



난황 유래 인지질로 합성한 리포솜의 물리적 특성과 안정성

박선현 · 김명희*

영남대학교 식품 · 외식학부 식품가공학전공

Physical Property and Stability of Liposome Prepared from Egg Yolk Phospholipids at Various Storage Conditions

Sunhyun Park and Myunghee Kim*

Division of Food Science/Technology and Food Service Industry, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

Liposomes were prepared from egg yolk phospholipids to study their physical properties and stability at various storage conditions. Under storage conditions at different pH levels, the particle sizes of liposomes increased at the range of pH 1-2, and the absolute values of ζ -potentials were reduced at the range of pH 1-4. The leakage of sulforhodamine B (SRB), a fluorescent dye which is encapsulated in the liposome, increased greatly at pH 2-4. At different storage temperatures, the particle size of liposomes increased from the 10 days of storage at 4°C and the 40 days at 20 and 35°C. The ζ -potentials decreased slightly later during storage under 4, 20 and 35°C. At the storage temperature of 50°C, the leakage of SRB was the greatest. Therefore, we concluded that the pH conditions lower than pH 6 and high temperature of 50°C are not conducive to storing liposomes. The results obtained here may prove helpful in developing liposome-based encapsulation and diagnostic reagents.

Key words : phospholipids, liposome, encapsulation, stability, egg yolk

서 론

리포솜은 지질 분자들이 수용액에 분산될 때 자발적으로 형성되는 지질 분자들의 회합체로서 내부의 수용성 공간이 지질 막으로 둘러 쌓인 액포이다(Bangham *et al.*, 1965). 리포솜의 크기는 직경 수십 nm에서 수십 μ m로 다양하게 존재할 수 있으며, 내부의 수용성 공간이나 지질 막 안에 각각 수용성 물질이나 지용성 물질을 포집할 수 있다. 또한 생체막의 기본 구조와 유사하여 인체에 대한 독성이 적을 뿐만 아니라, 제조가 용이하여 최근 화장품, 제약, 식품산업 등에서 인체에 부작용 없이 투여가 가능하거나, 물질의 효과적인 전달 등의 면에서 활용도가 높다(Kheadr *et al.*, 2003; Jeun and Yang, 2005; Lee *et al.*, 2005). 리포솜이 의약, 화장품 및 여러 용도로 활용도가 높은 요인들은 바로 리포솜의 유형, 조성 및 물리적, 화학적 성질 등이 다수의 제어 가능한 변수 등에 의해 다양하

게 조절이 가능하기 때문이다. 그러나, 일반적으로 지질로 구성된 리포솜의 액포는 고분자 입자나 다른 기능성 입자에 비하여 물리적, 화학적 안정도가 낮고, pH, 전해질의 농도, 온도, 계면활성제 등에 의해 안정도가 급격히 감소하는 단점이 있다고 보고된다(Jin and Yoo, 2001). 즉, 인지질이 가수분해되거나 산화될 수 있고 포집된 약물의 분해도 일어날 수 있다. 또한, 리포솜의 응집, 침강, 융합 등의 현상으로 인하여 리포솜은 물리적으로 불안정해져 크기가 변화되기도 한다(Kukarni *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 2006). 따라서 리포솜의 물리적, 화학적 안정성을 높이기 위한 연구는 꾸준히 진행되고 있다. 리포솜은 사용 목적 즉, 리포솜의 적용분야에 따라서 그 제조방법, 인지질의 종류, 성분, 조성 등이 달라진다. 경구용 리포솜의 안정성을 위하여 고분자로 코팅한 리포솜(Choi and Hanh, 1992), 혈중에 주사제로 사용하는 음이온성 리포솜(Nam *et al.*, 2004), 유지방구막에서 유래한 인지질과 대두에서 유래한 인지질로 합성한 서로 다른 리포솜의 물리적 안정성 비교(Thompson and Singh, 2006; Thompson *et al.*, 2006), 대두에서 유래된 불포화 레시틴(phosphatidyl choline)을 이용하여 제조한 리포솜(Kang *et al.*, 2004) 등 외에도

*Corresponding author : Myunghee Kim, Division of Food Science/Technology and Food Service Industry, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. Tel: 82-53-810-2958, Fax: 82-53-810-4662, E-mail: foodtech@ynu.ac.kr

서로 다른 조건으로 제조된 리포솜의 안정성에 관한 연구가 보고되고 있다.

