약학회지 제40권 제6호 646~652(1996)
Yakhak Hoeji Vol. 40, No. 6

상피세포성장인자를 함유한 동결건조-재분산 리포좀의 입도분포 및 봉입률

김희준 · 유성운 · 최영욱#
중앙대학교 약학대학
(Received August 30, 1996)

Size Distribution Characteristics and Entrapment Efficiency of Dried-Reconstituted Liposomes Containing Epidermal Growth Factor

Hee-Jun Kim, Sung-Un Yu and Young Wook Choi#
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Abstract—Epidermal Growth Factor (EGF), discovered by Stanley Cohen in 1960, has a potential healing effect for wounds and burns. Considering wound care, in order to avoid physical stress at the wound surface and efficiently apply EGF, the need for viscous spraying solutions was essential. Viscous spraying solutions containing EGF were prepared by utilizing viscosity-building polymer, poloxamer 407, and by introducing liposome systems. On the other hand, EGF is purified on reverse HPLC gradient program with the mobile solvent of acetonitrile. It is necessary to observe liposomal EGF changes as the acetonitrile contents varied in order to introduce liposome systems at the step of EGF solution (at the time of EGF purifying). By evaluating the size distribution and entrapment efficiency of EGF liposome, it was possible to determine the limit contents of acetonitrile and establish the optimal conditions for solution formulations. It has been revealed that, as the acetonitrile content increases, mean diameter of EGF liposomes increased and the width of size distribution tends to decrease. The limit contents of acetonitrile were 10%, since there was little difference to the acetonitrile-free liposomes.

Keywords □ Epidermal Growth Factor, Viscous Spraying Solution, Poloxamer 407, Liposome, Acetonitrile, Size Distribution, Entrapment Efficiency.

EGF (Epidermal Growth Factor)는 Stanley Cohen[1]에의해 처음으로 생쥐의 악하선에서 발견되었으며, 창상치유효과가 뛰어난데 반하여 수용액 중에서 매우 불안정하며, 특히 온도의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있어 안정화에 대한 연구들[2,3]이 제제개발에 있어서 중점적으로 진행되고 있으나, 현재까지는 적당한 안정화제를 찾지 못한 실정이다. 최근에 protease inhibitor를 안정화제로 넣어 만든 연고제[4,5]와 생체적합성이 우수하며 방출조절이 가능한 폴리머들의 개발로 이를 이용한 제제들의 연구가 많이 보고[6,7]되고 있다. 그 한 예로서, 겔형성능력이 우수한 carbopol과 reverse thermal behavior를 갖는 pluronic을 이용한 겔제제 등의 여러 제형의 제제들이 연구되었다. Carbopol을 이용한 겔제제(Carbogel), pluronic을 이용한 겔제제 (Plugel), EGF를 리포좀에 봉입시키고 이 리포좀현탁액을 carbopol을 이용한 겔제제에 도입한 겔제제 (Lipogel)등은 모두 창상치유효과에 있어서 연고제나 그 밖의 수용성 기제, 지용성 기제보다 뛰어난 것으로 보고되었다.[8] 그러나, 창상부위치료라는 점에서 기존의 제제들은 제제를 적용시키기 위해서 직접 상처표면에 접촉하여야 하고, 그에 따른 물리적 자극을 감

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5609 (팩스) 02-816-7338

수해야 하는 단점이 있었다. 따라서, 적용부위에 대한 자극을 피하고, 상처부위에 보다 긴밀하게 EGF를 적용시키기 위해 점성분무액의 필요성이 대두되었다. 뿐만 아니라, 점성액과 EGF분말을 별도 포장하여 사용시에 혼합할 경우 용액중에서의 EGF의 불안정성을 개선할 수 있는 장점이 있다. 이에 점성을 가지는 고분자인 poloxamer 407(Lutrol®F 127)을 이용한 점성분무액의 제제화를 연구하게 되었고, 여기에 리포좀을 도입하여 치료효과를 높히고자 하였다.

수용액중에서 상당히 불안정한 EGF의 안정성을 확보하기위해서는 리포좀에 봉입시킨 EGF를 동결건조시키는 방법을 이용할 수있다. 동결건조는 수용액중에서 안정성에 문제가 있는 화합물 등의 shelf-life를 연장시킬 수 있는 중요한 방법이 되고 있다.[9] 한편, EGF원료 정제시 reverse HPLC상에서 아세토니트릴이 혼입된다는 점에서 제조공정을 최소화하여 EGF의 안정성을 최대로 확보하기위해, 이 상태(동결건조전의 EGF 용액상태)에서 리포좀을 적용하는 것이 이상적이라 판단되어 이와 관련된 제조공정도입의 가능성을 평가하고자 하였다.

