

초임계 역상 증발법을 이용한 대두 레시틴 리포솜의 제조 및 특성

이미진[†] · 정노희* · 장부식

씨엔에이 바이오텍(주), 충북대학교 공업화학과*
(2010년 8월 28일 접수 ; 2010년 12월 3일 채택)

Preparation and Properties of Soybean Lecithin Liposome using Supercritical Reverse Phase Evaporation Method

Mi-Jin Lee[†] · Noh-Hee Jeong* · Boo-Sick Jeang

CNA Biotech, Co. Ltd.,

Department of Engineering Chemistry, Chunbuk National University, Cheongju 361-763 Korea
(Received August 28, 2010 ; Accepted December 3, 2010)

Abstract ; Soybean lecithin liposomes composed phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl inositol and phosphatidic acid were prepared by using the previously developed supercritical reverse phase evaporation method. The effect of phospholipid composition on the formation of liposomes and physicochemical properties were examined by means of trapping efficiency measurements, transmission electron microscopy, dynamic light scattering and zeta potential measurements. The trapping efficiency of liposomes for D-(+)-glucose made of CNA-I which contains approximately 95% phosphatidyl choline is higher than that of CNA-II and CNA-O which contain approximately 32% phosphatidyl choline. However there is no any difference between the trapping efficiency of liposomes for D-(+)-glucose made of CNA-II which has saturated hydrocarbons tails and that of liposomes made of CNA-O which has unsaturated hydrocarbon chains. The electron micrographs of liposomes made of CNA-II and CNA-O show small spherical liposomes with diameter of 0.1~0.25 μ m, while that of CNA-I shows large unilamellar liposomes with diameter of 0.2~1.2 μ m. These results clearly show that phospholipid structure of phosphatidylcholine allows an efficient preparation of large unilamellar liposomes and a high trapping efficiency for water soluble substances. Liposomes made of CNA-II and CNA-O remained well-dispersed for at least 14 days, while liposome suspension made of CNA-I separated in two phase at 14 days due to aggregation and fusion of liposomes. The dispersibility of liposomes made of CNA-I is lower than that of CNA-II and CNA-O due to the smaller zeta potential of CNA-I.

Keywords ; supercritical reverse phase evaporation, soybean lecithin liposomes, trapping efficiency.

[†]주저자 (E-mail : shuduc@hanmail.net)

1. 서론

레시틴은 1847년 Gobley에 의해 달걀 노른자에서 인지질을 분리하여 처음 사용하게 되었다. 레시틴은 난황레시틴(egg yolk lecithin)과 대두레시틴(soy bean lecithin) 등이 있어 화장품, 의약품 및 건강식품등 넓은 분야에서 이용되고 있다. 특히, 의약품분야에서는 주사제로서 레시틴을 이용한 리포솜(liposome)이 연구되어 왔다. 그러나 레시틴은 소수성부분인 불포화 지방산의 함량이 높아 화장품과 같이 오랫동안 안정성이 요구되는 제품에 있어서는 사용이 제한되었다[1]. 따라서 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져 불포화도가 높은 레시틴을 수소화시켜 포화지방산으로 하는 레시틴이 만들어져 보다 안정성이 향상된 레시틴을 응용하게 되었다[2]. 요즘에 이르러서는 불포화도가 높은 레시틴도 안정성을 개선하여 피부 침투 효과를 더욱 높여 매우 우수한 레시틴 리포솜계 제형에 응용되고 있다[3].

리포솜은 수용액에서 양친매성 지질분자들이 스스로 서로 모여 이루어지는 콜로이드 구조상이다. 리포솜들은 내부액상에 지질이중층 캡슐로 스스로 밀착하여 구면을 이루고[4], 생물학적 맴브레인과 비슷한 구조와 기능을 가지고 있기 때문에 생물학적 맴브레인에 대한 모델로 오랫동안 사용되어 왔다[5~9]. 요즘에 이르러 리포솜들은 이중층벽에 내부 수용상과 오일 가용층간 수용성 물질이 존재할 수 있기 때문에 약물전달시스템에서 전형적 전달매체의 역할을 할 수 있다. galactose와 mannose와 같이 당류를 이용하여 리포솜 표피를 모형화하기 쉽고[10, 11], polyethylene glycol[12]과 polyglycerol[13]과 같은 친수성 화합물을 가지고 리포솜 표피를 모델화하여 특이한 조직체나 세포를 유입시키는 리포솜도 있다.