본 연구팀은 쇠고기 분쇄육에 오염되어 식중독을 일으키는 *Escherichia coli* O157:H7의 검지(Kim *et al.*, 2003a)와 닭고기나 계란을 오염시켜 식중독을 유발하는 *Salmonella* spp.를 검지하는 진단시약으로써 리포솜을 개발(Shin and Kim, 2008)하면서 식중독 세균 진단시약으로써 리포솜의 잠재성을 확인한 바 있다(Kim *et al.*, 2003b). 리포솜을 이용한 식중독 균의 검출은 배지배양으로 식품 병원성 세균을 분리, 동정하는 방법에 비하여 신속하게 식중독 세균을 검출할 수 있는 장점을 지닌다. 즉, 분석하고자 하는 목표세균과의 면역반응을 하는 항체를 리포솜에 결합시킨 후, 이 시약을 목표세균과 반응시켜 리포솜 내부에 포집되어 있던 형광물질의 세기를 측정하여 목표세균을 정량적으로 분석한다. 이 경우 물리적, 화학적으로 안정한 리포솜을 사용하여야 정밀한 검출방법이 될 수 있기 때문에 리포솜을 안정하게 저장할 수 있는 조건의 확립이 필요하다. 앞서 언급한 바와 같이, 인지질의 종류와 지질 구성 비율 등에 따라 리포솜의 물리·화학적 성질은 달라지는 바, 본 연구에서는 난황으로부터 정제한 인지질 성분인 dipalmitoyl phosphatidylethanolamine(DPPE), dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC), dipalmitoyl phosphatidylglycerol(DPPG)과 cholesterol의 배합으로 합성한 리포솜의 안정성 지표를 마련하기 위하여 다양한 조건에서 저장기간 동안의 리포솜의 물리적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

리포솜의 수용성 공간에 포집될 형광물질인 sulforhodamine B(SRB)는 Molecular Probes(Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. DPPE, DPPC, DPPG, mini-extruder, polycarbonate membrane filter(0.4, 0.8 μm)는 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였다. *N*-succinimidyl-s-acetylthioacetate(SATA)는 Pierce(Rockford, IL, USA)로부터 구입하였다. Triethylamine, chloroform, cholesterol, methanol, isopropyl ether, Sephadex G-50-150, sucrose, sodium azide, sodium chloride는 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 리포솜 크기 측정을 위한 표준용액은 Duke Scientific(Palo Alto, CA, USA)으로부터 구입하였고, 제타전위 측정을 위한 표준용액은 Malvern Instruments(Malvern, Worcestershire, UK)로부터 구입하였다. 리포솜 크기와 제타전위의 측정을 위해 Zetasizer Nano ZS(Nano ZS, Malvern, UK)을 사용하였다. 형광도의 측정은 Infinite M200(Infinite M200, Tecan, USA)을 이용하였다. 96-well microplate는 BD Falcon(Franklin Lakes, NJ, USA)으로부터 구입하였다.