리포좀은 생체적합성이 뛰어나기 때문에 drug delivery system의 carrier로서 널리 사용 되고 있으므로[10], 상처부위에 EGF의 전달을 크게 하고, 창상치유시간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대된다. 그러나, 리포좀제조시에 아세토니트릴과 같은 유기용매가 혼입되면 인지질이 용해되어 리포좀 형성에 상당한 영향이 있음을 감안하여, 아세토니트릴의 함량변화에 따른 리포좀의 상태변화를 관찰하고 입도분포 및 봉입률 등의 물리적 파라미터를 비교하므로써 동결건조-재분산 리포좀제제의 최적제조조건을 확립하고자 하였다.

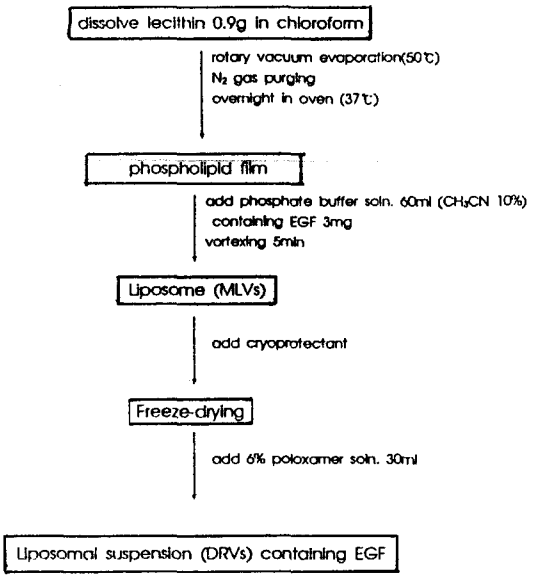
실험방법

시약 및 기기 - EGF(DWP401, Lot No. 401PU 003)는 (주)대웅제약에서 제공받아 그대로 사용하였으며, 시약으로는 Egg yolk lecithin (Tokyo Kasei chemicals Co., Japan), Acetonitrile (HPLC grade, J.T. Baker, U.S.A), Chloroform (E.P. 대정화금, Korea), Sodium phosphate(dibasic, E.P. Yakuri pure chemicals Co., Japan), Poloxamer 407 (BASF Aktiengesellschaft, Germany), D-mannitol (GR reagent Samchun pure chemical industries, Korea), D(+)trehalose (Sigma Chemical Co., U.S.A)를 사용하였다. 기기는 HPLC (Jasco system, Japan), Rotary vacuum evaporator (Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Japan), Ultracentrifuge (Centrikon T-1170, Kontron instruments, Italy), Particle size analyzer (Granulometer 1064 No. 130, France)등을 사용하였다.

리포좀현탁액의 제조 - 인지질로서 상전이온도가 4°C인 lecithin (from egg yolk,~60% phosphatidylcholine)을 사용하여 Bangham등[11]의 방법에 따라 MLVs(Multilamellar Vesicles) 리포좀을 제조하였으며, 인지질의 농도는 20 mM (15 mg/m*l*)로 하였다. 즉, 인지질 0.9 g을 정밀히 달아 클로로포름에 녹이고 이를 회전감압농축기로 상전이온도이상을 유지하면서 감압증류하여 둥근플라스크기벽에 얇은 인지질피막을 만들고, 질소가스를 통과시켜 잔류하는 클로로포름을 완전히 제거한다. 건조된 인지질피막을 incubator에서 하룻밤 더 건조시킨 후, EGF 3 mg을 아세토니트릴을 10%함유하는 0.01M 인산완충액(pH 6.5) 60 m*l*에 가하여 녹인 후, 인지질피막에 가하여 수화시킨 다음 5분간 vortex mixing하여 MLV리포좀을 제조하였다. 그 후 cryoprotectant를 첨가하고 동결건조한후, poloxamer 407 (Lutrol®F 127)을 0.01M 인산완충액(pH 6.5)에 녹여 6%로 만든 용액 30 m*l*로 재분산하여 최종의 제제인 liposomal EGF poloxamer solution을 제조하였다 (EGF농도 : 1 mg/10 m*l*). 이때, EGF의 외용제제화 대상제형이 분무제임을 감안하여, spray에 지장을 주지않고 상처표면에 살포했을 때에도 흐르지 않고 남아있을 정도의 점도를 유지하기 위해서 poloxamer 407의 농도를 6%로 정하였다. 폴록사머의 농도가 6% 미만일경우에는 점도가 낮아서 상처표면으로부터 흘러버리고, 14%를 초과할경우에는 점도가 너무 높아 분무제로서는 부적당하기 때문에 용액의 농도를 위와 같이 하였다. Cryoprotectant는 동결건조시 리포좀 입자들이 서로 엉켜붙어서 재분산성이 나빠지는 것을 방지하기 위하여 첨가하였으며, 10% (w/v) mannitol : 10% (v/v) glycerol=1:1 (이하 cryoA로 약함)[12]와 trehalose (이하 cryoB로 약함)[9]를 사용하였는데, cryoA는 리포좀현탁액에 동량씩 즉, 1:1(v/v)의 비율로 가하였으며, cryoB는 trehalose : lipid=1:1(w/w)의 비율로 가하였다. (Scheme I)

