

## 5-Fluorouracil과 그 유도체를 봉입한 Multilamellar Vesicle(MLV)과 Microemulsified Liposome(MEL)의 특성 및 약물방출 거동

지용길<sup>1</sup> · 박목순 · 이계원 · 류연근

충남대학교 약학대학  
(1995년 8월 1일 접수)

### Characteristics and Drug Release Profiles of Multilamellar Vesicle(MLV) and Microemulsified Liposome(MEL) Entrapped 5-Fluorouracil and Its derivatives

Ung Kil Jee<sup>1</sup>, Mok Soon Park, Gye Won Lee and Yeon Geun Lyu

College of Pharmacy, Chungnam National University and Taejon, Korea  
(Received August 1, 1995)

Although liposome has many advantages as a pharmaceutical dosage form, its application in the industrial field has been limited because of some problems such as preparation method, reproducibility, scale-up, stability and sterilization etc. Liposomes prepared by microemulsification method had defined size, narrow size distribution, reproducibility and high entrapment efficiency. For enhancing the stability, the dry form of liposome was recommended. These types of liposome are proliposome and freeze-dried liposome. The liposome must have some properties for preparing of freeze-dried liposome: small size (50~200 nm), narrow size distribution and cryoprotectant. In this experiment, the liposomes containing 5-Fluorouracil(5-FU) and its prodrug (pentyl-5-FU-1-acetate: PFA, hexyl-5-FU-1-acetate: HFA) were made with soybean phosphatidylcholine, cholesterol, stearylamine(SA) and dicetyl phosphate(DCP) employing hydration method or microemulsification method using Microfluidizer<sup>TM</sup>. Both of liposome types were MLV and MEL. After preparation, freeze drying and rehydration were performed. In the process of freezing, trehalose(Tr) was added as a cryoprotectant. Their evaluation methods were as follows: entrapment efficiency, mean particle size and size distribution, dissolution test, retain of entrapment efficiency and turbidity after freeze-drying. The results are summarized as follows. The entrapment efficiency of 5-FU was dependent on total lipid concentration and cholesterol content but that of PFA and HFA was decreased when cholesterol was added. When DCP and SA were added, entrapment efficiency was decreased. As the partition coefficient of drug was increased, entrapment efficiency was increased. Under the same condition, entrapment efficiency of MEL is similar to that of MLV. The mean particle size and size distribution of MEL were smaller than those of MLV. Dissolution rates of drug from both liposome types were comparatively similar. Dissolution rates of drugs with serum and liver homogenate were faster than without these materials. After preparation of liposome, free drug was removed effectively by Dowex 50W-X4. When liposome was freeze-dried and then rehydrated in the presence of Tr, characteristics of liposome were maintained well in MEL than MLV. Tr was used successfully as a cryoprotectant in the process of freeze drying and the optimal ratio of Tr:Lipid was 4:1(g/g).

**Keywords**—Microfluidizer, 5-Fluorouracil, Prodrug, Ion-exchange, Freeze-drying, Cryoprotectant, Trehalose.

1960년대에 인지질 계통의 계면 활성제들이 수상의 매질에서 생체막과 같은 이중막을 자발적으로 형성한다는 사실<sup>1)</sup>이 발견된 이래 리포솜은 생체막 연구의 모

델로서뿐 아니라 약제학 분야에서 생체내 약물 수송체의 적용에 많은 연구가 되어 왔다.<sup>2-3)</sup> 리포솜내에 약물을 봉입시키는 데에는 여러가지 요인들이 영향을 미

<sup>1</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

치는데 수용성 약물의 경우 주로 리포솜 내부의 수상에 봉입이 되며 지용성 약물의 경우는 막을 이루는 지질 사이에 끼이는 형태로서 주로 봉입 된다. 그러므로 수용성 약물은 사용하는 인지질의 종류에 큰 영향을 받는다. 리포솜을 약물 수송체로 적용할 경우 가장 큰 단점은 이를 수상에 분산된 형태로 보존할 경우 안정성이 매우 나쁘다는 것이다.<sup>4,6)</sup> 이는 리포솜 제조에 사용되는 인지질 자체가 산화되기 쉬운 물질인데다가 수상에 분산된 상태로 오래 보관할 경우 인지질의 응집, 융합에 의해 봉입율이나 입자 크기에 많은 변화를 일으키기 때문에 안정성을 증가시키는 목적으로 다양한 첨가제를 사용하는 방법은 이미 오래전부터 연구가 되었다.<sup>7)</sup> 안정화의 한 방법으로 리포솜을 건조된 상태로 보관할 수 있는 방법들이 연구되었는데 대표적인 것으로 프로리포솜,<sup>8,9)</sup> 동결 건조 리포솜<sup>10,11)</sup> 등은 좋은 예이다. 이들 건조 기법은 리포솜의 안정성을 증가시키는 목적외에 대량 생산에 적합하도록 연구가 되었는데 Chen 등<sup>12)</sup>은 유동층 코팅기를 사용하여 종래에 회전 증발농축기를 이용한 프로리포솜의 실험실적이며 소규모적인 단점을 해결하는 방법을 제시했으며 Martin은<sup>13)</sup> 동결 건조 기법을 이용해 리포솜을 대량생산 및 안정성을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시하였다.

리포솜이 실제 제약 산업에서 실용화 되려면 현탁액 상태에서의 낮은 안정성, 봉입 효율등에서 재현성이 매우 떨어진다는 점, 봉입시킨 약물의 누출(leakage), 현재까지 확립된 리포솜 제조 방법들이 대체로 대량 생산에 부적합하다는 점, 생산 공정 및 원료의 가격이 고가라는 점, 주사제 제형의 경우 멸균이 어렵다는 점 등이다.

리포솜의 산업화에 대한 가능성은 이미 여러 연구를 통해 보고되었다. 리포솜을 산업화하기 위해서는 봉입 효율의 재현성과, 입자 분포의 균일성을 보장할 수 있어야 하는데 이는 실제 리포솜을 임상에 적용했을 때 체내동태에 크게 영향을 미치는 요인이기 때문이다. 또한 주사제의 경우 멸균할 수 있어야 한다는 것도 반드시 고려해야 할 점이다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법으로 최근에 마이크로플루다이저(Microfluidizer™, Fig. 1)를 사용해 고농도의 지질 현탁액으로부터 작은 크기의 multilamella visicle(이하 MLV)을 제조하는 방법이 보고되었다.<sup>14)</sup> 이를 이용해 리포솜을 제조할 경우 MLV를 제조하는 방법에서 사용할 수 없는 고농도의 지질을 사용할 수 있다.<sup>14)</sup>

이에 본 연구에서는 일반적으로 봉입율이 매우 낮은

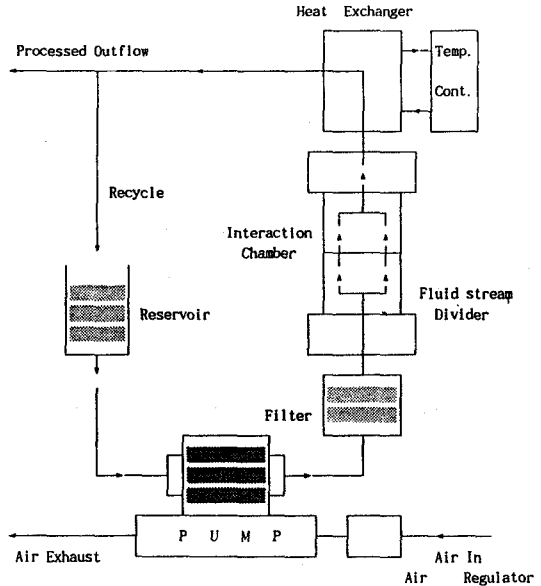


Figure 1 - Diagrammatic representation of the use of a microfluidizer to prepare liposomes.

5-Fluorouracil(이하 5-FU)의 봉입율을 높이는 방법으로 지용성이 증가된 프로드릭을 리포솜에 봉입시켜 봉입율을 향상시키고자 하였으며 리포솜의 제제화를 위하여 마이크로플루다이저를 사용해 5-FU를 봉입한 리포솜을 만들어 동결 건조에 적합한 작은 크기와 균일한 입자 분포를 갖도록 하였다. 또한 다당류를 첨가해 리포솜을 제조한 후 동결 건조법을 이용하여 건조한 다음 이를 다시 재분산시켜 리포솜의 성질을 비교하므로써 동결 건조를 이용한 안정화의 가능성을 검토하였다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

5-FU는 한울제약으로부터 공급 받았으며 이의 프로드릭은 실험실에서 합성된 것으로 pentyl-5-FU-1-acetate(이하 PFA)와 hexyl-5-FU-1-acetate(이하 HFA)를 사용하였다. 이들의 명칭과 구조 및 물리적 성질은 Fig. 2와 Table I에 나타내었다. 리포솜의 제조에 사용한 soybean phosphatidylcholine(PC Epikuron 200이하)은 Pacific Pharmaceuticals사에서 구입했으며 cholesterol(이하 CH), dicetyl phosphate(이하 DCP), stearylamine(이하 SA),  $\alpha$ -tocopherol acetate(이하 TA), Sephadex G-50(Fine, dry bead di-

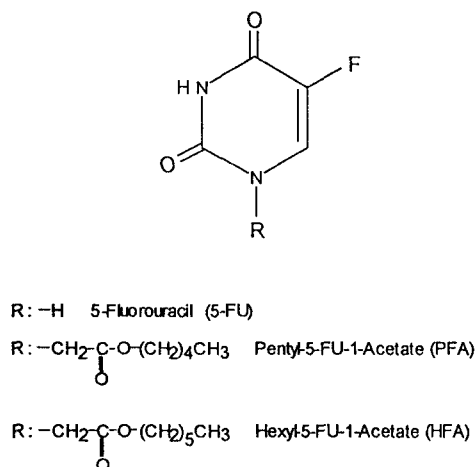


Figure 2—Structure of 5-fluorouracil and its prodrugs.

