



저작자표시-비영리 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

약학석사학위논문

동결건조법을 이용한 **proliposomes**의
제조 및 평가

**Preparation and evaluation of
proliposomes by freeze-drying method**

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
강민주

Preparation and evaluation of proliposomes by freeze-drying method

지도교수 김대덕

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약제과학 전공

강민주

강민주의 석사학위논문을 인준함

2014년 2월

위원장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위원 _____ (인)

Abstract

Preparation and evaluation of proliposomes by freeze-drying method

Min ju kang

Dept. of Pharmaceutics, College of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

Purpose. proliposomes are novel vesicular drug carrier system having several advantages over conventional liposomes. However, conventional methods of preparing proliposomes have limitation in terms of low drug content. Because the drug content of the proliposomes is proportional to the content of lipid, the aim of this study was to find a new method to increase the lipid content, resulting in increase in drug content. Simvastatin(SV) was selected as a model drug to increase bioavailability by improving its solubility and dissolution.

Methods. SV-proliposomes were prepared by freeze-drying technique using different contents ratio of lipid and SV for optimizing the formulation. The formulations were characterized for surface morphology, size, zeta potential and encapsulation efficiency. In vitro dissolution study of SV-proliposomes formulations was carried out comparing with SV powder and commercial SV tablet.

Results. The particle size of reconstituted liposomes was decreased with increasing the lipid /drug ratio. The particle size and zeta potential of reconstituted particles were in the range of 525~1090 nm and -48.8~46.7mV, respectively. The percentage encapsulation of drug was increased with increasing

the lipid/drug ratio, in the range of 50.8~78.6%. Moreover, SV release from the formulation was higher than commercial tablet and SV powder.

Conclusion. Drug loading of proliposomes can be enhanced by using freeze-drying method. Improvement in dissolution of SV from proliposomes formulations suggests the potential of proliposomes as a suitable carrier for improving oral delivery of SV.

keywords: proliposomes, SV, Dissolution study, Freeze-drying method

Student Number : 2012-21556

목 차

영문초록	1
목 차	3
List of Tables	4
List of Figures	5
1. 서론	7
2. 시료 및 실험 방법	9
3. 결과 및 고찰	16
4. 결론	25
5. 참고논문	26
Tables and Figures	31

List of Tables

Table. 1. Composition of blank proliposomes

Table. 2. Composition of SV-proliposomes

Table. 3. Characterization of proliposomes after reconstitution by gentle shaking (mean \pm S.D).

Table. 4. Characterization of proliposomes after reconstitution by vortexing and sonication (mean \pm S.D).

List of Figures

Fig. 1. Preparation methods of proliposomes (a) spray-drying method (b) freezing and drying method (c) fluidized bed method (d) film-deposition on carriers method.

Fig. 2. Chemical structure of simvastatin.

Fig. 3. Novel preparation methods of proliposomes (a) spray-drying method (b) melt-extrusion method (c) freeze-drying method.

Fig. 4. Effect of lipid content on the size of blank proliposomes (mean \pm S.D).

Fig. 5. Particle size distribution of blank proliposomes with 20% lipid content ; (a) intensity, (b) volume, and (c) number distribution.

Fig. 6. SEM images of (a) sorbitol, (b) SV, (c) blank proliposomes, (d) F1, (e) F2, and (f) F3,

Fig. 7. TEM images of proliposomes after reconstitution. (a) blank

proliposomes, (b) F1, (c) F2, (d) F3 after gentle shaking, (e) F1, (f) F2, (g) F3 after vortexing and sonication

Fig. 8. Particle size distribution of F1, F2, and F3 after gentle shaking ; (a) intensity, (b) volume, and (c) number distribution.

Fig. 9. Particle size distribution of F1, F2, and F3 after vortexing and sonication ; (a) intensity, (b) volume, and (c) number distribution.

Fig. 10. XRD of SV, Sorbitol, F1, F2, and F3.

Fig. 11. DSC of SV, Sorbitol, F1, F2, and F3.

Fig. 12. Effect of SLS concentration in the release medium on the stability of liposomes. (a) Liposome size after 0hr and (b) liposome size after 3hr (mean \pm S.D).

Fig. 13. Release profiles of SV from F1, F2, and F3 into the release medium with (a) pH 7.0, (b) pH 4.0, and (c) pH 1.2, containing 0.02% SLS (mean \pm S.D).

Fig. 14. Pictures after 3hr release study ; (a) pH 7.0, (b) pH 4.0, and (c) pH 1.2, containing 0.02% SLS.

1. 서론

약물 개발과정에 있어서 new chemical entities (NCEs) 의 약 70% 가 물에 잘 녹지 않는 성질을 가지고 있으며, 속방형 경구제제의 약물 중 약 40% 가 용해도 100 µg/mL 미만의 ‘물에 거의 녹지 않음’ 으로 분류되고 있다 (1). 특히, 난용성이면서 막 투과도는 높아서 BCS class II 로 분류되는 약물의 경우, 체내 생체이용률이 낮은 주요 원인은 약물의 낮은 용해도로 설명할 수 있으며 (2), 따라서, 약물 개발에 있어서 난용성 약물의 가용화는 중요한 사항으로 여겨지고 있다. 실제로, 많은 논문에서 이러한 낮은 생체이용률을 증가시키고자 난용성 약물의 가용화를 시도하였고, 다양한 가용화 기술을 통해 문제를 극복하였다 (1, 3, 4).

난용성 약물을 가용화할 수 있는 제형의 하나로 liposomes를 들 수 있다. liposomes는 생체 적합한 약물 전달체의 하나로, 약물의 생체막 투과도를 높일 수 있을 뿐만 아니라 용출을 개선할 수 있는 장점을 갖는다. 또한, 이것은 화학적인 변화를 거치지 않은 채 친수성, 친유성 약물 모두 봉입 가능하다 (5-8). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 liposomes는 약물의 경구 전달에 쓰이는 데에 한계가 있다. Liposomes는 물에 분산된 상태로 존재하기 때문에 저장 기간 동안 침강이나 응집, 인지질의 가수분해 등이 일어나 물리적으로 불안정하기 때문이다 (9-13).

Proliposomes는 물을 가하면 쉽게 liposomal suspension을 형성하는, 유동성이 좋은 liposomes 전구체인 고체로 정의된다 (14). Proliposomes의 경우, powder 내지 granule 정도의 일정한 크기로 취급할 수 있기 때문에 체제를 다루거나 보관 시에도 용이하다 (15). 또한 제제가 고체 상태이기 때

문에 온도와 습도가 control 되는 환경에서 장기간 보관 시에도 안정성을 보일 수 있다 (16). 따라서, proliposomes는 기존 liposomes의 장점을 갖되, liposomes의 물리화학적 불안정성을 극복한 새로운 입자성 약물 전달체로 평가되고 있다 (14).

Proliposomes의 제법으로는 spray-drying method (17)와, freezing and drying method (18), fluidized-bed method (19), film-deposition on carriers method (20) 등이 있다. (Figure.1.) 그러나 이러한 제법들은 다공성 물질인 matrix의 표면에 약물과 인지질을 코팅하여 건조시키는 방식에 따르며 (13, 21, 22), 이 제법을 통해 만들어진 proliposomes은 약물 함량이 낮을 수밖에 없다. 이것은, 인지질을 한번에 코팅할 수 있는 양이 한계가 있고 그 코팅 표면에만 약물이 존재하기 때문에 프로리포솜 내의 약물 함량이 낮을 수밖에 없기 때문이다. 또한, proliposomes의 약물 봉입률은 제제 내의 지질의 함량에 비례하므로 지질의 함량이 낮은 이러한 기존 제법들을 통해서도 proliposomes의 약물 봉입률을 높이는 데에 한계가 있다 (23). 따라서, 프로리포솜이 갖는 장점은 그대로 살리되, 기존의 프로리포솜의 단점을 극복할 수 있는, 지질과 약물 함량을 높일 수 있는 proliposomes의 새로운 제법을 찾는 것이 필요하게 되었다.

만들어진 프로리포솜을 평가하기 위한 모델 약물을 Simvastatin(SV)으로 선정하였다. SV (Figure2)은 지질저하제로서 HMG-coA 효소의 억제제로 작용하여 간에서 콜레스테롤 생합성을 막는 역할을 하며 10-80mg의 비교적 낮은 용량으로 사용되고 있다 (24). 분자량 418.57의 흰색 고체로, 물에서의 용해도가 1.45 µg/mL인 난용성인 물질이며 BCS class2 물질로 알려져 있다. 또한 이 약물은 용출 속도가 위장관내 약물 흡수의 율속 단계이므

로 물에 대한 낮은 용해도로 인하여 위장관에서 느리고 불충분한 약물 흡수가 일어나게 되므로 용해도 개선이 필요하다 (25). SV은 경구투여시 약물의 생체이용률이 5%로 굉장히 낮은 편이고, 이것은 약물이 난용성일 뿐만이 아니라 간에서의 초회통과효과 때문이라고 알려져 있다. 낮은 생체이용률과 초회통과 효과로 인하여 약물 치료 효과가 크게 변동할 수 있어 위험하므로 SV의 생체이용률을 개선할 필요가 있다. 이러한 SV의 생체이용률을 높이기 위한 시도로 나노에멀전 (26), SMEDDS (27), liposomes (28) 등 여러 가지 제형을 통하여 약물의 용해도와 용출개선을 통해 생체이용률을 높이려는 시도가 이어져 왔다. 하지만, 아직까지 proliposomes를 통하여 생체이용률을 개선하려는 시도는 없었으며, SV의 용량이 낮고, 낮은 용해도와 낮은 생체이용률을 보이기 때문에 proliposomes 제제의 좋은 모델 약물이 될 것이라 생각하여 선정하게 되었다.

따라서, 본 실험에서는 기존의 제법과는 다른 새로운 제법으로 proliposomes를 제조함으로써 약물 함량이 낮은 기존의 한계를 극복하는 연구를 진행했으며, 또한 최종적으로 해당 제제에 난용성 약물인 SV을 봉입하여 용출 개선을 평가하고자했다.

2. 시료 및 실험 방법

2.1. 시료

Sorbitol과 sucrose는 서울대학교 약학대학 제약공장에서 소분하여 사용하였고, poloxamer 188은 BASF Korea(Seoul, Korea)로부터 시료를 얻어 사

용하였으며 SV는 LUPIN Ltd.(Mumbai, India)에서 구입하였다. Ethanol은 대정화금(주) (Siheung, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 기타 다른 시약 및 용매는 HPLC grade의 것을 국내에서 구입하여 사용하였다.

