

메타크릴산-메틸메타크릴레이트 공중합체와 락토신의 마이크로/나노 입자화

윤희리 · 이종휘[†]

중앙대학교 화학신소재공학부
156-756 서울시 동작구 흑석동 221
(2008년 1월 31일 접수, 2008년 2월 5일 채택)

Micro- and Nanoparticle Preparation of Methacrylic Acid-Methyl Methacrylate Copolymer and Lactocin

Hye Ri Yun and Jonghwi Lee[†]

Department Chemical Engineering and Materials Science, Chung-Ang University, 221 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea
(Received 31 January 2008; accepted 5 February 2008)

요 약

나노입자는 생체활성물질을 지능적으로 전달하는 다양한 응용분야를 위해 개발되고 응용되어왔다. 본 연구에서는 락토신과 메타크릴산-메틸메타크릴레이트 공중합체(eudragit L100)가 나노입자로 가공되었다. 이 eudragit 고분자는 락토신을 위산으로부터 보호해주고 장에서 용출되도록 할 수 있다. 아세톤과 pH 7의 버퍼용액을 각각 비용매, 용매로 사용하였을 경우, 가장 작은 입자크기인 290 nm를 얻을 수 있었다. 얻은 입자는 분산제인 carrageenan 존재하에 동결건조를 통해, 응집을 최소화하며 건조 분말로 전환시킬 수 있었다. 락토신과 eudragit을 이용하여 얻은 일차입자는 SEM 관찰을 통해 수십나노미터크기임을 확인할 수 있었다.

Abstract – Nanoparticles have been developed and applied for various applications to intelligently deliver bioactive materials. Herein, lactocin was processed into nanoparticles with methacrylic acid-methyl methacrylate copolymer (1:1) (eudragit L100). The eudragit polymer can protect lactocin from the stomach acid and release lactocin in the intestines. When acetone and pH 7 buffer solution were used as non-solvent and solvent, respectively, the smallest volume-average particle size (290 nm) could be obtained. Freeze drying in presence of carrageenan (dispersant) can process the particles into dried powders with minimum aggregation. SEM observation revealed the primary particles prepared based on lactocin and eudragit were of a few tens of nanometers.

Key words: Nanoparticle, Microparticle, Eudragit, Lactocin, Aggregation

1. 서 론

약물전달분야에서 약물 입자의 크기가 줄어들수록 입자 표면적이 증가함에 따라 다양한 장점을 얻을 수 있다[1]. 특히 생체이용률의 증가나 방출패턴의 변화는 가장 큰 장점 중 하나이다. 이것은 증가된 표면적에 의해 약물의 용해와 흡수가 증가되어 일어나는 현상이다. 많은 약물들이 난용성을 가지고 있어 나노입자의 활용은 새로운 신약의 스크리닝을 효율적으로 해주고 있고, 약물의 함량을 증가시킬 수 있고, 공복시 흡수량과 식사 후의 흡수량 차이를 줄일 수도 있다. 최근들어 나노입자의 활용은 다양한 약물전달 기술과 접목되어 그 적용분야의 폭을 급격히 넓히고 있다[1-3].

입자의 크기를 줄이기 위한 방법은 그에 따른 표면에너지의 증가

를 어떻게 다루느냐에 달려있다. 현재까지의 제조 방법은 크게 두가지의 접근법으로 분류할 수 있는데, 한가지는 열역학적 접근법으로 표면안정화제나 적절한 매질(medium)을 사용하여 에너지를 다루는 방법이다. 다른 한가지는 동력학적 접근법으로 외부 에너지를 주입하여 표면에너지를 다루는 방법으로 높은 전단력을 사용하거나, impinging 제트 흐름 등을 이용하는 방법들이 있다. 보통은 이들의 방법들을 접목하여 제조하는 경우가 대다수인데, 표면안정화제와 homogenization을 동시에 사용하여 나노에멀전이나 나노현탁액을 만드는 방법이 널리 쓰이는 편리한 방법 중 하나로 본 실험에서 이용하였다.