리포솜의 제조

리포솜은 역상 증발 방법을 변형하여 다음과 같이 제조하였다(Kim *et al.*, 2003a; Siebert *et al.*, 1993). 난황에서 정제한 DPPE 0.005 g과 SATA 0.0035 g을 반응 플라스크에 넣고 chloroform에 녹인 0.7% triethylamine 용액 1 mL을 가한 후 45°C 항온수조에서 N_2 가스를 분사하면서 1분간 초음파 처리를 하면서 용해시켰다. 초음파 처리 후, 0.7% triethylamine 용액을 다시 가하고 45°C 항온수조에서 1분간 방치하였다. 교반기로 옮기고 혼합물이 반응하도록 실온에서 20분 동안 교반하였다. 2 mL의 chloroform을 가하고, triethylamine을 제거하기 위해 45°C에서 회전식 감압 농축기(Rotavapor R-215, Buchi, Switzerland)로 감압하여 증발시키는 과정을 두 번 더 반복하였다. 이때, 약 0.1 mL의 DPPE-ATA가 얻어졌고 이 생성물에 1 mL의 chloroform을 추가하였다. 난황에서 정제한 DPPC 0.0296 g, DPPG 0.003 g과 cholesterol 0.0158 g을 반응 플라스크에 넣고 3 mL의 chloroform과 0.5 mL의 methanol을 가한 후, 45°C 항온수조에서 1분간 초음파 처리하면서 녹였다. 이 지질 혼합물에 0.5 mL의 DPPE-ATA를 가했다. 3 mL의 isopropyl ether를 가하고 플라스크를 흔들어 주면서 섞고, 혼합물이 들어있는 반응 플라스크를 45°C 항온수조에서 N_2 가스 아래 1분간 초음파 처리하면서 지질을 용해시켰다. 45°C로 가온한 100 mM SRB 용액 2 mL을 가하자마자 45°C 항온수조에서 N_2 가스 아래 3분 동안 때때로 플라스크를 흔들어 주면서 초음파를 처리하였다. 다시 100 mM SRB용액 2 mL을 가하고 1분간 초음파 처리하였다. 잔존하는 유기용매를 더 제거하기 위해 회전식 감압 농축기로 감압 처리하였다. 균일한 리포솜액을 얻을 때까지 교반과 증발, 초음파 처리를 반복하였다. 45°C로 예열시킨 extruder(Mini-extruder, Avanti Polar Lipids, USA)에 membrane filter를 끼우고 100 μL syringe에 리포솜을 통과시켜 균질화하였다. 얻어진 용액을 Sephadex G-50-150 column에 통과시켜 SRB가 포집된 리포솜 분획만을 모아 pH 7.0-7.5의 0.01 M HEPES 완충액(0.2 M NaCl과 0.01% NaN_3 포함)으로 4°C 암실에서 하룻밤 동안 투석하였다.

pH의 변화에 따른 리포솜의 영향

0.01 M HEPES 완충액의 pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 pH 1-10으로 조절한 후 입자 크기가 서로 다른 3종류의 리포솜 용액을 희석시켜 4°C에서 저장하면서 pH변화에 따른 리포솜의 영향을 살펴보았다. 저장 0시간과 저장 24시간이 지난 후의 입자크기와 제타전위를 측정하였다. 같은 방법으로 0.01 M HEPES 완충액의 pH를 2, 4, 6, 8, 10으로 조절한 후 리포솜 용액을 희석시켜 저장하면서, 3일 간격으로 리포솜의 수용성 부분에 포집된 SRB의 누출량을 형광도를 측정하여 확인하였다.

온도에 따른 리포좀의 영향

리포좀 용액을 4, 20, 또는 35°C의 온도에서 100일간 저장하면서 변화를 관찰하였다. 10일 간격으로 입자크기와 제타전위를 측정하여 입자의 물리적 안정도를 측정하였다. 또한, 4, 20, 35, 또는 50°C의 온도의 범위에서 10일 간격으로 SRB의 누출 정도를 알기 위해 형광도를 측정하였다.

리포좀 입자크기와 제타전위의 측정

리포좀 시료의 평균 입자크기와 제타전위는 Zeta Nano ZS의 version 5.0 software에 의해 동적광산란방식으로 측정하였다. 리포좀 시료에 대한 굴절률의 값은 1.45, 시료를 분산시키기 위해 사용된 HEPES 완충액에 대한 굴절률의 값은 1.33, 점도는 0.8872값을 적용하여 측정하였다.