2.2. Blank proliposomes

2.2.1. Blank proliposomes의 제조

본 연구에서는 freeze-drying method를 통해 proliposomes를 얻어내는 실험을 진행 하였으나 이전에 기존의 proliposomes 제법과 다른 방법을 통해 지질 함량, 나아가 약물 함량을 높인 제제를 만들기 위해 freeze-drying method 외에도 다양한 제법을 시도하였다. (Fig. 3. a-c)

그 중 한가지는 spray-dryer 를 이용한 새로운 제법으로 (Fig 3a) matrix로서 sorbitol, 인지질로서 L- α soybean phosphatidylcholine (SPC), 계면활성제로서 poloxamer 188 을 70% ethanol 에 모두 녹이고 이것을 spray-dry하고자 하였다. 다른 방법으로는 melt-extrusion 을 이용한 새로운 제법으로 (Fig 3b) matrix로서 sucrose, 인지질로서 SPC, 계면활성제로서 poloxamer 188 을 고르게 섞은 뒤 extruder를 통해 열과 압력을 가해 고르게 섞인 반죽을 얻어내고 상온에서 굳힌 뒤 분쇄하여 proliposomes powder 를 얻었다.

마지막으로 동결건조법을 이용하여 새롭게 proliposomes를 제조하였는데, (Fig 3c) matrix로서 sorbitol, 인지질로서 SPC, 계면활성제로서 poloxamer 188을 사용하였다. 우선, Sorbitol, SPC, poloxamer 188을 70% 에탄올 용액에 완전히 녹을 때까지 10분간 vortexing 해주고, 이것을 액체질소에서

60분 간 동결한 후, 동결건조기를 이용하여 동결건조하여 blank proliposome을 제조하였다. 적절한 조성을 찾기 위하여 약물을 제외하고 만든 blank proliposomes를 통해 지질의 비율을 서서히 높이면서(Table 1) 재분산된 liposomes의 입자 크기의 변화를 관찰하여 적절한 지질 비율을 선정하였다.

2.2.2. Blank proliposomes의 size 측정

Liposomes의 크기와 표면전하는 전기영동 광산란측정기(electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-Z, Photal; Otsuka Electronics Co. Ltd., osaka, Japan)를 사용하여 관찰하였다. Blank proliposomes에 10 mg/mL의 농도가 되도록 증류수를 가해 9분간 손으로 흔들어 주고, 얻어진 liposomes 용액 1mL를 분취하여 관찰하였다.

2.2.3. Blank proliposomes의 SEM, TEM

고체 proliposomes의 표면 형태를 관찰하기 위하여 주사전자현미경을 이용하였다. Blank proliposomes과 sorbitol, SV, blank proliposomes의 고체 표면의 형태를 FE-SEM (JSM-6700F) 으로 비교 관찰하였다.

Proliposomes을 물에 재분산시켜 얻어진 liposomes을 관찰하기 위하여 투과전자현미경을 이용하였다. Proliposomes에 10 mg/mL의 농도가 되도록 증류수를 가하고 9분간 손으로 흔들어 주어 liposomes을 얻었다. 이 liposomal suspension을 copper grid coated with carbon film에 올리고 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy; JEM 1010; JEOL,

Tokyo, Japan)을 통하여 liposomes의 형태를 확인하였다.

2.3. SV-proliposomes

2.3.1. SV-proliposomes의 제조

SV-proliposomes의 제조 방법은 위의 blank proliposomes의 제조법과 동일하였다. Sorbitol, SPC, poloxamer 188, 그리고 약물인 SV을 70% 에탄올 용액에 완전히 녹을 때까지 10분간 vortexing 해주고, 이것을 액체질소에서 60분 간 동결한 후, 동결건조기를 이용하여 동결건조하여 SV-proliposomes을 제조하였다. 적절한 지질 대 약물의 비율을 찾기 위하여 SV proliposomes의 조성은 Table 2와 같이 다양하게 하였다.

2.3.2. SV-proliposomes의 size, zeta potential 측정

SV-proliposomes으로부터 얻어지는 liposomes의 크기와 표면전하는 ELS (Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-Z, Photal; Otsuka Electronics Co. Ltd., osaka, Japan)를 사용하여 관찰하였다. Blank proliposomes에서와 달리 재분산 방법을 다음과 같이 두 가지로 하여 결과를 비교하였다. SV-proliposomes에 10 mg/mL의 농도가 되도록 증류수를 가해 (1) 9분간 손으로 흔들어 준 것과 (2) 2분간 vortexing 후 7분간 sonication을 한 것의 두 가지 방법을 통하여 liposome 용액을 얻은 후

liposome 용액 1mL를 분취하여 관찰하였다.

2.3.3. SV-proliposome의 encapsulation efficiency(EE) 측정

SV-proliposomes에 10 mg/mL의 농도가 되도록 증류수를 가해 앞에서 언급한 두 가지 방법을 통하여 liposome으로 재분산시켰다. SV은 물에 굉장히 난용성이므로 proliposomes을 물에 재분산 시킬 경우 봉입되지 못한 SV는 석출될 것이다. 따라서 proliposomes을 물에 재분산 시킨 용액을 0.2 μm 필터에 통과시켜 liposomes에 봉입되지 못한 SV을 여과한 뒤 적절히 희석하여 HPLC를 통하여 샘플들을 분석하였다. 두 가지 방법으로 재분산시켜 얻은 liposomes에 봉입된 SV의 봉입 효율은 다음과 같은 식에 의하여 계산하였다.

$$EE (\%) = \frac{\text{actual amount of SV in proliposomes}}{\text{theoretical amount of SV in proliposomes}}$$

2.3.4. SV-proliposomes의 SEM, TEM 사진

SV-proliposomes의 SEM 이미지는 앞의 blank proliposomes에서와 동일한 방법을 통해 얻었다. TEM 이미지는 앞의 blank proliposomes에서와 동일한 방법으로 얻되, 재분산 방법은 앞에서 언급한 두 가지 방법으로 하여 각 방법을 통해 얻어진 liposomes의 TEM 이미지를 비교 관찰하였다.

2.3.5. SV-proliposomes의 XRD 측정

SV, sorbitol, F1, F2, F3 의 crystallity 를 확인하기 위하여 X-Ray diffraction (XRD) 을 측정하였다. XRD 패턴은 X-ray diffractometer (D8 ADVANCE with DAVINCI, BRUKER, German) 을 사용하여 얻었다. Voltage 와 current generator 는 각각 40kV 와 40mA 로 설정하였고, 10-30 의 $^{\circ}2\theta$ 범위에서 샘플을 분석하였다. 분석 스캔속도는 1 $^{\circ}$ /min 으로 진행하였다.

2.3.6. SV-proliposomes DSC 측정

SV, sorbitol, F1, F2, F3 의 T_m 등의 물리적 상태를 확인하기 위하여 differential scanning calorimetry (DSC) 를 측정하였다. DSC 패턴은 differential scanning calorimeter (DSC-Q1000, TA Instrument, UK) 를 사용하여 얻었다. 샘플들은 알루미늄 팬에 밀폐하여 놓아졌으며, 20-180 $^{\circ}$ C 의 범위에서 10 $^{\circ}$ C/min 으로 샘플들을 스캔하였다.

2.4. 용출 평가

2.4.1. 용출액의 선정

SV의 용해도를 증가시키기 위해 용출액(pH7.0 sodium phosphate buffer)에 가해진 sodium lauryl sulfate(SLS)가 liposome의 안정성에 미치는 영향을 관찰하였다. 용출액에 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.5%(w/v)의 SLS

를 가하고 F1 SV-proliposomes 제제를 10 mg/mL의 농도로 재분산하였다. 시간에 따른 liposomes의 크기와 강도의 변화를 ELS를 사용하여 세시간 동안 확인하여, 계면활성제가 첨가된 용출액에서의 liposomes의 안정성을 확인하였다.

2.4.2. pH 별 용출시험

SV-proliposomes과 대조군 제형의 SV의 *in vitro* 용출 특성을 계면활성제 존재하에 pH 1.2, pH 4.0, pH 7.0에서 용출기(Electrolab TDT-08L, USP XXIII)를 통하여 비교 관찰하였다.

비교 용출은 시험약 또는 대조약을 취하여 대한약전 일반시험법 용출시험법 중 제 2법(패들법)에 따라 50 rpm으로 시험하였다. 대조약은 Zocor정(20 mg)과 pure SV powder 20 mg을 사용하였고, 시험약은 SV proliposomes 제제(F1,F2,F3)를 250 mg으로 하여 캡슐에 넣었다. 캡슐의 경우 대한약전에서 규정하는 sinker를 사용하여 위로 부유하는 것을 방지하였다. pH 별 각 용출액의 조성은 대한약전 일반시험법 기준을 따랐으며, 0.02%(w/v) SLS를 사용하였다. 용출액 900mL의 온도는 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, 용출 개시 후 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180분에 용출액을 5ml씩 채취하고 새로운 용출액을 다시 채워주어 총 부피를 맞춰주었다. 리포솜에서 용출된 약물량은 얻은 용출액 샘플을 0.2 μm filter로 여과 후 적절히 희석하여 HPLC를 통하여 정량하여 계산하였다. 또한, 용출액 샘플을 여과하지 않고 HPLC를 통하여 분석함으로써 liposomes안에 봉입되지 않은 약물까지도 정량하여 약물의 전체량도 확인하였다. 용출 마지막 시간에 용출 용기에

가라안은 제제가 있는지의 여부도 육안으로 확인하였다.