Table I—Physical Properties of 5-Fluorouracil and its Prodrugs

Name	M. W.	Solubility <sup>a</sup>	$P_{\text{CHCl}_3}$ <sup>b</sup>	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$
5-FU	130.08	<12.7	0.01	275
PFA <sup>c</sup>	258.15	<0.7	14.6	282
HFA <sup>d</sup>	272.18	<0.08	31.99	282

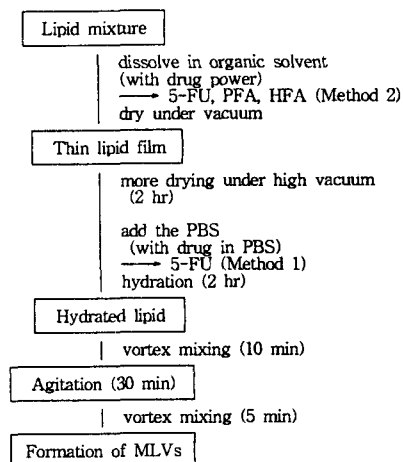
<sup>a</sup>Solubility in PBS (pH 7.4), mg/ml.

<sup>b</sup>Apparent partition coefficient between chloroform and pH 7.4 PBS.

<sup>c</sup>pentyl-5-FU-1-acetate. <sup>d</sup>hexyl-5-FU-1-acetate.

ameter 20–80  $\mu\text{m}$ ), dialysis sack (MWCO 12,000), benzoylated dialysis sack (MWCO 2,000), trehalose, Dowex-50W (Dowex 50W X4-100, hydrogen form)은 Sigma사로부터 구입하였고 기타 시약은 모두 일급 및 특급을 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 rotary evaporator (Büchi Rotavapor R110, Switzerland), high vacuum pump (Vacuum pump DD-40, precision scientific, USA), vortex mixer (Model 1801, Dong Yang Scientific Co., Korea), biomixer (Ultra Turrax T 25, Original Ika Co., Japan), fast flow liquid chromatography (FFLC No. 540 FMI-C, Yamazen Co., Japan), UV/vis 흡광도측정기 (Uvikon 860, Kontron Instruments Co., Zurich, Switzerland), 원심분리기 (Beckman XL-90, Beckman Instrument, Inc., USA), 항온진탕기 (KMC-8480S, Vision Scientific Co. Ltd., Korea), 초원심분리기 (Cavitator, Mettler Electronics Co., USA), 마이



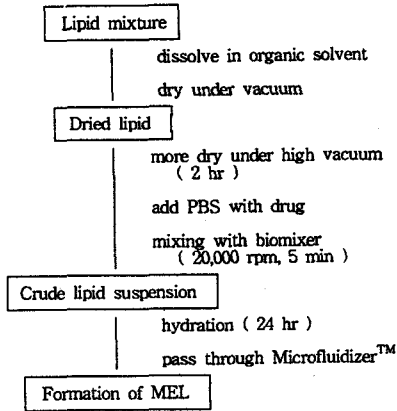
Scheme I—Preparation of multilamellar vesicles (MLVs).

크로플루다이저 (Microfluidizer<sup>TM</sup> 110Y, Microfluidics Co., Massachusetts, USA), laser light scattering (He-Ne laser Model 127, Lelax Laser, Inc., Analysis Software: BI-8000AT Digital Correlator), microcentrifuge (Beckman Microfuge ETM, Beckman Instrument, Inc., USA), 동결건조기 (Christ Alpha 1-4, LarbomensExport, Germany) 등이다.

### 리포솜의 제조

MLV의 제조—리포솜 제조에 사용된 5-FU의 농도는 0.0125 M과 0.05 M이었으며 PFA와 HFA는 0.025 M로 고정하였고 지질의 조성은 PC를 50, 100, 150 및 200  $\mu\text{mol/ml}$ 로 하고 CH는 몰비율(mol%)로 변화시켜 제조하였다. 또한 한전 물질로서 DCP와 SA를 PC에 대하여 각각 5, 10 및 20 mol% 되도록 첨가하여 봉입율에 미치는 영향을 검토하였으며 항산화제로 TA를 PC에 대해 1 mol% 되도록 첨가하였다. 리포솜은 Scheme I과 같이 두가지 제법에 의하여 제조하였다.

첫째, Bangham 등<sup>11)</sup>의 방법에 따라 1 l 용량의 등근 플라스크에 지질들을 조성에 따라 칭량하여 클로로포름과 메탄올 혼합액(1:1 v/v%) 20 ml에 녹인 후, 감압하에서(45°C, 700 mbar) 천천히 증류하여 유기용매를 제거한 후 고진공으로 2시간동안 더 건조하여 플라스크의 내벽에 지질 박막을 만들었다. 건조가 완료되면 약물이 녹아있는 PBS 용액 10 ml를 가하여 2시간동안 수화시켜 vortex mixer로 10분동안 진탕한 후 30분동안 방치하고 다시 5분동안 vortexing하여



Scheme II — Preparation of microemulsified liposomes.

MLV를 제조하였다(제법 1).

둘째, 약물과 지질혼합물을 유기용매 혼액에 같이 용해시켜 얇은 지질막을 형성시킨 후 제법 1과 동일한 조작으로 수화시켜 MLV를 제조하였다(제법 2).

**Microemulsified Liposome(MEL)의 제조<sup>14)</sup>**—Scheme I과 같은 동일한 방법으로 지질막을 제조하여 0.05 M의 농도로 5-FU를 용해시킨 PBS 용액 100 ml를 가하여 손으로 흔들어서 수화시킨 후 이를 biomixer를 이용하여 20,000 rpm으로 5분동안 격렬히 혼합하여 MLV를 제조하였다. 제조된 MLV를 다시 24시간동안 방치한 후 80 ml의 현탁액을 취하여 내부압력 8,000 p.s.i., 유속 300 ml/min, 순환시간 10분의 조건으로 마이크로플루이디저로 40회 반복하여 처리했다.(Scheme II)

#### 봉입되지 않은 약물의 분리

리포솜에 봉입되지 않은 약물은 Dowex 수지(sodium form)를 사용하여 분리하였다. 먼저 5-FU에 대한 Dowex의 분리능을 알아보기 위해 약물이 함유된 PBS 완충액을 1 ml씩 취해 Dowex 수지를 습윤 상태의 중량으로 1, 2, 3, 4, 5 및 6 g씩 가한 후 5분간 가볍게 흔들어 혼합이 되도록 하고 여과지로 여과하여 Dowex를 제거한 다음 여액에 남은 5-FU의 양을 UV로 정량하였다. 여기서 나온 결과를 바탕으로 리포솜 현탁액 1 ml당 4 g의 Dowex 수지를 가한 후 위와 같은 방법으로 처리하여 봉입되지 않은 약물을 제거하였다.

#### 리포솜의 동결 건조 및 재분산

동결중에 일어날 수 있는 리포솜의 응집과 융합을 방지하기 위한 cryoprotectant로서 trehalose를 지질양에 대해 중량비로 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 및 5:1이 되도록 약물

이 녹아 있는 PBS 용액에 가하여 MLV, MEL을 제조하고 MLV의 일부는 20분 동안 bath sonicator로 초음파 처리하여 sonicated vesicle을 제조한 다음 봉입되지 않은 약물은 Dowex 수지를 이용하여 분리하였다. 얻어진 리포솜 현탁액 1 ml를 취하여 동결 건조한 후 이를 1 ml의 PBS 용액으로 재분산시켰다. 동결건조 전과 동결건조하여 재분산시킨 후의 봉입율의 변화를 관찰하고 가시광선 파장(540 nm)에서 광선의 투과된 양(%T)으로 탁도(turbidity)를 측정하였다.

#### 봉입율의 측정

리포솜에 봉입된 각 약물의 양은 Sephadex G-50을 충전물로 하는 겔크로마토그래픽법을 응용하였다. 이 때 Sephadex G-50은 이동상으로 사용되는 PBS 용액에 넣고 실온에서 5시간 동안 수화시킨 후 다시 24시간 동안 냉장고에 방치하여 사용하였다. 제조된 MLV와 MEL 현탁액을 각각 1 ml씩 취하여 3 ml의 PBS 용액을 가하여 희석한 후, microcentrifuge(4,000 rpm, 10분)와 초원심분리기(4°C, 18,000 rpm, 40분)로 원심분리하여 얻어진 상정액 0.3 ml를 Fast Flow Liquid Chromatography에 주입하여 유속은 4 ml/min, 압력은 1.5 kg/cm<sup>2</sup>의 조건으로 피크를 분리하였다. 이 때 5-FU의 농도가 0.0125 M로 제조한 리포솜의 경우 200, 250, 400 및 800 µg/ml 농도의 표준용액을 제조하여 0.3 ml씩 주입하여 얻어진 피크 면적으로 작성된 검량선 식에(r=0.99998~0.99999) 피크 넓이를 대입하여 정량하였다. 또한 400, 800 및 1600 µg/ml 농도의 5-FU 표준액과 150, 200, 250, 400 및 800 µg/ml 농도의 PFA와 HFA 표준액을 제조하여 약물의 유출액 30 ml를 받아 이를 각각 흡수극대 파장인 275 nm(5-FU)와 282 nm(PFA, HFA)에서 흡광치를 측정하여 검량선을 작성하였으며 표준액과 같은 조작으로 얻어진 0.05 M로 제조한 리포솜의 흡광도를 검량선 식에 대입하여 정량하였다. 리포솜에 봉입된 약물의 봉입효율을 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{봉입율}(\%) = \frac{\text{총약물량} - \text{리포솜에 봉입되지 않은 약물량}}{\text{총약물량}} \times 100$$

#### 입자 크기 및 분포 측정

제조한 각각의 리포솜에 대한 입자 크기와 분포는 동적광산란(dynamic light scattering)기법을 이용해

측정하였다. 먼저 리포솜 현탁액을 vortex mixer를 이용해 잘 혼합하고 리포솜 입자에 의한 레이저 광선의 산란이 유효한 범위로 유지되도록 하기 위해 일정량을 취하여 50배로 희석하였다. 이 때 사용한 광원은 He-Ne laser, 측정 파장은 632.8 nm, 온도는 25°C로 일정하게 유지되도록 하였고 pin hole size는 100으로 하였다. 산란 각도는 빛의 흔들림이나 시료내의 불순물 등에 의해 영향을 가장 적게 받는 90°로 설정하였다. 이러한 조건으로 측정한 결과의 분석은 Brook Haben사의 BI-8000AT digital correlator 프로그램을 이용하였다.

