

파클리탁셀을 함유한 인지질 나노 에멀전 제조

서동환* · 한희동 · 지상철* · 신병철†

한국화학연구원 나노생체재료연구팀

*성균관대학교 약학대학

(2004년 3월 2일 접수; 2004년 3월 24일 승인)

Preparation of Phospholipid Nanoemulsions Loaded with Paclitaxel

Dong Hoan Seo*, Hee Dong Han, Sang Cheol Chi* and Byung Cheol Shin†

Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107 Yuseong, Daejeon 305-606, Korea

*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-476, Korea

(Received March 2, 2004; Accepted March 24, 2004)

ABSTRACT—Paclitaxel is an effective antineoplastic drug for various cancers especially ovarian and breast cancer. This study is to find the optimum condition for the preparation of nanoemulsions and to improve the stability and loading amount of paclitaxel in nanoemulsions. Nanoemulsions were prepared by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. It was composed of phosphatidylcholine:cholesterol:1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N-[Methoxy (Polyethylene glycol)-2000]:paclitaxel at a weight ratio of 5:3:1:1 and the Tween 80 as a surfactant. The particle size and the shape of nanoemulsions were measured by particle analyzer and SEM, respectively. The loading amount of paclitaxel in nanoemulsion was measured by UV-visible spectroscopy at 227 nm. The particle sizes were 80~120 nm and the loading efficiency of paclitaxel was 8~39%. The optimum conditions for the preparation of nanoemulsions were 8% w/w phospholipid, 16% w/v Tween 80 and 2% w/w paclitaxel, respectively.

Key words—Paclitaxel, Nanoemulsions, Phospholipid, Tween 80

파클리탁셀(paclitaxel, $C_{47}H_{51}NO_{14}$)은 주목 나무의 껍질로부터 추출되어진 디테르페노이드계 천연항암약물로서 여러 암 중에서도 난소암과 유방암에 대하여 가장 우수한 효능이 있으며 물에 대한 용해도가 0.5 mg/l 이하인 난용성 약물로 보고되고 있다.¹⁾ 또한 일반적으로 임상 투여되고 있는 파클리탁셀은 크레모포어와 무수알콜이 1:1로 가용화된 혼합용액으로써 사용되어지고 있으며, 크레모포어의 과민반응, 신독성 및 신경독성 등의 심각한 부작용으로 인하여 임상적 사용이 제한적이다.¹⁾ 따라서 크레모포어를 배제한 주사제형의 개발이 시급한 실정이며, 주사제형으로서 리포솜,^{2,4)} 마이셀,⁵⁾ o/w 에멀전^{6,7)} 및 사이클로덱스트린 복합체⁸⁾ 등의 약물수송체 내부에 파클리탁셀을 로딩시켜 주사제로 개발하고자하는 연구가 활발히 진행 중이다. 특히 o/w 에멀전 제조방법을 이용한 파클리탁셀 수송체에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있다.^{1,9,10)}

o/w 에멀전 제조법으로는 유화제의 계면 화학적 성질을 이용하는 방법과 호모믹서, 콜로이드밀 등에 의한 기계적인

힘을 빌어 유화하는 물리적인 방법이 있으며, 이 두 가지 방법을 병용하는 경우도 있다.

본 실험에서는 호모믹서와 초음파발생기의 기계적인 힘에 의해 o/w 에멀전을 제조할 수 있는 자발적인 유화 용매확산법의 기계적 교반 방법을 응용하여 10~100 nm 크기의 나노 에멀전을 제조하고자 하였다.¹¹⁾ 나노 에멀전 입자 제조를 위한 인지질로는 대두유에서 추출한 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC)을 사용하였고 유화제로는 비이온성인 Tween 80을 사용하였으며 항암약물로는 파클리탁셀을 사용하였다. 그리고 제조되어진 나노 에멀전의 입자 크기, 형태, 파클리탁셀의 봉입률 및 나노 에멀전의 안정성을 측정하여 입자의 크기가 ~100 nm인 조건과 파클리탁셀의 봉입률을 최대로 향상시킬 수 있는 제조 조건을 관찰하고자 하였다.