리포솜의 장점은 최근까지 생체막 연구의 모델뿐만 아니라 여러 약물의 운반체로서, 피부에서의 역할은 영양성분의 표적부위 도달과 지속적인 방출 등에 널리 이용되어 왔다. 비록 제형으로서의 안정성에 대한 문제점 또한 많이 대두되고 있으나 리포솜의 제형은 유용한 미용성분을 담을 수 있는 캡슐화의 한 개념으로서 여러 의약품계의 유전자 치료와 암 치료 및 식품 등에 널리 활용되고 있다. 특히, 근래에는 미백, 주름방지, 항노화 등의 기능성 화장품의 생리활

성 천연성분들을 비교적 안정하게 피부에 전달시키는 매개체로서 각광받고 있으며 그 효능성은 계속 연구되고 있다. 예를 들어 리포솜들은 암 치료 효과면에서 치명적인 특이한 세포들에 응용되고[14], 유전자트래핑 베지클(gene-trapping vesicle)에 사용되어 유전자 치료에도 응용되고 있다[15]. 또한 리포솜들은 약품성형과 화장품공업에도 광범위하게 사용되고 있다.

리포솜 제조에는 여러 방법들이 있다. Bangham의 방법[4], 유기용매 주사법[16, 17] 및 역상 탈수법[18] 등이 보고되었다. 이 방법들은 chloroform, ether, freon, methylene chloride 및 methanol 등은 친환경적 차원과 인체에 해를 주는 유기용매들로서 많은 양을 필요로 한다. 소수의 제조 방법들은 유기용매를 사용하지 않고 물에 가용성 물질에 대한 높은 트래핑 효율(trapping efficiency)을 갖고 있어 리포솜을 높은 수득율로 얻을 수 있다[9]. 리포솜들이 약품전달매체로 사용되었을 때는 유기용매를 사용하면 이를 완전히 제거하지 않고 남아 있기 때문에 가능한 한 이를 피하는 것이 바람직하다.

위의 방법들은 초임계 역상 탈수법[19]을 제외하고는 대부분 여러 제조공정을 거치기 때문에 정량적 제조 생산에서는 부적당하다. 초임계 유체는 비용축적이고 임계점이하의 온도와 압력에서 높은 농도를 갖는다. 초임계 유체는 변화하는 온도와 압력에 의하여 민감하게 변할 수 있는 성질을 갖고 있는 고도의 기능성 용매이다. 부분적으로 초임계 탄산가스(sc-CO₂)는 낮은 임계온도(Tc=31℃)와 임계압력(Pc=73.8 bar) 그리고 무독성, 불연소성 및 제조단가가 저렴하기 때문에 유기용매를 대체 할 수 있는 친환경적인 변성 용매로 간주하게 되었다[20, 21].

본 연구에서는 sc-CO₂를 이용한 리포솜의 제조방법을 인용하였다[22]. 즉, 단순 단계로 sc-CO₂와 에탄올을 혼합용매로 사용하여 리포솜을 제조하는 초임계 역상 증발법(scRPE-법)으로 다른 유기용매는 사용하지 않았다. scRPE-방법을 리포솜 제조에 실제로 이용한 것은 인지질의 종류와 함량에 따른 리포솜의 안정성 및 물리화학적 성질이 다른 것을 제조할 수 있기 때문이다. 즉, phosphatidyl choline(PC), phosphatidyl ethanol amine(PE),

phosphatidyl inositol(PI) 및 phosphatidic acid(PA) 등 구성성분의 조성이 다른 대두레시틴을 사용하여 세 종류의 리포솜을 제조하였다. 리포솜을 형성하는데 인지질의 구조적 역할과 물리화학적 성질 등을 트래핑 효율 측정, 투과전자현미경, 열역학적 빛 산란 및 제타포텐셜 측정 등을 이용하여 실험하였다.