### 약물 방출 실험

제조한 리포솜의 방출 실험은 활성화시킨 dialysis sack(MWCO 12,000)에 리포솜 현탁액 1 ml를 넣고 199 ml의 PBS를 방출 용매로 하여 항온진탕기에서 37°C, 100 rpm의 조건으로 실시하였으며 1, 2, 4, 6, 8, 18 그리고 24 시간마다 3 ml의 방출액을 취하여 5-FU 및 PFA와 HFA를 각각 275 nm와 282 nm에서 흡광도를 측정하였다. 리포솜으로부터 약물의 방출에 미치는 혈장 영향을 검토하기 위해 사람 혈장(Type O)을 50 % (v/v)가 되도록 가하여 방출 실험을 행하였으며 지용성 프로드럭의 경우는 가수 분해의 영향을 검토하고자 랫트의 간 호모지네이트를 50 % (v/v) 되도록 가한 후 같은 조건에서 실시하였다. 이때 혈장 및 간 호모지네이트로부터 약물 이외의 성분이 흡광치에 미치는 영향을 최소화 하기 위해 benzoylated dialysis sack(MWCO 2,000)을 사용하였다.

이 때 각 약물에 대한 용출 검량선은 약물의 농도가 2, 4, 6, 8 그리고 16 µg/ml이 되도록 표준액을 제조한 후 흡수 극대 파장인 275와 282 nm에서 흡광도를 측정한 다음 최소자승법을 이용하여 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### 5-FU 리포솜의 제조 특성

형성된 박막을 수화시키는 방법은 PBS를 가한 후 상온, 상압의 조건으로 회전증발농축기를 사용하여 회전시키면서 플라스크 내벽의 지질 박막이 고르게 떨어지도록 하는 방법을 사용했으므로 glass bead를 사용하지 않고도 지질 박막을 잘 수화시킬 수 있었으나 지질농도가 400 µmol/ml 이상이 되면 점도가 높아 제조가 용이하지 않았다. 지질 농도가 낮은 리포솜에서는 별다른 영향을 미치지 않았으나 지질 농도가 200 µmol/ml인 경

우에 10과 20 mol% 첨가했을 때 크림상이 되어 제조가 곤란했으나 5 mol%인 경우에는 제조가 가능했다. 또한 지질 농도를 300 µmol/ml인 경우 20 mol%일 때 크림상이 되어 지질 박막을 수화시킬 때 glass bead를 넣어 주었으나 5와 10 mol%인 경우는 크림상이 되지 않아 제조가 용이하였다. Mayhew 등<sup>14)</sup>에 따르면 지질 전체의 농도가 300 µmol/ml 이상인 경우는 지질 농도가 너무 높아 hydration method에 의해 MLV를 제조할 수 없다고 하였으나 위와 같이 만든 것은 400 µmol/ml까지 제조할 수 있었다.

DCP나 SA의 농도가 지질에 대해 20 mol%가 되면 리포솜의 침전이 일어나 수상과 분리되는 현상이 일어났고 지질 온도가 높은 경우는 이러한 현상이 더 빠르게 일어났으므로 고농도로 지질을 사용할 경우 지질막에 전하를 주는 물질의 첨가는 10 mol%은 적합하지 않았다.

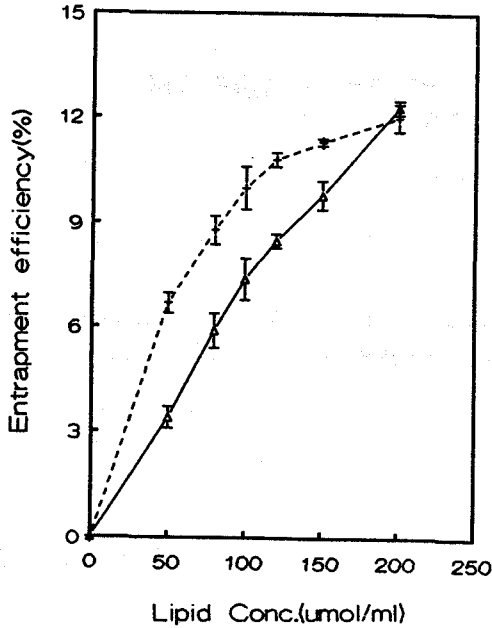
마이크로플루다이저를 사용하는 과정에서 지질현탁액의 점도나 지질 농도에 따라 압력이 변하는데 지질의 농도가 증가할수록 유속이 느려지면서 압력이 10,000 p.s.i. 이상으로 증가하였다. 그러나 약 2분 정도 통과하게 되면 리포솜의 입자 크기가 감소하면서 압력이 떨어지고 유속도 원래의 상태로 돌아오는 현상을 보였다.

지질 농도를 150 µmol/ml로 하고 이에 대하여 DCP 및 SA를 5, 10, 20 mol%이 되도록 첨가하여 MLV를 제조할 때에는 10 mol%의 농도까지만 가능했으나 마이크로플루다이저는 모든 농도에서 제조가 가능했다. 또한 지질 농도를 400 µmol/ml로 한 경우도 제조가 용이하였다. 그러나 DCP와 SA의 농도가 20 mol%인 MEL의 경우는 MLV와 마찬가지로 리포솜의 응집 현상이 신속히 일어나 대부분이 수상과 분리되어 침전된 상태로 존재하였다.

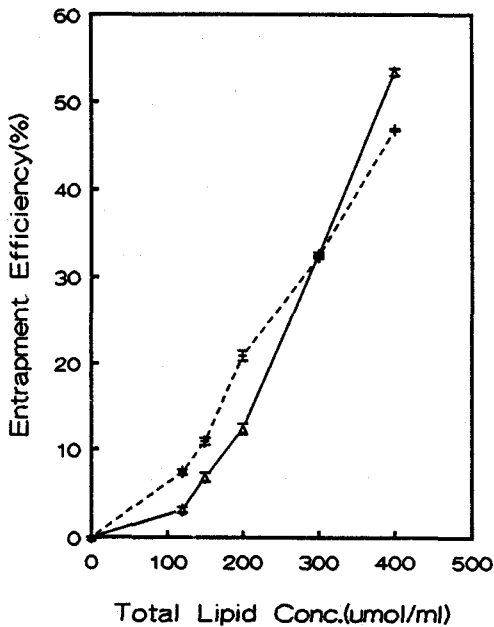
### 봉입효율

Fig. 3은 5-FU를 봉입시킨 MLV에 대한 제법과 지질의 농도에 따른 봉입율의 변화를 나타낸 것으로 제법 1에 비하여 제법 2에서 높은 봉입율을 보여 주고 있다. 이러한 결과는 낮은 지질 농도에서는 지질에 대한 수상의 비율이 커지게 되므로 약물이 수상에 녹아 있는 경우(제법 1)보다 지질과 함께 박막을 형성하고 있는 경우(제법 2)가 지질과의 접촉 기회가 더 많게 되어 봉입율이 증가되지만 지질양이 늘어날수록 이러한 차이는 크게 나타나지 않아 200 µmol/ml 이상에서는 봉입율은 별다른 차이가 없는 것으로 생각된다.

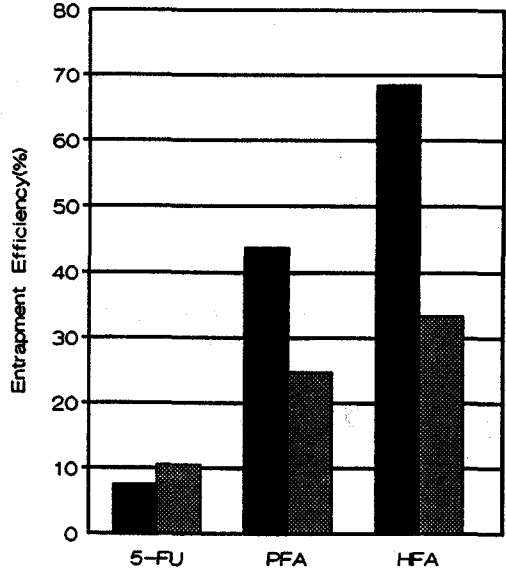
Fig. 4는 마이크로플루다이저를 사용해 만든 MEL의 봉입율 변화를 나타낸 것으로 지질 농도가 300



**Figure 3**—The effect of the liposome preparation method on the entrapment efficiency of 5-fluorouracil into multilamellar vesicles.  
Key : Δ: Method 1, +: Method 2



**Figure 4**—The effect of total lipid concentration on the entrapment efficiency of 5-fluorouracil into multilamellar vesicles (MLVs) and microemulsified liposomes (MELs).  
Key : Δ: MLVs, +: MELs