2.5. HPLC 분석법

SV의 정량은 HPLC system (Waters Co., Milford, MA)을 통하여 하였고, UV detector (Waters 2487 dual λ absorbance detector)를 사용했다. Column은 phenomenex C-18 column(5 μ m, 250 x 460 mm)을 45°C 상태로 유지하여 사용하였으며 이동상으로 아세토나이트릴(ACN)과 pH5.6 20mM potassium phosphate buffer 을 80:20으로 혼합한 용액을 사용하였고, 이 이동상을 유속 1.0 ml/min으로 유출시켰다. 주입 부피는 20 μ l로 하여 파장 238 nm에서 약물을 검출하였다. Stock solution은 SV 5 mg을 ACN 25 mg에 녹여 200 μ g/mL의 농도로 제조하였다. Standard solution은 SV stock solution을 serial dilution하여 제조하였고 최종 농도가 0.05-20 μ g/mL가 되도록 하였다. 이를 토대로 검량선을 작성하였고, 미리 작성한 검량선과 비교하여 SV의 농도를 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Blank proliposomes

기존의 단점을 극복한 proliposomes를 제조하기 위하여 세 가지 새로운 제법을 통해 제제를 설계하였다. 세 가지 제법 모두 기존의 matrix 에 인지

질 solution 을 분사하여 코팅하는 제법이 아닌 matrix, 인지질, 계면활성제를 모두 섞어서 제조하여 제제 안의 인지질의 함량을 늘리려 하였다. 하지만, spray-drying method (Fig 3a)와 melt-extrusion method (Fig 3b)으로는 proliposomes를 재현성 있게 제조하는데 실패하였다. Spray-drying method에서는 용매인 70% ethanol를 evaporation 시키기 위한 온도를 설정하는 과정에서 용매를 원활히 날리기 위한 온도가 인지질의 녹는점 보다 크게 높았다. 그 결과, spray 된 인지질이 녹아버려 spray-dryer의 벽면에 끈적하게 부착되었고 이를 회수하지 못하였다. 또한, melt-extrusion method는 온도를 높여 넣어준 mixture 가 유동성 있는 반죽을 만들게 되는데, 해당 온도에서 matrix로서 넣어준 sucrose 가 캐러멜화 되는 현상이 발생하여, 실험의 재현성 측면에 문제가 있어 실험을 진행할 수 없었다. 따라서 온도를 높이지 않고, 실험의 재현성을 확보할 수 있는 freeze-drying method (Fig 3c)를 통해 새롭게 proliposomes를 제조하기로 하였다.

3.1.1. Blank proliposomes의 size

약물이 포함되지 않은 blank proliposomes의 특성을 관찰하면서 적절한 지질 비율을 선정하였다. Proliposomes의 약물 봉입률은 지질 함량에 비례하므로, 적절한 흐름성과 점도를 갖는 proliposomes이 생성될 수 있는 최대 지질 비율을 찾으려 하였다. Table 2와 같이 1%부터 20%까지 지질의 비율을 높여 proliposomes을 제조한 후, 재분산된 liposomes의 크기를 ELS를 통하여 관찰한 결과 Figure 4와 같이 liposomes의 크기가 지질비율의 증가에 따라 증가함을 확인할 수 있었다. 지질의 비율을 20%로 높였을 때에 평

균 입자의 크기가 1 μm 인 liposomes을 얻었으며, 약물 전달체로서 liposomes이 더욱 효과적으로 작용하기 위하여 liposomes의 size가 더욱 증가하지 않도록 지질의 비율을 20% 이상 높이지 않는 것으로 하였다 (29-31). 따라서 Proliposomes 제조시 지질의 비율은 20%로 정하여 뒤의 처방 구성에 이용하였고, 20%의 지질 비율을 갖는 blank proliposomes의 intensity, volume, number distribution 은 Fig 4와 같았다.

3.1.2. Blank proliposomes의 SEM, TEM 사진

Matrix로서의 sorbitol과 약물, blank proliposomes의 표면을 주사전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig 5의 (a-c)와 같았고, blank proliposomes을 물에 재분산하여 얻어진 liposomes을 투과전자현미경을 통해 관찰한 결과는 Fig 6(a)와 같았다. 이러한 결과를 바탕으로 20%의 지질 비율로 proliposomes을 제조하였을 때에도 liposomes이 생성됨을 확인할 수 있었다.

3.2. SV-proliposomes

3.2.1. SV-proliposomes의 size, zeta potential, encapsulation efficiency

일반적으로 proliposomes를 경구 투여할 경우 위장에서 proliposomes는

인위적인 큰 에너지 없이 생체액과 만나 부드럽게 섞여 재분산이 될 것이다. 따라서 새로운 제법인 동결건조법을 통하여 만들어진 고체가 물과 접촉시 큰 에너지가 필요 없이 즉시 liposomes을 형성하는지를 확인하기 위하여 만들어진 제제를 두 가지 방법으로 물에 풀어 물성을 확인하였다. 큰 에너지 없이 손으로 9분간 부드럽게 흔들어 proliposomes을 물에 재분산시키는 방법을 통해 얻은 liposomal suspension과 (Table3), 전통적으로 liposomes을 형성하기 위한 에너지를 가해 (32) vortexing과 sonication을 통하여 얻어지는 liposomal suspension (Table 4)의 물성확인 결과를 비교하여 손으로만 흔들어도 충분히 liposomes이 형성될 수 있음을 확인하고자 하였다. Table 3에서 볼 수 있듯이, 제제를 에너지 없이 손으로만 흔들어 재분산 시에도 평균입자경 500-1000 nm 인 liposomes을 얻을 수 있었으며 약물 봉입률은 50~80% 대의 결과를 얻을 수 있었다. 또한 지질 대비 약물 loading 비율이 높은 제제일수록 재분산 시 liposomes의 평균입자경이 커지고 약물 봉입률은 감소하는 경향을 보였다. 에너지를 가하여 재분산한 Table 4의 결과에서는 Table 3의 결과에 비해 liposomes의 평균입자경이 작았고 약물 봉입률은 전체적으로 커졌으나, 약물 loading량에 따른 liposomes의 평균입자경과 약물 봉입률의 변화는 같은 경향성을 보였다. 이것은 지질의 양이 약물을 충분히 봉입하기에 부족하여, 약물 loading량이 낮을수록 높은 봉입률을 보인 것으로 생각된다 (33). Table 3과 4의 평균입자경과 봉입률 변화가 일치하는 경향으로 보아, 손으로만 흔들어 재분산하여도 약물이 봉입된 liposomes이 충분히 형성될 수 있음을 확인하였다.

한편, 경구투여된 proliposomes이 장내에서 재분산될 경우 특별히 liposomes의 크기가 일정해 지도록 filtration을 거치는 과정이 없으므로, 제

제의 물성 평가 시에도 filtration 과정을 거치지 않았다. 때문에 liposomes의 크기 분포가 넓었으며, 미처 녹지 않은 약물이나 지질 덩어리 등이 매우 큰 입자 크기대에서 검출될 수도 있다. 이에 따른 blank proliposomes와 SV-proliposomes을 물에 재분산시켜 ELS를 통해 intensity, volume, number distribution을 비교한 결과가 Figure 5,8,9에 나타나있다. Figure 5에서 볼 수 있듯 약물이 들어가지 않은 blank proliposomes를 재분산 한 결과에서는 10 μm 이상의 크기를 갖는 입자가 관찰되지 않은 반면, 약물이 들어간 SV-proliposomes을 재분산 한 결과(Fig 7과 8)에서는 눈에 띄게 관찰되었다. 또한, F1과 F2, F3에서의 결과에서 지질 대 약물의 비율이 가장 높은 F1에서 10 μm 이상의 크기를 갖는 입자들이 많이 관찰됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보았을 때 이런 크기의 입자들은 liposomes로 보기에 어렵고, 봉입 되지 않은 약물이라고 추측할 수 있었다. 그렇기 때문에 blank proliposome 재분산 시에는 관찰이 되지 않았던 것이고, 지질 대비 약물 비율이 가장 낮은 F3에서 가장 적게 관찰되었던 것으로 추측된다. 또한 이것은 실제로 약물 봉입률(Table 3과 4) 결과와도 일치하였다. F1과 F2, F3의 봉입효율을 비교해 보면(Table 3과 4), 약물 loading 양이 많을수록 liposomes에 봉입되는 약물의 비율이 낮아짐을 확인할 수 있었다. 즉, 지질 대 약물의 비율이 높을수록 liposomes에 봉입되지 못하고 liposomes 밖에 존재하는 약물의 비율이 높아짐을 의미한다. 약물 봉입률이 가장 높은 F3 조성에서 10 μm 이상의 크기를 갖는 입자가 가장 적었던 size distribution 결과를 통해, liposomes에 봉입되지 못한 약물들은 물에 굉장히 난용성이므로 녹지 않고 큰 입자로 존재하게 되며 이것이 10 μm 이상의 크기를 갖는 입자들을 나타낼 것이라는 추측이 가능하다.

3.2.3. SV-proliposomes의 SEM 및 TEM 사진

SV, sorbitol, blank proliposomes과 SV proliposomes의 표면을 주사 전자 현미경을 통해 관찰한 결과는 Fig 6과 같다. 그리고 SV-proliposomes을 두 가지 방법을 통하여 물에 재분산하여 얻어진 liposomes을 투과 전자 현미경을 통하여 관찰한 결과는 Fig 7과 같다. 이러한 TEM 사진 비교를 통해서 SV-proliposomes을 vortexing과 sonication과 같이 큰 에너지를 가지 않고서 손으로 흔들어서 재분산했을 시에도 충분히 liposomes 입자가 생성됨을 확인할 수 있었다.

3.2.5. SV-proliposomes의 XRD

SV, sorbitol, F1, F2, F3 의 XRD 패턴은 Fig 10과 같았다. SV 의 경우 회절각 ($^{\circ}2\theta$) 이 7.6, 9.3, 10.9, 15.5, 16.5, 17.1, 17.8, 18.7, 19.5, 22.5 에서 특징적인 피크가 관찰되었다. 또한 sorbitol 의 경우, 11.8, 18.7 에서 특징적인 피크가 관찰되었다. 이는 이들의 고유한 crystalline 특성을 나타내는 피크인 것으로 보여진다 (34, 35). 하지만, F1, F2, F3 조성에서는 다음과 같은 특징적인 피크가 사라졌고, 피크자체가 매우 broad 해짐을 알 수 있었으며, 그 intensity 또한 매우 작음을 알 수 있었다. 이는 F1, F2, F3 의 제조과정에서 SV 의 고유한 crystallinity 가 사라져 SV 의 일부가 amorphous 한 형태로 바뀌었음을 의미하며, 이로써 SV 자체의 용해도가 증가할 것으로 예상된다 (34). 또한, 이것은 이후의 F1, F2, F3 조성으로부터

의 용출 증가 현상을 설명할 수 있는 근거가 되는 결과이다 (35).