2. 실험방법

2.1. 재료

세 종류의 대두레시틴 CNA-I, CNA-II 및 CNA-O는 CNABIOTECH Co., Ltd사제이고 이를 리포솜을 제조하는데 사용하였다. CNABIOTECH Co., Ltd사에서 제공받은 시료의 PC, PE, PI 및 PA의 평균 조성을 Table 1에 나타내었다. 다른 조성물인 탄수화물과 그의 다른 인지질이 다소 미량 포함되어 있지만 확실한 조성이 확인되지 않았다.

에탄올(99.8%)은 Wako제 특급을 사용하였고, 수용성 매개물의 트래핑 효율을 시험하기 위하여 D-(+)-glucose(98%)는 Aldrich제를 구입하여 사용하였다. 주사용 증류수는 2차 이온수를 용매로 사용하였다.

2.2. scRPE-방법에 따른 리포솜 제조

Fig.1은 리포솜 제조 실험장치이다. 레시틴 시료(0.036 g)와 에탄올(0.85 g)의 혼합물을 View cell에 주입시킨 후 탄산가스(12.15 g)를 셀에 넣고 셀의 온도를 60°C까지 가열시킨다. 이는 DSPC의 상전이 온도 56°C보다 높은 온도이다. 한편 압력은 유리관을 통하여 셀을 관찰하여 200 bar를 유지시켰다. 20분 동안 평형을 갖게 하고 수용성 D-(+)-glucose수용액 (0.2 mol/l)이 충분한 양이 채워질 때 까지 HPLC 펌프로 셀에 0.05 ml/min 유속으로 서서히 유입시킨다. 압력은 탄산가스가 소실되어 균일한 리포솜 분

산이 이루어지도록하고 마그넷 교반기로 계속 혼합시킨다.



Fig. 1. Apparatus for preparation of liposome.

2.3. 트래핑 효율 측정

글루코오스 트래핑 효율측정실험에 있어서 리포솜 분산체는 셀로판 튜브(Viscose Scales Corp. 제)를 사용한 증류수에 투석한다. 이는 분산 매개물에 남아 있는 비캡슐화된 글루코오스를 재활용한 것이다. 튜브 안의 리포솜은 에탄올 첨가로 파괴된다. 용액 내의 글루코오스량은 mutarotase GOD법[23]에 의하여 스펙트로메타(MPS-2000, Shimazu제)로 측정한다.

2.4. 리포솜의 투과전자현미경 관찰

리포솜 분산체는 냉동장치(Leica EM CPC, Leica Co.사제)를 사용하여 액체프로판을 이용하여 완전 냉동시켰다. 냉동된 시료는 -150°C에서 냉동모형제조장치(FR-7000Å, Hitachi Science Co.사제)로 분쇄시킨다. 분쇄시킨 표면은 45°각도에서 증발 프레트니움으로 복제시킨다. 복제를 강화하기 위하여 일반 투사에서 탄소소에 의하여 따른다. 그때 아세톤과 증류수로 세척 후 구리그리드 메쉬에 옮겨 투과전자현미경(JEM-1200EX, JEOL Co. 사제)으로 관찰하였다.

Table 1. Average Composition of Lecithins(%)

Type of Lecithin	PC	PE	PI	PA	others
CNA-I (hydrogenated)	95	-	-	-	-
CNA-II (hydrogenated)	35	30	17	6	-
CNA-O(unhydrogenated)	35	30	17	6	-

2.5. 리포솜의 입도크기 측정

scRPE-방법에 의하여 제조된 리포솜들은 보통 성형장치(Lipex Biomembranes, Canada 제)로 60°C 성형하여 축소시켰다. 액면 크기 200 nm 크기의 리포솜을 얻기 위해 폴리탄산헨타(200nm, Nucleopore, USA)를 사용하였다. 리포솜의 입자크기는 열역학적 광산란법에 의하여 결정하였고 사이즈 분포는 Dynamic Light Scattering Malvern사의 모델 Zetasizer Nano S90를 사용하여 30°C에서 측정하였다. 광원은 파장이 533nm에서 다이오드 펌프 고체상 레이저이고 산란각은 90°였다.

