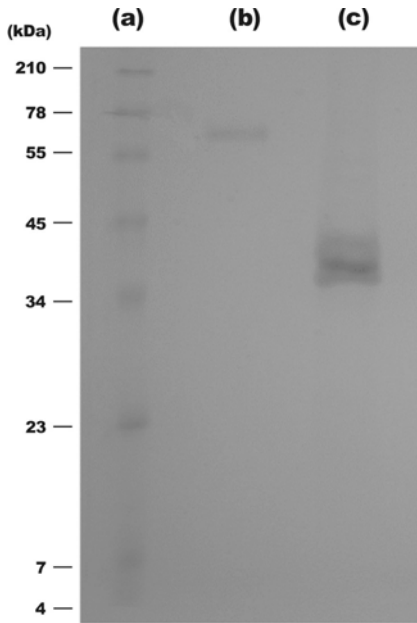


Figure 1. Electrophoresis of the CRP in 15% SDS-PAGE. (Molecular marker, (b) BSA and (c) CRP.

리포솜 입자를 일정량의 PBS용액에 희석시켜 여러 개의 시험관에 담아 밀폐시킨 후 25 ℃와 37 ℃에 저장 보관하면서 일정 시간 후에 3% Triton[®] X-100를 이용하여[28] 리포솜을 파괴한 후 BCA방법으로 방출율을 측정하였다.

각 조건에서의 방출율은 아래의 식에 의해 결정하였다.

$$\text{방출율(\%)} = \frac{\text{일정시간 후 방출 되어 나온 CRP의 양}}{\text{초기 리포솜 안의 CRP양}} \times 100(\%)$$

2.2.5. 안정성 측정

리포솜에 포집된 CRP의 안정성 검사로 열 또는 자외선으로 처리한 후 이 CRP의 항겐디다 효과의 감소여부를 검색하였다.

열 대한 안정성 검사 방법으로 CRP를 microcentrifuge tube (1.5 mL)에 넣고 PBS에 용해시킨 다음 50 ℃로 고정된 항온조에서 가열하여 측정하였다. 자외선에 대한 안정성 검사 방법으로는 CRP를 ultra-violet (UV) lamp 하에서 24 h 조사한 후 그 효과를 agar diffusion susceptibility 방법으로 측정하였다[29]. UV Lamp는 fluorescent-typed lamp (15 Watts; 파장 312 nm)로 시료와 UV Lamp와의 거리는 20 cm였다.

CRP가 포집된 리포솜을 호모게나이저(IKA-WERKE, GMBH Co. Ltd, Germany)로 10000 rpm에서 1 min 동안 파괴한 후 PBS에 분산시켜 사용하였다. *Candida albicans*로 접종된 고형배지(Mycobiotic agar; Difco, USA)에 wells을 만들어 각 80 μL씩 넣고 37 ℃에서 배양하여 well 주변의 *Candida albicans* 성장유무를 검색한다. 이때, 균의 성장이 억제된 부위(inhibitory zone)의 직경을 측정하여 그 활성 정도를 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황련 단백질의 확인

황련에서 추출한 단백질을 확인을 위하여 BCA법 및 전기영동법

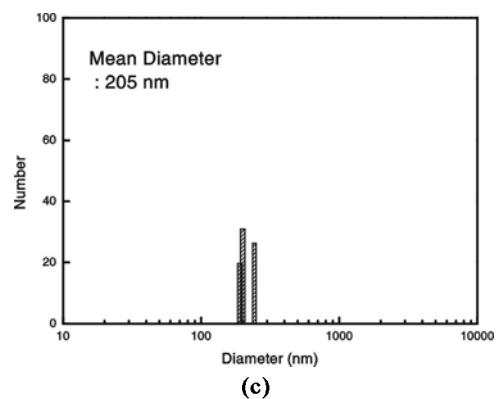
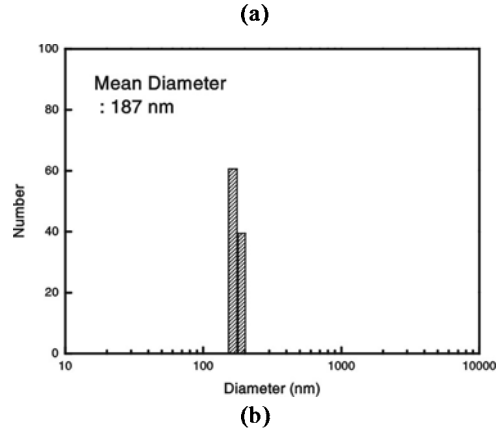
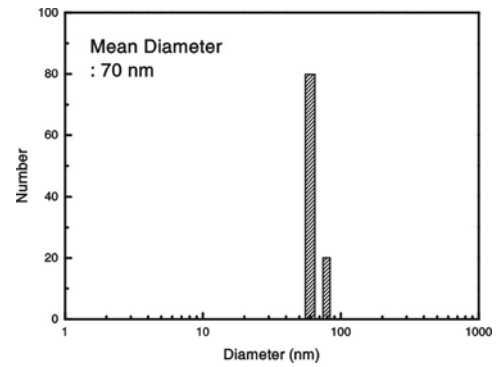