3.2.4. SV-proliposomes의 DSC

SV, sorbitol, F1, F2, F3 의 DSC 패턴은 Fig 11 에 나타내었다. SV 의 경우, 138°C 에서 흡열성의 피크가 관찰되었고, sorbitol 의 경우, 100°C 에서 피크가 관찰되었다. 이는 이들의 고유한 melting temperature 에서의 흡열성의 피크인 것으로 보여진다 (34, 36). 하지만, F1, F2, F3 의 제제에서는 SV melting temperature 에서의 피크는 완전히 사라졌으며, 오히려 흡열성의 피크가 78°C 로 이동한 것을 볼 수 있다. 이는 만들어진 제제가 인지질 내에 SV 가 봉입된 새로운 particle 이 되었음을 의미한다 (37). 또한, 일반적으로 약물의 녹는점과 관련된 흡열성의 피크가 사라진 것은 만들어진 제제에서 약물의 crystalline 구조의 결여와 관련된 것으로 여겨지고 있다 (34). 따라서, 만들어진 proliposomes 제제에서 SV 의 고유한 crystalline 구조가 변하였음을 알 수 있었고, 이는 이전의 XRD 패턴과 일치하는 결과라 말할 수 있다.

3.3. 용출 평가

3.3.1. 용출액의 선정

난용성 약물인 SV의 USP에 명시된 용출 기준은 “0.5% SLS in sodium

phosphate buffer, pH 7.0” 이다. 하지만 계면활성제는 liposomes를 micelle로 분해시킬 수 있으므로, 높은 농도의 계면활성제가 함유된 용출액에서 liposomes은 제제학적으로 불안정성을 보일 우려가 있다 (38). 따라서 liposomes이 안정하게 유지될 수 있는 용출액을 선정하기 위하여 계면활성제인 SLS가 다양한 농도로 함유된 용출액에서 liposomes의 안정성을 확인하였다. SLS가 함유되지 않은 것을 대조군으로 하여, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5% (w/v)의 SLS가 함유된 pH 7.0 완충액에서 3시간 동안의 liposomes의 안정성을 확인한 결과는 Fig 12과 같다. SLS의 영향이 없는 대조군에서의 liposomes의 size 결과에 유의적인 차이가 없어야 liposomes가 안정하다고 판단하여 SLS의 농도를 결정하였다. 그 결과 최대 0.02% (w/v) SLS를 함유한 용출액에서 liposomes의 안정성에 문제가 없는 것으로 확인이 되었고, 따라서 제제에 영향을 주지 않는 계면활성제 SLS의 최대 농도를 0.02% (w/v)로 확립하였다.

3.3.2. pH 별 용출 시험

제제로부터 SV의 용출은 약물의 생체이용률과 관계가 깊으므로, 시험약 및 대조약의 비교 용출 실험을 통하여 기존 제제에 비하여 SV proliposomes 제제의 용출이 개선되어있는지를 확인하고자 하였다. 대조약의 용출과 본 연구의 제제의 용출을 비교한 결과는 Fig. 13과 같았다. 계면활성제가 첨가된 pH 7.0에서의 용출 결과 대조군에 비하여 세 가지 제제가 약 두 배 가량 높은 용출률을 보임을 확인할 수 있었다. 이러한 용출률의 증가는 난용성 약물인 SV가 liposomes의 지질 층 내에 봉입되어 가용화 되었기 때문이라고 여

겨진다. 뿐만 아니라 앞의 XRD, DSC 결과를 바탕으로 봉입된 약물이 고유한 crystallinity를 잃은 채 amorphous 한 형태로 변했기 때문에 약물의 용해도 자체가 상승한 이유도 있을 것이다. 제제의 전체 용출률은 약 50% 정도이며, filtration을 하지 않은 용출 곡선에서는 100%가 나온 것으로 보아 약물의 약 50% 정도가 liposomes 내에 봉입되어 용출되었고, 나머지 50%는 liposomes 내에 봉입되지 않은 채로 용출액에 존재함을 알 수 있었다. 하지만 pH 4.0 에서의 용출 결과 (Fig. 13b)에서는 대조군과 세 가지 제제의 용출률 (약 10%)이 차이가 없이 낮았으며, filtration을 하지 않은 용출 곡선에서도 100%가 아닌 약 60%만이 나왔다. pH 1.2에서의 용출 결과 (Fig. 13c)에서는 대조군에 비하여 오히려 제제의 용출률이 낮았으며, 약물이 정량한계 미만의 농도로 검출되었다. 이렇게 pH 1.2와 4.0에서 제제의 용출과 filtration을 하지 않은 용출이 모두 낮게 나온 것은 Fig 14로 설명 가능하다. 즉 pH 7.0에서는 용출 시험 종료 직후에 용출용기에 가라앉은 잔류물이 없이 깨끗함을 알 수 있다. 실제로 pH 7.0에서의 용출 결과, filtration을 하지 않음으로써 liposome 내에 봉입된 약물과 봉입되지 못하고 liposome 밖에 존재하는 약물의 합을 정량한 결과가 100%였던 것과 일치하는 결과이다. 하지만 나머지 pH에서는 용출용기에 뿌옇게 가라앉은 잔류물을 확인할 수 있었으며, 이것은 산성 환경에서 용출 시험 시 제제가 불안정하여 liposomes를 형성하지 못하고 가라앉은 것으로 보인다. 이 때문에 제제의 용출이 낮았을 뿐만이 아니라 filtration을 하지 않은 용출까지도 낮았던 것으로 생각된다. 이는 pH 1.2에서 용출용기 바닥에 침전물이 많았던 사실과 이에 따라 용출률 또한 낮았던 것과 일치하는 결과이다. 이러한 결과는 지질로 사용된 SPC가 산성 환경에서 불안정하기 때문인 것으로 보인다 (39).

4. 결론

새로운 제법인 동결건조법을 통해 인지질, 매트릭스, 계면활성제 그리고 약물을 이용하여 proliposomes을 제조하였고, 이에 따라 지질의 함량을 20% 까지 늘려 기존의 단점을 극복한 proliposomes 제제를 개발하였다. 또한 이를 큰 에너지를 가하지 않고 손으로만 흔들어서 물에 재분산시켜도 500-1000 nm 크기 대와, 50-80% 대의 약물 봉입효율을 가지는 liposomes 입자가 생성됨을 확인하였다. 용출시험 시 pH 7.0 조건에서 대조군에 비해 약 2 배 가량 높은 용출률을 보여 난용성 약물의 가용화가 성공적으로 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이러한 난용성 약물의 가용화를 통한 최종적으로 약물의 생체이용률 증가를 확인하기 위해서는 *in vivo* 시험이 필수적이다. 하지만 위의 세 가지 제제 군에서의 용출률 차이가 보이지 않음에 따라 추후에 제제의 permeation study를 진행하여 제제 간 차이를 보아야 할 것이다. 또한 산성 조건에서 제제가 불안정하여 용출률이 급감한 자료를 토대로, 추후 *in vivo* 시험 시 이러한 위의 산성 환경을 피할 수 있는 제제의 연구(예, 장용성 제제)가 필요할 것으로 생각된다.

References

1. Ku MS, Dulin W. A biopharmaceutical classification-based Right-First-Time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from First-In-Human to clinical Proof-Of-Concept. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2012;17(3):285-302.
2. Kim KT, Lee JY, Lee MY, Song CK, Choi J, Kim D-D. Solid dispersions as a drug delivery system. *J Pharm Invest*. 2011;41:125-142.
3. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;420(1):1-10.
4. Rao S, Song Y, Peddie F, Evans AM. Particle size reduction to the nanometer range: a promising approach to improve buccal absorption of poorly water-soluble drugs. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:1245-1251.
5. MR f. Liposomal drug delivery: advantages and limitations from a clinical pharmacokinetics and therapeutic perspective. *Clinical Pharmacokinetics*. 1991;21:155-164.
6. Akbarieh M, Besner J, Galal A, Tawashi R. Liposomal delivery system for the targeting and controlled release of praziquantel. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1992;18(3):303-317.
7. Jia Y, Joly H, Omri A. Liposomes as a carrier for gentamicin delivery: development and evaluation of the physicochemical properties.

- International Journal of Pharmaceutics. 2008;359(1):254-263.
8. Hwang KJ. In *Liposomes: from Biophysics to Therapeutics*. Marcel Dekker Inc New York. 1987:109-110.
 9. Klein R. The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*. 1970;210(3):486-489.
 10. Larrabee AL. Time-dependent changes in the size distribution of distearoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*. 1979;18(15):3321-3326.
 11. Wong M, Thompson TE. Aggregation of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*. 1982;21(17):4133-4139.
 12. Lentz BR, Carpenter TJ, Alford DR. Spontaneous fusion of phosphatidylcholine small unilamellar vesicles in the fluid phase. *Biochemistry*. 1987;26(17):5389-5397.
 13. Ahn B-N, Kim S-K, Shim C-K. Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol. *Journal of Controlled Release*. 1995;34(3):203-210.
 14. Payne NI, Timmins P, Ambrose CV, Ward MD, Ridgway F. Proliposomes: a novel solution to an old problem. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1986;75(4):325-329.
 15. Rojanarat W, Changsan N, Tawithong E, Pinsuwan S, Chan H-K, Srichana T. Isoniazid Proliposome Powders for Inhalation-Preparation, Characterization and Cell Culture Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(7):4414-4434.
 16. Gupta V, Barupal AK, Ramteke S. Formulation development and in vitro

- characterization of proliposomes for topical Delivery of aceclofenac. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;70(6):768-775.
17. Chen QI HY, Gu XQ, Chen CZ, Huang DN. A study on the preparation of proliposomes by spray drying method. J Shenyang Pharm University. 1997;14:166-169.
 18. Zhang J, Zhu J. A novel method to prepare liposomes containing amikacin. Journal of Microencapsulation. 1999;16(4):511-516.
 19. Yang ZJ HT, Kawashima Y. Studies on the size of rehydrated new liposomes from scutellaria proliposomes. Journal of China Pharmaceutical University. 1993;24:161-164.
 20. Junping W, Maitani Y, Takayama K, Nagai T. In vivo evaluation of doxorubicin carried with long circulating and remote loading proliposome. International Journal of Pharmaceutics. 2000;203(1):61-69.
 21. Hu C, Rhodes DG. Proniosomes: a novel drug carrier preparation. International Journal of Pharmaceutics. 1999;185(1):23-35.
 22. Song K-H, Chung S-J, Shim C-K. Preparation and evaluation of 2002;84(1):27-37.
 23. Ramana LN, Sethuraman S, Ranga U, Krishnan UM. Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine. Journal of Biomedical Science. 2010;17(1):57-65.
 24. Cheng H, Sutton SC, Pipkin JD, Zentner GM, Rogers JD, Schwartz JI, et al. Evaluation of Sustained/Controlled-Release Dosage Forms of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) Reductase Inhibitors in Dogs and Humans. Pharmaceutical Research. 1993;10(11):1683-1687.