단일 성분의 화학약물의 경우 그 성분의 물리화학적 성질을 이용하고, 사용되는 고분자 물질의 특성을 고려하여 적절한 조건에서 나노입자의 제조가 용이하다. 그러나 천연물에서 유래한 복합성분의 생체활성 물질인 경우 그 제조가 단순하지 않을 수 있다. 특히 각 성분의 용해도 등이 상이할 경우 나노입자 제조 후 담지되어 있는 물질의 성분 구성이 변할 수 있으며, 이것은 이러한 물질을 다루는

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jong@cau.ac.kr

*이 논문은 약물전달기술 분야 특집 논문입니다.

대다수의 공정이 가지고 있는 동일한 특성이다. 따라서 최대한 원료 물질의 성분을 유지하면서 최적의 나노입자 제조 방법을 개발하는 것이 목적이 되겠다.

장출혈성 대장균인 O-157균의 감염은 미국에서 매년 73,500 건 이상의 질병의 원인으로 추측 된다. 살모넬라, E.coli, Listeria와 같은 식품기원 병원체도 주요 위장질환의 원인이다. 락토신은 김치 유산균인 락포바실러스 프란타룸과 페디오코커스 펜토사세우스(L. plantarum CBT-LP2, Pediococcus pentosaceus CBT-PP1)에서 분리한 항균활성물질로 식중독을 유발하는 여러 유해 미생물에 대한 억제 효과를 검증하였다[4, 5]. 최근의 in vitro 실험에서 O-157(E. coli O157:H7), 포도상구균(S. aureus), 리스테리아(L. monocytogenes), 살모넬라(S. enteritidis)균 등 식중독과 설사 등을 유발하는 유해세균을 2.5% 이상의 농도에서 모두 억제 하는 것으로 보고되었다[4, 5]. 이러한 락토신 성분은 균의 사체에서 추출한 복합성분이어서, 위산에 약하고 장에서 주로 생체활성을 나타내는 물질이다.

본 실험에서는 락토신을 위산으로부터 보호하면서 효과적으로 장에서 활성을 나타낼 수 있게하는 장 표적성 나노입자를 제조하였다. 위산으로부터 락토신을 보호하면서 서방성을 나타내게하기 위해 메타크릴산과 메틸메타크릴레이트의 공중합체로 구성된 eudragit L100 고분자를 사용하여 복합입자로 제조하였고[6-11], 사용된 미세침전의 제조 방법은 액상의 현탁액을 얻게 됨으로 이를 동결건조하여 고체 분말까지 얻는 방법을 시도하였다. 이렇게 얻은 고체 분말은 현탁액 상태보다 보존안정성이 우수하며 락토신의 생체활성을 최대화시켜줄 수 있을 것으로 사료된다.

2. 실험

2-1. 시약

용매로 사용한 pH 7의 버퍼용액을 제조하는데 사용한 KH_2PO_4 (potassium phosphate, monobasic)와 NaOH(sodium hydroxide), 에탄올, 아세톤은 Duksan Pure Chemical에서 구매하였다. Methacrylic acid-methyl methacrylate copolymer(1:1) Ph. Eur.(Eudragit L100)은 데구사(Degussa, 한국)에서 구매하였으며, 벤질알콜은 Junsei Chemical에서 구매하였다. 락토신은 ㈜나노푸드에서 지원 해주었다. λ -Carrageenan은 Fluka, USA(non-gelling at 1% in 0.2 M KCl-solution)에서 구매하였고, 모든 시약은 정제 없이 사용하였다.

