

이중 유제 방법으로 제조된 PLGA 미립자들과 반구체 : 특성과 라니티딘(ranitidine)의 방출 양상

남대식 · 김성철 · 강수용 · 오돈치맥 문크자갈 · 심영기 · 이우경[†]

인제대학교 공과대학 나노공학부
(2008년 1월 25일 접수 · 2008년 2월 19일 승인)

PLGA particles and half-shells prepared by double emulsion method: characterization and release profiles of ranitidine

Dae-Sik Nam, Seong-Cheol Kim, Soo-yong Kang, Munkhjargal Odonchimeg, Young Key Shim and Woo-kyoung Lee[†]

School of Nano Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea
(Received January 25, 2008 · Accepted February 19, 2008)

ABSTRACT – PLGA micro/nano particles encapsulating ranitidine as a hydrophilic model drug were prepared by the double-emulsion solvent evaporation method. Surface morphology investigation by scanning electron microscope (SEM) showed that the emulsification by sonication could produce nanoparticles, whereas microparticles were prepared using high speed homogenizer. Moreover, while nanohalf-shell structure instead of spherical nanoparticle could be produced by adding poloxamer into oil phase (MC) with PLGA 504H, the addition of poloxamer didn't change particle shape in case of PLGA 502H. On the other hand, microparticle with poloxamer had more surface pores than those without poloxamer. The size and polydispersity (PDI) of particles were determined by particle size analyzer. Effective diameters of particles were in the range of 400~800 nm and 1200~3300 nm in case of nanoparticles and microparticles, respectively. Encapsulation efficiencies were in the range of 1.2~2.9%. The addition of poloxamer produced the particles with higher encapsulation efficiency. *In vitro* release study in phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C showed common large initial burst release. However, the relative slower release profile could be observed in case of microparticles. Poloxamer addition increased the release rate, which was thought to be related to the increased surface area of particles.

Key words – PLGA nanoparticles, half-shells, ranitidine HCl

약물전달시스템에서 마이크로 또는 나노입자를 이용한 약물전달 기술은 관심을 갖는 분야 중의 한가지이다. 치료를 위한 이런 입자들은 마이크로구체, 나노구체, 마이크로캡슐, 그리고 리포솜 등으로, 마이크로입자(microparticles)는 고체 구형의 입자들이 1 µm에서 1000 µm의 직경을 가지고, 나노입자(nanoparticles)는 고체 콜로이드성 입자의 직경 범위가 1 nm에서 1000 nm의 범위를 가지며 액상 전달체를 이용하여 유동 형태로 투약할 수 있는 것들을 말한다.¹⁾

이와 같은 나노 및 마이크로 입자를 제조하는 방법으로는 크게 단량체의 고분자 중합을 이용하는 방법과 고분자의 분산에 의해 이루어지는 방법, 두 가지로 나눌 수 있다. 분산을 이용하는 방법으로 poly(lactic acid), poly(D,L-glycolide), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), 그리고 poly(ε-caprolactone)을 이용하여 생분해성 나노입자를 만드는 방법들

이 제안되었고, 그 중 친수성 약물을 봉입하는 방법으로 이중유제 용매 증발방법(double-emulsion solvent evaporation method) 등이 보고되었다.^{1,2)}

또한 보고에 따르면 분산에 의해 입자를 제조하는 방법 중의 하나인 계면 침전법(interfacial deposition)으로 친수성 약물을 전달하는 PLGA 나노입자의 제조하는 연구에서 2개의 PEO사슬과 한 개의 PPO사슬을 가지는 (Figure 1)³⁾ 폴록사머(poloxamer)를 코팅하여 약물의 봉입효율이 증가되는 것을 확인 하였다.⁴⁾ 그리고 폴록사머를 계면활성제로 이용하는 것뿐만 아니라 생분해성 PLA와 혼합하여 고분자 전달체로 이용하는 연구가 보고된 바 있다.^{5,6)}

이에 본 연구에서는 전통적인 친수성 약물 전달을 위한 미립자를 PLGA와 폴록사머를 혼합하여 이중유제 용매 증발방법으로 제조 하였고, 이때 친수성 표본 약물로는 위산분비의 히스타민 활성을 선택적으로 저해하는 H₂ 수용체 길항제 중의 하나인 염산라니티딘을 이용하였다.⁷⁾ 특히, 폴록사머를 이용하여 반구체의 특이한 형태를 가지는 입자를 제조

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 055)320-3875, E-mail : wlee@inje.ac.kr