25. R.P. Patel MMP. Inclusion complexion-physico-chemical characterization and in vitro dissolution behavior of simvastatin-cyclodextrin inclusion compounds. *Drug Delivery Technology*. 2007;7:50-56.
26. Chavhan SS, Petkar KC, Sawant KK. Simvastatin nanoemulsion for improved oral delivery: design, characterisation, in vitro and in vivo studies. *Journal of Microencapsulation*. 2013 (30):771-779.
27. Kang BK, Lee JS, Chon SK, Jeong SY, Yuk SH, Khang G, Lee HB, Cho SH. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *International journal of Pharmaceutics*. 2004;274(1):65-73.
28. Schwendener RA, Schott, H. J. Lipophilic 1-beta-d-arabinofuranosyl cytosine derivatives in liposomal formulations for oral and parenteral antileukemic therapy in the murine L1210 leukemia model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1996;122:723-726.
29. Hlrano K, Anthony Hunt C. Lymphatic transport of liposome-encapsulated agents: Effects of liposome size following intraperitoneal administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1985;74(9):915-921.
30. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, Jain RK. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Research*. 1995;55(17):3752-3756.
31. Mayer LD, Tai LC, Ko DS, Masin D, Ginsberg RS, Cullis PR, Bally MB. Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Research*. 1989;49(21):5922-30.

32. Mozafari MR. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2005;10(4):711-719.
33. Rojanarat W, Nakpheng T, Thawithong E, Yanyium N, Srichana T. Levofloxacin-Proliposomes: Opportunities for use in lung tuberculosis. *Pharmaceutics*. 2012;4(3):385-412.
34. Bolourchian N, Mahboobian MM, Dadashzadeh S. The Effect of PEG molecular weights on dissolution behavior of simvastatin in solid dispersions. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:9-18.
35. Sandhiya Jatwani, Avtar Chand Rana, Gurpreet Singh, Geeta Aggarwal. Solubility and Dissolution enhancement of simvastatin using synergistic effect of hydrophilic carriers. *Der Pharmacia Lettre*. 2011;3(6):280-293.
36. Sztatisz J, Gál S, Fodor L, Pungor E. Thermal investigations on the crystallization of sorbitol. *Journal of Thermal Analysis*. 1977;12(3):351-360.
37. Hiremath PS, Soppimath KS, Betageri GV. Proliposomes of exemestane for improved oral delivery: Formulation and in vitro evaluation using PAMPA, Caco-2 and rat intestine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;380(1):96-104.
38. De la Maza A, Parra Juez J. Disintegration of liposomes by anionic surfactants and formation of mixed micelles. *Langmuir*. 1993;9(3):870-873.
39. Grit M, Underberg WJ, Crommelin DJ. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1993;82(4):362-366.

Table. 1. Composition of blank proliposomes

Soy PC (%)	Poloxamer 188 (%)	Sorbitol (%)
1	1	98
2	1	97
5	1	94
7	1	92
10	1	89
12	1	87
15	1	84
20	1	79

Table. 2. Composition of SV-proliposomes

Formulation	Soy PC (%)	Poloxamer 188 (%)	Sorbitol (%)	Simvastatin (%)	Lipid : Drug Ratio
F1	20	1	79	4	5 : 1
F2	20	1	79	2.66	7.5 : 1
F3	20	1	79	2	10 : 1

Table. 3. Characterization of proliposomes after reconstitution by gentle shaking (mean±S.D).

Formulation	Size (nm)	PI	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
F1	1090±178	0.411±0.0605	-46.7±1.45	50.8±4.05
F2	559±52.2	0.258±0.0140	-47.6±0.741	66.7±3.04
F3	525±7.73	0.327±0.0443	-48.8±2.29	78.6±11.7

Table. 4. Characterization of proliposomes after reconstitution by vortexing and sonication (mean±S.D).

Formulation	Size (nm)	PI	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
F1	758±84.0	0.315±0.0266	-53.9±0.712	75.5±2.24
F2	340±5.52	0.137±0.00681	-55.0±0.692	80.3±5.24
F3	219±26.1	0.262±0.0528	-45.0±0.932	85.1±3.38

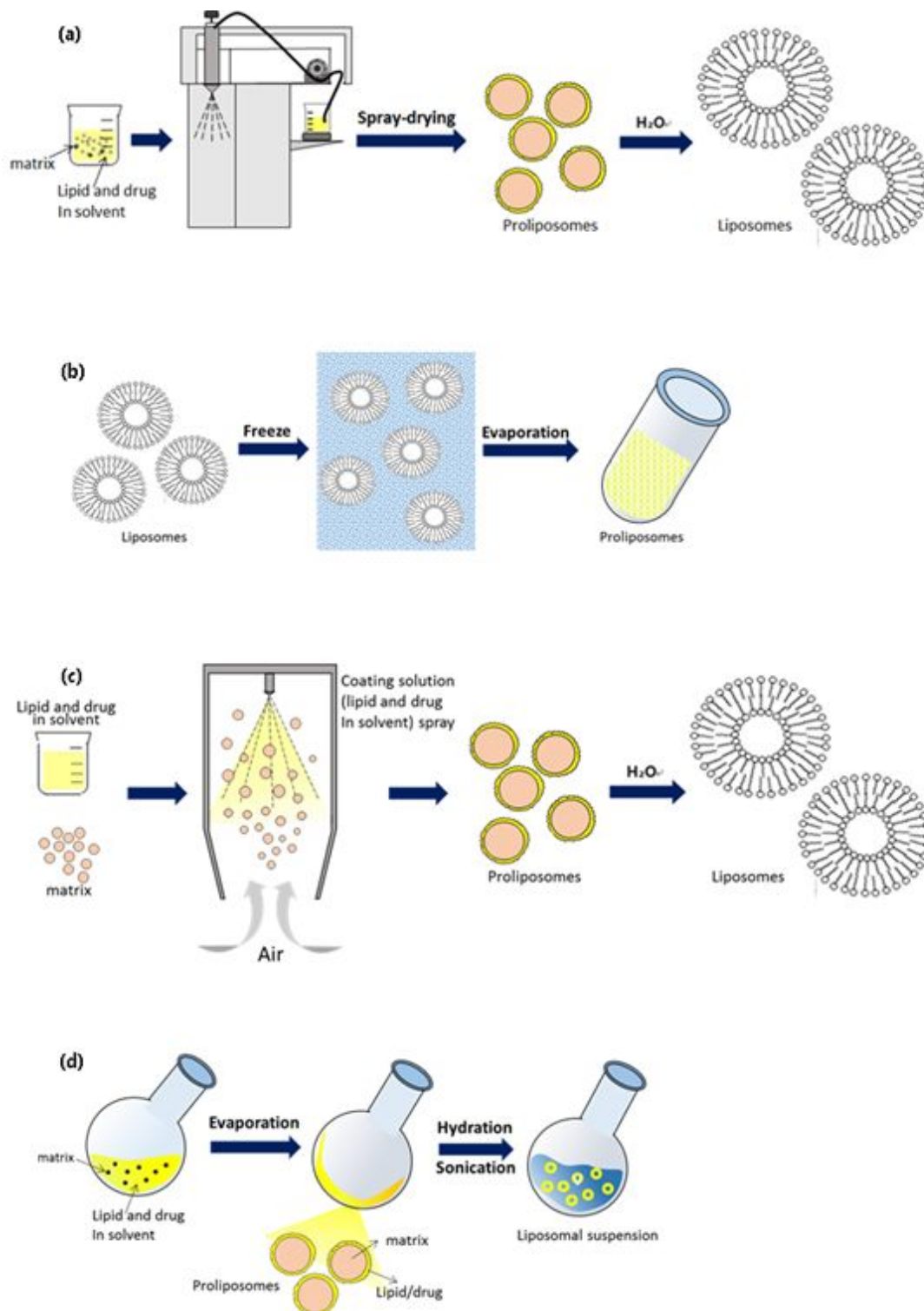


Fig. 1. Preparation methods of proliposomes (a) spray-drying method (b) freezing and drying method (c) fluidized bed method (d) film-deposition on carriers method.

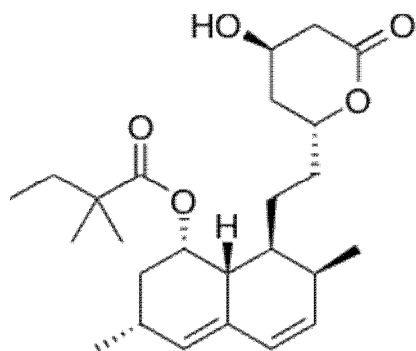


Fig. 2. Chemical structure of simvastatin.