저장기간에 따른 SRB 누출량 측정

리포좀에 포집된 SRB가 누출되는 정도를 측정하기 위해서 리포좀 용액을 0.01 M HEPES 완충액에 희석시켰다. 96-well plate에 시료를 260 µL씩 분주하여 형광도를 측정하였다. 이때 여기파장은 550 nm, 발광파장은 585 nm로 선택하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS version 14.0 software(2006)를 이용하여 서로 다른 저장 온도에서 저장한 리포좀 용액의 시간 경과에 따른 입자의 크기와 제타전위 값의 평균의 유의성 검정을 하였다. 분산분석 및 Duncan의 다중검정을 실시하여 처리 간의 유의성($p < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

pH에 따른 리포좀의 영향

pH를 1-10으로 조절한 리포좀 용액을 0시간과 24시간 경과 후에 입자크기를 측정하였다(Fig. 1). 기준인 pH 7에서 입자의 평균 크기는 리포좀 A가 159.7±0.3 nm, 리포좀 B가 173.8±1.5 nm, 리포좀 C가 179.3±0.2 nm를 나타내었다. 크기가 서로 다른 3종류의 리포좀 용액의 입자크기는 pH 2-10에서 0시간과 저장 24시간 경과 후 모두 큰 변화가 없었으나 pH 1에서는 크기가 증가함을 알 수 있었다.

3종류의 리포좀 용액에 있어서 pH변화에 따른 제타전위의 변화는 서로 비슷한 양상을 나타내었다(Fig. 2). pH 4-10에서 평균 -70 - -80 mV의 제타전위 값을 가지고, pH 1-4에서는 제타전위의 절대값이 감소하였다. 제타전위란 액체에 부유하는 콜로이드 입자의 표면 전기적 특성으로서, 부유 물질끼리 또는 부유 물질과 필터 등의 표면에서의 전기적 인력과 반발력의 기준으로 사용된다(Lee *et al.*, 2003). 즉, 액체 속에 부유하는 콜로이드 입자들의 표면 대전량 정도를 나타내는 지표로써 콜로이드의 안정도와

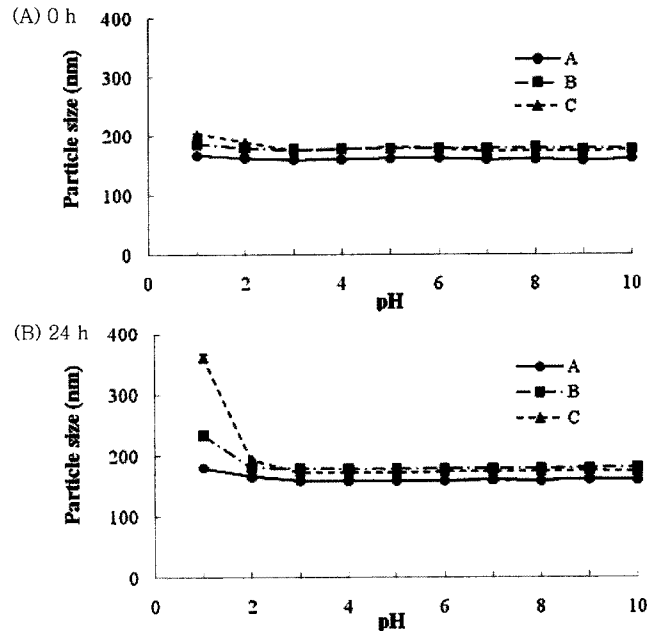


Fig. 1. Changes in particle sizes for liposomes under a wide pH range. A, B, and C indicate the different sizes of liposomes used. The average sizes at pH 7.0 were 159.7±0.3 nm for A, 173.8±1.5 nm for B, and 179.3±0.2 nm for C. The particle size of the samples was measured at 0 h (A) and 24 h (B) after adjusting the pH. Each point is the mean of three measurements with error bars±1 S.D.