2-2. 나노 입자의 제조

버퍼 완충용액(pH 7, 0.1 M) 10 ml에 eudragit의 양을 0.1, 0.5, 1.5 g으로 조건을 변화시키면서 용해시켰다. Eudragit L100이 완벽하게 용해된 후에 락토신의 양을 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.5 g으로 변화시켜 용해시켰다. 침전을 잡기 위해 사용한 비용매로는 벤질알콜, 에탄올, 아세톤을 사용하였고, 비용매의 양도 40, 80, 160 ml로 변화를 주어 현탁액을 형성하였다. 형성된 현탁액의 입자 크기를 줄이기 위해 homogenizer, Ultra-turrax T8(IKA-werke, Germany)를 사용하여 15,000 rpm에서 5분간 homogenization하였다.

2-3. 나노입자의 동결건조

먼저 동결건조 후 원활한 재분산을 돕기위한 분산제(cryoprotectant)로서 1.0 wt%의 carrageenan 수용액을 사용하였고, 비용매로 아세톤을 사용했던 샘플을 사용하여 동결건조를 시도했다. 물에 용해되는 분산제인 carrageenan을 현탁액에 용해시키기 위해 우선 비용매로 사용했던 아세톤을 증발시켜야 했다. 이를 위해 evaporator를 이용하여 40 °C에서 4 h 동안 아세톤을 증발시켰다. 고온에서 락토신의 성분이 파괴될 수 있기 때문에 더이상의 고온은 사용하지 않았다. 그 후 carrageenan을 녹인 용액과 혼합한 후 액체질소에 한방울씩 떨어뜨려 동결시킨 후 24 h 동안 동결건조기(FD-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 건조 분말을 얻었다. 동결건조는 trap chilling 온도를 -45 °C, 진공도를 5.6 Pa로 하여 실시 하였다. 건조 분말의 재분산은 아래 입도측정 방법을 이용하여 증류수에 재분산시킨 후 확인하였다.

2-4. 락토신 입자의 분석

미세침전법으로 형성된 락토신 나노 현탁액의 입자크기는 입도분석기 LA-910(Horiba Co., Kyoto, Japan) 레이저 광산란기(Mie & Fraunhofer법, relative refraction index=1)를 사용하여 측정하였다. 입도분석시 초음파 분산기의 분해전력은 40 W(39 kHz)이고 교반속도와 순환속도는 340 ml/min였다.

락토신 나노 현탁액의 입자와 동결건조한 입자의 모폴로지(morphology)를 확인하기 위해 주사전자현미경 scanning electron microscope S-4700(SEM, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 조사하였다. SEM 분석 조건은 샘플 위에 백금-팔라듐을 6.7 nm/min 속도로 120 초간 코팅하여 10 kV 조건하에서 조사하였다. SEM 분석용 코팅 전 샘플을 3,000 rpm, 33 s 조건으로 spin coater, Spin-1200D(마이더스시스템, 한국)를 이용하여 스핀 코팅한 후에 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

락토신과 같은 복합성분을 고분자 내에 담지하여 위산으로부터 보호하면서 장으로 전달하려면 우선적으로 고려해야 할 조건이 충분히 락토신의 주성분을 담지할 수 있는 입자 제조 방법을 선정하는 것이다. 락토신의 성분이 다양하여 각 성분들마다 친수성, 극성 등의 성질이 다르고 따라서 사용된 eudragit 안에 담지되는 성향도 모두 다를 수 밖에 없다. 따라서 모든 성분을 완벽하게 입자 내로 담지하는 것은 현실적으로 어려운 목표이다. 본 실험에서 사용한 미세침전법을 통해 나노입자를 제조할 경우 최대한 락토신의 성분을 침전시킬 수 있는 조건을 우선적으로 조사하였다.