입도분포의 측정 - 리포좀의 입도분포에 미치는 아세토니트릴의 영향을 알아보고 한계혼입량을 결정하기 위해 아세토니트릴의 혼입량을 0, 10, 20, 30%로 나누어 실험하였다. 즉, 각 리포좀의 hydration단계에서 인산완충액 및 10~30% 아세토니트릴-인산완충액 일정량을 가하고 hand-shaking 및 5분간 vortex-mixing하여 MLVs를 만들고, 입도분포를 측정하였다. DRVs(Dried Reconstituted Vesicles)에 대해서도 각각 인산완충액과 6% 폴록사머 용액으로 재분산하여 입도분포를 관찰하였다. 한편, 동결건조된 EGF리포좀 분말을 폴록사머용액에 재분산시켜 DRV리포좀을 만들 때에, 점성고분자인 poloxamer 407(Lutrol®F 127)[13]이 리포좀의 입도분포에 어떤 영향을 미치는가를 평가하기 위해 다음과 같이 나누어 관찰하였다. 즉, 리포좀제조의 hydration단계에서 14% 폴록사머용액으로 hydration한 것(I), 만들어진 리포좀에 폴록사머용액을 가하여 용액의 농도를 14%로 만든 것(II), DRV제조시 14% 폴록사머용액으로 재분산시킨 것(III)을 각각 만들어 입도분포를 조사하였다.

봉입률의 측정 - EGF의 리포좀내 봉입률은 K. Jörg에 의해 보고된 방법에 준하여 원심분리후 상징액중의 EGF농도 및 리포좀 파괴후 EGF의 농도를 정량하여 구하였다.[14] 먼저 최종의 EGF제제농도인 1 mg/10m*l*의 농도를 갖는 리포좀을 제조한 후, 1 mg/40 m*l*의 농도로 희석하여 MLVs와 DRVs의 제조용으로 각각 4 m*l*씩 나누고, 이를 다시 2 m*l*씩으로 나누었다. 그 중 한 검체는 인산완충액으로 4배 희석하여 ultracentrifuge (100,000 g, 30 min, 4°C)시켜[15] 상징액과 리포좀pellet으로 분리하고 상징액을 취한후 HPLC로 분석하여 EGF의 농도(a)를 구하였고, 다른 검체는 아세토니트릴과 메탄올혼액을 과량 가하고 vortexing하여 리포좀을 완전히 파괴한후, 인산완충액 4 m*l*를 가하여 HPLC로 분석하여 EGF의 농도(b)를 구하였다. 두 검체간의 농도차 (b-a)에 의해 봉입된 EGF의 농도를 구한 후, 처음 제조시에 가한 EGF의 이론농도(c)에 대한 비율로서 봉입률을 계산하였다. EGF의 HPLC분석은 reverse phase column을 사용하였으며, gradient program을 사용하여 분리능을 높였다. 분석에 사용된 HPLC system (Jasco, Japan)은 pump로서 PU 980, 검출기로는 UV 975, integrator는 807 IT를 사용하였으며, column은 Waters μ-Bondapak C-18 (3.9×300 mm, 10 μm particle size)을 사용하여 214



Scheme I — Preparation of liposomal EGF poloxamer solution.