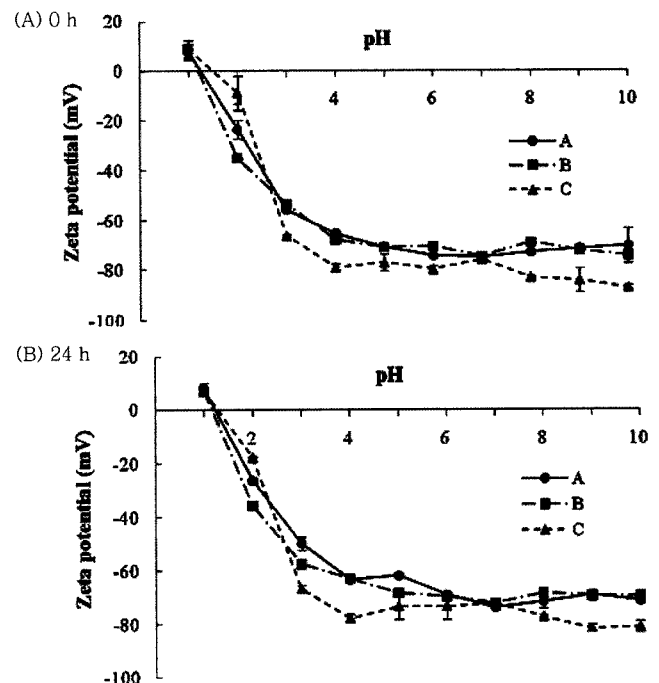


Fig. 2. Changes in the ζ-potentials of liposomes under a wide pH range. A, B, and C indicate liposomes with various particle sizes at pH 7.0 (A, 159.7±0.3 nm; B, 173.8±1.5 nm; C, 179.3±0.2 nm). The ζ-potentials of the samples were measured at 0 h (A) and 24 h (B) after adjusting the pH, respectively. Each point is the mean of three measurements with error bars±1 S.D.

직접적인 관계가 있다. 제타전위의 절대값이 증가하면 액체상의 전기적 반발력이 크기 때문에 분산도가 증가하여 응집현상이 줄어들어 콜로이드가 안정하다고 평가한다. 미국 재료 시험학회의 기준에 따르면 물과 폐수에서 제타전위의 값은 -61 mV 보다 절대값이 클 때 매우 안정한 콜로이드를 가진다고 한다. 콜로이드는 -41 - -60 mV의 범위에서는 안정하고, -31 - -40 mV에서는 보통이며, -10 - -30 mV에서는 불안정하고, +5 - -5 mV의 제타전위에서는 강력한 응집이 일어나는 범위로 나타내어진다(ASTM, 1985). 본 실험에서는 pH 4 이하의 산성 범위에서 제타전위의 절대값이 감소하는 경향을 나타내었으므로 pH 4 이하에서는 리포솜 입자간에 응집이 일어나는 것으로 보여진다. 이와 같이 제타전위의 절대값이 감소하여 응집이 일어날 것으로 예측되는 결과는 pH 4 이하, 특히 pH 1-2 범위에서 리포솜의 입자크기가 증가(Fig. 1)하는 현상과도 일치하였다. 액체상의 전기적 반발력의 감소로 인하여 불안정해진 용액내의 입자들은 응집, 융합되어 입자의 크기가 크게 측정되는 것으로 추론할 수 있다.

pH 변화에 따른 포집된 SRB의 누출량을 측정하기 위하여 3일 간격으로 리포솜 용액의 형광도를 측정하였다(Fig. 3). pH 2와 4를 제외한 조건에서 형광도의 변화는 적었으나 pH 2와 pH 4에서 리포솜 용액을 저장한 경우에 형광도의 값이 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 형광도는 리포솜 막의 물리적 안정성을 평가하는 중요한 지표로 사용된다. SRB는 리포솜의 수용성 공간에 포집되는 물질로서 형광을 나타내는 염료이다. 리포솜의 막이 물리적으로 불안정하게 되면 형광물질인 SRB가 리포솜의 내부로부터 외부로 나오게 되어 용액의 형광도는 증가하게 된다.