2.6. 리포솜의 제타포텐셜 측정

리포솜의 제타포텐셜은 pH 6.5에서 NICOMP 380ZLS(Particle Sizing System Co. 사제)를 사용하므로써 레이저 도플러 방법(Hetero법)을 가지고 측정하였다. 이 방법은 파티클에 의한 레이저 빛 산란의 빈도전환(frequency shift)인 도플러 전환(doppler shift)을 기초로 한 전자영역에서 움직이는 입자들의 전자이동변동성과 제타전위로 주워진다. 레이저 외부파워는 10 mV, 빛 산란각은 19.8° 그리고 전기자장크기는 5.0 V/cm였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 상 변화성

sc CO₂/에탄올/레시틴 혼합물의 첫 번째 상 변화 상태는 증류수를 첨가하기 전 20°C, 200 bar에서 유리관을 통하여 관찰되었다. CNA-I 인 경우 레시틴 겔의 매우 적은 양이 셀 내부에서 관찰되었다. 다른 한편 CNA-II과 CNA-O의 경우는 셀 밑바닥에 레시틴 파우더가 침전으로 남았다. Montanari 등[24]은 대두에서 인지질들이 추출되어 sc CO₂/에탄올 혼합물이라고 하였다. 온도 60°C와 압력 240 bar에서 추출된 인지질의 조성은 79% PC, 20.5% PE였다. 본 실험에서 관찰된 침전들은 PC보다 낮은 용해도 갖는 PE, PI 및 PA 이다. 최초 증류수량이 줄어 지속적으로 증류수를 첨가하는 과정에서 셀의 내부는 수용액 상이 투명상으로 된다. 증류수를 더욱 첨가하면 셀 바닥에 증류수만 남게 된다. 수용액상은 처음에는 투명해지다가 증류수를 더 가하고 강하게 교반하게

되면 탁해진다. 셀 내부에 sc CO₂를 배척한 후 유일한 리포솜 현탁이 셀 내부에 얻어진다.

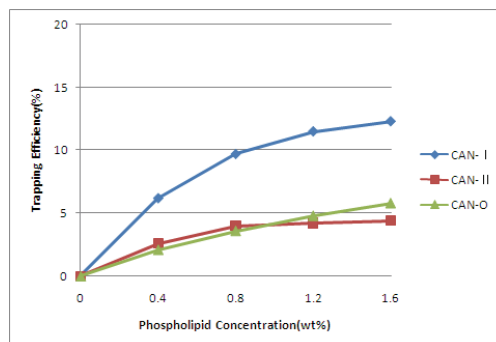


Fig. 2. The relationship between trapping efficiency and phospholipid concentration.

3.2. 리포솜이 트래핑 효율에 인지질 조성의 영향

D-(+)-glucose에 대한 sc RPE-방법에 의해 제조된 리포솜의 트래핑 효율과 인지질 농도와의 관계를 Fig. 2에 나타내었다. 가로 좌표는 첨가한 D-(+)-glucose 용액의 부피에 대한 인지질의 량으로 인지질의 농도는 셀에 주입되는 D-(+)-glucose 용액의 부피가 떨어질 때 보다 높게 된다. 트래핑 효율은 다음 식에서 산출된다.

$$W = (V_1/V_0) \times 100 \quad (1)$$

여기서 W= trapping efficiency

V_1 = D-(+)-glucose encapsulated in liposome

V_0 = D-(+)-glucose in liposomal solution

대두 레시틴 세 종류의 트래핑 효율은 전반적 인지질의 농도가 증가 할수록 증가하는 경향을 가져왔다. 이 시스템에서 첨가된 에탄올은 트래핑 효율이 직선적으로 증가되지 않는 이유와 거의 일치한다.

D-(+)-glucose에 대한 리포솜의 트래핑 효율은 레시틴 조성에 따른다. 그리하여 약 95% PC 함유한 CNA-I 으로 이루어진 리포솜은 약 35% PC를 함유한 CNA-II과 CNA-O로 이루

어진 리포솜보다 높은 수치를 갖는다. sc CO₂/에탄올에 있어 PC의 용해도 이상 기록되는 것은 PE, PI 및 PA의 것보다 높다. sc-CO₂/에탄올의 혼합용매에 있어 PC보다 용해도가 높은 것은 약 95%인 PC를 함유하는 CNA-I으로 제조된 리포솜들의 보다 높은 트래핑 효율의 원인으로 본다. 여기서 지질에 대한 연구에 관한 것들은 PC가 수용성 물질에 대한 높은 트래핑 효율을 갖고 리포솜이 가장 효율적으로 제조됨을 보여준다.