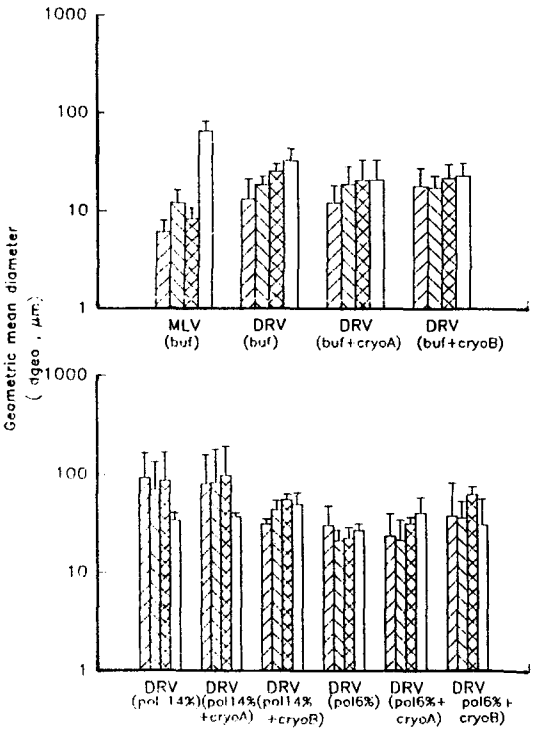


Fig. 1 — Geometric mean diameter of various liposomes
▨: CH_3CN 0% (buffer only), ▧: CH_3CN 10%, ■: CH_3CN 20%, □: CH_3CN 30%

nm에서 측정하였다. flow rate는1.2 m*l*/min으로하였고, injection volume은 20 μ*l*로 하였다. mobile

phase는 solvent A (10v/v% acetonitrile, 90v/v% 10 mM Na_2HPO_4, pH 6.5)와 solvent B (70v/v% acetonitrile, 30v/v% 10 mM Na_2HPO_4, pH 6.5)를 gradient program에 의해 흐르도록 하였다. 즉, A/B (%)를 93/7로 유지하면서 흐르게 하다가 30분에 58/42가 되도록 하였다.

결과 및 고찰

입도분포에 미치는 아세토니트릴의 영향 - 아세토니트릴의 혼입에 따른 리포좀의 변화를 mean diameter (d_{geo}, μm)와 span값으로 비교하였다. 이때, span값은 $(d_{0.9}-d_{0.1})/d_{0.5}$로부터 구하였으며 아래첨자의 숫자는 누적분포율(%)로서 각각 90%, 10%, 50%를 나타낸다. MLV상태에서는 아세토니트릴의 혼입량이 10% 또는 20%일 때는 혼입되지 않은 리포좀의 경우와 큰 차이를 나타내지 않았지만, 30%가 혼입되었을 때는 mean diameter와 span값 모두 큰 증가를 보였다 (Fig. 1, 2). DRV리포좀의 경우에 있어서는 각각의 혼입량에 있어 큰 차이를 나타내지는 않았지만, 10% 혼입되었을 때가 아세토니트릴을 함유하지 않는 DRV와 유사한 결과를 나타내었다. 아세토니트릴의 혼입량증가에 따른 리포좀의 변화를 보다 쉽게 비교하기 위해 상대적인 비에 의한 그래프로 나타내었다. 즉, MLV상태일 때의 mean diameter와 span을 기준으로 하여 상대적인 비를 나타내었다 (Fig. 3, 4). 각각의 경우에 있어서 아세토니트릴이 20%이상 혼입되었을 때는 상당한 변화가 있음을 알 수 있었고, 입도분포의 측면에 있어서 cryoA나 cryoB의 효과차이는 없었으며, cryoprotectant를 가하지 않은 경우와 큰 차이를 보이지는 않았지만, 재분산성이 더 뛰어나기 때문에 cryoprotectant를 첨가하는 것이 제제화에 유리할 것