Table 1에는 다양한 비용매에 침전되어 나온 락토신 성분의 양을 분석하여 비교하였다. 사용된 비용매들은 사용된 고분자인 eudragit의 비용매로 생체활성 성분 없이 고분자만의 입자 제조에 사용될 수 있는 물질들이다. 최대한 락토신의 복합성분을 유지하면서 나노입자를 제조하기 위하여 용매와의 혼합이 안되는 경우도 포함

Table 1. Selection of a non-solvent for the preparation of lactocin nanoparticles based on the precipitation amount (wt%). A buffer solution (pH 7) was used as the solvent

Nonsolvent	Acetone	Ethanol	Toluene	Cyclohexane	Benzyl alcohol	Ethyl acetate	Water	Acetic acid	Methanol
Precipitated materials (wt%)	82	51	32	22	21	16	16	14	5

Table 2. Volume average mean sizes of lactocin/eudragit particles prepared at different conditions

Nonsolvent	Lactocin (%w/v)	Eudragit (%w/v)	Use of omogenizer	Mean particle sizes (micron)
Benzyl alcohol	0	0.2	N	11.01
Benzyl alcohol	0	0.2	Y	10.80
Benzyl alcohol	0.2	0.2	N	3.96
Benzyl alcohol	0.2	0.2	Y	13.48
Ethanol	0	0.2	N	1.35
Ethanol	0.2	0.2	N	0.64
Ethanol	1.0	1.0	N	0.61
Ethanol	2.8	2.8	N	1.63
Ethanol	0.2	0.2	Y	0.45
Ethanol	0.1	0.2	N	1.12
Ethanol	0.1	0.2	Y	0.95
Acetone	0	0.2	Y	508.91
Acetone	0.2	0.2	N	0.69
Acetone	0.2	0.2	Y	0.29
Acetone	0.1	0.1	Y	576.52
Acetone	0.06	0.1	Y	0.85
Acetone	0.03	0.1	Y	0.47

하여 실험을 시도하였다. Eudragit과 함께 입자로 제조되기 위해, 즉 최대한의 락토신 침전을 위해서는 아세톤과 에탄올이 유리한 것으로 파악되었다. 이 두 비용매와 더불어 본 실험에서는 벤질알코올도 비용매로 사용하여 입자 제조를 시도하고 그 결과를 비교하였다.

Table 2에서는 다양한 조건에서 제조된 락토신/eudragit 입자의 부피평균입자크기를 비교하였다. 우선 벤질알코올을 사용하여 eudragit 입자를 제조한 경우 상당히 큰 약 10 미크론 정도의 입자를 얻었는데, homogenization을 가하지 않고 락토신을 첨가한 경우 입자의 크기가 오히려 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 homogenization을 가한 경우 입자 크기는 조금 증가하였다. Homogenization은 때로 입자의 응집을 유도할 수도 있는데[12], 본 실험의 경우 그러한 응집 유도가 일어난 것으로 보인다. 이러한 현상은 에탄올이나 아세톤을 사용하여 입자크기를 1 미크론 이하로 줄인 경우에는 관찰되지 않았고, homogenization은 입자크기를 줄이는 일반적인 효과를 보였다.

락토신의 첨가에 따라 입자 크기가 감소하는 경향은 에탄올을 비용매로 사용한 경우 더욱 뚜렷하게 관찰할 수 있었다. 0.2%의 고분자와 락토신을 사용한 경우는 락토신이 없는 경우에 비해 1.35 미크론에서 0.64 미크론으로 입자크기가 감소하였다. 그러나 이 감소는 락토신이 0.1%로 줄어들거나 락토신과 eudragit의 농도가 동시에 2.8%로 증가한 경우에는 사라지고 오히려 입자크기가 증가하였다. 반면에 락토신과 eudragit의 농도가 함께 0.1%로 감소한 경우에는 입자크기의 변화가 뚜렷하지 않았다. 이러한 결과로부터 락토신은 표면안정화제 역할을 하는 성분을 함유하고 있는 것으로 추측할 수 있다. 실지 많은 세포들은 지질 등 표면안정화제 역할을 하는 다양한 분자량의 성분들을 함유하고 있다. 따라서 eudragit 자체의 입자형성 시 발생하는 단위 표면적 증가에 따른 Gibbs 자유에너지의 증가량은 락토신이 함께 존재할 경우보다 크다고 추측할 수 있다.