실험 방법

시약

나노 에멀전을 제조하기 위한 PC와 입자의 안정성을 향상시키기 위하여 사용된 만니톨, 수크로오스, 말토스 그리고 항암약물인 파클리탁셀은 Sigma-Aldrich 사(Louis, MO, 미

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)860-7223, E-mail : beshin@pado.kriect.re.kr

국)에서 구입하여 사용하였고, 에멀전의 안정성을 향상시키기 위해 사용된 1,2-디스테로일-sn-글리세롤-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] (mPEG-2000)과 콜레스테롤(cholesterol, CHOL)은 Avanti Polar Lipids 사 (Alabaster, AL, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 유화제로는 비이온성인 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트(Tween 80)를 Yakuri Pure Chemical 사(Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였고 메탄올은 일반적인 시약 등급을 사용하였다.

인지질 나노 에멀전의 제조

파클리탁셀을 함유한 인지질 나노 에멀전은 자발적 유화 확산법을 응용하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다.¹¹⁾ 유화제인 Tween 80을 증류수로 용해하여 4% w/v 수용액으로 제조하였고, 제조된 Tween 80 수용액 4 ml에 입자의 안정화제로서 0.01 g의 말토스를 첨가하여 사용하였다. 인지질 용액은 PC, mPEG-2000, CHOL 그리고 파클리탁셀을 5:3:1:1 비율로 50 mg을 혼합한 후 메탄올 2 ml에 용해시켰다. 4 ml의 Tween 80 수용액을 교반해 주면서 2 ml의 인지질 용액을 1 ml/min의 속도로 서서히 첨가한 후, 이 혼합 용액을 초음파 발생기(Ultrasonicator, model 500, Fisher Scientific, Hampton, Kentucky, 미국)의 팁 부분이 1/2정도 잠기게 고정된 다음 10°C 이하를 유지하면서 2분간 초음파를 5회 실시하였다. 에멀전 분산 용액은 일정한 크기의 입자를 얻기 위하여 가압 압출기(Northern Lipids 사, Vancouver, 캐나다)를 사용하여 100 nm 폴리카보네이트 막(Millipore 사, County Cork, 아일랜드)을 통과시킨 후 획득하였고, 최종적인 에멀전 입자는 2°C에서 72시간 동안 막 투석(MWCO 3,500, Viskase 사, Chicago, Illinois, 미국)을 실시하여 메탄올과 Tween 80을 제거한 후 획득하였다.

에멀전 입자의 크기 측정

에멀전 입자의 크기는 광산란 장치(Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, OTUSKA Electronics 사, Osaka, 일본)를 사용하여 에멀전 분산용액 1 ml를 증류수로 2배 희석하여 입자의 크기를 관찰하였다.

에멀전 입자 형태 관찰

에멀전 입자의 형태는 분산용액 6 ml를 15,000 rpm으로 30분간 원심분리(centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, 독일)를 5회 실시하여 상등액을 제거하고 농축된 입자를 0.5 ml의 증류수로 재 분산 후 2°C에서 건조하여 주사 전자 현미경(6700F Cold/Fe-SEM, JEOL 사, Tokyo, 일본)을 이용하여 관찰하였다.

에멀전 입자에 함유된 파클리탁셀의 봉입률 측정

에멀전 입자에 함유된 파클리탁셀의 봉입률은 UV 분광계(UV mini 1240, Shimadzu, Kyoto, 일본)를 이용하여 측정하였다. 파클리탁셀을 표준물질로 하고 100% 메탄올 용액을 사용하여 검량선을 작성한 후, 파클리탁셀과 Tween 80 수용액의 농도 변화에 따라 제조되어진 에멀전 용액 1 ml를 취해서 파클리탁셀의 최대 흡수 파장인 227 nm에서 측정하였으며 봉입률은 식 (1)에 의해 계산하였다.^{12,13)}

$$\text{봉입률 (\%)} = \frac{\text{인지질 나노 에멀전에 포함된 파클리탁셀의 양}}{\text{초기에 사용된 파클리탁셀의 양}} \times 100(\%)$$

에멀전 입자의 안정성 측정

나노 에멀전 입자의 안정성은 8% w/w의 인지질과 4% w/v의 Tween 80 수용액의 조건으로 에멀전을 제조하여 30 일 동안 4.0, 25.0 및 37.5°C에서 입자의 크기변화를 측정하여 평가하였고, 동결건조 전, 후의 입자의 크기를 측정하여 동결건조에 따른 입자의 안정성을 평가하였다.