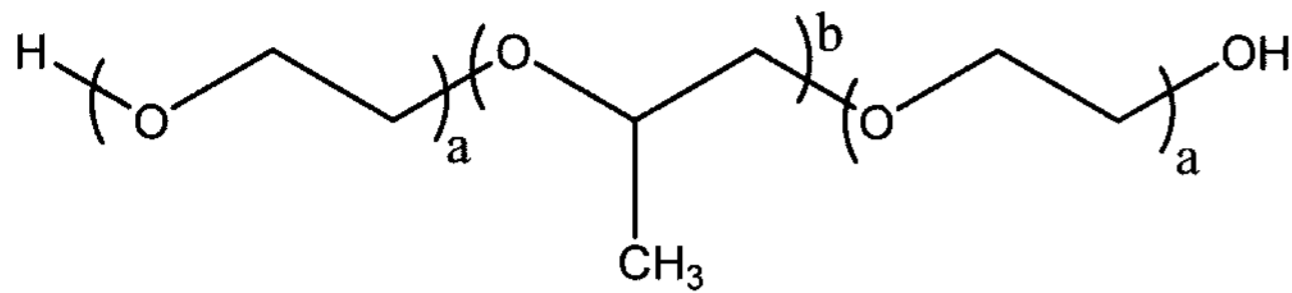


Figure 1—Chemical Structure of Poloxamer.

(a) ethylene oxide portion (b) propylene oxide portion

하였으며, 이를 구형입자와 비교 연구하였다. 그리고 이중 유제 증발 방법에서 이 다양한 미립자의 제조를 위한 연구 조건으로 에멀전(emulsion) 제조 방법, 폴록사머의 첨가, PLGA 고분자의 분자량 변화, 용매량의 변화를 이용하였다. 제조된 3종류의 약물 전달체로서의 미립자들은 형태와 크기, 봉입효율, 방출특성, 그리고 특이적인 반구체 모양의 형성 요인을 평가하였다.

실험 방법

시료, 시약 및 기기

Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA)는 RESOMER[®] RG 502 H와 RESOMER[®] RG 504 H로 두 가지 모두 Boehringer Ingelheim (Germany)의 제품을 사용하였다. 폴록사머는 pluronic F-127 (BASF, Germany)을 사용하였고 phosphate buffered saline (pH 7.4, Sigma, USA)과 염산라니티딘(ranitidine HCl) 은 Sigma-Aldrich, Inc.(USA)의 제품을 사용하였으며, 기타 용매는 시판 제품 중 시약급 이상을 사용하였다.

실험 및 평가를 위해서 입도 분석기(BI-90 Plus, Brookhaven, USA), 전계 방출 주사전자현미경 (Field Emission - Scanning Electron Microscope, S-4300 SE, HITACHI, Japan), UV/Vis Spectrophotometer (S-3100, SCINCO, Korea), HPLC는 waters 600 controller, 2996 photodiode array, column (C₁₈, Waters, USA)로 구성되는 기기 등을 사용하였다. 그리고 미립자 제조에서 에멀전 형성을 위한 기기로는 high speed homogenizers로 POLYTRON[®] (PT3100, KENEMATICA, Switzerland)과 digital ultrasonic homogenizers으로 SONIFIER[®] (S-450A, BRANSON, USA)를 사용하였다.

염산라니티딘이 봉입된 입자의 제조

분자량의 차이에 따른 미립자의 특성을 관찰하기 위해 120 mg의 PLGA 502H(Mw 12 kDa)와 PLGA 504H(Mw 48 kDa)를 각각 methylene chloride(MC) 4 mL에 녹인 후 염산 라니티딘 20 mg을 200 μL의 증류수에 녹인 용액을 더한 후 digital ultrasonic homogenizer를 이용하여 초음파 처

리 하였다. 50 mL의 1% polyvinyl alcohol(PVA) (w/v) 수용액을 채운 후 만들어진 w/o 에멀전을 넣고 다시 초음파 처리하였다. 그 후 에멀전은 실온에서 교반하여 MC를 증발시켰고 증류수로 씻은 후 동결 건조 하였다(502 NP, 504 NP). 상기의 조성과 방법으로 PLGA 질량의 0.5배 폴록사머를 추가 하여 미립자를 제조하였고(502-P NP, 504-P NP), 다른 균질화 방법인 high speed homogenizer를 이용하여 PLGA 504H 그리고 PLGA 504H에 폴록사머를 첨가한 에멀전을 제조하고 MC 증발 후 동결 건조 하였다.