이러한 결과는 제조법의 실지 적용의 경우 단점으로 작용할 수 있는데, 락토신의 성분 변화없이 나노입자화하기 어렵다는 것으로

간접적으로 증명해주고 있기 때문이다. 따라서 이 결과는 Table 1에서 관찰한 침전량이 100%가 아닌 결과와 일치하는 결과라고 볼 수 있다. 또한 eudragit의 양에 비해 락토신의 양이 줄어들 경우 입자 크기가 커지는 Table 2의 경향과도 일치한다.

아세톤에서의 거동은 에탄올에서의 거동과는 조금 상이한 특징들을 보였다. 우선 아세톤을 사용하는 제조법이 Table 1에서 볼 수 있듯이 가장 많은 락토신의 성분들을 유지할 수 있는 방법이다. 락토신 없이 입자 제조를 시도한 경우에 비해 락토신이 있는 경우 그 크기가 줄어드는 대체적인 경향을 볼 수 있으나, eudragit을 0.1%(w/v)로 고정시키고 락토신을 증가시킨 경우에는 에탄올과는 상이한 거동을 보였다. 즉, 락토신 증가와 함께 입자크기가 증가하는 것을 관찰할 수 있는데, 이는 락토신 증가로 표면안정화 역할을 하는 성분의 증가와 동시에 eudragit과 함께 입자화되는 락토신의 절대량 자체의 증가에 따라 입자크기가 증가하는 것으로 보인다. 즉 락토신 성분에 존재할 표면안정화제의 역할은 락토신이 소량있을 경우 충분히 관찰될 수 있는데, 그 이상의 락토신이 존재할 경우 입자내의 함량 증가로 입자크기가 커지는 것으로 사료된다.

동일한 조건에서의 비용매의 영향은 Fig. 1에서 아세톤과 에탄올의 경우를 비교하여 이해할 수 있다. 에탄올의 경우 submicron의 피크는 아세톤의 경우보다 적었으나 아세톤의 경우에는 1 미크론 이상의 피크가 없어 상대적으로 평균크기는 적었다.

Fig. 2에서는 아세톤을 비용매로 사용한 경우 락토신의 농도에 따른 효과를 보여주고 있다. 앞서 서술한바대로 락토신의 농도가 커질수록 입자크기가 커지는 것을 확인할 수 있다. 특히 락토신 농도의 증가와 함께 1 미크론 이상 영역에서의 피크가 관찰되는데, 0.1%에서는 수백 미크론에 해당하는 입자들이 다수 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

락토신 0.06%와 eudragit 0.1%를 아세톤을 비용매로 사용하여 제조한 입자를 동결건조를 통해 건조 분말로 제조하고, 이를 다시 증류수에 넣어 재분산 입자크기를 조사하였다(Fig. 3). 건조 전 입자는 소량의 1 미크론 이상의 입자들과 1 미크론 이하의 입자들로 구

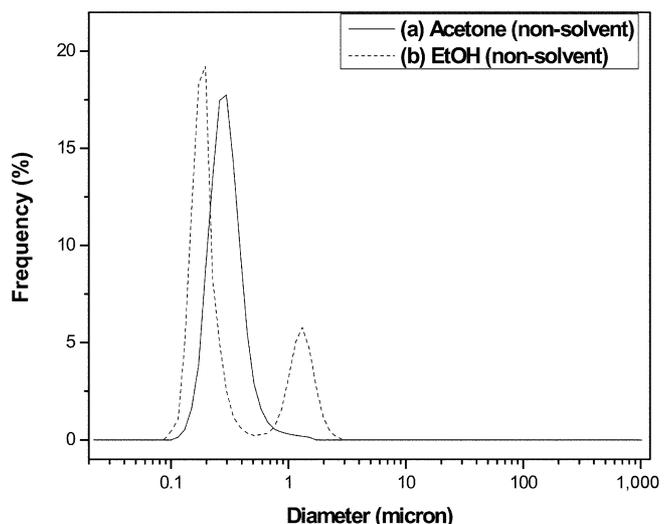


Fig. 1. Particle size distributions of lactocin/eudragit particles prepared using different non-solvent: (a) acetone, (b) ethanol [sonication = 2 min, pH 7 buffer solution 10 ml, lactocin 0.2% (w/v), eudragit 0.2% (w/v), non-solvent 40 ml, with homogenization].