3.3. 리포솜의 구조에 미치는 인지질 조성의 영향

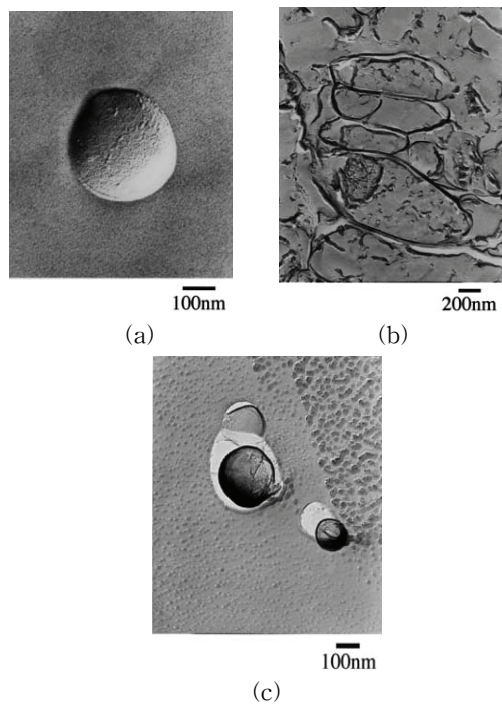


Fig. 3. Freeze fracture electron micrographs liposomes prepared by scRPE method. (a) CNA-I; (b) CNA-II; (c) CNA-O

리포솜 구조에 대한 인지질들의 조성에 대한 영향은 냉동투과전자현미경에 의하여 시험하였다. Fig. 3은 scRPE-방법에 의하여 제조된 세 종류의 리포솜들의 전형적 냉동투과전자현미경으로 측정된 마이크로그래프이다. Fig. 3(a)에서

보는 바와 같이 CNA-I으로 제조된 리포솜들의 경우 이미 보고된[22]와 비슷한 0.2~1.2 μm의 반경을 갖는 라지 타원형 유니라멜라 리포솜이 관찰되었다. 리포솜들이 타원체 모양을 갖는 것은 구체 멀티라멜라 리포솜들과 비교하여 낮은 안정성을 나타내기 때문이다. Fig. 3(b)와 (c)에서 보는 바와 같이 CNA-II와 CNA-O의 경우 0.1~0.25 μm 직경을 갖는 구형 리포솜들도 관찰되었다. 이들 리포솜들은 CNA-I의 리포솜보다 적었으며, 멀티라멜라였다. 일반적으로 리포솜들의 트래핑 효율은 리포솜 각각에 이중층 막의 수에 비례한다.

3.4. 리포솜의 입자크기에 있어 인지질 조성의 영향

리포솜 입자크기의 분포를 Table 2.에 이 들 세 종류 CNA-I, CNA-II 및 CNA-O의 평균 입자크기를 나타내었다.

Table 2. Values of Mean Diameter for Liposomes Prepared by sc RPE-Method

Type of Lecithin	Mean Diameter (nm)
CNA-I	190
CNA-II	240
CNA-O	220

CNA-I으로 제조된 리포솜들의 입자크기와 입자분포에 있어 특이한 변화는 없었다. 다른 한편 CNA-II와 CNA-O로 제조된 리포솜들은 CNA-I (2 Kgf/cm²)에 비하여 폴리카보네이트 휠타를 통과하는데 압력이 5 Kgf/cm² 정도 더 필요로 하였다. 이 결과는 인지질 침전물이 CNA-II와 CNA-O으로 이루어진 리포솜 분산체로 존재한다는 것을 알 수 있으며, 위에서 말한 바와 같이 sc-CO₂/에탄올에 대한 PC의 용해도는 PE, PI 및 PA의 용해도보다 높다. 이는 95% PC를 포함하는 CNA-I은 다른 두 개의 레시틴 보다 높은 트래핑 효율을 나타낸 것과 같다. 이러한 사실들은 sc-CO₂/에탄올 혼합 용매의 추출이 CNA-II와 CNA-O에서 얻어진 리포솜 현탁에서 인지질들의 침전을 일으키는 것에 대하여 PE, PI 및 PA가 보다 낮은 용해도를 갖기 때문인 것으로 판단된다.