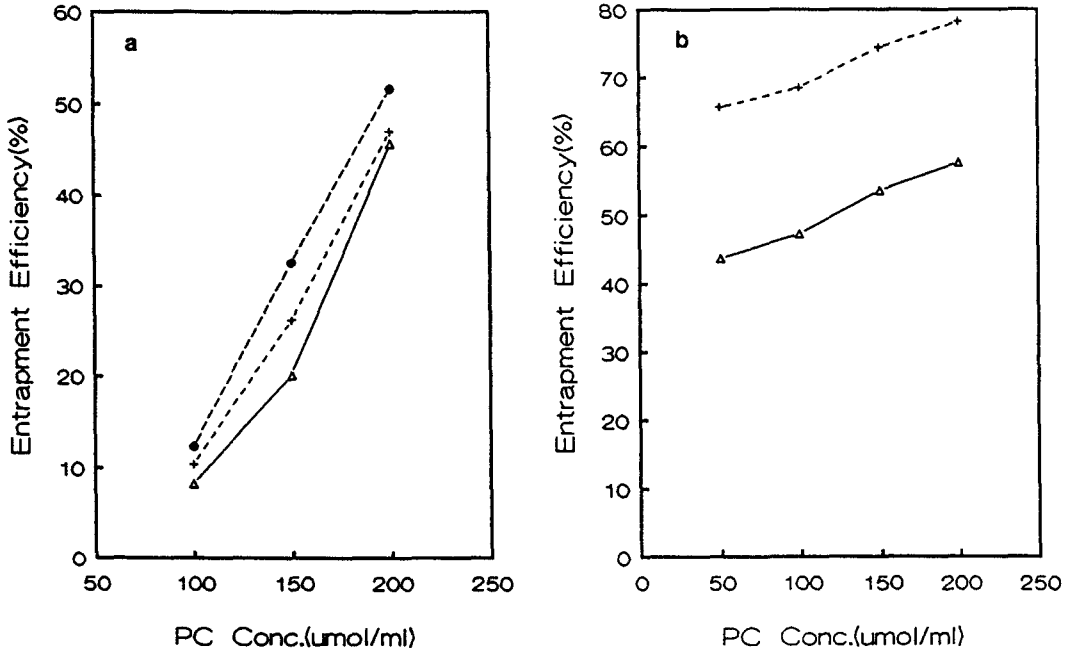


**Figure 5**—The effect of drugs on the entrapment efficiency of multilamellar vesicles (MELs). Phosphatidylcholine concentration is 100 μmol/ml.  
Key : ■: MLV, □: MEL

μmol/ml까지는 MLV에 비해 비교적 봉입율이 높게 나타났으나 그 이상에서는 MEL보다 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 MLV에 비해 MEL의 입자 크기가 훨씬 작으므로 내부 수상의 부피가 작아지기 때문이라 생각된다.

Fig. 5는 지용성이 증가된 프로드럭의 경우는 유수 분배계수가 높은 HFA가 PFA에 비하여 동일한 지질 농도에서 높은 봉입율을 나타낸다. 이는 내부 수상의 부피가 같을지라도 약물 자체의 지용성 성질이 클수록 지질막 사이에 끼어들어가 봉입되는 양이 증가하기 때문이다. 즉 지질 농도가 100 μmol/ml일 때 PFA의 경우 MLV의 봉입율은 47.4%이었으나 MEL의 봉입율은 24.7%로 저하 되었다. HFA의 경우도 동일한 지질 농도에서 MLV의 봉입율은 68.5%이었으나 MEL의 경우는 33.6%로 나타났다. 그러나 동일한 지질 농도에서 5-FU의 봉입율인 10.5%보다는 높은 봉입율을 나타내었다.

Fig. 6은 지질 농도에 따른 봉입효율의 변화를 나타낸 것으로 사용한 지질 농도가 높을수록 봉입율은 높아졌다. 즉 5-FU의 경우 지질 농도가 100 μmol/ml에서 200 μmol/ml로 높아짐에 따라 큰 비율로 봉입율이 증가했으나(Fig. 6-a)지용성이 큰 프로드럭의 경우는 봉입율의 증가율이 비교적 작게 나타났었다(Fig. 6-b). 일반



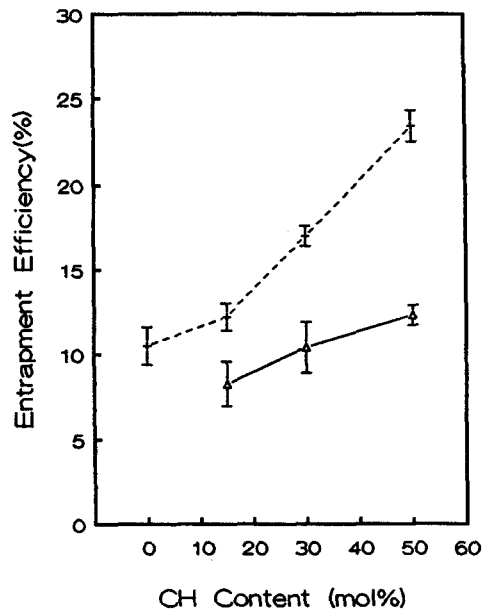
**Figure 6**—(a) The effect of the total lipid concentration on the entrapment efficiency of 5-fluorouracil multilamellar vesicles.  
 Key :  $\Delta$ : CH 15 mol%, +: CH 30 mol%,  $\bullet$ : CH 50 mol%  
 (b) The effect of phosphatidylcholine concentration on the entrapment efficiency of pentyl-5-FU-1-Acetate(PFA) and hexyl-5-FU-1-acetate (HFA) into multilamellar vesicles.  
 Key :  $\Delta$ : PFA, +: HFA

적으로 지용성 약물을 리포솜에 봉입시킬 때 사용한 지질과 약물의 비율이 봉입율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 약물대 지질의 비율을 1:4에서 1:8까지 높여서 실험한 결과 봉입율의 큰 증가는 관찰되지 않았다.

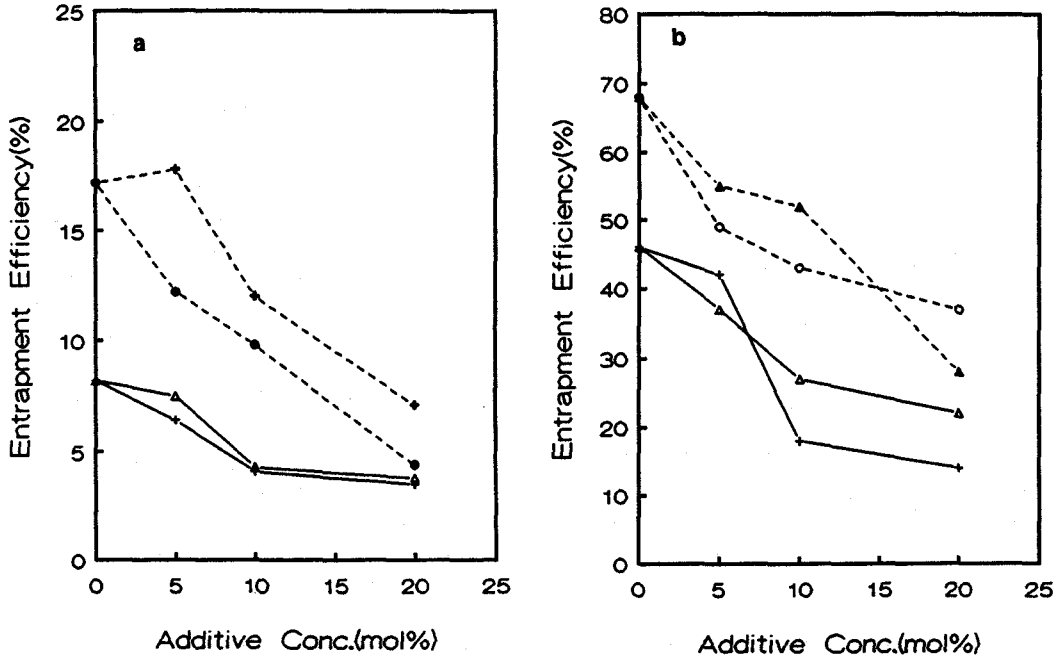
또한 PC의 농도를 100, 150, 200  $\mu\text{mol/ml}$ 로 하고 이에 대하여 콜레스테롤을 15, 30, 50 mol%로 첨가하였을 때 첨가된 양이 증가할수록 봉입율은 증가하는 것으로 나타났다.

Fig. 7에서 보면 콜레스테롤의 양이 증가할수록 MEL은 매우 높게 봉입율이 증가했으나 MLV는 큰 증가가 없었다.

Fig. 8은 전하 물질인 DCP와 SA가 봉입율에 미치는 영향을 검토한 것으로 PC와 콜레스테롤의 농도를 각각 150  $\mu\text{mol/ml}$ 로 하고 이에 대하여 DCP의 양을 5, 10, 20 mol%로 첨가하였을 때 MLV의 경우 DCP양에 따른 봉입율이 5 mol%까지는 봉입율이 거의 변하지 않았으나 그 이상에서는 오히려 봉입율이 감소하는 경향을 보였다. 또한 SA를 첨가한 경우는 전반적으로 봉입율이 감소하였다. MEL의 경우도 MLV와 비슷한 양상을 보였는데 Fig. 8-a에서 보는 바와 같이 지질 농



**Figure 7**—The effect of cholesterol concentration on the entrapment efficiency of 5-fluorouracil into multilamellar vesicle(MLV) and microemulsified liposome(MEL). Phosphatidylcholine Concentration is 100  $\mu\text{mol/ml}$ .  
 Key :  $\Delta$ : MLV, +: MEL



**Figure 8**— (a) The effect of dicetylphosphate(DCP) and stearylamine(SA) content on the entrapment efficiency of 5-fluorouracil into multilamellar vesicles(MLVs) and microemulsified liposomes(MELs). Key : solidline: MLV, △: dcp, +: SA, dotted line: MEL, ○: DCP, ●: SA (b) The effect of DCP and SA content on the entrapment efficiency of pentyl-5-FU-1-acetate(PFA) and hexyl-5-FU-1-acetate(HFA) MLVs. Key : solidline: PFA, +: DCP △: SA, dottedline: ○: DCP, ▲: SA

도에 대한 DCP의 함량이 5 mol%까지는 봉입율이 증가하였으나 SA를 첨가하면 모두 큰 폭으로 감소하는 현상을 보였다. 한편 PEA와 HFA의 경우도 Fig. 8-b에 나타난 바와 같이 이들을 첨가했을 때 전반적으로 봉입율이 감소하는 것으로 나타났다.

**입자 크기 및 분포**

MEL 및 MLA의 입자 크기를 측정한 결과 대부분이 단분산이 아닌 이분산을 나타내었다. 이분산으로 나타난 경우 입자의 평균 크기는 큰 의미를 지니지 않으나 여기서는 입자의 평균크기로서 비교하였으며 첨가제의 종류에 관계없이 전반적으로 첨가제의 양이 증가할수록 크기가 증가하였다.