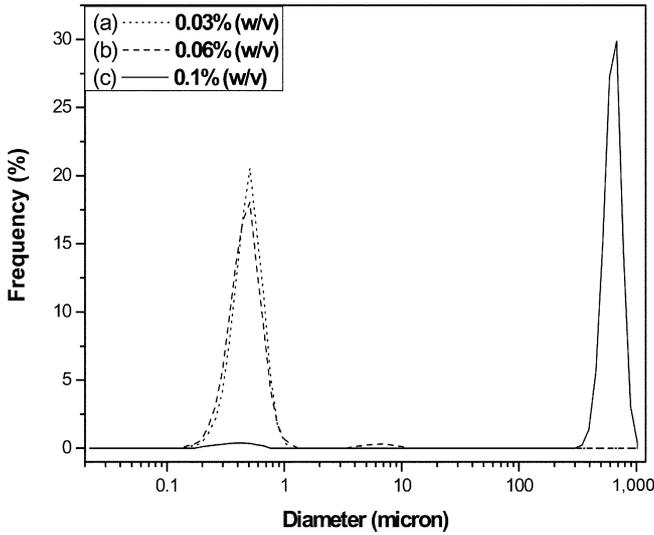


Fig. 2. Particle size distributions of lactocin/eudragit particles prepared at different lactocin concentrations: (a) 0.03% (w/v), (b) 0.06% (w/v), (c) 0.1% (w/v) [sonication = 2 min, pH 7 buffer solution 10 ml, eudragit 0.1% (w/v), non-solvent(acetone) 80 ml, with homogenization].

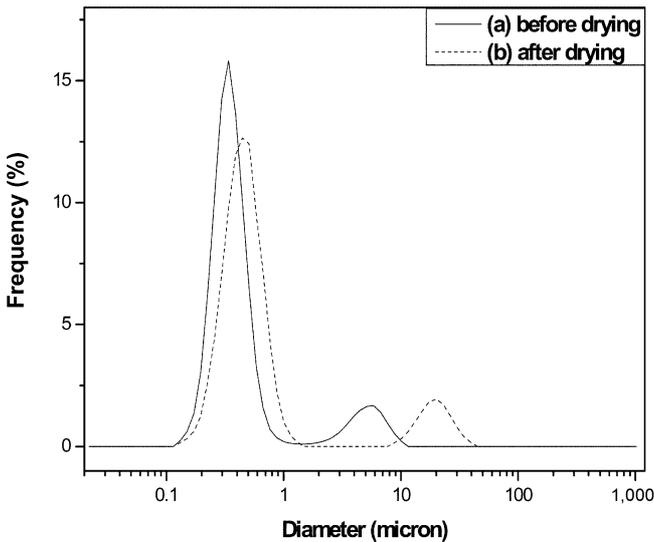
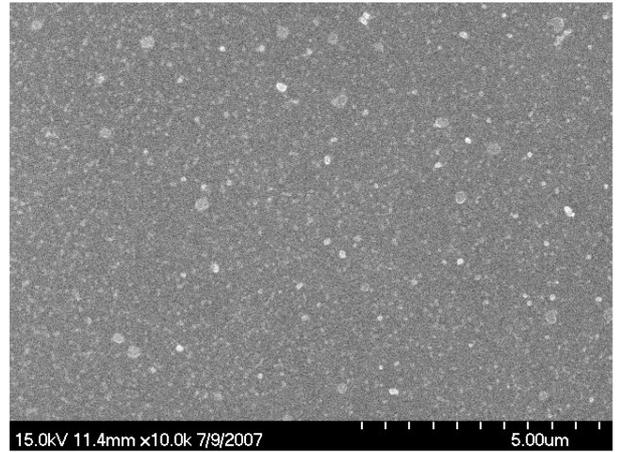
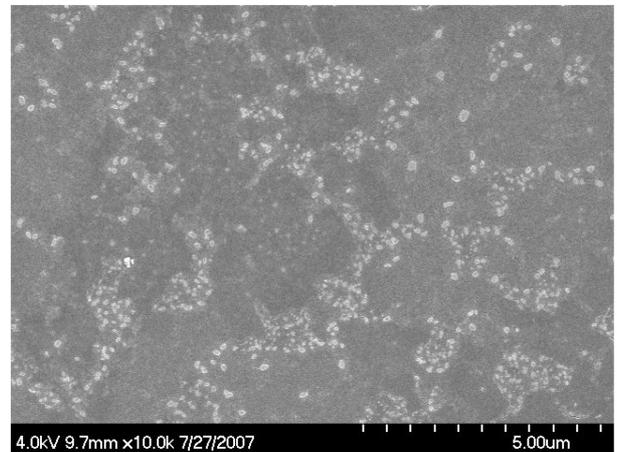