Figure 2. Particle size and size distribution of liposomes using laser scattering. (a) Liposome, (b) CRP-encapsulating liposome and (c) PVA-coated liposome containing CRP in the core.

으로 정성 및 정량 분석하였다. 추출물 중 단백질 성분을 BCA로 정량 분석한 결과 추출물 중에 차지하는 단백질의 비율은 19%였다.

CRP의 분자량은 15% SDS-PAGE에서 전기영동을 통해 확인하였다. standard marker와 비교하였을 때 대략 34~45 kDa 사이에 존재함을 알 수 있었다(Figure 1).

3.2. 리포솜의 입자 분포 및 표면전하

Figure 2는 CRP가 포집된 리포솜 및 PVA 코팅에 따른 리포솜의 입자분포도를 나타내고 있다. 순수한 리포솜의 평균 입자 크기는 70 ± 10 nm였고, 좁은 입자크기 분포를 나타내고 있었다. CRP가 함유된 나노리포솜의 입자크기는, 코팅이 안된 리포솜의 경우 187 ± 13 nm, PVA 코팅된 리포솜의 경우 205 ± 15 nm의 입자크기를 나타내었다. 즉, CRP가 함유되었을 경우 입자 크기가 원래 리포솜에 비해

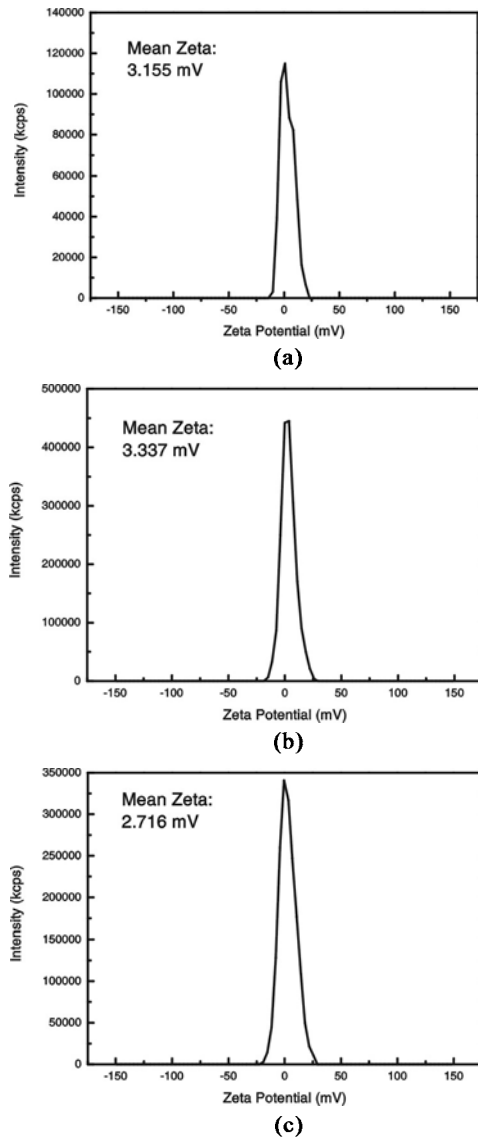


Figure 3. Surface charge on the surface of liposomes. (a) Liposome (b) CRP-encapsulating liposome and (c) PVA-coated liposome containing CRP in the core.

120 nm 정도 커짐을 알 수 있었고, PVA 코팅이 되었을 경우 코팅이 안된 나노리포솜의 입자크기에 비교하여 30 nm 정도로 원래 입자의 크기에 비해 증가함을 확인하였다.