고분자 농도에 따른 입자의 제조

이중 유제 용매 증발방법(double-emulsion solvent evaporation method)^{8,9)}으로 나노입자를 제조하였다. 20 mg의 염산라니티딘을 200 μL의 증류수에 녹인 후, PLGA 504H 120 mg과 폴록사머 60 mg을 각각 MC 2 mL, 3 mL, 4 mL에 녹인 유기 상과 섞은 후 digital ultrasonic homogenizer를 이용하여 초음파 처리하였다. 만들어진 w/o 유제를 1% PVA 20 mL에 넣고 2차 초음파 처리하였다. 실온에서 MC를 증발 시켰고, 6000 rpm으로 15 min간 원심분리 하는 방법으로 잔여 PVA용액을 제거 후 동결 건조 하였다.

입자의 형태학적 관찰

시료를 ion sputter를 이용하여 Pt(Platinum)와 Pd(Palladium)을 120 Å으로 코팅한 후 제조한 모든 나노입자들의 크기, 표면, 형태 등을 전계 방출 주사 현미경(Field Emission - Scanning Electron Microscopy, FE-SEM)을 이용하여 관찰하였다.

입자 크기 측정

증류수 10 ml에 동결 건조된 시료들을 0.01 g~0.02 g 정도씩 넣고 10분간 초음파를 이용하여 분산 시켰다. 각각의 시료들은 입도 분석기(particle size analyzer, PSA)로 측정하였고, 미립자 지름의 평균값과 다분산지수(polydispersity index)의 평균값을 기록하였다.

봉입 효율 측정

In vitro test와 약물 봉입 효율 연구를 위한 염산라니티딘의 표준시료는 염산라니티딘 20 mg을 acetonitrile과 증류수의 조성이 2:8 (v/v)인 용매로 제조하였다. HPLC 시스템의 C₁₈ column을 이용하였으며, 313 nm 파장에서의 흡광을 감지하였고, 이동상 acetonitrile과 증류수의 조성은 2:8이고 흐름속도는 1 mL/min으로 정하였다.¹⁰⁾ 염산라니티딘이 봉입된 입자 시료 6개를 각각 0.04g씩 측정하고, 각각을 acetonitrile