Table II는 콜레스테롤의 함량에 따른 MLV와 MEL의 입자 크기 및 분포를 나타낸 것인데 MLV의 경우는 평균 크기가 1,000 nm를 넘고 입자 크기 분포도 넓었으며 콜레스테롤에 의한 입자 크기의 변화가 크게 나타나지 않았으나 MEL의 경우는 입자크기도 작고 균일하였으며 콜레스테롤의 함량이 높아질수록 입자 분포는 큰 변함없이 입자 크기가 증가하였다. 이

**Table II**— The Size Distribution and Mean Particle Size of 5-Fluorouracil Entrapped Liposome Preparation Method and Cholesterol Content

Liposome	CH	Mean	Size dist.	P. I. <sup>1</sup>
MLV <sup>b</sup>	15	1339	154~	2
	30	1485	2388	2
	50	1687	65~5562	2
MEL <sup>c</sup>	15	89	18~217	2
	30	97	33~271	2
	50	133	22~240	2

<sup>a</sup>All Type of Liposomes Were Made from Phosphatidylcholine 100 μmol/ml only.

<sup>b</sup>multilamellar vesicle prepared by hydration method.

<sup>c</sup>microemulsified liposome prepared by Microfluidizer<sup>TM</sup>.

<sup>d</sup>cholesterol content, mol% of phosphatidylcholine concentration, <sup>e</sup>nm, <sup>f</sup>polydispersity index (1:monodisperse, 2:bidisperse).

결과로부터 Crowe 등<sup>10)</sup>이 제시한 바와 같이 MEL의 입자 대부분은 리포솜의 동결 건조에 적당한 크기 분포인 50~200 nm 범위에 있었다. 또한 Table III은



**Table III**—The Size Distribution and Mean Particle Size of 5-Fluorouracil and its Derivatives Entrapped Microemulsified Liposomes (MELs)<sup>a</sup>

Entrapped Drug	Mean size <sup>e</sup>	Size dist. <sup>e</sup>	P. I. <sup>f</sup>
5-FU <sup>b</sup>	101	14~253	2
PFA <sup>c</sup>	109	30~257	2
HFA <sup>d</sup>	97	8~257	2

<sup>a</sup>Phosphatidylcholine Concentration is 100 μmol/ml,

<sup>b</sup>5-fluorouracil, <sup>c</sup>pentyl-5-FU-1-acetate,

<sup>d</sup>hexyl-5-FU-1-acetate

MEL이 봉입된 약물의 종류나 지용성 정도의 차이에 관계없이 입자 크기와 분포가 비슷한 결과를 나타낸다. 이러한 결과로부터 지용성이 강한 PFA와 MEL에 봉입시켰을 때 봉입율이 저하된 현상이 입자 크기의 감소에 의한 것임을 알 수 있다.

Table IV는 DCP와 SA를 첨가했을 때 입자크기와 분포를 나타낸 것으로 DCP와 SA를 첨가했을 때 입자 크기가 증가되었고 동일량에서 DCP보다는 SA에서 크게 증가되었으며 첨가량이 많을수록 이러한 경향은 크게 나타났다. 일반적으로 지질막에 하전을 주는 물질을 첨가하면 지질막에 끼어 막 사이에 동일한 전하의 반발력을 일으켜 입자 크기를 증가시키는 것으로

**Table IV**—The Distribution and Mean Particle Size of 5-Fluorouracil Entrapped Microemulsified Liposomes (MELs)<sup>a</sup> by Dicytylphosphate and Stearylamine Content

	Mean size <sup>e</sup>	Size dist. <sup>e</sup>	P. I. <sup>f</sup>
DCP <sup>b</sup> content <sup>d</sup>			
0	119	34~252	1
5	141	73~194	1
10	172	115~303	1
20	229	73~1201	2
SA <sup>c</sup> content			
0	119	34~252	1
5	138	27~237	2
10	246	39~412	2
20	875	689~1092	1

<sup>a</sup>Phosphatidylcholine Concentration is 150 μmol/ml,

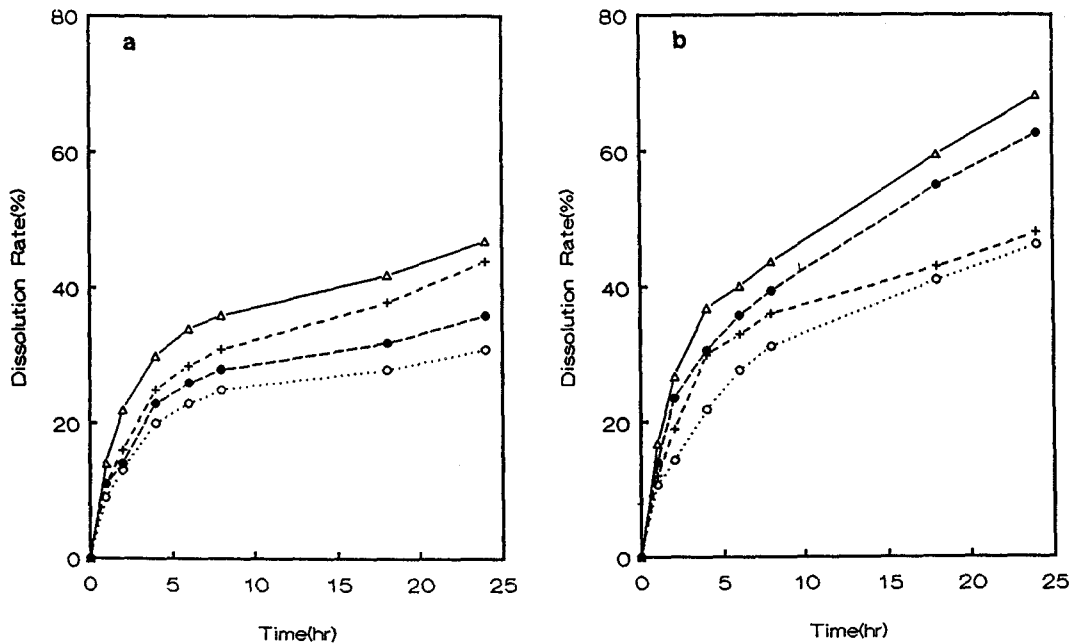
<sup>b</sup>dicytylphosphate, <sup>c</sup>stearylamine, <sup>d</sup>mol%, <sup>e</sup>nm,

<sup>f</sup>polydispersity index (1:monodisperse, 2:bidisperse).

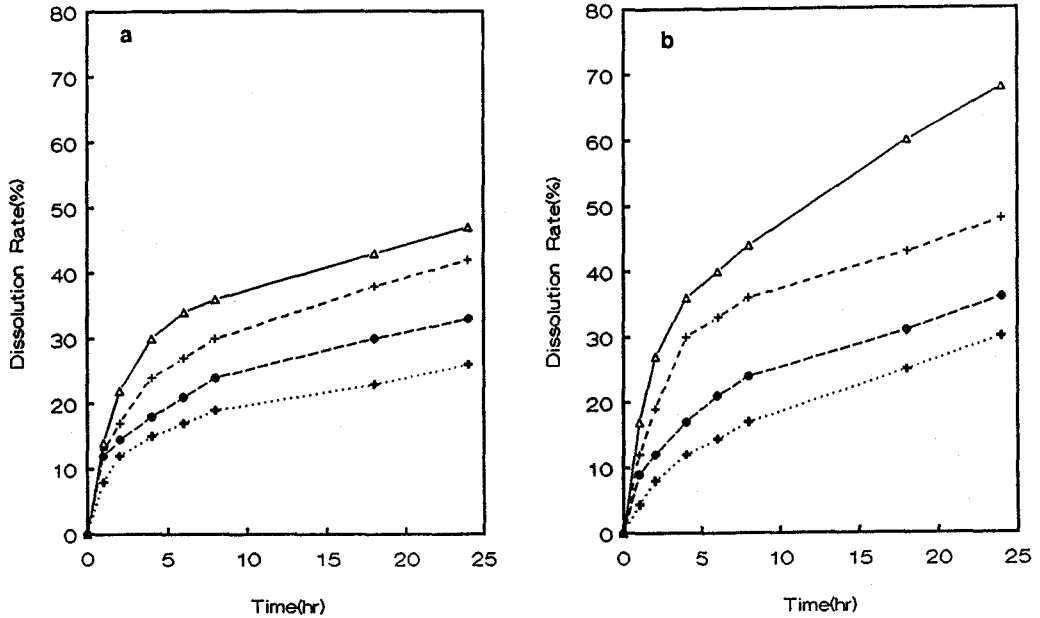
알려져 있는데 이상의 결과로부터 음의 하전을 띠는 리포솜보다 양의 하전을 띤 리포솜의 경우 이러한 현상이 더 크게 일어난 것으로 보인다.