결과 및 고찰

에멀전 입자의 크기 측정

Figure 1에는 인지질의 농도변화에 따른 에멀전 입자의 크기변화를 나타낸 것이다. 유화제로 쓰인 4% w/v Tween 80 수용액을 첨가한 경우 인지질의 농도가 2% w/w 일 때 평균크기는 121.5 nm이었으며, 8% w/w인 경우 입자의 평균크

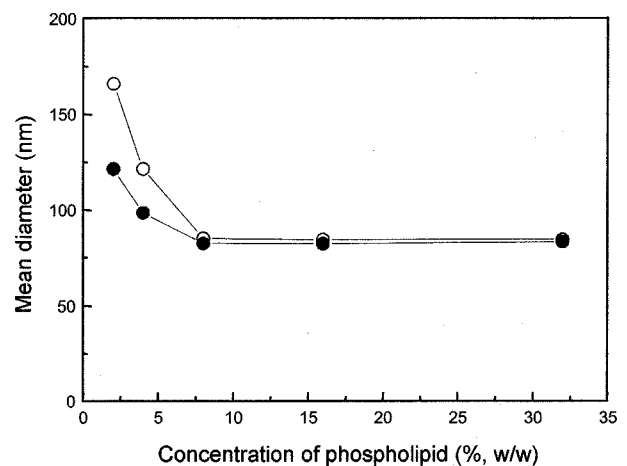


Figure 1—Mean particle size of nanoemulsion with a variation of concentration of phospholipid. The nanoemulsion was composed of mPEG-2000:CHOL:paclitaxel at a weight ratio of 3:1:1 and 4% w/v Tween 80 as a surfactant. The data is shown as mean \pm S.D.(n=3). (○- without surfactant, ●- with surfactant).

기가 감소하여 82.3 nm이었다. 인지질의 농도가 8% w/w 이상부터는 평균입자의 크기가 82.2 nm 정도로 일정하게 나타났다. 또한 4% w/v Tween 80 수용액을 첨가하지 않은 경우 인지질의 농도가 2% w/w일 때 평균입자의 크기는 168.5 nm이었으며, 8% w/w의 농도일 때는 크기가 급격히 감소하여 85.0 nm를 나타내었다. 결과적으로 4% w/v Tween 80 수용액을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 인지질의 농도가 8% w/w 이상부터는 입자의 크기가 82~85 nm로 일정하게 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다. 입자의 크기가 감소하는 이유는 인지질의 농도가 증가 할수록 미셀 구조를 형성하여 입자가 안정화되고 입자간 응집이나 유착 등을 억제하는 작용이 발생했기 때문이다.^{14,15)} 따라서 4% w/v 농도의 Tween 80 수용액과 8% w/w의 인지질을 이용하여 에멀전을 제조하였을 경우 입자의 크기가 82 nm로 제조됨을 확인하였다.

Figure 2에는 인지질과 Tween 80의 무게 비율에 따른 에멀전 입자의 크기 변화를 나타내었다. 인지질과 Tween 80의 무게 비율이 10/90% w/w일 경우 평균입자의 크기가 약 217 nm이었으며, 50/50% w/w의 경우 약 90 nm의 평균입자 크기를 나타내었다. 또한 인지질과 Tween 80의 양이 동일해질수록 입자의 크기가 작아짐을 관찰 할 수 있었다. 이것은 인지질의 양이 증가 할수록 안정한 입자를 형성하였고¹⁶⁻¹⁸⁾ Tween 80에 의해 입자의 표면장력이 감소되어 입자간의 응집이나 유착 등을 억제하는 작용이 발생했기 때문에 입자의 크기가 감소하게 되었다.^{14,15)} 또한 인지질과 Tween 80을 50/50% w/w으로 첨가하여 에멀전을 제조하였을 때 입자의 크기를 감소시키는 최적의 효과를 나타낸다고 보고된바 있