입자의 크기, 제타전위, 형광도의 측정과 같은 3가지 물리적 특성에 관한 실험을 통하여 리포솜 입자를 분산시키

는 분산매가 산성인 용액의 경우는 리포솜의 안정성에 영향을 미칠 수 있으므로 가급적 피하는 것이 좋을 것으로 유추할 수 있다.

온도에 따른 리포솜의 영향

4, 20, 및 35°C에서 저장한 리포솜을 10일 간격으로 입자크기와 제타전위를 측정하였다. 리포솜 입자크기는 3가지 온도조건에서 시간경과에 따라서 저장 100일 동안 큰 변화는 없었으나 저장 기간이 길어질수록 미세하게 증가하는 추세를 보였다(Fig. 4). 저장 초기의 리포솜의 평균 입자크기인 200.1 ± 1.7 nm에 비하여 4°C와 20°C의 조건에서는 각각 10일째와 40일째에서 유의성이 있는($p < 0.05$) 크기 변화를 보였다. 35°C에서 저장하였을 때는 40일째와 90일째에서 초기의 입자 크기와 차이를 보였으나 100일째에는 다시 초기의 입자 크기와 차이를 보이지 않았다.

제타전위의 경우에도 큰 차이를 보이지는 않았지만 시간이 경과함에 따라 절대값이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5). 저장 초기의 제타전위의 평균값은 -74.23 ± 0.8 mV를 나타냈다. 4°C에서 저장하였을 때 제타전위의 값은 절대값이 오히려 미세하게 증가하여 안정된 양상을 나타내었다. 저장 40일째 제타전위의 절대값이 감소하는 경향을 보였으나 저장을 지속하여서 100일째에서의 제타전위값은 -69.37 ± 0.1 mV로 안정한 범위의 값을 유지하였다. 이러한 현상은 20, 35°C에서도 비슷하게 나타났고 20°C에서 100일째의 평균 제타전위값은 -65.73 ± 1.7 mV, 35°C에서 값은 -62.63 ± 1.0 mV를 유지하여 저장 초기의 안정도보다는 떨어지는 수준이지만 안정한 기준의 콜로이드 상태를 보였다.

온도 변화에 따른 리포솜 내부의 형광물질 누출량을 나타내는 형광도는 4, 20, 35°C에서는 거의 누출이 되지 않았지만, 50°C의 경우 저장시간이 경과함에 따라 SRB 누출

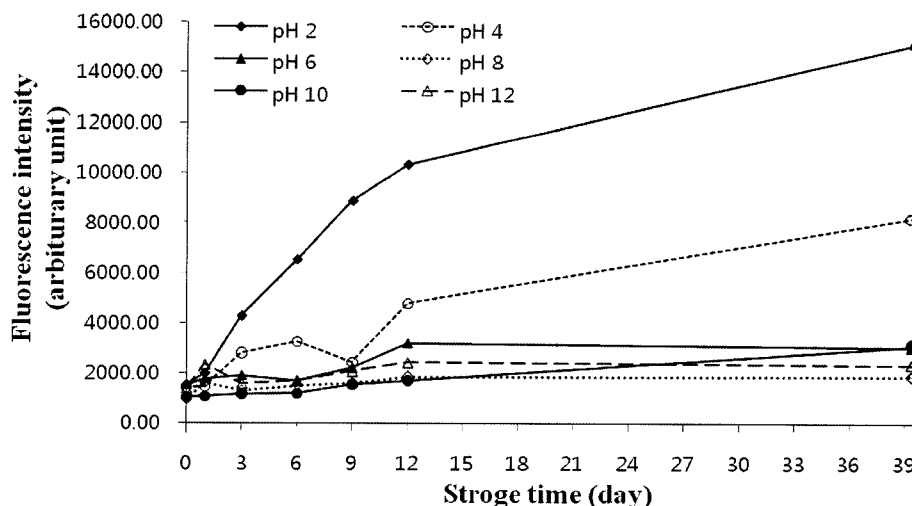


Fig. 3. Leakage of SRB during storage at various pH range. The liposome solutions were diluted with 0.01M HEPES buffers at different pH levels to measure the degree of leakage of SRB which was encapsulated in interior volume of liposome. Each point is the mean of three measurements with error bars ± 1 S.D.