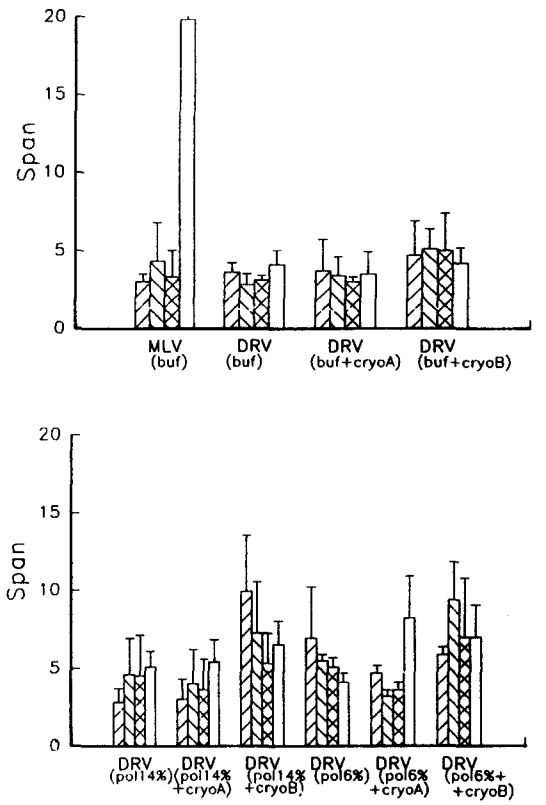


Fig. 2 — Span of various liposomes.
▨: CH_3CN 0% (buffer only), ▧: CH_3CN 10%, ■: CH_3CN 20%, □: CH_3CN 30%

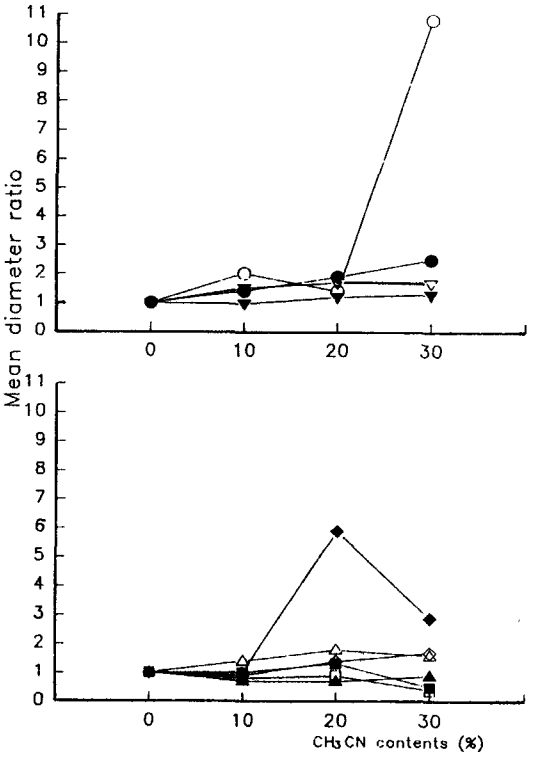


Fig. 3 — Geometric mean diameter ratio of various liposomes.
○: MLV(buf), ●: DRV(buf), ▽: DRV(buf+cryoA), ▼: DRV(buf+cryoB), □: DRV(pol 14%), ■: DRV(pol 14%+cryoA), △: DRV(pol 14%+cryoB), ▲: DRV(pol 6%), ◇: DRV(pol 6%+cryoA), ◆: DRV(pol 6%+cryoB)

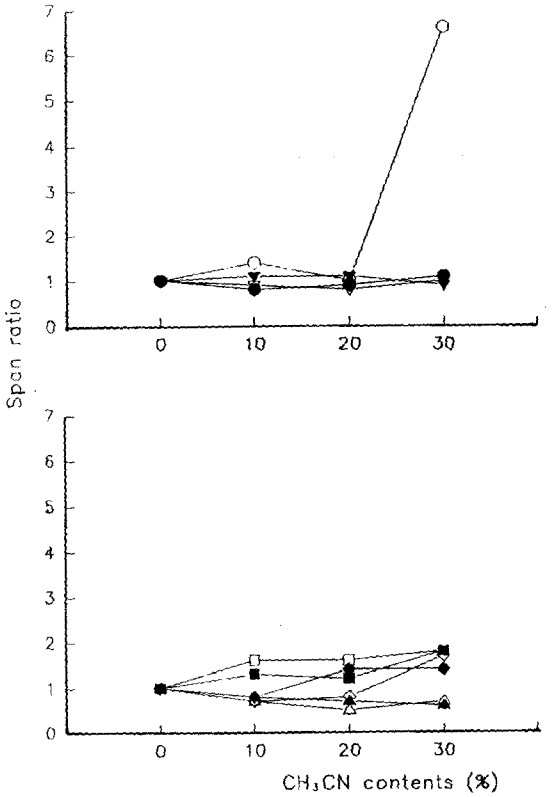


Fig. 4 — Span ratio of various liposomes.
○: MLV(buf), ●: DRV(buf), ▽: DRV(buf+cryoA), ▼: DRV(buf+cryoB), □: DRV(pol 14%), ■: DRV(pol 14%+cryoA), △: DRV(pol 14%+cryoB) ▲: DRV(pol 6%), ◇: DRV(pol 6%+cryoA), ◆: DRV(pol 6%+cryoB)