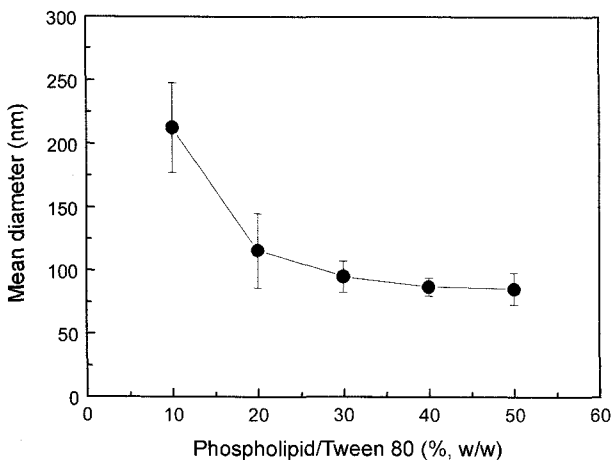


Figure 2—Mean particle size of nanoemulsion on the mixed ratio of phospholipid and Tween 80. The nanoemulsion was composed of mPEG-2000:CHOL:paclitaxel at a weight ratio of 3:1:1. The data is shown as mean ± S.D.(n=3).

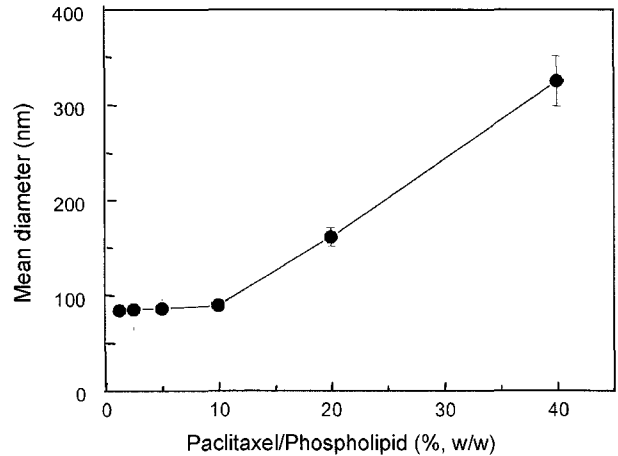


Figure 3—Effect of the mixed ratio of paclitaxel and phospholipid on the mean size of nanoemulsion. The nanoemulsion was composed of mPEG-2000:CHOL at a weight ratio of 3:1 and 4% w/v Tween 80 as a surfactant. The data is shown as mean ± S.D.(n=3).

다.¹⁶⁾ 결과적으로 인지질과 Tween 80의 무게 비율이 50/50% w/w으로 에멀전을 제조하였을 때 평균입자의 크기가 약 90 nm로 가장 작게 제조됨을 확인하였다.

Figure 3에는 파클리탁셀의 농도와 인지질의 농도에 따른 에멀전 입자의 크기변화를 나타내었다. 파클리탁셀/인지질이 1/99~10/90% w/w의 농도 범위에서 제조된 입자의 크기가 약 90 nm 정도로 변화가 없었으며, 농도 비율이 10/90% w/w 이상부터는 입자의 크기가 증가하여 40/60% w/w일 때는 입자의 크기가 약 325 nm이었다. 결과적으로 인지질 용액 내에서 파클리탁셀의 농도가 증가 될수록 입자의 크기가 증가되는 것을 관찰 할 수 있었고, 이는 인지질 용액에서 파클리탁셀을 용해시킬 수 있는 임계한계를 넘었기 때문이며,⁹⁾ 실제로 파클리탁셀의 양이 증가함에 따라 용해되지 못한 파클리탁셀이 응집현상으로 인하여 용액내부에서 입자의 침전이 관찰되었으며 입자의 크기 또한 증가하였다. 결과적으로 인지질 용액 내에서 파클리탁셀의 농도가 ~10% w/w일 때 안정된 입자를 형성하는 것을 확인 하였고, 에멀전 입자의 크기가 약 90 nm로 가장 작은 입자를 제조할 수 있는 것을 확인하였다.

에멀전 입자 형태

Figure 4에는 에멀전 입자의 크기와 형태를 나타내었다. 제조된 입자의 크기는 약 85 nm 정도이며 입자의 형태는 구형인 것을 확인하였다. 이때 입자의 뭉침 현상이 관찰되는 것은 농축된 입자를 증류수로 재분산하는 과정에서 입자간 유착과 응집현상이 발생하여 분산이 제대로 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