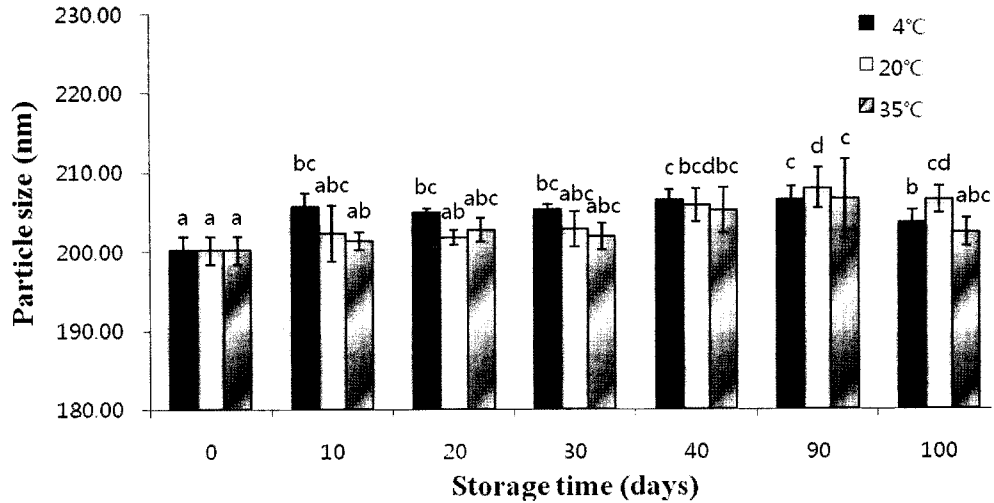


Fig. 4. Changes in particle sizes for liposomes during storage at various temperatures. Each point is the mean of three measurements with error bars±1 S.D. Values with different letters on the same column are significantly different at $p < 0.05$.

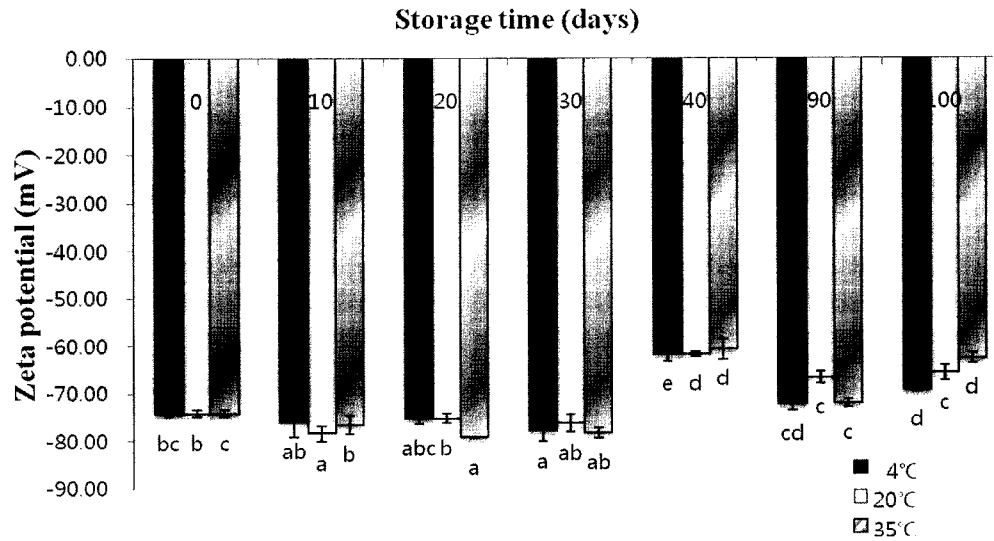


Fig. 5. Changes in the ζ -potentials of liposomes during storage at various temperatures. Each point is the mean of three measurements with error bars±1 S.D. Values with different letters on the same column are significantly different at $p < 0.05$.