**지질 및 첨가제에 따른 방출 거동**

Fig. 9는 5-FU를 봉입한 MLV와 MEL의 첨가제에



**Figure 9**—Release of 5-fluorouracil from multilamellar vesicles(a) and microemulsified liposomes(b) with cholesterol (CH), dicytylphosphate (DCP) and stearylamine(SA). Phosphatidylcholine concentration is 150 μmol/ml. Key : Δ: PC only, +: CH 50 mol%, ●: DCP 10 mol%, ○: SA 10 mol%



**Figure 10**—Release of 5-fluorouracil from multilamellar vesicles(a) and microemulsified liposomes(b) with different amount of cholesterol(CH). Phosphatidylcholine(PC) concentration is 150  $\mu$ mol/ml. Key :  $\Delta$ : PC only, + (- -): CH 15 mol%,  $\bullet$ : CH 30 mol%, + ( $\cdots$ ): CH 50 mol%

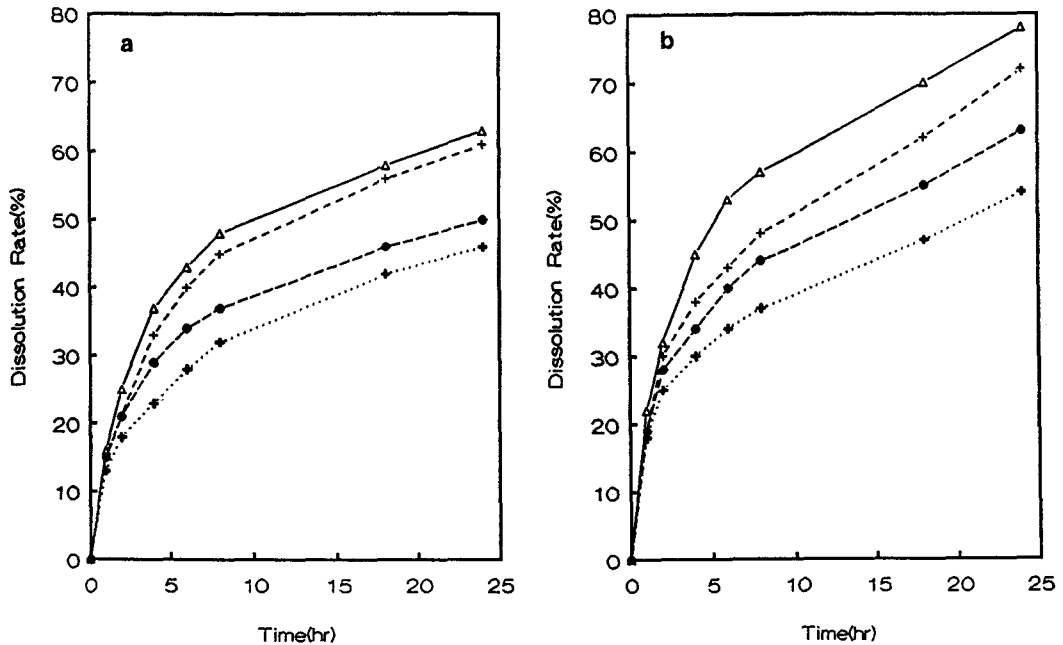
다른 방출을 나타낸 것으로 MEL의 방출 속도가 MLV보다 빠르게 나타났는데 Mayhew 등<sup>14)</sup>이 제시한 바와 같이 MEL은 입자 크기가 작아 표면적이 증가하므로 상대적인 방출 속도의 증가를 보인 것으로 생각된다. 또한 두가지 리포솜 모두 첨가제에 의해 모두 방출속도가 감소되었다. 5-FU는 pH 7.4에서 약간 해리하고 대부분은 비전해질로 존재하므로 지질막의 표면 전하에 따른 방출 속도에 큰 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.<sup>1)</sup>

또한 지질에 대한 콜레스테롤의 비율을 달리하여 제조한 5-FU 리포솜의 방출 양상을 Fig. 10에 나타내었으며 Fig. 10-a는 MLV의 경우로 콜레스테롤의 첨가량이 30 mol%에서 50 mol%로 증가함에 따라 방출 속도가 감소한다. 이러한 경향은 MEL에서도 동일하며 MEL이 MLV보다 방출 속도가 빠르다(Fig. 10-b). 이러한 현상에 대하여 Ganapathi 등<sup>16)</sup>은 콜레스테롤이 지질막을 이루는 인지질의 탄화수소 사슬의 회전 자유도를 감소시켜 지질막을 견고하게 만들고 상전이가 억제되므로 액물의 방출이 느려진다고 하였다.

Fig. 11은 5-FU를 봉입한 MLV와 MEL에 50% (v/v)의 혈장을 가했을때의 방출을 나타낸 것으로 혈장이 첨가되면 MLV와 MEL 모두 방출 속도가 증가하는 경향을 나타냈으며 콜레스테롤의 첨가량에 따라

큰 변화는 나타내지 않았다. Senior 등<sup>17)</sup>은 혈장이 포함되면 콜레스테롤의 양이 증가할 때 방출 속도가 달라져 낮은 비율로 첨가 되었을 경우 봉입된 약물의 방출속도가 빠르게 일어나고 그 비율이 높아지기에 따라 방출 속도는 느려진다고 보고하였는데, 이 경우는 15 mol%로 첨가되었을때 오히려 콜레스테롤이 첨가되지 않은 경우보다 방출 속도가 빠르게 나타났다. 또한 Stephen 등<sup>18)</sup>은 5-FU가 양친성 물질이므로 수상이나 지질에 모두 잘 녹게 되어 방출이 빠르게 일어났다고 하였으나 위의 결과는 좀 더 느린 방출 양상을 나타내었다. 이러한 차이는 사용한 지질 농도가 높아서 지질 막으로부터 약물의 방출이 느리게 일어났기 때문이라 생각된다.

일반적으로 혈장중에 존재하는 단백질이 리포솜막을 불안정하게 하여 약물의 방출을 증가시킨다고 알려져 있다. Ganapathi 등<sup>16)</sup>은 리포솜에 혈장 50%를 가하고 adriamycin의 방출 실험을 한 결과 혈장을 가하지 않은 경우보다 방출이 더 빠르게 일어난 것으로 보고 하였다. 또한 콜레스테롤의 양이 비례하여 초기의 방출 속도가 증가하였다. Senior 등<sup>17)</sup>은 carboxyfluorescein의 방출 속도를 실험한 결과 혈장이 없는 경우는 콜레스테롤의 양이 증가하면 방출 속도가 감소하는 반면 혈장 50%를 가하고 방출 실험을 한 결과 콜레스테



**Figure 11**—Release of 5-fluorouracil from multilamellar vesicles(a) and microemulsified liposome(b) with human serum (50%v/v). Phosphatidylcholine(PC) concentration is 150  $\mu$ mol/ml. Key :  $\Delta$ : PC only, +(- -): CH 15 mol%,  $\bullet$ : CH 30 mol%, +( $\cdots$ ): CH 50 mol%

률의 비율이 지질에 대해 1:0.2로 제조한 리포솜은 불안정하여 방출이 빠르게 일어났으나 1:0.5로 제조한 리포솜은 혈장의 영향을 적게 받아 느린 방출 속도를 나타냈다. Inoue<sup>15)</sup>는 콜레스테롤을 첨가하여 지질막의 유동성을 변화시키므로서 약물의 방출을 조절할 수 있다고 하였는데 20 mol%의 콜레스테롤이 첨가되면 온도에 따른 약물의 방출이 증가하는 반면 33 mol% 이상이 되면 온도에 따른 지질막의 약물 투과를 감소시킨다고 하였다.

또한 지용성이 증가된 프로드럭을 봉입시킨 MLV의 경우 방출 속도는 5-FU를 봉입시킨 리포솜 보다 느려졌다. 수용성이 큰 약물의 경우는 지질 성분이나 첨가된 콜레스테롤의 양에 따라 방출 양상이 달라지나 지용성 약물은 콜레스테롤의 영향을 거의 받지 않으며<sup>36)</sup> 유수분배계수에 반비례하는 양상을 나타내고 약물의 봉입에서와 마찬가지로 사용된 지질 종류에 따라 방출 속도가 달라진다고 하였다.<sup>19,20)</sup> 따라서 종류에 따라 5-FU의 프로드럭인 PFA와 HFA의 방출 속도는 유수분배계수가 더 큰 HFA가 PFA에 비해 다소 느린 방출 속도를 보였으며 첨가제의 종류에 관계없이 방출 속도는 증가하였다. 또한 5-FU와는 다르게 DCP나 SA를 첨가한 MLA의 초기 방출 속도가 더 큰 것으로 나타났

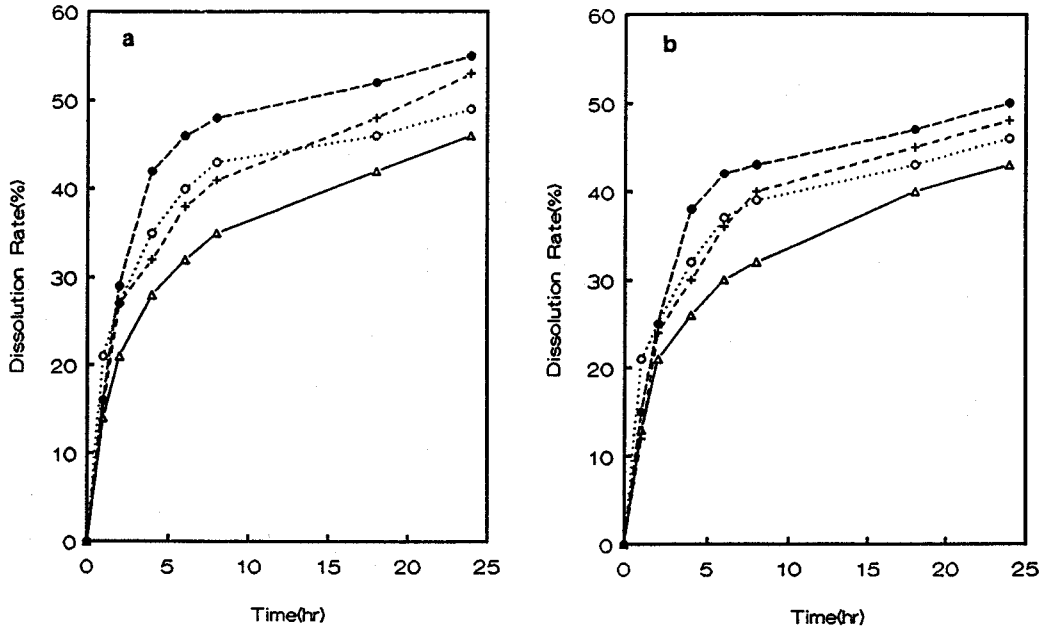
으며 10시간 이후에는 이들의 방출속도가 감소하는 것을 볼 수 있다(Fig. 12).