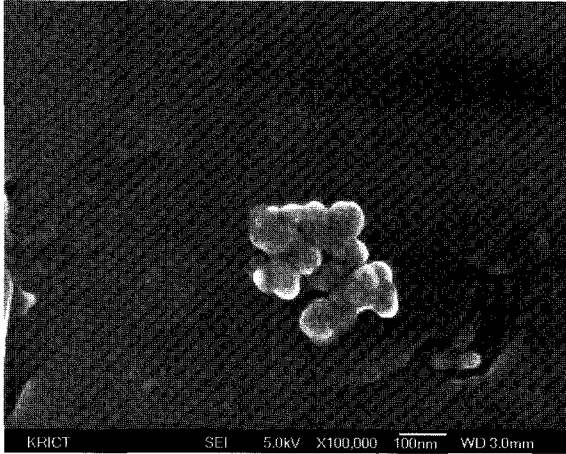


Figure 4—Scanning electron microscopy image of phospholipid nanoemulsions containing paclitaxel. The nanoemulsion was composed of PC:mPEG-2000:CHOL:paclitaxel at a weight ratio of 5:3:1:1 and 4% w/w Tween 80 as a surfactant.

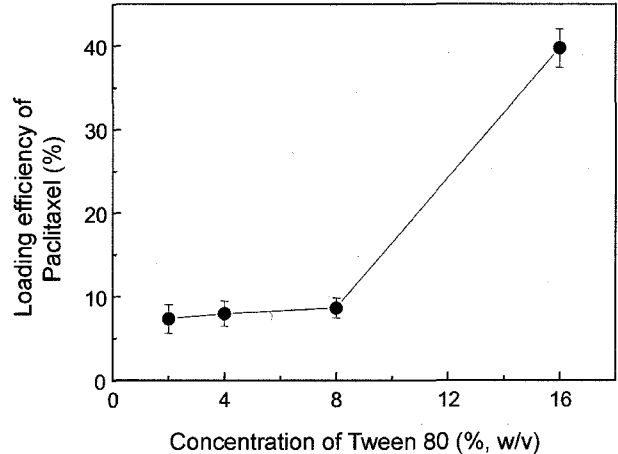


Figure 6—Loding efficiency of paclitaxel in nanoemulsion with a variation of concentration of Tween 80. The nanoemulsion was composed of PC:mPEG-2000:CHOL:paclitaxel at a weight ratio of 5:3:1:1. The data is shown as mean \pm S.D.(n=3).

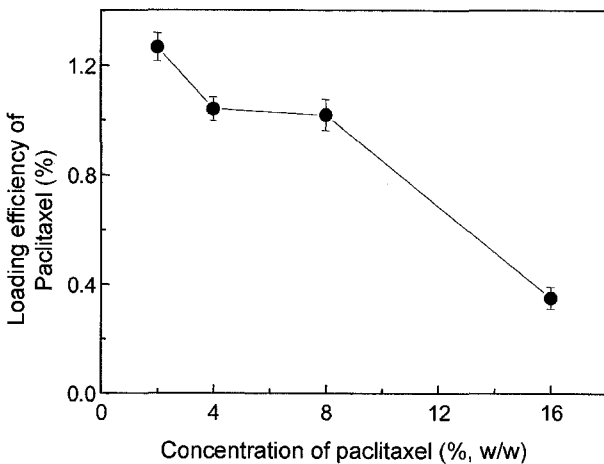


Figure 5—Loding efficiency of paclitaxel in nanoemulsion with a variation of concentration of paclitaxel. The nanoemulsion was composed of PC:mPEG-2000:CHOL at a weight ratio of 5:3:1 and 4% w/w Tween 80 as a surfactant. The data is shown as mean \pm S.D.(n=3).

파클리탁셀의 봉입률

Figure 5에는 파클리탁셀의 농도 변화에 따른 에멀전 입자 내부의 파클리탁셀의 봉입률을 나타낸 것이다. 파클리탁셀의 농도가 2% w/w일 때 봉입률이 1.26%로 가장 높았으나 16% w/w일 때는 봉입률이 급격히 감소하여 0.35%를 나타내었다. 결과적으로 인지질 용액 내에서 파클리탁셀의 농도가 증가될수록 봉입률이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었고, 또한 Figure 3과 Figure 5에 의해 용해도와 loading 양이 비례함을 알 수 있었고, 봉입률이 감소하는 것은 인지질용액 내에서 지용성 약물인 파클리탁셀을 용해시킬 수 있는 한계인 8% w/w를 넘어, 파클리탁셀의 용해도가 감소하

였기 때문이다.¹⁰⁾ 그러므로 파클리탁셀을 포화농도 이상으로 첨가하였을 경우 입자의 크기는 증가하지만 봉입률은 감소한다. 인지질 용액에 과잉 공급된 파클리탁셀은 뭉침 현상이 발생하여 분산용액 내에 다량의 침전이 발생하였고 침전물을 여과하는 과정에서 입자에 봉입되지 못한 파클리탁셀이 제거됨으로써 봉입률이 감소된 것으로 사료되었다. 따라서 2% w/w 파클리탁셀과 4% w/v 농도의 Tween 80 수용액으로 에멀전 입자를 제조하였을 경우 파클리탁셀의 봉입률이 1.26%로 최대가 되는 것을 관찰할 수 있었다.