3.5. 리포솜의 분산성에 있어 인지질 조성의 영향

리포솜의 분산성의 인지질 조성에 대한 영향은 리포솜의 분산상에 대하여 시각적 관찰로 검토하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 대부분이 모두 용액으로 제조되자마자 현탁되었다. 이는 리포솜 용액의 특이성이다. CNA-II와 CNA-O에서 제조된 리포솜들은 적어도 14일 정도는 잘 분산된다. CNA-I으로 제조된 리포솜은 14일 동안 리포솜들이 서로 응집과 융해로 특이한 상분리가 일어난다. 이와 같은 결과들은 CNA-II와 CNA-O으로 만들어진 리포솜의 분산성은 CNA-I에서 제조된 리포솜의 분산성보다 우수하다. 일반적으로 리포솜의 분산성은 제타전위 같은 물리화학적 성질에 의해 지배된다. 그리고 보다 높은 제타전위를 갖는 리포솜들의 분산성이 우수하다.

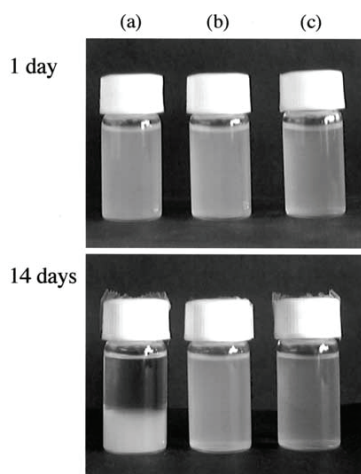


Fig. 4. Time dependence of liposomal solutions prepared by sc-RPE method. (a) CNA-I; (b) CNA-II; (c) CNA-O

Table 3은 sc RPE-방법에 따라 제조된 리포솜의 제타전위 값을 나타낸 것들이다.

CNA-II와 CNA-O로 제조된 리포솜들의 제타전위 값들은 CNA-I으로 제조된 리포솜의 제타전위 값 보다 매우 높다. PC는 pH 6.5 측정에서 양쪽성 이온 지질이었다. 한편 PE, PI 및 PA는 리포솜들이 인산염 그룹의 음이온 전하가 증진된 음이온성 전하지질이다. CNA-I으로 제조된 리포솜들의 분산성은 CNA-II와 CNA-O으로 제조된 리포솜들의 분산성 보다

낮은 것은 CNA-I의 보다 적은 제타전위 값에 기인된다.

Table 3. Values of Zeta Potential for Liposomes Prepared by sc RPE-Method

Type of Lecithin	Zeta Potential(mV)
CNA-I	-4.9
CNA-II	-23.5
CNA-O	-24.8

4. 결론

리포솜들의 정량적 생성에 있어 sc RPE-방법에 따른 것은 적당한 구성 성분으로 이루어진 레시틴들로 제조된 리포솜들을 제조함에 경제적이고 효율적이었다. 즉, 95% PC로 구성된 CNA-I은 양쪽성이온지질로 0.2~1.2 μm 직경을 갖는 라지타원형 유니라멜라형 리포솜을 제조하는데 사용되었고, 다른 한편 35% PC, 30% PE, 15% PI 및 6% PA로 구성된 CNA-II와 CNA-O으로 제조된 리포솜들은 0.1~0.25 μm 직경을 갖는 구형멀티라멜라형 리포솜을 형성하였다.

이 결과들은 sc-RPE 제조 방법에 의하여 제조된 리포솜들은 sc CO₂/에탄올 혼합용매에서 인지질의 용해도 따른다. PC(양쪽성이온지질)는 PE, PI 및 PA(음이온성 지질들)보다 높은 트래핑 효율을 가진 리포솜들의 효율적 제조됨을 확인하였다.