리포솜의 입자크기에 있어서, 본 연구에서와 같이 수화액정의 형성 후 분사매를 통해 제조된 리포솜의 입자크기는 film hydration 방법[20-22]을 통해서 제조된 리포솜의 평균 입자크기 100~120 nm보다 다소 작음을 알 수 있었다. 또한, 기존문헌에서 리포솜을 PVA [20], 키토산[23]으로 코팅하였을 경우 입자크기 증가가 각각 30 nm와 50 nm씩 증가하여 본 제조방법과 비슷한 증가량을 나타내었다. 이렇게 리포솜의 입자크기가 증가한 이유는 PVA를 코팅함으로써 리포솜 표면에 새로운 layer를 형성하기 때문이다.

Figure 3은 순수한 리포솜과 CRP 함유 리포솜 및 PVA 코팅된 리포솜의 표면전하를 측정한 결과를 나타내었다. 표면전하는 입자상호간의 정전기적 반발력에 의하여 입자들이 상호 응집되지 못하고 안정화되는 주요 인자이다[11]. 리포솜의 표면전하는 3.155 mV의 전하

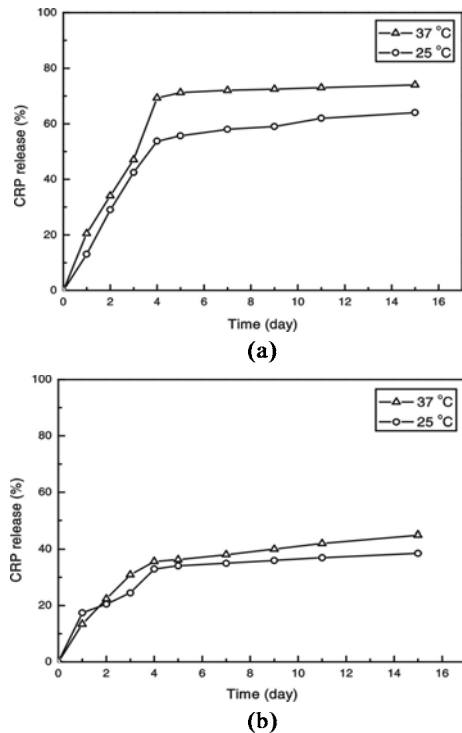


Figure 4. Release kinetics of CRP from (a) non-coated liposome and (b) PVA-coated liposome in PBS solution.

량을 가지고 있음을 확인하였다. CRP 함유된 나노리포솜의 표면전하를 측정한 결과 코팅이 안된 리포솜의 경우 3.337 mV, PVA 코팅된 리포솜의 경우 2.716 mV로 초기 코팅 안된 리포솜에 비해 감소하였으나, CRP가 함유되었을 경우 평균 표면전하가 원래 리포솜에 비해 상승함을 알 수 있다. 이는 리포솜에 함유된 추출물 성분 중 CRP 뿐만 아니라 다른 양이온성 성분들의 발현 결과로 예측되며, 리포솜의 PVA 코팅을 통해 순수 리포솜보다 표면전하가 음전하로 됨을 알 수 있었다.

3.3. CRP의 포집효율 및 방출거동

BCA법을 이용하여 리포솜 제조시의 황련유래 단백질의 포집효율을 측정하였다. HPC로 구성된 리포솜 제조시 황련 추출물 1 mg (황련유래 단백질: 85.4 µg)을 투입하였을 때 약 33%의 황련유래 단백질을 포집하고 있는 것으로 나타내었다.

우리의 기존 연구의 결과[9]에 따르면, 저분자 물질인 칼세인을 모델약물로 사용하였을 경우 50~60% 정도의 포집율을 나타내었다. 그러나, CRP의 포집율은 칼세인에 비해 상대적으로 낮게 나옴을 알 수 있었다. 이는 CRP가 34~45 kDa의 분자량을 가지는 단백질이기 때문이다. 즉, HPC의 리포솜 형성시에 CRP의 상대적으로 높은 분자량으로 인하여 리포솜 내부로의 함입이 상대적으로 용이하지 못하기 때문에 낮은 포집율을 나타내는 것으로 추측된다.

리포솜 막의 성질을 조사하기 위하여 온도변화 및 코팅에 따른 CRP의 방출속도를 측정하였으며 이때, 막 내부로부터 방출되어 나온 CRP의 양은 BCA법으로 정량화하여 분광광도계로 측정하였다. Figure 4(a)는 CRP가 함유된 리포솜의 방출거동을 나타내었다. 25 °C, 37 °C 조건 모두 5일 안에 각각 50%, 70%의 CRP를 방출하였으며 37 °C에서 상대적으로 높은 방출율을 보인 것은 온도상승에 따른 CRP의 확산속도의 증가 및 리포솜 막의 안정성 저하에 기인한 것이다.