Figure 6에는 Tween 80 수용액의 농도 변화에 따른 에멀전 입자 내부의 파클리탁셀의 봉입률을 나타내었다. PC, mPEG-2000, CHOL 및 파클리탁셀의 비율을 5:3:1:1로 고정시킨 후 Tween 80 수용액의 농도를 변화시켜가며 파클리탁셀의 봉입률을 비교하였다. Tween 80 수용액의 농도가 2~8% w/v일 때는 파클리탁셀의 봉입률이 8% 정도로 큰 차이가 없으나, 농도가 8% w/v 이상부터는 급격히 증가하여 16% w/v일 때는 39.73%의 봉입률을 나타내었다. 봉입률이 증가하는 이유는 유화제의 농도가 증가함에 따라 임계미셀 농도 이상이 되면서 유화제가 미셀의 분자 집합체를 형성하게 되어 입자의 안정성을 향상시켰기 때문으로 사료되었다.¹⁴⁾ 결과적으로 Tween 80 수용액의 농도가 증가함에 따라 파클리탁셀의 봉입률이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었으며, 16% w/v의 Tween 80 수용액을 이용하여 에멀전 입자를 제조하였을 경우 파클리탁셀의 봉입률이 39.70%로 가장 우수하게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 Tween 80 수용액의 농도가 증가될수록 입자의 크기가 증가하는 단점이 있기 때문에 ~100 nm의 입자를 제조하기 위해서는 8%

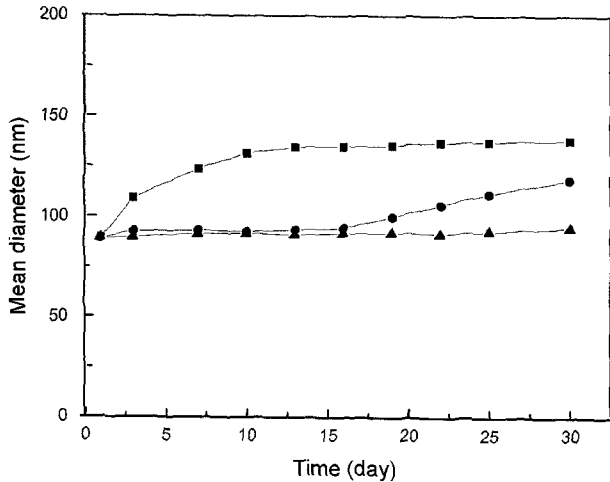


Figure 7—Estimation for the stability of nanoemulsion at 4.0, 25.0 and 37.5°C for 30 days. The nanoemulsion was composed of PC:mPEG-2000:CHOL:paclitaxel at a weight ratio of 5:3:1:1 and 4% w/w Tween 80 as a surfactant. (-■ - 4.0°C, -●- 25.0°C, -▲ - 37.5°C)

w/v 이내의 Tween 80 수용액을 사용하여야 한다.

에멀전 입자의 안정성

Figure 7에는 여러 온도에서 시간에 따른 에멀전 입자의 크기변화를 나타내었다. 4.0°C의 경우 입자의 크기가 80에서 120 nm로 증가되었고, 25.0°C의 경우 15일 후에 입자의 크기가 20 nm 정도 증가하였으나 37.5°C에서는 입자의 크기가 일정하게 유지됨을 관찰할 수 있었다. 4.0°C와 25.0°C 경우에 37.5°C와는 다르게 입자의 크기가 증가하는 이유는 낮은 온도에서는 4% Tween 80 수용액이 입자를 안정화시켜주지 못하였기 때문으로 사료되었으며, 또한 에멀전 입자간 유착과 응집 그리고 오스트왈드 리페닝(Ostwald ripening)현상에 의해 입자의 크기가 증가한 것으로 사료되었다.¹⁹⁾ 결과적으로 30일간 4.0°C와 25.0°C에서는 입자의 크기가 20~40 nm 증가하였으나 37.5°C에서는 안정하였다.