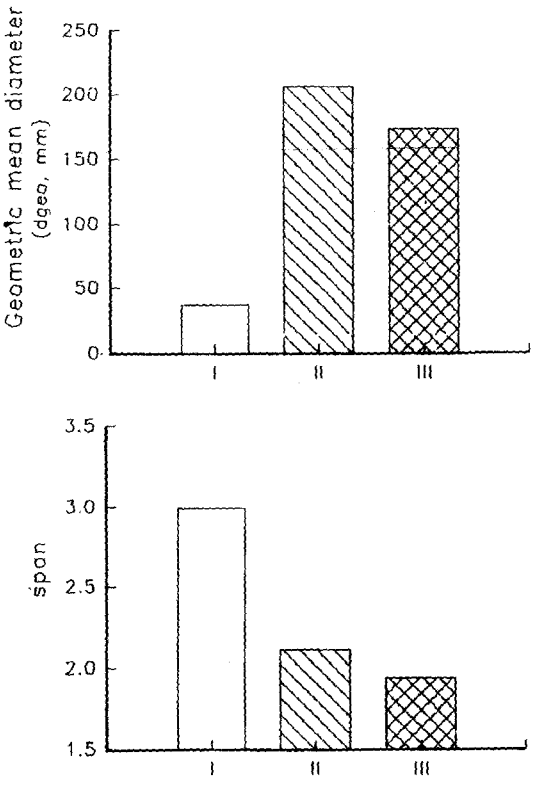


Fig. 5 — Effect of poloxamer on the size changes of liposomes.
I : MLV liposomes made by hydration with 14% poloxamer solution.
II : MLV liposomes diluted with poloxamer solution by surface adsorption techniques.
III : DRV liposomes reconstituted in 14% poloxamer solution.

으로 평가되었다.

입도분포에 미치는 폴록사머의 영향 – DRV를 6%와 14% 폴록사머용액으로 재분산시켰을 때, mean diameter 값이 폴록사머의 농도에 비례하여 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1, 6). 그 이유는 폴록사머가 리포좀입자 표면에 흡착되어 결과적으로 입자도가 커진 것으로 사료되며, 이것은 리포좀의 표면변조시 수용성 고분자를 흡착시키는 surface adsorption technique의 결과[16,17]와도 일치한다. 또, 리포좀 제조시 폴록사머가 어느 단계에서 표면흡착에 주로 관계하는가를 확인하기위해 수용성 고분자를 가하는 시점을 각기 달리하여 관찰한 결과, 만들어진 리포좀에 폴록사머용액을 가하여 용액의 농도를 14%로 만든 것(II)의 경우가 DRV제조시 14% 폴록사머 용액으로 재분산시킨 것(III)과 유사한 패턴을 나타내는 것을 알 수 있었고

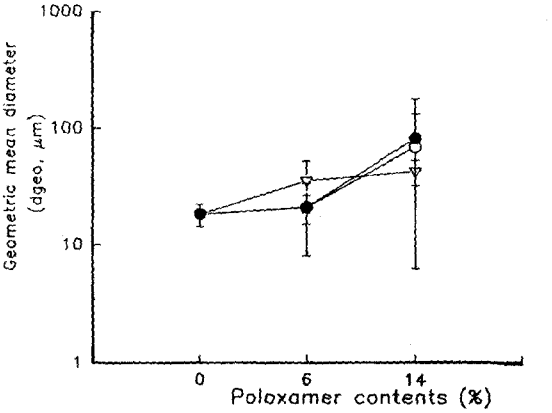


Fig. 6 — Changes in mean diameter of 10% CH_3CN containing liposomes according to the poloxamer contents.
○: DRV(without cryoprotectant), ●: DRV (cryoA), ▽: DRV(cryoB)

(Fig. 5). 따라서 폴록사머가 리포좀표면에 흡착된 것으로 생각할 수 있었다.