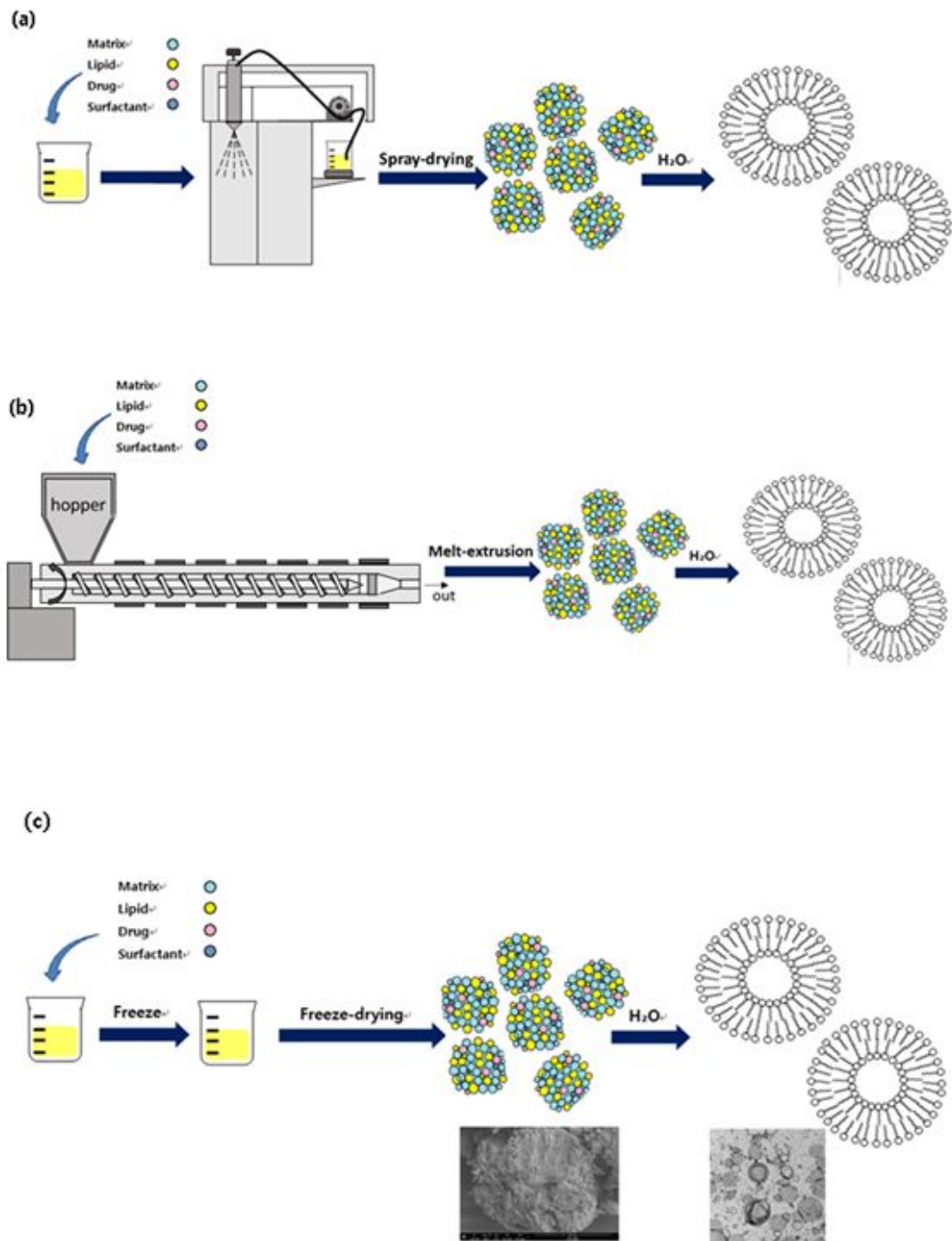


Fig. 3. Novel preparation methods of proliposomes (a) spray-drying method (b) melt-extrusion method (c) freeze-drying method.

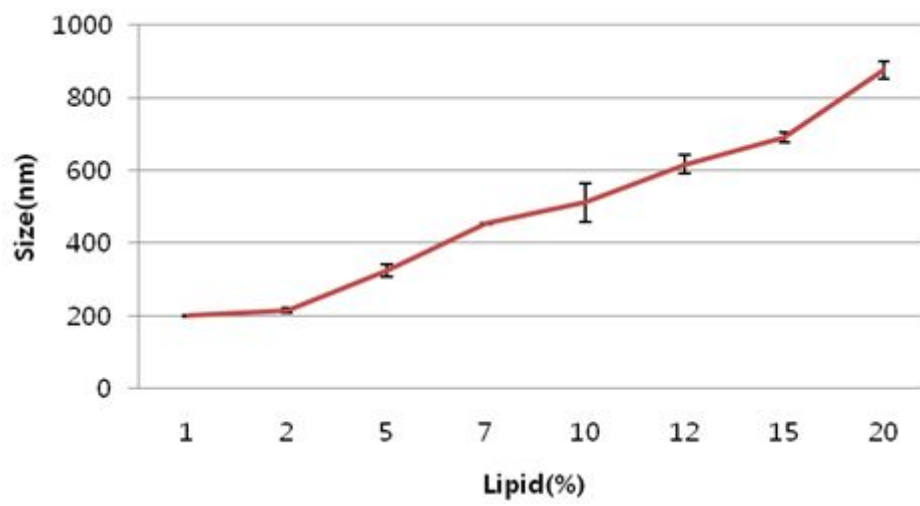


Fig. 4. Effect of lipid content on the size of blank proliposomes (mean \pm S.D).

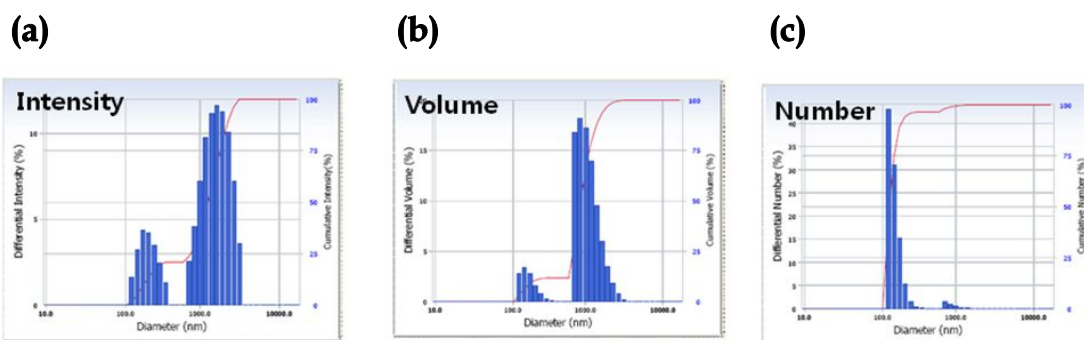


Fig. 5. Particle size distribution of blank proliposomes with 20% lipid content ; (a) intensity, (b) volume, and (c) number distribution.

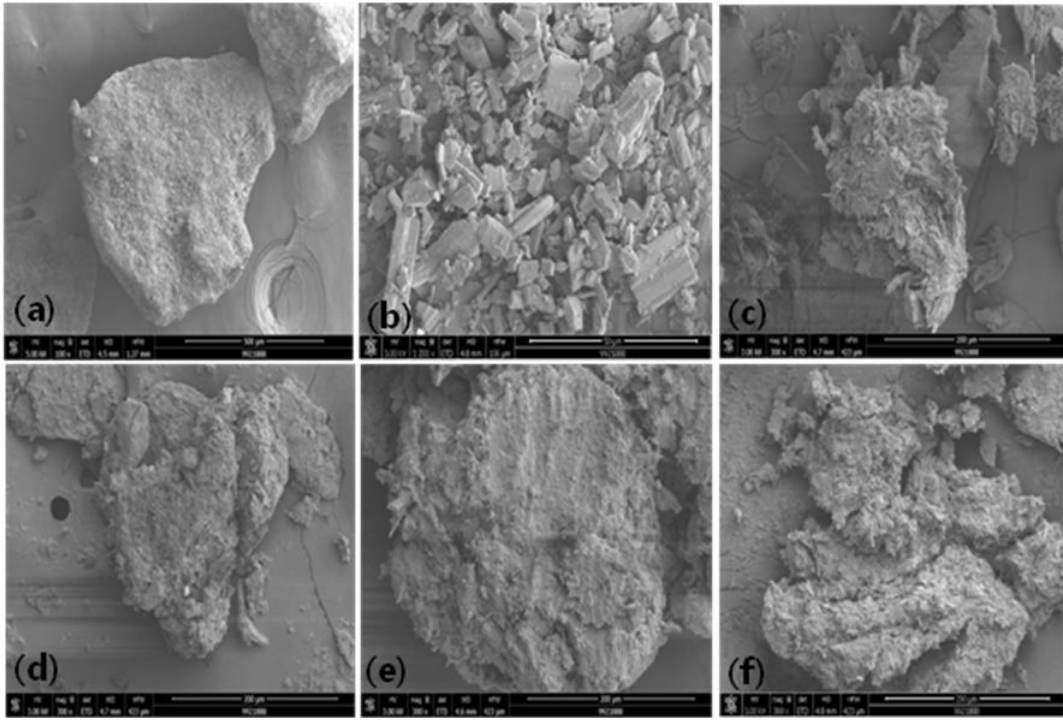


Fig. 6. SEM images of (a) sorbitol, (b) SV, (c) blank proliposomess, (d) F1, (e) F2, and (f) F3,

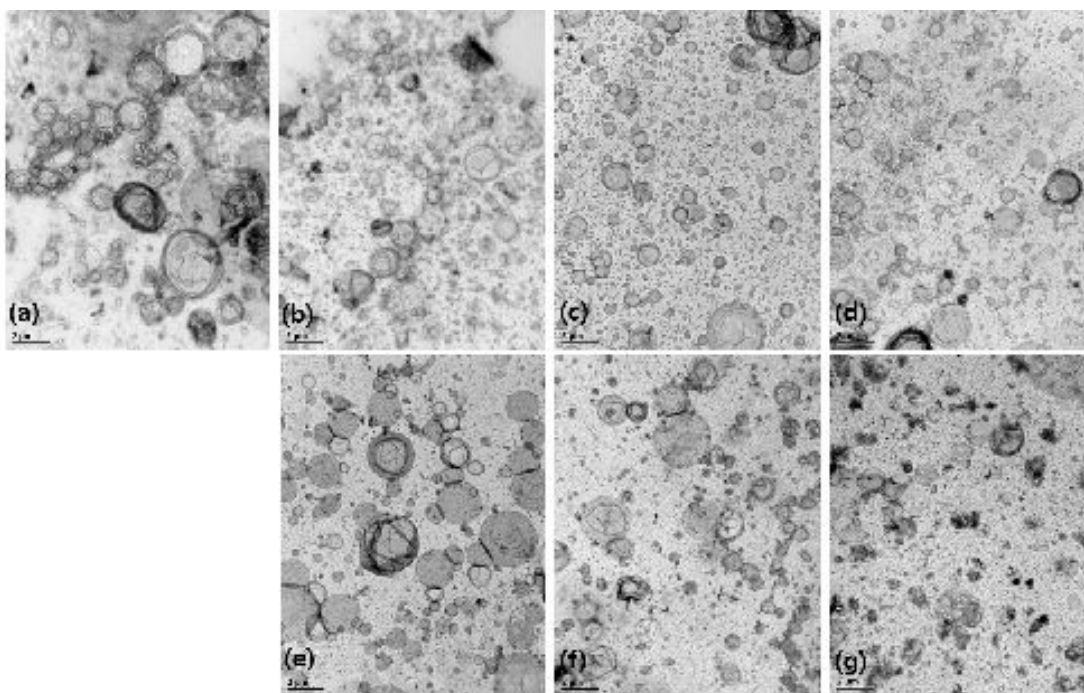


Fig. 7. TEM images of proliposomes after reconstitution. (a) blank proliposomes, (b) F1, (c) F2, (d) F3 after gentle shaking, (e) F1, (f) F2, (g) F3 after vortexing and sonication.