Figure 8에는 에멀전 입자에 사카라이드계열인 말토스, 수크로오스 및 만니톨을 첨가했을 때 동결건조 전과 후의 입자크기 변화를 나타내었다. 사카라이드를 첨가하지 않은 대조군의 경우, 동결건조 후 입자의 크기가 약 100에서 500 nm로 증가하였으나, 말토스, 수크로오스 및 만니톨을 첨가했을 경우는 입자의 평균크기가 190 nm로 일정하게 유지되었다. 동결 건조 전후의 입자 크기에 변화가 없는 이유는 사카라이드의 CH₂, CH₂ 그룹들이 약한 소수성을 나타내어 이 그룹들에 의해 올리고머들이 인지질 막과 상호작용을 하여, 인지질 막 표면에서 소수성 결합을 나타내기 때문으로 사료되었으며,²⁰⁾ 또한 이결합의 영향으로 사카라이드를 첨가

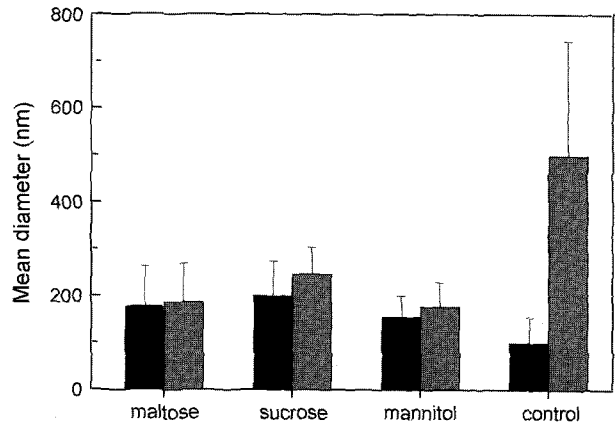


Figure 8—Estimation for the stability of nanoemulsion with adding saccharide derivatives before(■) and after(■) freeze-drying. The nanoemulsion was composed of PC:mPEG-2000:CHOL:paclitaxel at a weight ratio of 5:3:1:1 and 4% w/w Tween 80 as a surfactant. The data is shown as mean ± S.D.(n=3).

하여 에멀전입자를 제조하였을 경우 인지질 막이 두껍게 형성되어 대조군 보다 입자의 크기가 크게 제조되었다. 그러나 사카라이드를 첨가하였을 경우 재분산 시, 인지질 막의 소수성 결합을 강화시켜주는 역할을 함으로써 입자의 크기를 안정하게 유지시켜주는 역할을 수행하는 것을 관찰 할 수 있었다. 결과적으로 사카라이드계열을 첨가하여 에멀전 입자를 제조 할 경우 동결건조 후 재분산된 입자의 크기 변화가 없는 안정한 에멀전 입자를 얻을 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 자발적인 유화 확산법의 기계적 교반방법을 응용하여 평균 입자의 크기가 100 nm 내외인 조건과 파클리티탁셀의 최대 봉입률을 만족하는 인지질 나노 에멀전 입자의 제조 조건을 관찰하였다. 인지질과 파클리티탁셀 그리고 Tween 80의 농도를 변화시켜 입자를 제조한 결과 Tween 80 수용액의 농도가 일정할 때, 인지질의 농도를 증가시킬수록 입자의 크기가 감소하였고, 파클리티탁셀의 농도를 증가시킬수록 입자의 크기는 증가하였으며, 봉입률은 감소하였다. 한편, Tween 80 수용액의 농도를 증가시킬수록 파클리티탁셀의 봉입률은 증가하였다. 또한 나노 에멀전 입자의 형태는 구형을 나타냈으며, 37.5°C에서 30일간 안정하였고, 사카라이드계열을 함유하고 있는 입자들은 동결건조 후 재분산의 경우에도 입자의 크기변화가 없이 안정하였다. 본 결과로서 나노 에멀전 입자 제조 시 100 nm 내외의 입자 크기를 만족하는 가장 우수한 조건은 8% w/w 인지질이며, 파클리티탁셀의 봉입률이 가장 우수한 조건은 2% w/w 파클리티탁셀과 16% w/v Tween 80 수용액으로 제조된 경우임을 확인할 수 있었다.