한계혼입량인 아세토니트릴 10%에 있어서 폴록사머 농도의 증가에 따른 입도분포의 변화를 그래프로 나타내었다 (Fig. 6). 폴록사머의 농도가 증가함에 따라 평균입자경이 증가하는 경향을 보였는데, 이것 역시 친수성 고분자의 표면흡착을 뒷받침하는 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, 흡착되는 정도에도 차이를 보여 입자경의 증가와 함께 표준편차도 상대적으로 커짐을 알 수 있었다.

봉입률 - MLV리포좀 및 인산완충액 또는 6% 폴록사머 용액으로 재분산시킨 DRV리포좀은 봉입률을 구할 수 있었으나 (Fig. 7), 14% 폴록사머 용액의 경우에는 164,000 g에서 1시간 원심분리하여도 인지질이 pellet으로 분리되지 않아서 구할 수 없었다. 이는 폴록사머의 고농도에 기인한 점성증가 및 계면활성작용으로 인하여 리포좀 미립자가 오히려 균등분산되었기 때문이라고 생각된다.

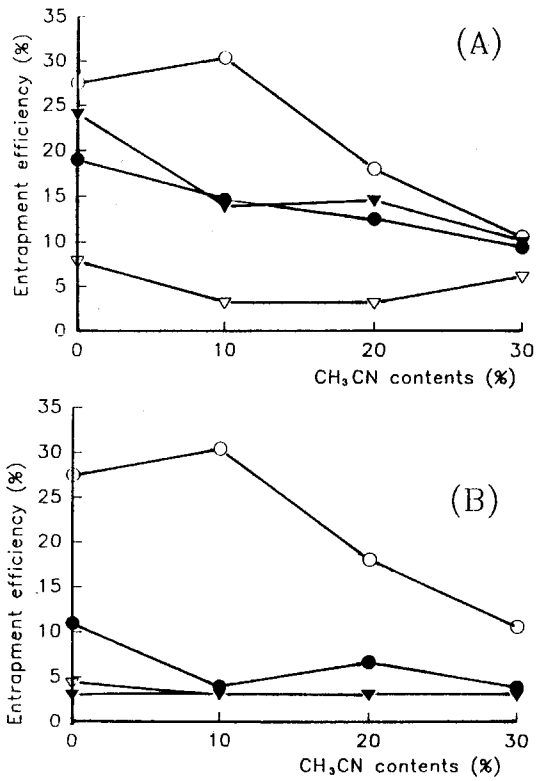


Fig. 7 — Changes in liposomal entrapment efficiency of EGF according to the CH_3CN contents.
(A) Liposomes in buffer
○: MLV(buf), ●: DRV (buf), ▽: DRV(buf+cryoA), ▼: DRV (buf+cryoB)
(B) Liposomes in 6% poloxamer solution.
○:MLV(buf), ●: DRV (pol 6%), ▽: DRV(pol 6%+cryoA), ▼: DRV (pol 6%+cryoB)

EGF봉입률은 전체적으로 10~20%미만인데, 이와 같이 봉입률이 낮은 이유는 리포좀의 제조방법(thin film method)에도 그 원인이 있지만 첫째로는, 동결건조시의 osmotic dehydration과 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉, 리포좀의 dehydration은 리포좀 미립자 밖의 수분이 리포좀 내용물보다 먼저 얼 때 일어나는데, 이것이 리포좀으로 부터의 수분의 유출을 일으키며, 이때 약물도 같이 유출되는 것이다.[9] 둘째로는, 동결건조처리과정중의 EGF의 분해 가능성을 생각해 볼 수 있다. EGF자체를 동결건조하여 재분산후에 HPLC분석한 결과, 함량이 동결건조전의 80%정도로 나타났다. 위와 같은 이유로 인해 EGF의 봉입률이 낮아진것으로 생각된다. 또 전체적으로 MLV리포좀이 DRV리포좀에 비해 봉입률이 더 크게 관찰되었고(Fig. 7), 폴록사머 용액에 재분산시킨 경우에는 봉입률이 현저히 낮았는데 이는 EGF가 폴록사머 존재하에서 안정성이 떨어지는 것으로 해석된다.

Cryoprotectant첨가에 의한 리포좀막의 안정화를 관찰했을때, 아세토니트릴이 10%까지 혼입되었을때는 봉입률이 어느정도 유지되었으나, 20%, 30% 로 혼입량이 늘어났을때는 리포좀간의 융합과 인지질의 용해로 인한 내용물의 유출이 일어나 봉입률이 현저하게 낮아졌으며, 리포좀의 안정화를 예측할수 없었다. 따라서, 봉입률의 측면에서도 아세토니트릴의 한계혼입량은 10%정도일것으로 판단된다.