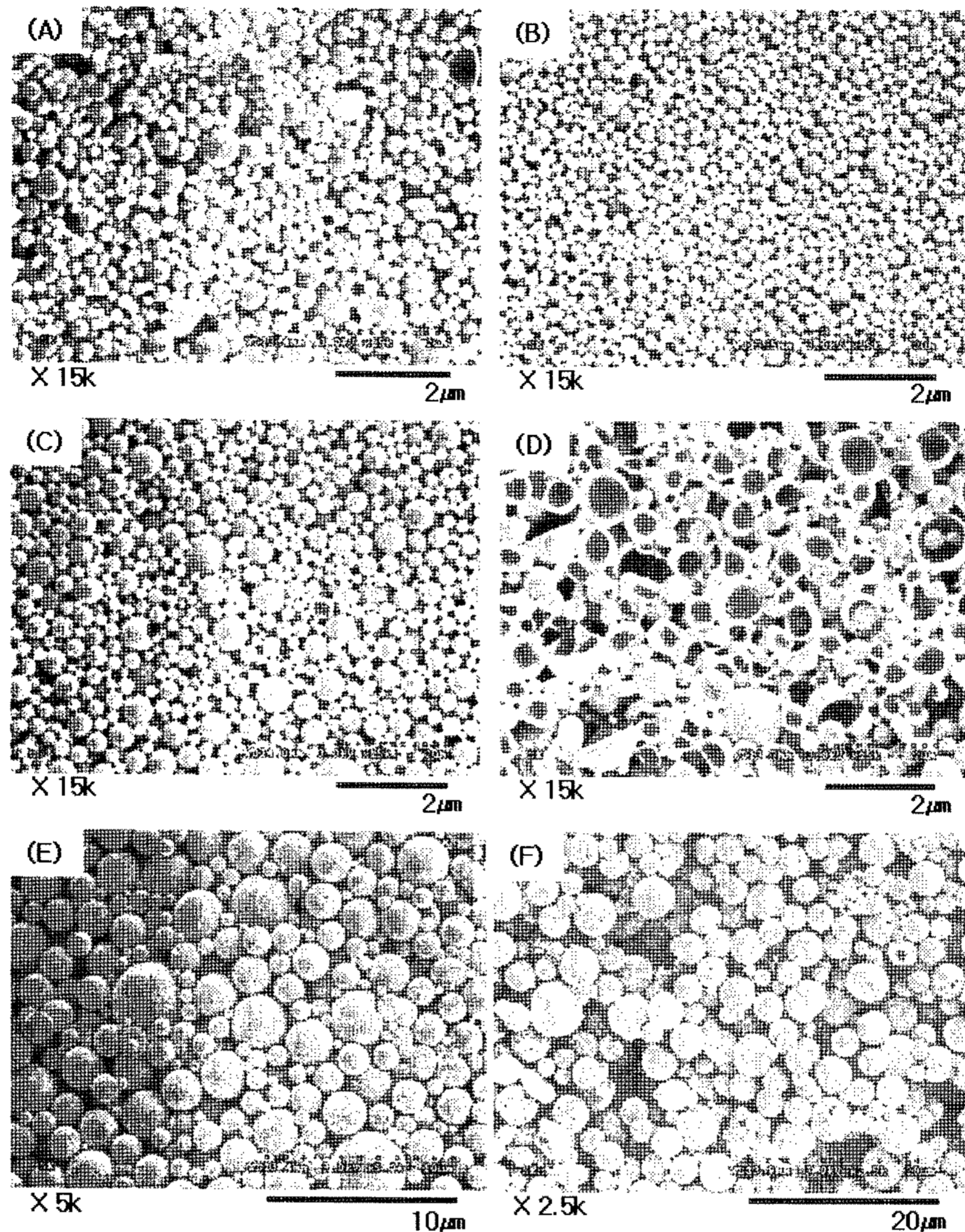


Figure 2—Scanning Electron Microscopy images of PLGA particles. PLGA particles entrapping ranitidine HCl were fabricated by double-emulsion solvent evaporation method. (A) PLGA RG 502H+ultrasonic (502 NP), (B) PLGA RG 502H+ultrasonic+poloxamer (502-P NP), (C) PLGA RG 504H+ultrasonic (504 NP), (D) PLGA RG 504H+ultrasonic+poloxamer (504-P NP), (E) PLGA RG 504H+high speed homogenization (504 MP), (F) PLGA RG 504H+high speed homogenization+poloxamer (504-P MP).

2 mL에 녹인 후, 증류수 8 mL를 추가하여 초음파 처리하였다. 그 후 원심 분리하여 상층액을 추출하였고 HPLC 시스템에서 농도를 측정하고 봉입 효율을 산정 하였다.

(v:v)비율로 혼합 후 HPLC 시스템을 이용하여 측정하였다.

In vitro 방출 특성 연구

염산라니티딘의 in vitro 방출 특성 연구는 Choi 등¹¹⁾과 Yang 등⁸⁾의 논문을 참고 하였다. 염산라니티딘이 봉입된 각각의 입자 시료 6개를 100 mg씩 나누어 담고 25 mL의 PBS(0.01M, phosphate buffered saline, pH 7.4)용액을 채운 후 intelli-mixer를 이용하여 교반하고, 37°C incubator안에 보관하면서 임의의 시간 마다 1 mL씩 추출하였다. 추출한 시료를 원심분리한 후 상층액을 acetonitrile과 증류수를 8:2

결과 및 고찰

염산라니티딘이 봉입된 입자 형태

이중 유제 용매 증발방법을 이용하여 여러 조성과 방법으로 염산라니티딘이 봉입된 입자들을 제조하였으며, 그 입자들의 형태를 FE-SEM 사진을 통해 확인 하였다(Figure 2). PLGA 502H를 이용하여 제조한 입자들인 502 NP, 502-P NP 에서는 폴록사머의 첨가 여부와 관계없이 나노크기의 구형 입자가 대부분을 이루고 있음이 확인되었고, PLGA 504H만을 이용한 504 NP의 경우에도 대부분이 구형 나노입

자임을 확인하였다. 반면, 폴록사머와 PLGA 504H를 이용한 504-P NP에서는 대부분이 나노크기의 반구체 형태를 이루고 있었다(Figure 2 D). 반구체 형태의 나노입자는 일반적으로 제조되기 어려운 구조로서 본 연구에서는 PLGA 504H와 폴록사머가 결합된 특이한 조건에서 반구체가 형성된다는 것을 확인할 수 있었다. 어떠한 메커니즘을 통해 반구체가 제조되는 지에 대해서는 본 연구의 결과로서는 아직 판단하기 힘들며 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