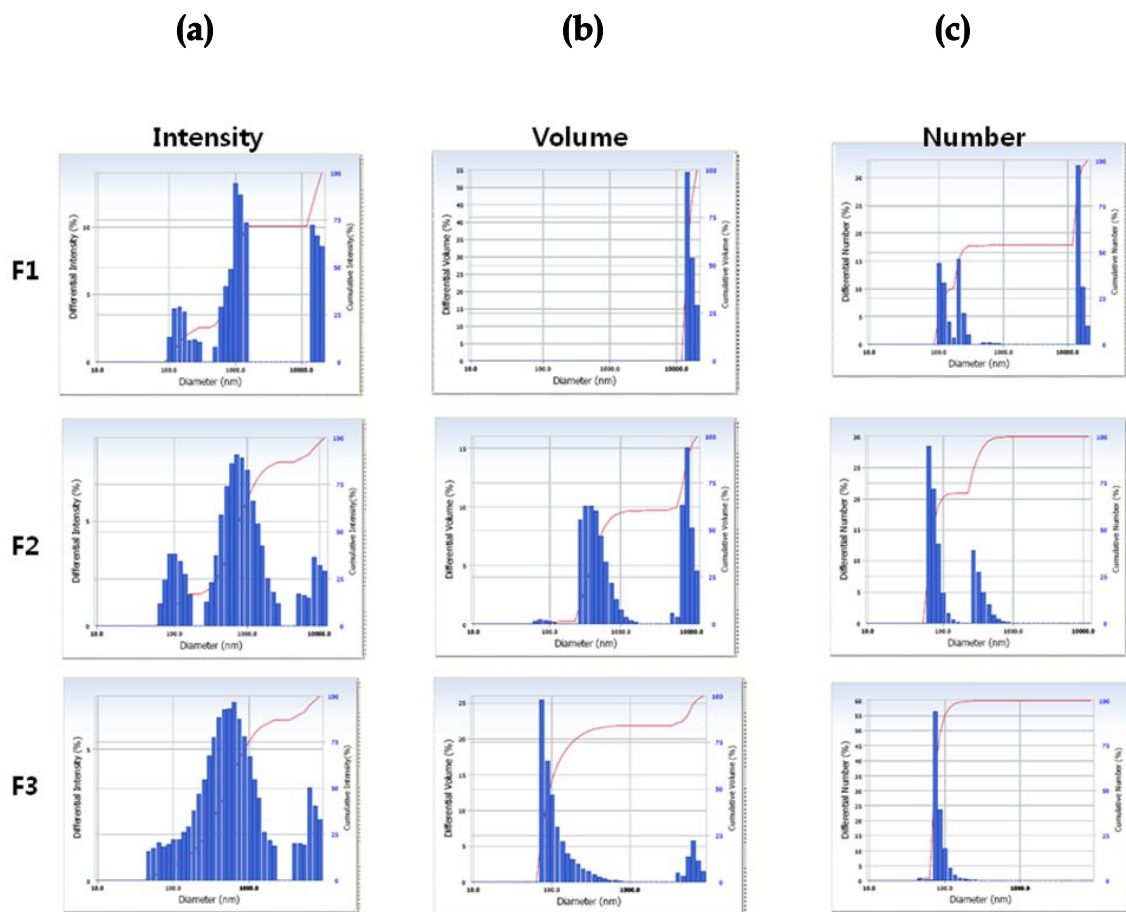


Fig. 8. Particle size distribution of F1, F2, and F3 after gentle shaking ; (a) intensity, (b) volume, and (c) number distribution.

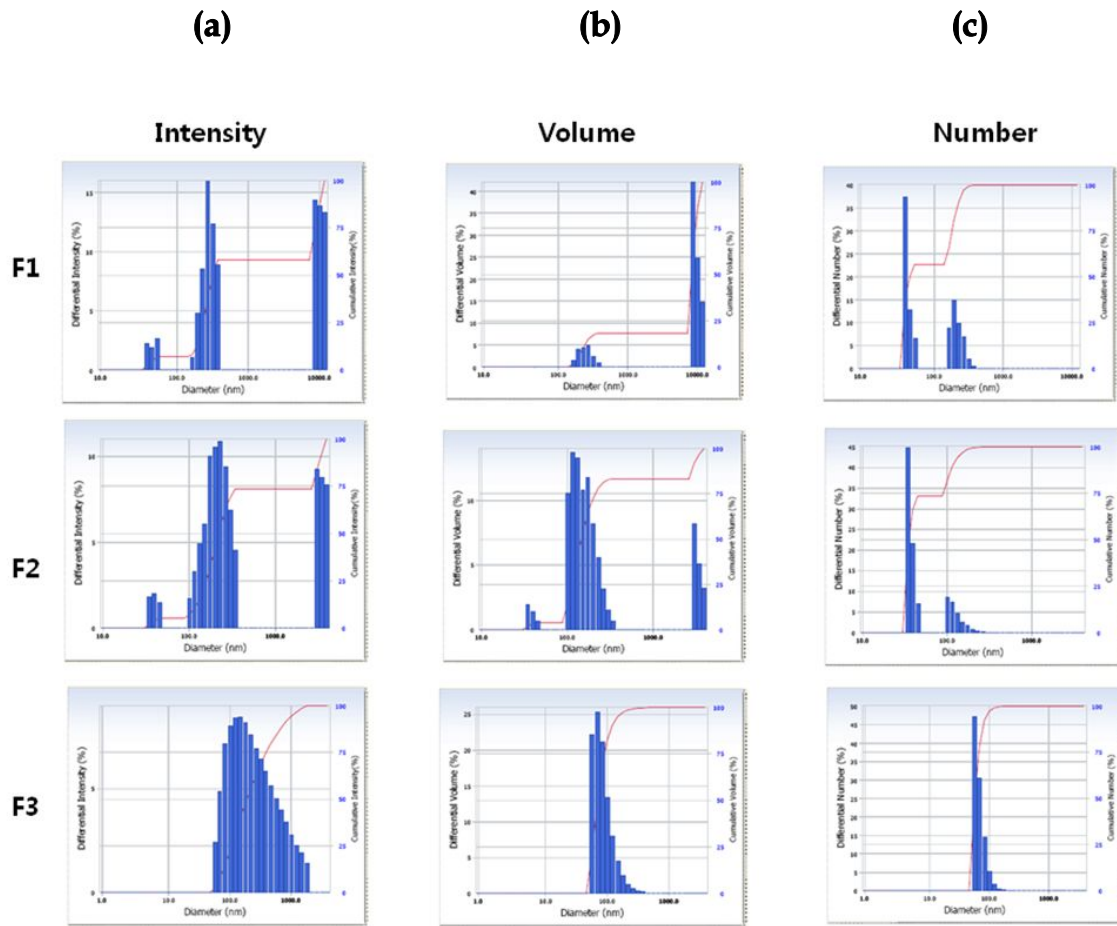


Fig. 9. Particle size distribution of F1, F2, and F3 after vortexing and sonication ; (a) intensity, (b) volume, and (c) number distribution.

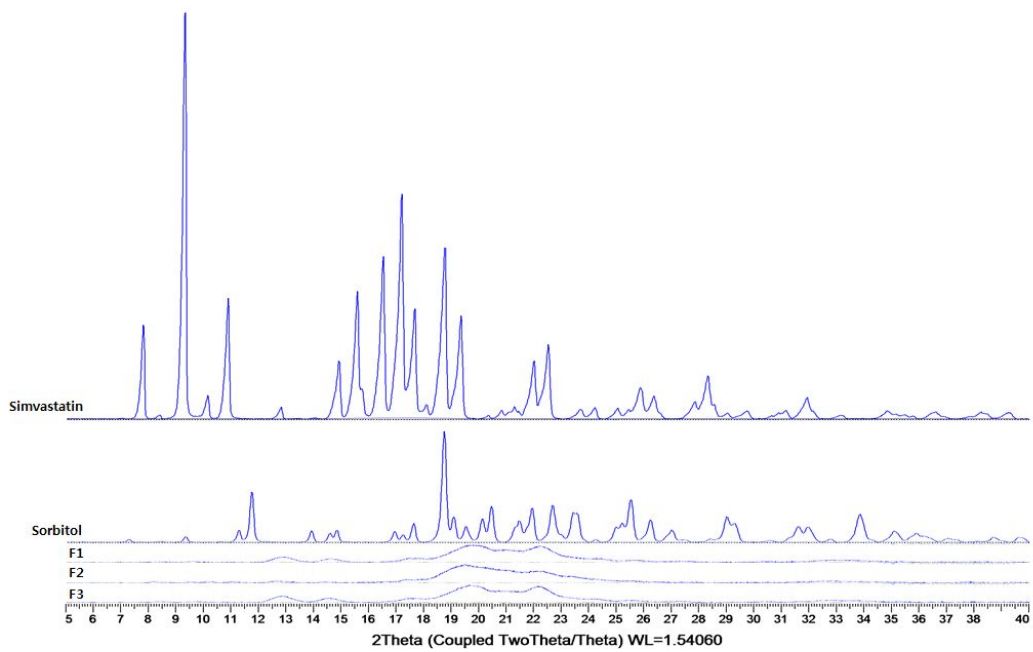


Fig. 10. XRD of SV, Sorbitol, F1, F2, and F3.