Fig. 13은 콜레스테롤의 첨가량에 따른 PFA와 HFA의 방출속도를 나타낸 것이다. Ganapathi 등<sup>16)</sup>이 제시한 바와 같이 방출속도는 콜레스테롤의 양에 따라 큰 영향을 받지 않았으며 방출 양상도 거의 비슷하게 나타났다. 여기에 혈장 50%를 가하고 방출실험한 결과를 Fig. 14에 나타내었는데 혈장이 첨가된 경우는 좀 더 빠른 방출양상을 보였으나 콜레스테롤의 양이 증가할수록 방출속도는 떨어지는 것을 볼 수 있다.

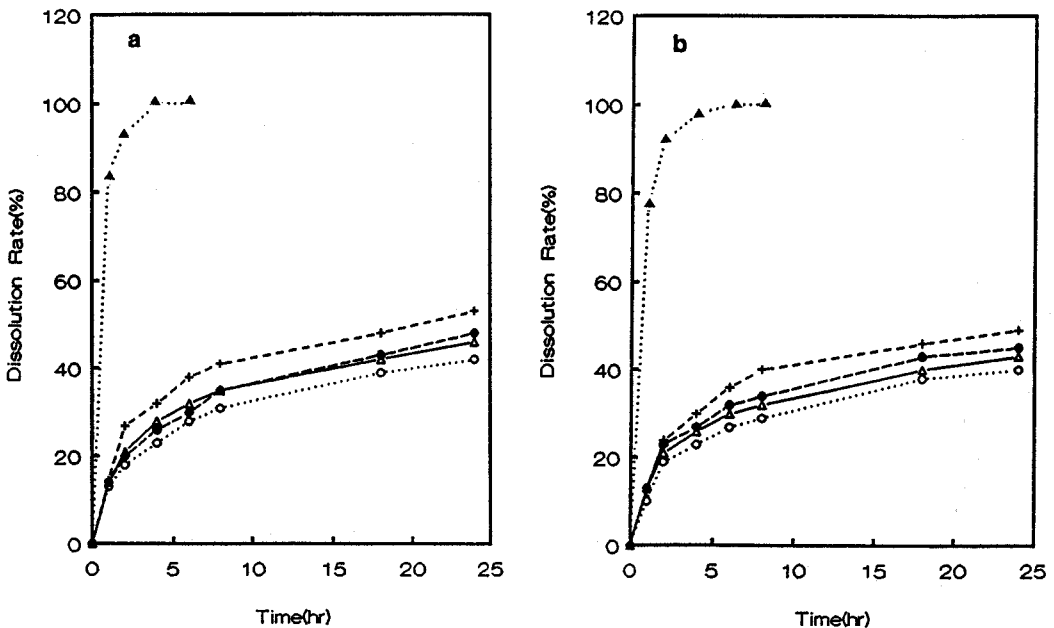
Fig. 15는 PFA와 HFA를 봉입한 MLV에 대해 50%의 랫트간 homeogenate를 가하고 방출 실험한 결과로서 두 약물 모두 지속적인 방출을 나타냈으며 콜레스테롤이 첨가된 경우는 방출 속도가 떨어지는 양상을 나타내며 약물의 유수분배계수의 영향을 받는 것을 알 수 있다.

**리포솜의 동결 건조**

지질에 대해 trehalose의 양을 중량비로 변화시켜 동결건조한 후 리포솜 안정화능을 평가한 결과 trehalose의 첨가량이 지질에 대해 중량비로서 2:1까지는 동결 건조 전후에 리포솜의 봉입률 및 입자 크기



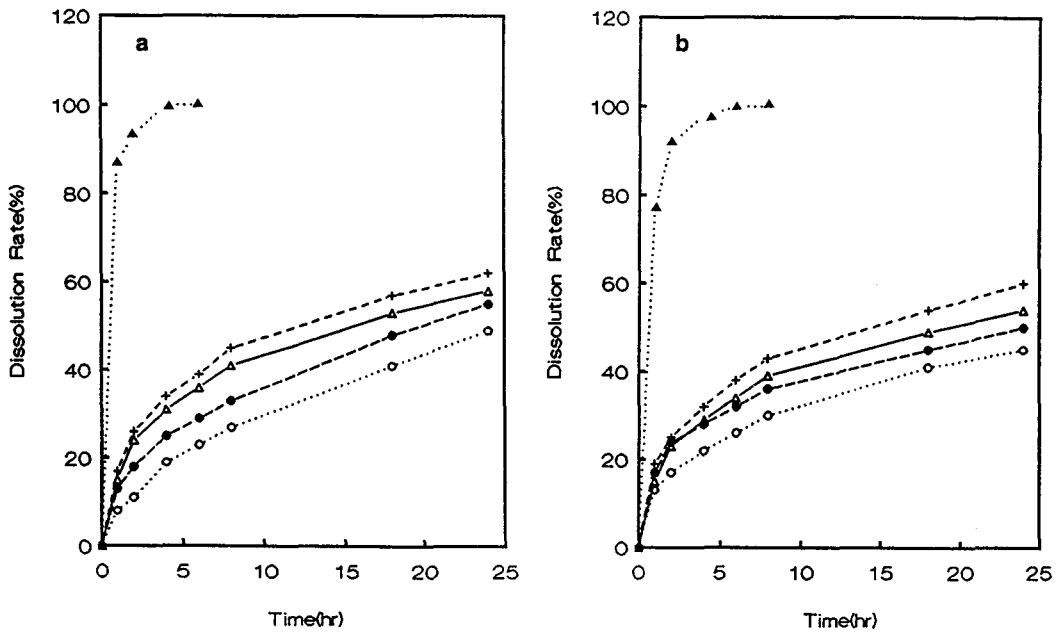
**Figure 12** -- Release of pentyl-5-FU-1-acetate(b) from multilamellar vesicles with cholesterol(CH), dicetylphosphate(DCP) and stearylamine(SA). Phosphatidylcholine(PC) concentration is 150  $\mu$ mol/ml.  
 Key :  $\Delta$ : PC only, +: CH 30 mol%,  $\bullet$ : DCP 10 mol/ml,  $\circ$ : SA 10 mol%



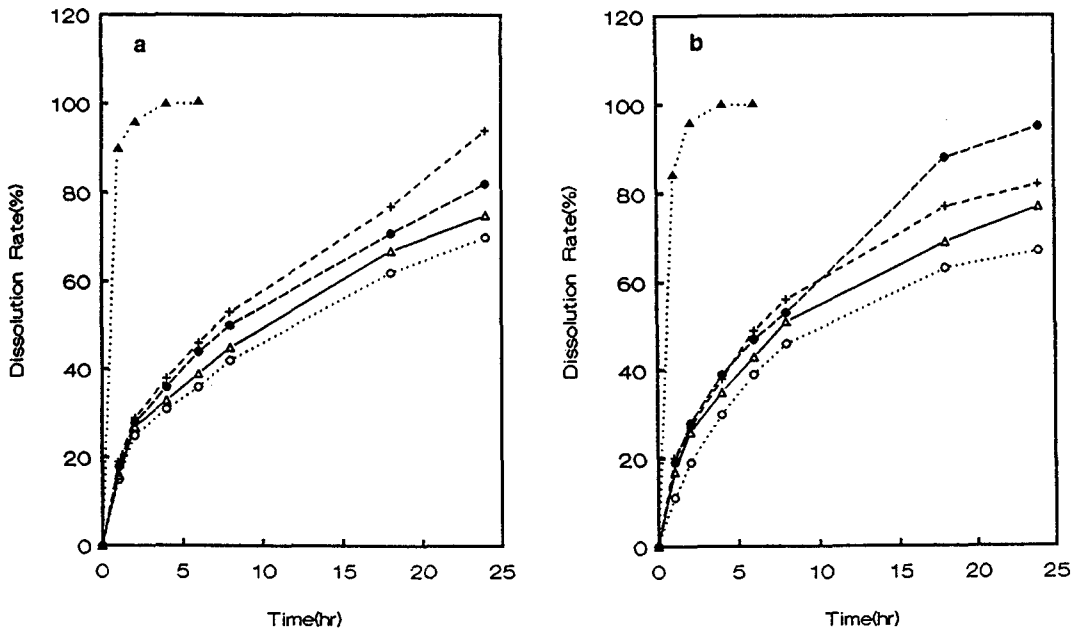
**Figure 13** -- Release of pentyl-5-FU-1-acetate(a) and hexyl-5-FU-acetate(b) from multilamellar vesicles with cholesterol. Phosphatidylcholine(PC) concentration is 100  $\mu$ mol/ml.  
 Key :  $\blacktriangle$ : Free drug,  $\Delta$ : PC only, +: CH 15 mol%,  $\bullet$ : CH 30 mol%,  $\circ$ : CH 50 mol%

가 크게 변하는 것으로 나타났다. 이에 비하여 4:1 이상이 되면 봉입율이 80%정도로 유지되는 것이 관찰되

었으므로 지질양에 대해 trehalose의 양을 4배 이상 넣어 주어야 동결 건조시 안정화제로서 역할을 할 수



**Figure 14**—Release of pentyl-5-FU-1-acetate(a) and hexyl-5-FU-1-acetate(b) from multilamellar vesicles with different with human serum (50%v/v). Phosphatidylcholine(PC) concentration is 100  $\mu$ mol/ml.  
Key : ▲: Free drug, △: PC only, +: CH 15 mol%, ●: CH 30 mol%, ○: CH 50 mol%



**Figure 15**—Release of pentyl-5-FU-1-acetate(a) and hexyl-5-FU-1-acetate(b) from multilamellar vesicles with rat liver homogenate(50%v/v). Phosphatidylcholine(PC) concentration is 100  $\mu$ mol/ml.  
Key : ▲: Free drug, △: PC only, +: CH 15 mol%, ●: CH 30 mol%, ○: CH 50 mol%

있음을 알 수 있었다.(Table V)