Fig. 3. Particle size distributions before (a) and after, (b) freeze drying and re-dispersion of lactocin/eudragit particles [sonication time = 2 min, pH 7 buffer solution 10 ml, lactocin 0.06% (w/v), eudragit 0.1% (w/v), acetone 80 ml, with homogenization].

성되어 있었는데, 동결건조를 통해 두 피크가 모두 크기가 증가하는 방향으로 이동한 것을 확인할 수 있었다. 동결 건조 동안 가능한 한 동결힘(freezing stress)이 발생하지 않도록 액체질소에 미세한 양의 방울을 떨어뜨려 동결시키고 건조시켰다. 이러한 방법을 통해, 생성되는 얼음 입자의 크기를 줄일 수 있고, 따라서 동결힘을 감소시켜 입자의 응집 현상을 억제할 수 있다[13]. 아울러 동결분산제(cryoprotectant)로 carrageenan을 사용하였다. 그러나 이러한 조건에서도 상당량의 응집현상이 일어난 것으로 Fig. 3에서 확인할 수 있는데, 이는 락토신의 복합성분에 기인하는 것으로 파악된다. 즉, 다양한 성분들이 존재하기 때문에 동결 과정에서 얼음이 생성되면서 얻어지는 농축액(cryo-concentrated solution)에



(a)



(b)

Fig. 4. Scanning electron micrographs of lactocin/eudragit particles: (a) before freeze drying, (b) after freeze drying. [(a) pH 7 buffer solution 10 ml, lactocin 0.06% (w/v), eudragit 0.1% (w/v), acetone 80 ml, with homogenization; (b) carrageenan 1.0 wt%].

서 한가지 이상의 상의 결정화나 무결정의 vitrification이 일어날 수 있다. 이러한 현상들은 모두 여분의 동결힘을 발생시켜 입자 응집을 유도할 수 있다.

입자의 모폴로지 관찰은 주사전자현미경(SEM)을 사용하였다. Fig. 4에서는 그 대표적인 입자 모습들을 보여준다. 우선적으로 입자들의 대체적인 크기가 수십나노미터에 불과한 것을 파악할 수 있다. 따라서 응집이 일어나지 않은 일차입자의 경우 그 크기가 수십 나노미터이고 대다수의 입도 측정 결과에서 보이는 피크들은 이러한 일차입자들의 응집된 덩어리의 크기인 것으로 파악된다. Carrageenan을 사용하여 건조한 후의 모습이 보다 더 응집된 모습을 보이는 것은 Fig. 3에서의 결과와 일치하는 것으로 동결건조 동안 약간의 응집이 일어나는 것으로 파악된다.