문헌

- 1) S.S. Feng and G. Huang, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel(Taxol®) from nanospheres of biodegradable polymers, *J. Control. Release*, **71**, 53-69 (2001).
- 2) M.F. Shieh, I.M. Chu, C.J. Lee, P. Kan, D.M. Hau and J.J. Shieh, Liposomal delivery system for Taxol, *J. Fermentation. Bioeng.*, **83**, 87-90 (1997).
- 3) M. Schmitt-Sody, S. Strieth, S. Krasnici, B. Sauer, B. Schulze, M. Teifel, U. Michaelis, K. Naujoks and M. Dellian, Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposome improves antitumoral efficacy, *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2335-2341 (2003).
- 4) R. Kunstfeld, G. Wickenhauser, U. Michaelis, M. Teifel, W. Umek, K. Naujoks, K. Wolff and P. Petzelbauer, Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "Humanizes" SCID mouse model, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 476-482 (2003).
- 5) S.C. Kim, D.W. Kim, Y.H. Shim, J.S. Bang, H.S. Oh, S.W. Kim and M.H. Seo, *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy, *J. Control. Release*, **72**, 191-202 (2001).
- 6) B.B. Lundberg, V. Risovic, M. Ramaswamy and K.M. Wasan, A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration, *J. Control. Release*, **86**, 93-100 (2003).
- 7) L. He, G.L. Wang and Q. Zhang, An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile, *Int. J. Pharm.*, **250**, 45-50 (2003).
- 8) S. Alcaro, C.A. Ventura, D. Paolino, D. Battaglia, F. Ortuso, L. Cattel, G. Puglisi and M. Fresta, Preparation, characterization, molecular modeling and *in vitro* activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 1637-1641 (2002).
- 9) P. Kan, Z.B. Chen, C.J. Lee and I.M. Chu, Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system, *J. Control. Res.*, **58**, 271-278 (1999).
- 10) D.G. Rodrigues, C.C. Covolán, S.T. Cora^o, R. Barboza and R.C. Maranhão, Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vesicle for paclitaxel, *J. Pharma. Pharmacol.*, **54**, 765-772 (2002).
- 11) H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi and Y. Kawashima, Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, *Int. J. Pharm.*, **187**, 143-152 (1999).
- 12) L.Z. Wang, P.C. Ho, H.S. Lee, H.K. Vaddi, Y.W. Chan and C.S. Yung, Quantitation of paclitaxel in macro-sample rat plasma by a sensitive reversed-phase HPLC assay, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **31**, 283-289 (2003).
- 13) G. Theodoridis, G. Laskaris, C.F. de Jong, A.J.P. Hofte and R. Verpoorte, Determination of paclitaxel and related diterpenoids in plant extracts by high-performance liquid chromatography with UV detection in high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **802**, 297-305 (1998).
- 14) H.Y. Kwon, J.Y. Lee, S.W. Chio, Y.S. Jang and J.H. Kim, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method, *Colloids and surfaces*, **182**, 123-130 (2001).
- 15) S.J. Park, S.H. Kim, J.R. Lee, H.B. Lee and S.K. Hong, Preparation and characterization of biodegradable Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique, *Polymer(Korea)*, **26**, 326-334 (2002).
- 16) P. Kan, Z.B. Chen, R.Y. Kung, C.J. Lee and I.M. Chu, Study on the formulation of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs, *Colloids and Surface. B. -Biointerfaces*, **15**, 117-125 (1999).
- 17) M. Jumaa and B.W. Muller, Parenteral emulsions stabilized with of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**, 207-212 (2002).
- 18) K.M. Park, M.K. Lee, K.J. Hwang and C.K. Kim, Phospholipid-based microemulsions of flubiprofen by the spontaneous emulsification process, *Int. J. Pharm.*, **183**, 145-154 (1999).
- 19) J.D. Ng, B. Lober, J. Witz, A.T. Dietrich D. Kern and R. Giege, The crystallization of biological macromolecules from precipitates: evidence for Ostwald ripening, *J. Cryst. Growth*, **168**, 50-62 (1996).
- 20) T. Suzuki, H. Komatsu and K. Miyajima, Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes, *Bioch. Biophys. Acta*, **1278**, 176-182 (1996).