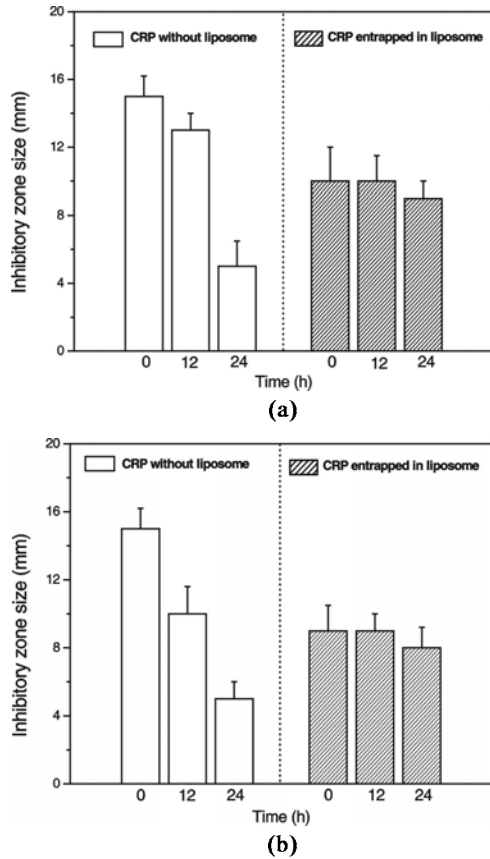


Figure 5. Inhibitory zone size after treating at (a) 50 °C and with (b) UV irradiation.

PVA 코팅된 리포솜의 CRP 방출율은 50% 이하로, 코팅되지 않은 리포솜의 방출율보다는 현저하게 낮아진 것을 볼 수가 있다(Figure 4(b)). 이는 PVA를 코팅함으로써 리포솜 막의 파괴를 막아줌으로써 리포솜의 안정성을 향상시켜주고, 최종 바깥의 새로운 barrier를 형성시켜 CRP의 방출을 어렵게 만들어 주기 때문이다.

3.4. 리포솜 함유 CRP 안정성 측정

Figure 5는 시간에 따른 CRP의 열, UV 안정성을 Agar diffusion susceptibility 방법을 통하여 측정하였다[29]. CRP를 50 °C에서 열처리할 경우 초기에는 *Candida albicans*의 성장억제의 크기는 대략 15 mm로 나타났으나 12, 24 h에 각각 13, 5 mm로 급격하게 감소하였다. 즉, 시간이 경과됨에 따라 단백질의 변성이 생겨 효능이 급감함을 알 수 있었다. 리포솜에 함유된 CRP의 경우에는 24 h 후에도 그 효능을 유지하였다(Figure 5(a)).

Figure 5(b)는 CRP를 UV lamp 하에서 다양한 시간 동안 조사한 후 그 효과를 나타내었다. CRP를 UV처리할 경우 초기에 *Candida albicans* 성장억제의 크기는 24 h 동안 급격하게 감소함을 알 수 있었다. 그러나, 리포솜에 함유된 CRP의 경우에는 24 h 후에도 초기 효능을 유지하였다.