고속 균질기(High speed homogenizer)를 이용하여 제조한 입자의 경우, 상대적으로 크기가 큰 마이크로 입자를 형성하였으며, 표면에 작은 기공을 가진 마이크로입자로 제조됨을 확인하였다(Figure 2 E, F). 또한 폴록사머를 첨가하게 되면 더 많은 표면의 기공을 형성함을 관찰하였다. 유제 증발 방법으로 제조된 표면에 작은 기공을 가진 마이크로입자는 이전에도 보고되었다.^{8,9,12)} 보고에 따르면, 고분자 층 내부에 작은 수용액 에멀전이 다량 존재하는 경우, 표면의 고체화가 빨리 진행되며 이때 내부의 에멀전이 서로 융합되기 전에 표면이 고체화됨으로써 표면에 기공을 형성한다고 기술되었다. 따라서, 본 연구에서 PLGA 504H만을 이용하였을 때보다 폴록사머를 첨가한 경우 표면에 더 많은 기공을 형성한 이유는 고분자 층에 존재하는 수용액 에멀전의 양의 차이에서 기인한다고 생각된다. 이는 양쪽성을 가진 폴록사머가 고분자 층에 존재하는 경우 그 양쪽성으로 인해 보다 많은 수용액 에멀전과 또 만들어진 에멀전이 보다 안정한 상태로 존재할 수 있는 보다 좋은 환경을 제공하기 때문이라고 판단된다.

고분자 농도에 따른 half-shell 입자의 변화

PLGA 504H와 폴록사머를 이용한 입자 제조에서, 유기층(MC) 조성에 변화를 주어 염산라니티딘이 봉입된 입자를 이중 유제 증발 방법으로 제조하였고, SEM 사진에서 전체적으로 반구체의 모습을 확인하였다(Figure 3). 또한 같은 조성의 고분자와 약물로 입자를 제조하면서 MC의 부피를 2 mL, 3 mL, 4 mL로 증가 시키자 입자의 크기가 작아짐을 확인하였다. 이는 이미 보고된 고분자의 농도 감소가 입자의 크기를 감소시키는 연구 내용이 반구체 미립자의 경우에도 적용되기 때문이라 판단된다.⁹⁾

입자 크기와 다분산지수

염산 라니티딘이 봉입된 입자의 크기와 그 분포를 입도 분석기를 이용하여 측정 하였다(Table I). PLGA 502H를 이용하여 제조된 입자의 경우에는 502 NP와 502-P NP의 유효크기가 각각 557.4 ± 7.8 nm, 459.7 ± 3.4 nm로, 폴록사머를