참고문헌

1. S. J. Hong, D. R. Kim, I. J. Yoon and K. W. Kang, "Fatty Acid Analysis from Leech Skin", *J. Biochem. mol. Biol.*, **28**(3), 261 (1995).
2. M. Schmit and M. Kietzmann, "Skin penetration properties of cosmetic formulations using a perfused bovine udder model", *J. Cosmet. Sci.*, **50**, 147

- (1999).
3. E. P. Guemiu and J. L. Zatz, "Interaction of skin with surfactant Vesicle Component", *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **46**, 77 (1995).
 4. A. D. Banghan, M. M. Standish and T. C. Watkins, "Diffusion of Univalent Ions across the Lamella of Swollen Phospholipids", *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965).
 5. K. Balon, B. U. Riebesehl and B. W. Mueller, "Determination of liposome partitioning of ionizable drugs by titration", *J. Pharm. Sci.*, **88**(8), 802 (1999).
 6. M. Colic and D. Morse, "The elusive mechanism of the magnetic 'memory' of water", *Colloids and Surfaces A*, **154**, 167 (1999).
 7. M. T. Montero, J. Hernandez-Borrel and K. M. W. Keough, "Fluoroquinolone-biomembrane Interactions : Monolayer and Calorimetric Studies", *Langmuir*, **14**, 2451 (1998).
 8. Y. Kaneda, "Virosomes ; evolution of the liposome as a targeted drug delivery system", *advanced Drug Delivery Reviews*, **43**, 197 (2000).
 9. J. Marjan, Z. Xie and D. V. Devine, "Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin", *Biochim. et Biophys. Acta*, **1192**, 35 (1994).
 10. H. Yamauchi, H. Kikuchi, M. Sawada, M. Tomikawa and S. Hirota, "Characterization and tissue distribution of liposomes containing lactone mono-fatty acid derivatives", *J. Microencapsulation*, **11** (2), 179~188 (1994).
 11. K. Yachi, H. Kikuchi, H. Yamauchi, S. Hirota and M. Tomikawa, "Distribution of liposomes containing mannobiose esters of fatty acid in rats", *J. Microencap.*, **12**, 377 (1995).
 12. D. Lasic, F. Martin, "Stealth Liposomes", CRC Press, Boca Raton, FL (1995).
 13. K. Maruyama, S. Okuizumi, O. Ishida, H. Yamauchi, H. Kikuchi and M. Iwatsuru, "Phosphatidyl polyglycerols prolong liposome circulation in vivo", *Inter. T. of Pharm.*, **111**, 103 (1994).
 14. A. Hayashi, T. Nakanishi, S. Nakagawa and T. Mayumi, "The application of drug delivery system to cancer immunotherapy", *Drug Delivery System*, **15-1**, 49 (2000).
 15. M. Nishikawa and L. Hwang, "gene therapy and drug delivery system - Overview", *Drug Delivery System*, **15-2**, 80 (2000).
 16. S. Batzry and E. D. Korn, "Single Bioayer Liposomes Prepared without Sonication", *Biochim. et Biophys. Acta*, **298**, 1015 (1973).
 17. D. Deamer and A. D. Bangham, "Large Volume Liposomes by an Ether Vaporization Method", *Biochim. et Biophys. Acta*, **443**, 629 (1976).
 18. G. Szoka and D. Papahadjopoulos, "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75** (9), 4194 (1978).
 19. T. Imure, K. Otake, S. Hashimoto, T. Gotoh, M. Yuasa, S. Yokoyama, H. Sakai, J. F. Rathman and M. Abe, "Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method", *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* **27**, 133 (2002).
 20. C. E. Bunker, H. W. Rollins, J. R. Gord and Y. P. Sun, "Efficient Photodimerization Reaction of Anthracene in Supercritical Carbon Dioxide", *J. Org. Chem.*, **62**, 7324 (1997).
 21. J. H. Heo, S. Y. Kim, H. S. Kim and K. P. Yoo, "Enzymatic preparation of a carbohydrate ester of medium-chain fatty acid in supercritical carbon dioxide", *Biotechnology Letters*, **22**, 995 (2000).

22. K. Otake, T. Imura, H. Sakai and M. Abe, "Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide", *Langmuir*, **17**, 3898 (2001).
23. I. Miwa, J. Okuda, K. Maeda and G. Okuda, "Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with β -D-glucose oxidase", *Clin. Chim. Acta*, **37**, 538 (1972).
24. L. Montanari, P. Fantozzi, M. J. Snyder and W. J. King, "Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol", *J. Supercritical Fluids*, **14**, 87 (1999).