용매/비용매를 사용한 미세침전법을 이용하여 생체활성물질인 락토신 성분을 eudragit 고분자와 성공적으로 입자화 할 수 있었다. Eudragit 고분자는 위산에서 락토신 성분을 보호하는 역할을 할 수 있으며, 따라서 보다 활성이 유지된채 장에까지 도달할 수 있는 표적지향성 입자 제조가 가능하다. 이러한 방법을 통해 장에 유용한 락토신 성분을 효과적으로 전달하는 것이 가능할 것으로 보인다.

4. 결 론

장 표적성 나노입자의 제조 기술을 락토신 성분에 적용하여 효과적으로 나노입자로 제조하는 방법을 연구하였다. 용매/비용매를 이용한 미세침전법을 사용하여 락토신과 eudragit 고분자의 복합입자를 제조하였고, 그 입자들의 평균 입자크기를 분석함으로써 최적의 제조 조건을 조사하였다. 락토신과 eudragit이 0.2%(w/v) 함유된 성분에서 가장 작은 290 nm의 복합입자를 얻을 수 있었다. 얻어진 복합입자 현탁액은 carrageenan을 분산제로 동결건조하여 고체 분말로 얻었는데, 이 과정에서 응집현상을 관찰할 수 있었다. 본 제조 방법을 통해 장에 유용한 락토신을 장으로 전달할 수 있는 나노입자를 성공적으로 제조할 수 있었다.

감 사

본 연구는 2007년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, J., "Drug Nano- and Microparticles Processed into Solid Dosage Forms: Physical Properties," *J. Pharmaceutical Science*, **92**(10), 2057-2068(2003).
2. Lee, J., Lee, S. -J., Choi, J. -Y., Yoo, J. Y. and Ahn, C. -H. "Amphiphilic Amino Acid Copolymers as Stabilizers for the Preparation of Nanocrystal Dispersion," *Eur. J. Pharmaceutical Science*, **24**, 441-449(2005).
3. Eerikäinen, H. and Kauppinen, E. I., "Preparation of Polymeric Nanoparticles Containing Corticosteroid by a Novel Aerosol Flow Reactor Method," *Inter. J. Pharmaceutics*, **263**, 69-83(2003).
4. Martin, N. I., Sprules, T., Carpenter, M. R., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. and Vederas, J. C., "Structural Characterization of Lactacin 3147, a Two-Peptide Lantibiotic with Synergistic Activity," *Biochemistry*, **43**, 3049-3056(2004).
5. Kim, D. and Chung, M., "A Probiotics Condensate Mixture: Novel Antimicrobial Application," *Nutrafoods* **3**(3) 11-16(2004).
6. Devarajan, P. V. and Sonavane, G. S., "Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of Gliclazide Loaded Eudragit Nanoparticles as a Sustained Release Carriers," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **33**, 101-111(2007).
7. Ravi Kumar, M. N. V., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H. and Domb, A. J., "Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives," *Chem. Rev.*, **104**, 6017-6084(2004).
8. Burkhard, P., "Nano-Biotechnology and Protein De Novo Design," *Structural Biology & Biophysics*, Biennial Report 2004-2005.
9. Delie, F. and Blanco-Prieto, M. J., "Polymeric Particulates to Improve Oral Bioavailability of Peptide Drugs," *Molecules*, **10**, 65-80(2005).
10. Sood, A. and Panchagnula, R., "Peroral Route: An Opportunity for Protein and Peptide Drug Delivery," *Chem. Rev.*, **101**, 3275-3303(2001).
11. Fatima, L., Asghar, A. and Chandran, S., "Multiparticulate Formulation Approach to Colon Specific Drug Delivery: Current Perspectives," *J Pharm Pharmaceut Sci.*, **9**(3), 327-338(2006).
12. Ogden, L. V., Walstra, P. and Morris, H. A., "Homogenization-Induced Clustering of Fat Globules in Cream and Model Systems," *J. Dairy Sci.*, **59**(10), 1727-1737(1976).
13. Lee, J. and Cheng, Y., "Critical Freezing Rate in Freeze Drying Nanocrystal Dispersions," *J. Controlled Release*, **111**(1-2), 185-192(2006).