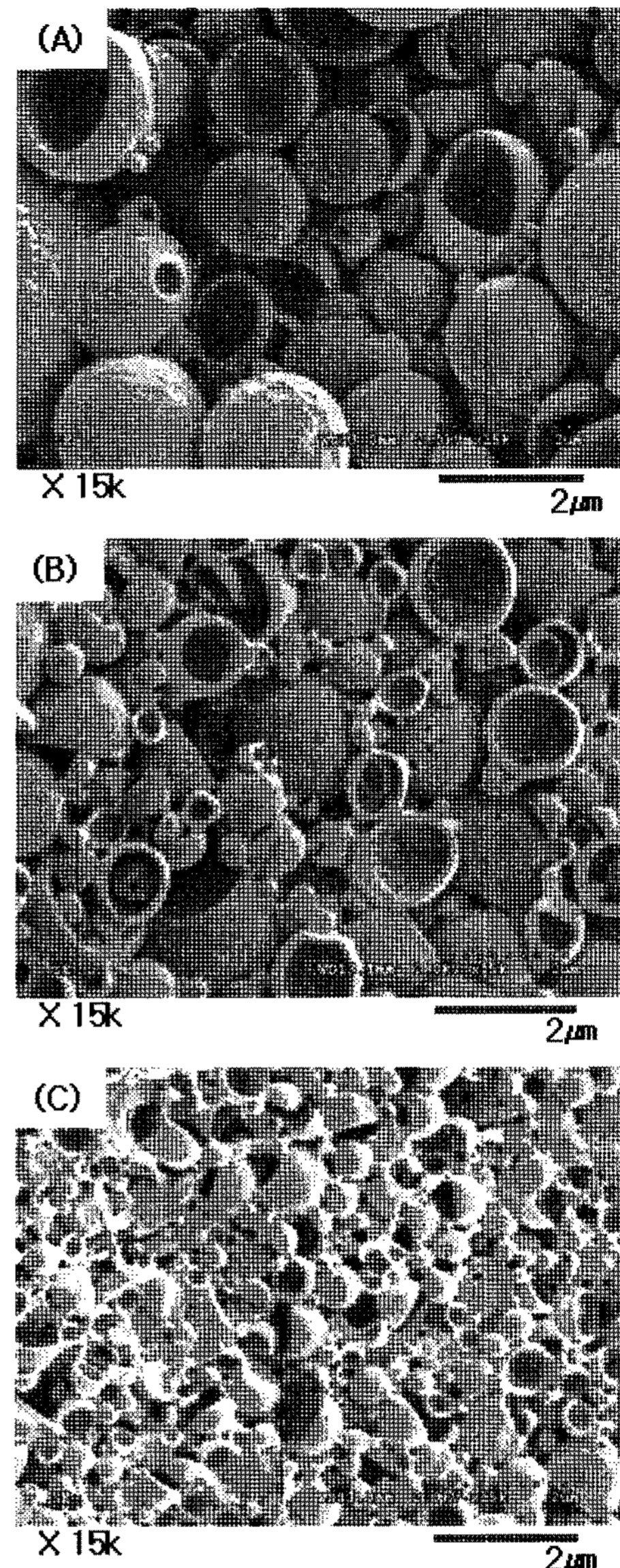


Figure 3—Scanning Electron Microscopy images of Half-shells. Half-shells were prepared by varying the volume of oil phase (MC). (A) 2 mL, (B) 3 mL, (C) 4 mL.

첨가함으로써 크기가 줄어들었으나, PLGA 504H를 이용하여 제조된 입자의 경우에는 폴록사머를 첨가하게 되면, 나노입자와 마이크로 입자 두 가지 경우 모두에서 입자의 평균 크기가 증가하였다. 이는 전자현미경으로 관찰되는 결과와도 일치하였다. 즉, 나노입자인 경우에는 504 NP와 504-P NP가 각각 435.8 ± 7.4 nm, 841.7 ± 87.8 nm 이었으며, 마이크로입자인 경우인 504 MP와 504-P MP가 각각 1231.4 ± 100.6 nm, 3309.1 ± 126.8 nm이었다. 따라서, PLGA 504H를 이용한 경우에는 폴록사머의 첨가가 모양의 변화를 일으킴과 동시에 입자의 평균크기도 증가시킴을 확인하였다. 다분산 지수는 입자의 평균크기가 증가할수록 감소하였다.

Table I—Mean Diameter and Polydispersity of Ranitidine-loaded PLGA Particles (Mean ± S.D., n = 5)

Sample	Emulsification	Polymer	^d Poloxamer	Mean diameter (nm)	^f PDI
502 NP	Ultrasonic	^a 502H		557.4 ± 7.8	0.206 ± 0.021
502-P NP	Ultrasonic	502H	○	459.7 ± 3.4	0.251 ± 0.015
504 ^c NP	Ultrasonic	^b 504H		435.8 ± 7.4	0.220 ± 0.021
504-P NP	Ultrasonic	504H	○	841.7 ± 87.8	0.037 ± 0.049
504 ^e MP	Homogenizer	504H		1231.4 ± 100.6	0.005 ± 0.00
504-P MP	Homogenizer	504H	○	3309.1 ± 126.8	0.005 ± 0.040

^a502H: Poly(lactide-co-glycolic acid) RG 502H (50:50, Mw 12 kDa)

^b504H: Poly(lactide-co-glycolic acid) RG 504H (50:50, Mw 48 kDa)

^cNP: Nanoparticles

^dPoloxamer: F-127 used or not

^eMP: Microparticles

^fPDI: Polydispersity index

약물 봉입 효율

HPLC 시스템을 이용하여 각각의 입자 시료의 봉입효율을 산정하였을 때, drug content는 약 0.17~0.28%로 나타났고, 봉입 효율은 약 1.2~2.9%로 확인 되었다(Table II). 폴록사머를 첨가하면 공통적으로 봉입효율이 증가함을 관찰할 수 있었다. 이는 양쪽성을 가지는 폴록사머의 첨가로 인해 고분자층에 유입되는 친수성 약물의 양이 증가하였기 때문이라고 생각된다. 또한 입자의 크기가 큰 마이크로입자의 봉입효율이 나노입자에 비해 증가하였다. 하지만 염산라니티딘을 chitosan/celulose acetate multimicrospheres의 봉입 model drug로 이용한 Zhou 등의 연구에서의 약 10%의 봉입 효율과 비교해 볼 때 전체적으로 낮은 drug content와 봉입 효율은 아직 개선할 과제로 남아 있다.¹³⁾

In vitro 방출 특성

염산라니티딘을 봉입한 마이크로 또는 나노입자들에 대해 36 hr 동안 방출 특성을 관찰하였으나, 그 중 봉입 효율이 제일 낮은 504 NP의 경우는 방출되는 약물 농도가 검출한계를 벗어나 결과를 산정하지 못하였다. 504 NP를 제외한 입자들의 방출 특성은 Figure 4와 같이 확인 되었다.