결 론

이상의 결과로 부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 아세토니트릴의 혼입량 증가에 따라 각 리포좀의 평균입자경은 증가하고 입도분포폭은 좁아지는 경향을 나타내었다.

2) 아세토니트릴이 10% 혼입되었을 때는 DRV의 입도분포와 봉입률이 일정한 수준을 유지하였고, 혼입되지 않은 경우와 큰 차이를 나타내지 않았으므로, 리포좀을 이용한 EGF제제의 제조시에는 아세토니트릴 10%가 한계량인 것으로 판단되었다.

3) Cryoprotectant의 첨가는 DRV제조시 리포좀의

재분산성을 우수하게 하였으며, 아세토니트릴이 10% 혼입되었을때 리포좀의 osmotic dehydration과 관련된 문제를 개선할수 있었다.

4) 아세토니트릴이 20, 30% 혼입되었을때는 인지질의 용해와 리포좀의 lysis로인한 내용물의 유출로 봉입률이 현저히 낮아졌으며, cryoprotectant를 첨가하여도 리포좀의 안정화를 기대할수 없었다.

5) 폴록사머 농도에 비례하여 DRV리포좀의 입자도는 증가하였으나, 이는 고분자인 폴록사머가 리포좀의 표면에 흡착되어 일어나는 것으로 해석되며 리포좀을 이용한 외용제제화에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 평가되었다.

문 헌

1) Cohen, S. : Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerat- ing incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555 (1962).

2) Njicha, F. K. and Shalaby, S. W. : Stabilization of epidermal growth factor. *J. Bioactive and Comp. Polymers* **7**, 288 (1992).

3) Langer, R. and Moses, M. : Biocompatible controlled release polymers for delivery of polypeptides and growth factors. *J. Cell. Biochem.* **45**, 340 (1991).

4) Okumura, K., Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M. and Fuwa, T. : Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. I. Effect of nafamostat, gabexate, or gelatin on stab ilization and efficacy of EGF. *Pharm. Res.* **7**, 1289 (1990).

5) Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M., Fuwa, T. and Okumura, K. : Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. II. Effect of protease inhibitor, nafamostat on stabilization and efficacy of EGF in burn. *J. Pharmacobio-Dyn.* **14**, 47 (1991).

6) DiBiase, M. D. and Rhodes, C. T. : Investigation of epidermal growth factor in semisolid formulations. *Pharm. Acta. Helv.* **66**, 165 (1991).

7) Tan, E. L., Shah, H. S., Leister, K. J., Kozick, L. M., Pasciak, P., Vanderlaan,R. K., Yu, C. and Patel B. : Transforming growth factor-α in a semisolid dosage form : Preservative and vehicle selection. *Pharm. Res.* **10**, 1238 (1993).

8) Yi, J. W., Kim, H. J., Cho, S. W., Park, J. S. and Choi, Y. W. : Topical gel formulations of Epidermal Growth Factor and their wound healing effec ts. *Yakhak Hoeji* **40**, 411 (1996).

9) Guru, V. B., Scott, A. J. and Daniel, L. P. : Liposome Drug Delivery Syst ems. Technomic Publishing Company Inc., p.42 (1993).

10) Norman, W., Frank, M. and Mohammad, R. : Liposomes as a drug delivery system. *Drug Devel. Ind. Pharm.* **15**, Marcel Dekker Inc., p1523 (1989).

11) Bangham, A. D., Standish, M. M. and Watkin, J. C. : Diffusion of univalent ion across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238 (1965).

12) Özer, A. Y. : Stability studies on 5-FU liposomes. *Microencapsulation of Drugs*. Harwood Academic Publishers, p153 (1992).

13) Wade, A and Weller, P. J. : Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd ed., The Pharmaceutical Press, p352 (1986).

14) Jörg, K.: *Colloidal Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, Inc., p98 (1994).

15) Sriram, V. and Rhodes, C. T. : Development and characterization of a liposome preparation by a pH-gradient method. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 778 (1994).

16) Han, Y. H., Kim, S. H., Yang, S. G. and Choi, Y. W. : Physical property of pullulan-coated liposomes and stability against bile salts. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **7**, 67 (1993).

17) Han, Y. H., Yi, J. W. and Choi, Y. W. : Palmitoylpolysaccharide-coated liposomes as a potential oral drug carrier. *J. Korean Pharm. Sci.* **24**, 73 (1994).