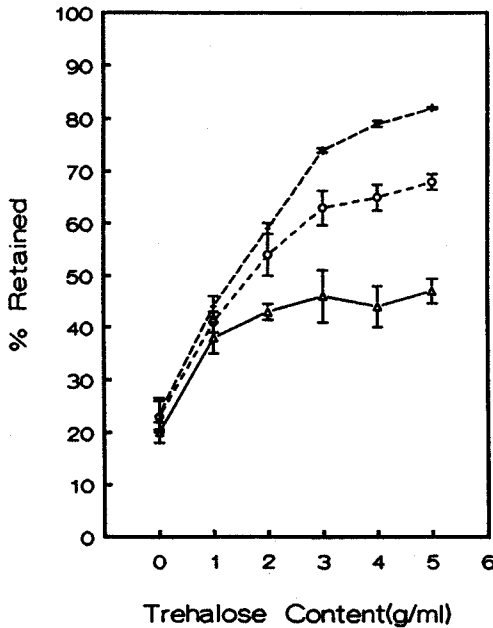
Fig. 16은 trehalose의 첨가량에 따라 동결 건조 후

에 각 리포솜의 봉입을 변화를 나타낸 것으로 입자 크기가 큰 MLV는 동결건조 후 재수화 시켰을 때 봉입을

**Table V**—Turbidity Changes(%T) of Freeze Dried 5-Fluorouracil Entrapped Multilamellar Vesicle(MLV), Sonicated MLV and Microemulsified Liposome(MEL) in the Presence of Trehalose

Trehalose content (mg/ml)	MLV <sup>a</sup>		sonicated vesicle <sup>a</sup>		MEL <sup>a</sup>	
	before	after	before	after	before	after
0	71.8±1.2	89.5±3.7	68.3±0.8	87.3±5.7	58.5±0.8	86.7±5.6
400	72.4±0.7	86.2±2.3	67.2±1.6	83.8±2.4	60.7±1.2	85.1±1.7
800	75.9±1.1	85.9±3.1	69.4±0.9	84.6±1.2	60.2±0.9	75.4±2.1
1200	78.6±1.3	86.7±2.5	70.5±1.2	80.4±1.7	62.5±1.1	68.8±1.5
1600	81.3±0.6	87.6±1.2	71.2±0.5	76.8±0.5	63.2±0.6	64.3±1.3

<sup>a</sup>phosphatidylcholine concentration is 150 μmol/ml, n=3, mean±S.D.



**Figure 16**—Retain of the entrapment efficiency of the 5-fluorouracil entrapped liposomes treated freeze-drying proportion to the trehalose content.

Key : ○: Sonicated Multilamellar Vesicle, △: Multilamellar Vesicle, +: Microemulsified Liposome

과 입자 크기의 변화가 크게 일어남을 보였으며 상대적으로 입자 크기가 감소한 sonicated vesicle은 이보다 좋은 결과를 보였으나 입자 크기는 변하는 것을 알 수 있다. 이에 비해 MEL은 trehalose의 양을 지질에 대해 4배 이상 첨가해 주면 봉입율 및 입자 크기가 유지됨을 알 수 있다. Crowe 등<sup>22)</sup>은 trehalose가 형성된 리포솜의 지질 성분 중 인지질의 친수성 부분인 head group과 수소결합을 형성하여 물분자를 치환하므로 동결중에 일어날 수 있는 리포솜의 응집과 융합 현상을 방지한다고 하였으며 이를 다시 재수화 시

키면 신속히 물분자와 치환되어 원래의 리포솜 모양을 이룬다고 보고하였다.

이와 같이 MEL을 제조하여 동결건조를 한 건조된 리포솜은 리포솜의 큰 단점중 하나인 안정성 문제를 해결할 수 있는 좋은 방법이라고 생각된다. 그러나 동결건조후 이를 재분산시킬 때 분산이 신속히 이루어지지 않으며 분산 조건에 따라 원래의 성질에 변화를 줄 수 있는 가능성을 가지고 있다는 문제점이 있어 앞으로 해결해야 할 문제라고 생각된다.

## 결 론

1. 5-FU를 봉입한 MLV의 봉입율은 대체적으로 낮게 나타났으나 지질 전체의 농도 및 콜레스테롤의 함량을 변화시켜 봉입율을 향상시킬 수 있었다.
2. 5-FU의 프로드럭으로서 이용성이 증가된 PFA와 HFA의 MLV에 대한 봉입율은 동일한 지질 농도에서 5-FU에 비해 매우 크게 증가했으며 유수분배계수가 높을수록 봉입율은 높게 나타났다.
3. 리포솜의 지질막에 전하를 형성하는 첨가제로서 SA와 DCP를 첨가하였을때 MLV와 MEL모두 봉입율이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 이들 첨가제의 농도가 지질에 대해 20 mol% 이상이 되면 리포솜의 침전이 빠르게 일어났다.
4. MLV를 hydration 법으로 제조하였을때 높은 봉입율을 얻을 수 없었으나 동일한 지질 농도로 마이크로플루이데이션을 사용하여 MEL을 제조하면 빠르고 간단하게 높은 봉입율을 가지는 리포솜을 만들 수 있었다.
5. MLV는 입자 크기와 분포와 매우 다양하였으나 MEL은 평균 입자 크기가 200 nm이하로 작으면서 비교적 균일한 입자 크기분포를 나타내었다.
6. 각 리포솜으로부터 5-FU의 방출 속도는 콜레스테

물의 함량이 증가할수록 느려졌고 MEL이 MLV보다 빠른 방출율을 나타내었다. PFA와 HFA는 콜레스테롤의 첨가량에 따라 30 mol%이하에서는 방출이 빠르게 나타났고 50 mol%에서는 느리게 나타났다. 리포솜에 혈장에 첨가하면 모든 약물의 방출속도가 빠르게 나타났다.

7. Dowex는 이온교환수지를 사용하여 리포솜에 봉입되지 않은 5-FU를 효과적으로 분리하였으며 리포솜의 성질이나 지질 농도에 영향을 주지 않았다.

8. 5-FU를 봉입한 리포솜에서 MLV와 초음파 처리한 MLV 그리고 MEL에 안정제로서 trehalose를 첨가하여 동결 건조한 후 재분산시켜 봉입율과 탁도를 측정한 결과 지질에 대해 중량비로서 4:1이상에서 좋은 결과를 나타내었다. 안정화 효율은 MLV < sonicated MLV < MEL의 순서로 나타났다.

위의 결과로부터 5-FU를 봉입한 리포솜을 제제화하기 위해 지용성을 증가시킨 프로드럭을 약물로 마이크로플루다이저를 사용하여 MEL을 제조한 후 동결 건조한 리포솜이 안정성 및 제제화에 유용하다고 사료된다.

## 문 헌

- 1) A.D. Bangham, M.M. Standish and J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamella of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238~252 (1965).
- 2) F. Szoka and D. Papahadjopoulos, Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 467~508 (1980).
- 3) L.D. Mayer, M.B. Bally, K.J. Hope and P.R. Cullis, Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes, *Chem. Phys. Lipids*, **40**, 335~345 (1986).
- 4) S. Frokjaer, E.L. Hjorth and O. Worts, "Liposome Technology" Vol. 1, G. Gregoriadis, (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 235~245 (1984).
- 5) B.R. Lentz, T.J. Carpenter and D.R. Alford, Spontaneous fusion of phosphatidylcholine small unilamellar vesicles in the fluid phase, *Biochemistry*, **26**, 5389~5397 (1987).
- 6) Y. Yamamoto, E. Niki, J. Eguchi, Y. Kamiya and H. Shimasaki, Oxidation of biological membranes and its inhibition, free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen, *Biochim. Biophys. Acta*, **819**,

- 29~36 (1985).
- 7) C.A. Hunt and S. Tsang,  $\alpha$ -tocopherol retards autoxidation and prolongs the shelf-life of liposomes, *Int. J. Pharm.*, **8**, 101~110 (1981).
- 8) N.I. Payne, P. Timmis, C.V. Ambrose, M.D. Ward and F. Ridgway, Proliposomes: A novel solution to an old problem, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 325~329 (1986).
- 9) N.I. Payne, I. Browning, and C.A. Hynes, Characterization of proliposome, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 330~333 (1986).
- 10) L.M. Crowe, J.H. Crowe, A. Rudolph, C. Womersley and A. Appel, Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose, *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 240~247 (1985).
- 11) Tanaka Keiko, Takeda Tokuji and Keyoko Fujii, Freeze-drying of liposomes prepared by sonication and extrusion techniques, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(10), 2653~2656 (1991).
- 12) C.M. Chen and D. Alli, Use of fluidized bed in proliposome manufacturing, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 419 (1987).
- 13) J. Martin "Specialized Drug Delivery Systems" Praveen Tyle., (Ed.), Marcel Dekker, Inc., 267~316 (1990).
- 14) E. Mayhew, R. Lazo, W.J. Vail, King and A. M. Green, Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier, *Biochim. Biophys. Acta*, **775**, 169~174 (1984).
- 15) I. Keizo, Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin, *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 390~402 (1974).
- 16) R. Ganapathi and A. Krishan, Effect of cholesterol content of liposomes on the encapsulation, efflux and toxicity of adriamycin, *Biochem. Pharm.*, **33**(4), 698~700 (1984).
- 17) J. Senior and G. Gregoriadis, Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: The effect of the phospholipid and cholesterol components, *Life Science*, **30**, 2133~2136 (1982).
- 18) P.S. Stephen and A.K. Paul, Liposomal entrapment of floxuridine, *J. Pharm. Sci.*, **66**(7), 984~986 (1977).
- 19) M. Arrowsmith, J. Hadgraft and I.W. Kellaway, Thermodynamics of partitioning and efflux of phenothiazines from liposomes, *J. Membrane Biol.*, **58**, 181~189 (1981).
- 20) M. Arrowsmith, J. Hadgraft and I.W. Kellaway, The in vitro release of steroids from

- liposomes, *Int. J. Pharm.*, **14**, 191~208(1983).
- 21) G. Storm, *Liposomes as Delivery System for Doxorubicin in Cancer Chemotherapy*, pp. 31~44 (1987).
- 22) J. H. Crowe and L. M. Crowe, Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose, *Science*, **17**, 701~703