Table II—Drug Content and Encapsulation Efficiency of PLGA Particles (Mean ± S.D., n = 3)

Sample Name	Drug content (%)	Encapsulation efficiency (%)
502 NP	0.174 ± 0.0155	1.27 ± 0.10
502-P NP	0.172 ± 0.0156	1.79 ± 0.14
504 NP	0.169 ± 0.0159	1.23 ± 0.10
504-P NP	0.196 ± 0.0163	2.04 ± 0.15
504 MP	0.234 ± 0.0159	1.69 ± 0.10
504-P MP	0.282 ± 0.0155	2.88 ± 0.14

모든 입자들에서 큰 초기방출의 양상을 확인할 수 있었다. 이는 친수성 약물이 가지는 특성에 기인한다고 생각된다. 다만 마이크로입자인 504 MP와 504-P MP의 경우에 상대적으로 적은 초기방출을 관찰하였는데, 이는 마이크로입자의 낮은 표면적 때문이라고 판단된다. 또한 마이크로입자에서 둘 다 공통적으로 약 16 hr 동안의 지연 방출이 확인 되었는데, 이는 5 hr 미만의 지연 방출을 확인한 Zhou 등¹³⁾의 연구 보고 내용보다 약간 더 긴 시간 동안의 지연 방출이었다. 또한 폴록사머를 첨가한 경우(504-P MP)에 약물의 방출속도가 증가된 것을 확인할 수 있는데, 504-P MP의 입자 크기가 더 커서 표면적이 감소하였음에도 방출속도가 증가한 것은, 앞서 언급하였듯이 504-P MP의 표면에 존재하는 더 많은 기공 효과 때문이라고 생각된다. 즉, 표면에 더 많은 기공을 가지는 504-P MP의 경우 그 표면적은 더 확대되고 따라서 방출속도도 증가되는 것이라 판단된다.