열, UV안정성 실험 결과, CRP가 리포솜 내에서 변성 없이 안정성을 유지함을 알 수 있는 반면, 리포솜에 함유되지 않은 CRP는 일반 단백질과 같이 변성되어 효능이 저하됨을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 항원에서 유용한 단백질을 추출하여 그의 안정성을 높이기 위하여 리포솜을 제조하였다. 추출물중 단백질 함량이 19%였으며, 분자량은 34~45 kDa 사이에 있음을 알 수가 있었다. 리포솜의 입자 크기는 70 ± 10 nm였으며, CRP이 포집된 리포솜 및 PVA 코팅에 따른 리포솜의 평균 입자 크기는 각각 187 nm과 205 nm였다. 또한 리포솜의 표면전하는 3.155 mV의 전하량을 가지는 반면, CRP 함유 나노리포솜과 PVA코팅 리포솜의 경우 각각 3.337 mV, 2.716 mV임을 알 수 있었다. 리포솜에 포집된 CRP의 포집율은 약 33%이며, PVA 코팅된 리포솜의 막 내부로부터 방출되어 나온 항원 유래 단백질의 방출속도가 코팅 안된 리포솜의 방출속도보다 늦었다. 순수한 CRP을 50 °C 및 자외선 처리할 경우 그 항진균 효과가 급격히 감소하나 리포솜에 함유된 CRP의 경우에는 24 h 후에도 그 효능이 유지되는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구논문은 산업자원부 중기거점기술개발사업에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. Weinberger, L. Leibovici, S. Perez, Z. Samra, I. Ostfeld, I. Levi, E. Bash, D. Turner, A. Goldschmied-Reouven, G. Regev-Yochay, S. D. Pitlik, and N. Keller, *J. Hosp. Infect.*, in press.
2. M. Viejo-Diaz, M. T. Andres, and J. F. Fierro, *FEMS Immunology and Medi. Microbiology*, **42**, 181 (2004).
3. I. Mohammedi, A. Thiebaut, M. A. Piens, L. Argaud, O. Martin, and D. Robert, *J. Infect.*, **1** (2004).
4. S. G. Franzblau and C. Cross, *J. Ethnopharmacology*, **15**, 279 (1986).
5. N. Miura, M. Yamamoto, T. Ueki, T. Kitani, K. Fukuda, and Y. Komatsu, *Biochem. Pharmacology*, **53**, 1315 (1997).
6. M. L. Freile, F. Giannini, G. Pucci, A. sturniolo, L. Rodero, O. Pucci, V. Balzaret, and R. C. Enriz, *Fitoterapia*, **74**, 702, (2003).
7. H. K. Kim, J. H. Lee, J. K. Shim, and Y. M. Han, *J. Pharm. Soc. Korea*, **49**, 323, (2005).
8. S. S. Feng and G. F. Huang, *J. Control. Rel.*, **71**, 53 (2001).
9. B. S. Jin, Y. M. Han, K. H. Lee, and M. J. Choi, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **15**, 205 (2004).
10. S. S. Feng, G. Ruan, and Q. T. Li, *Biomaterials*, **25**, 5181 (2004).
11. E. Touitou, N. Dayan, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, *J. Control. Rel.*, **65**, 403 (2000).
12. B. Godin and E. Touitou, *J. Control. Rel.*, **94**, 365 (2004).
13. B. W. Barry, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 101 (2001).
14. J. A. Bouwstra and P. L. Honeywell-Nguyen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, S41 (2002).
15. K. Iga, Y. Ogawa, and H. Toguchi, *Pharm. Res.*, **9**, 658 (1992).
16. A. Ono, M. Yamaguchi, I. Horikoshi, T. Shintani, and M. Ueno, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 166 (1994).
17. K. Kono, H. Hayashi, and T. Takagishi, *J. Control. Rel.*, **30**,

- 69 (1994).
18. K. Kono, A. Henmi, H. Yamashita, H. Hayashi, and T. Takagishi, *J. Control. Rel.*, **59**, 63 (1999).
 19. K. Kono, K. Yoshino, and T. Takagishi, *J. Control. Rel.*, **80**, 32 (2002).
 20. H. Takeuchi, H. Kijima, T. Toyoda, H. Yamamoto, T. Hino, and Y. Kawashima, *Eur. J. Pharma. Biopharm.*, **48**, 123 (1999).
 21. H. Takeuchi, H. Kojima, H. Yamamoto, and Y. Kawashima, *J. Control. Rel.*, **68**, 195 (2000).
 22. H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Toyoda, and H. Toyobuku, *Int. J. Pharm.*, **164**, 103 (1998).
 23. J. Guo, Q. Ping, G. Jiang, L. Huang, and Y. Tong, *Int. J. Pharm.*, **260**, 167 (2003).
 24. E. Ruel-Gariepy, G. Leclair, P. Hildgen, A. Gupta, and J. C. Leroux, *J. Control. Rel.*, **82**, 373 (2002).
 25. R. C. Krieg, Y. Dong, K. Schwamborn, and R. Knuechel, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **65**, 13 (2005).
 26. A. S. Determan, Brian G. Trewyn, Victor S. Y. Lin, and Marit Nilsen-Hamilton, Balaji Narasimhan, *J. Control. Rel.*, **100**, 97 (2004).
 27. C. Remun an-Lopez, M. L. Lorenzo-Lamosa, J. L. Vila-Jato and M. J. Alonso, *Eur. J. Pharm. Biopharma.*, **45**, 49 (1998).
 28. Ozlem Ogun Cirli and Vasif Hasirci, *J. Control. Rel.*, **96**, 85 (2004).
 29. B. N. Joshi, M. N. Sainani, K. B. Bastawade, V. S. Gupta, and P. K. Ranjekar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246** 382 (1998).