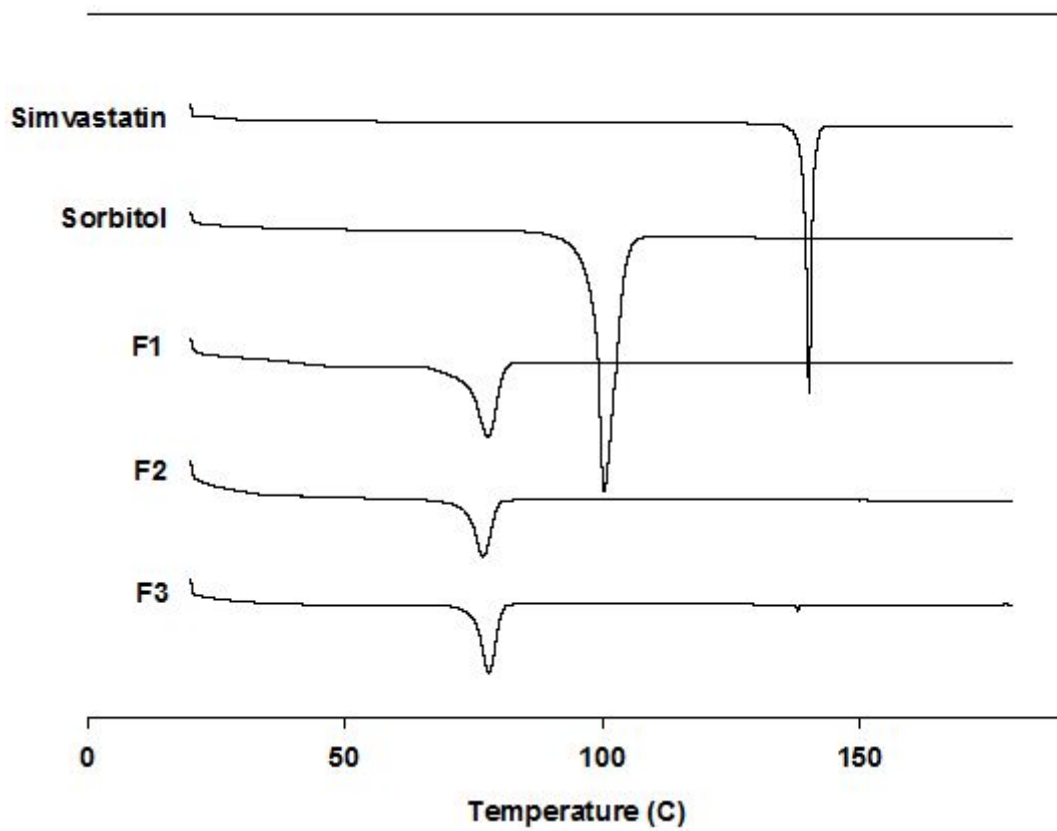


Fig. 11. DSC of SV, Sorbitol, F1, F2, and F3.

(a)

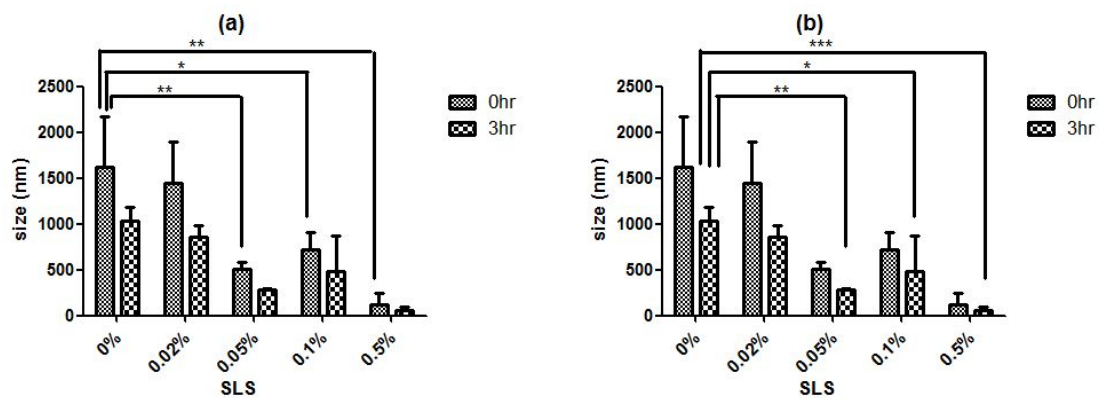


Fig. 12. Effect of SLS concentration in the release medium on the stability of liposomes. (a) Liposome size after 0hr and (b) liposome size after 3hr (mean \pm S.D).

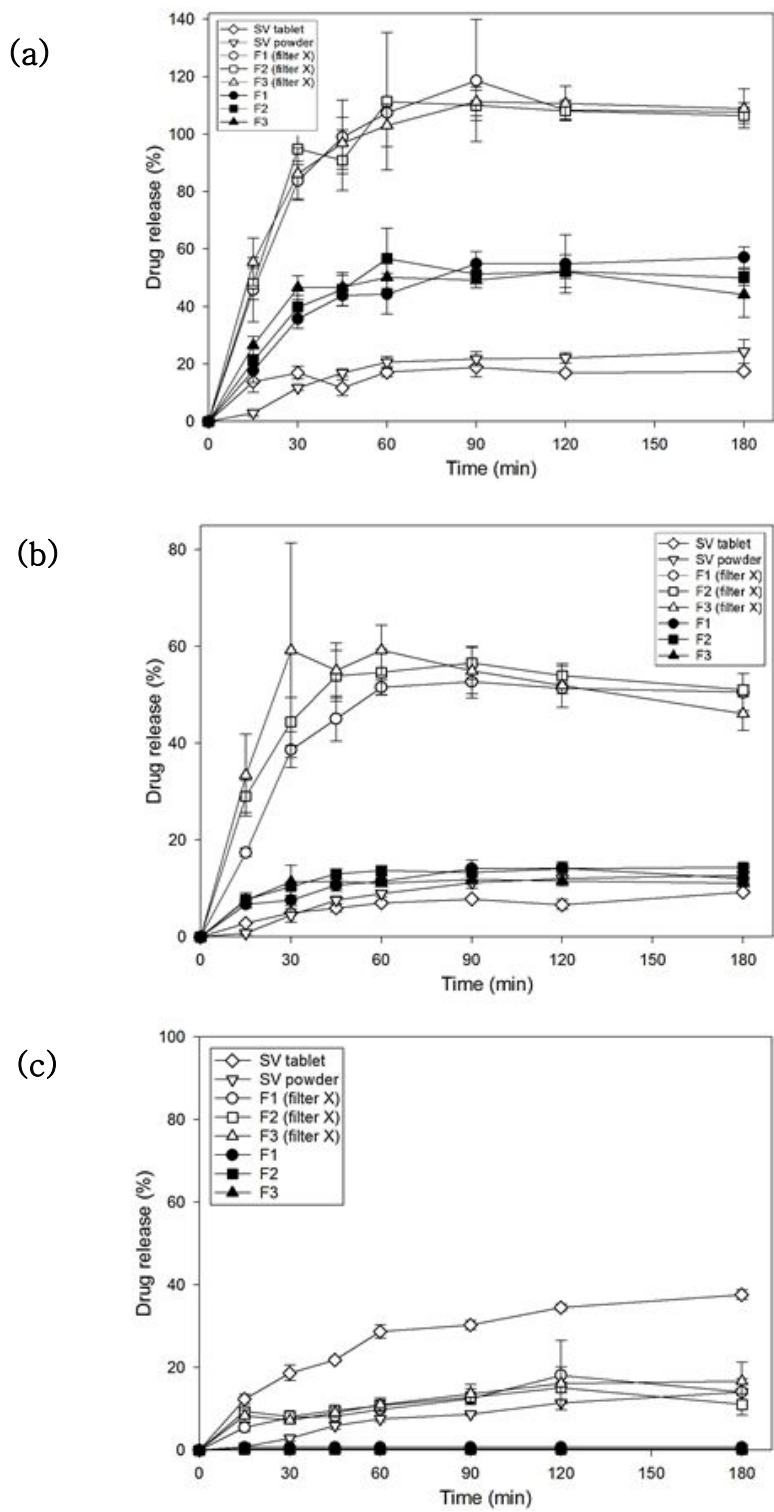


Fig. 13. Release profiles of SV from F1, F2, and F3 into the release medium with (a) pH 7.0, (b) pH 4.0, and (c) pH 1.2, containing 0.02% SLS (mean±S.D).

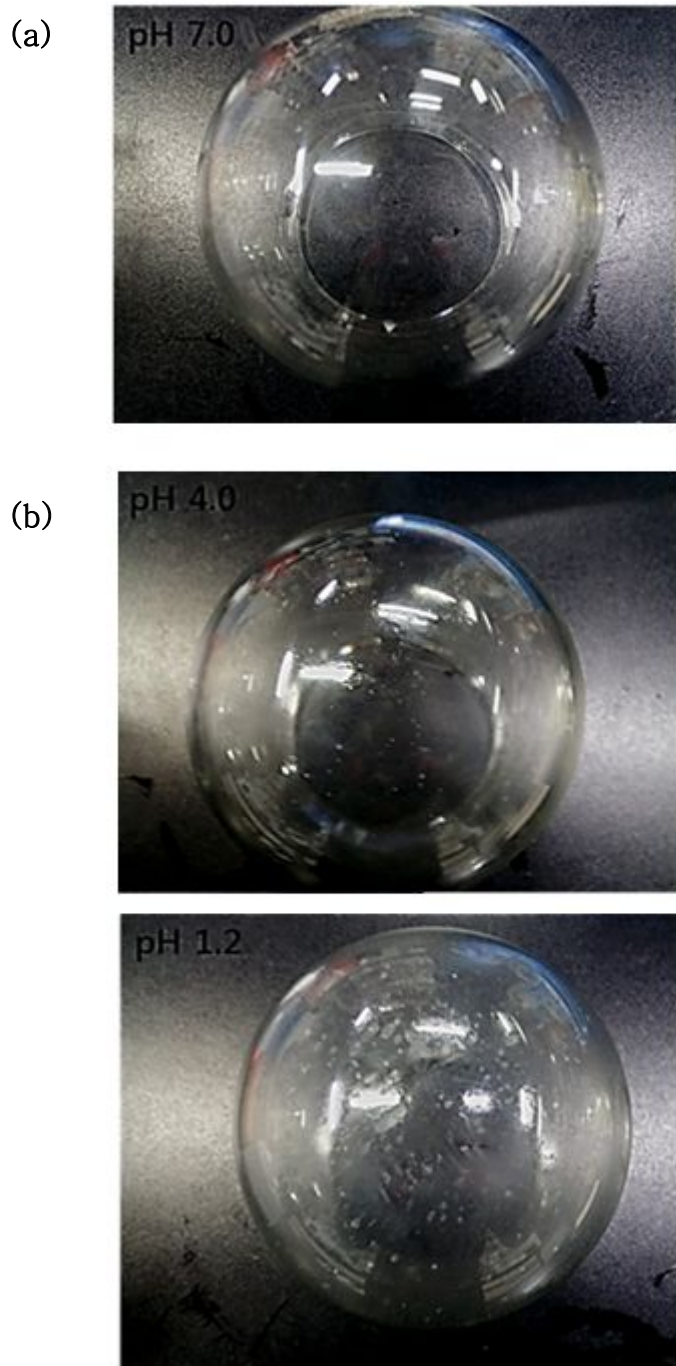


Fig. 14. Pictures after 3hr release study ; (a) pH 7.0, (b) pH 4.0, and (c) pH 1.2, containing 0.02% SLS.