나노입자의 경우에는 큰 초기방출과 4 hr 이내의 지연방

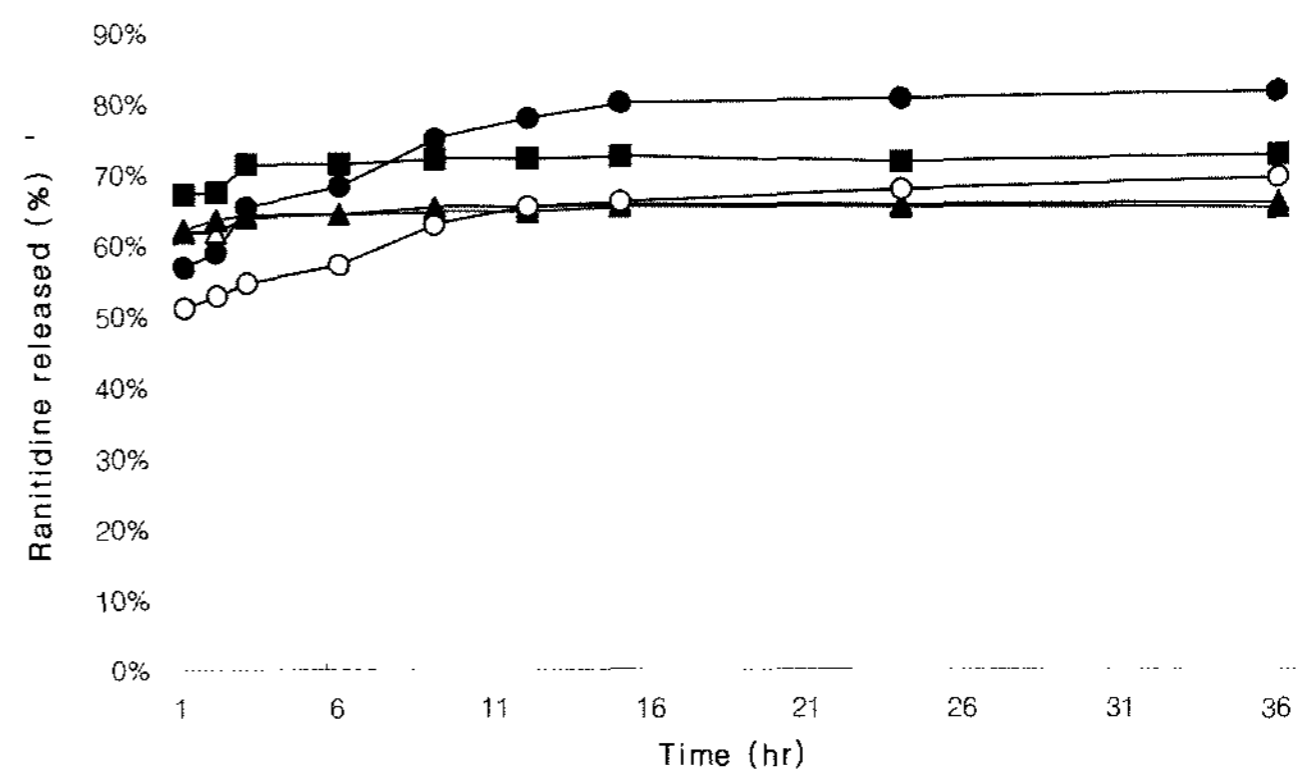


Figure 4—In vitro Release Profiles of PLGA Particles. Particles containing ranitidine HCl were incubated in PBS solution (pH 7.4, 0.2% Tween 80) at 37°C. The concentration of released drug was measured using HPLC (△) 502 NP, (▲) 502-P NP, (■) 504-P NP, (○) 504 MP, (●) 504-P MP.

출이 특징이다. 이는 나노입자가 가지는 큰 표면적에 기인한다고 볼 수 있다. 또한, 반구체 구조를 가지는 504-P NP의 초기방출속도가 가장 큰 것도 반구체가 가지는 넓은 표면적의 특징에서 비롯된다고 생각된다. 따라서, 방출속도의 경우 입자가 가지는 표면적과 밀접한 상관관계를 가지는 것으로 요약할 수 있을 것이다. 폴록사머의 첨가에 상관없이 구형 나노입자의 형태를 가지는 502 NP와 502-P NP에서는 서로 간에 거의 유사한 방출양상을 관찰할 수 있는 것도 표면적이라는 관점에서 설명할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구에서 이중 유제 증발 방법을 이용하여 친수성 약물을 봉입하는 나노입자, 나노 반구체, 마이크로 입자 형태의 미립자들의 제조 및 확인하였다. 또한 입자 제조 시 고분자의 농도 감소가 입자의 크기를 감소시킨다는 것이 나노 반구체의 경우에도 적용되는 것을 확인 하였다. 약물 봉입효율의 경우, 폴록사머를 첨가하면 봉입효율이 증가함을 관찰하였다. in vitro 방출 특성에서는 친수성 약물의 특성으로 인해 대체로 큰 초기방출을 나타내었으나 마이크로 입자에서는 약간의 지연방출이 확인되었다. 나노입자에서는 더 높은 초기방출이 관찰되었고 지연방출의 시간도 매우 짧았다. 방출속도와 관련해서는 입자들이 가지는 표면적의 크기와 밀접한 상관관계를 가지는 것으로 판단된다.

참고문헌

- 1) C. X. Song, V. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W. R. Humphrey, R. J. Shebuski and R. J. Levy, Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery, *J. Control. Release.*, **43**, 197-212 (1997).
- 2) K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni and W. E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release.*, **70**, 1-20 (2001).
- 3) J. J. Escobar-Chavez, M. Lopez-Cervantes, A. Naik, Y. N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero and A. Ganem-Quintanar, Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **9**(3), 339-358 (2006).
- 4) H. M. Redhead, S. S. Davis and L. Illum, Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation, *J. Control. Release.*, **70**, 353-363 (2001).
- 5) T. G. Park, S. Cohen and R. Langer, Controlled protein release from polyethyleneimine-coated poly(L-lactic acid)/pluronic blend matrices. *Pharm. Res.*, **9**(1), 37-39 (1992).
- 6) U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 67-75 (2005).
- 7) K. M. Koch, M. Liu, I. M. Davis, S. Shew and Y. Yin, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ranitidine in renal impairment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **52**, 229-234 (1997).
- 8) Y. Y. Yang, H. H. Chia and T. S. Chung, Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *J. Control. Release*, **69**, 81-96 (2000).
- 9) Y. Y. Yang, T. S. Chung, X. L. Bai and W. K. Chan, Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chem. Eng. Sci.*, **55**, 2223-2236 (2000).
- 10) C. L. Calull, L. G. Capdevila, C. Arroyo and J. Bonal, Simple and robust high-performance liquid chromatographic method for the determination of ranitidine in microvolumes of human serum. *J. Chromatogr.*, **693**, 228-232 (1997).
- 11) H. S. Choi, S. A. Seo, G. S. Khang, J. M. Rhee and H. B. Lee, Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres: in vitro release profiles, *Int. J. Pharm.*, **234**, 195-203 (2002).
- 12) G. Crotts and T. G. Park, Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres, *J. Control. Release*, **35**, 91-105 (1995).
- 13) H. Y. Zhou, X. G. Chen, C. S. Liu, X. H. Meng, C. G. Liu and L. J. Yu, Release characteristics of three model drugs from chitosan/cellulose acetate multimicrospheres. *Biochem. Eng. J.*, **31**, 228-233 (2006).