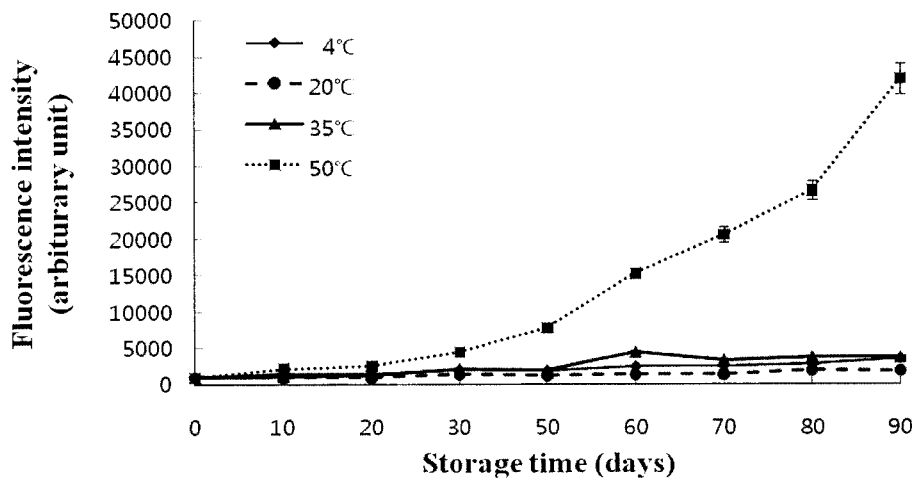


Fig. 6. Leakage of SRB during storage at various temperatures. Each point is the mean of three measurements with error bars±1 S.D.

량이 많아져서 형광도가 크게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 6). 4, 20, 35°C에서 리포솜 용액을 저장한 경우의 형광도는 거의 모든 기간에서 비슷한 세기를 나타냈다. 하지만 50°C에서 저장한 경우, 30일째부터 리포솜의 수용성 공간에 포집된 SRB의 누출이 시작되어 저장기간이 길어짐에 따라 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있었다. 즉, 50°C와 같은 높은 저장 온도에서는 리포솜의 안정성이 유지될 수 없는 것으로 나타났다.

요 약

난황 유래의 인지질을 주원료로 리포솜을 제조하여 서로 다른 저장조건에서의 리포솜의 물리적인 안정성을 연구하였다. 리포솜 용액의 pH를 달리하여 저장한 후 리포솜 입자크기와 리포솜 용액의 제타전위와 형광도를 측정 한 결과, 리포솜은 pH 1-2에서 입자크기의 증가를 나타내었고 pH 4 이하에서 제타전위의 절대값이 감소하였으며 리포솜의 내부에 포집된 수용성물질의 손실량 지표인 형광도의 측정치 또한 pH 2-4에서 급격하게 증가한 것으로 보아 산성의 저장조건에서는 리포솜이 불안정함을 추론할 수 있다. 저장 온도별 리포솜의 안정성 평가에서는 4°C에서 저장하였을 때 10일째부터 입자의 크기 변화가 있었고 20, 35°C에서 저장할 경우, 저장기간 40일째 이후부터 입자의 크기변화가 있었다. 제타전위는 3가지 온도조건에서 동일하게 저장 말기에 측정값의 절대값이 미세하게 감소하는 경향을 보였다. 또한, 50°C에서 저장된 리포솜의 형광도 측정실험에서 포집된 SRB의 누출량이 급격히 증가하는 양상을 나타내었다. 따라서 pH 6 이하의 산성의 조건에서 리포솜은 불안정하며 50°C와 같이 높은 온도에서 인지질로 구성된 리포솜의 안정성을 유지하기 어렵다는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 난황 유래 인지질로 구성된 리포솜을 이용한 진단용 시약 개발 및 포집 특성 연구에 유용한 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2005-KRF-205-F00013).

참고문헌

1. ASTM (1985) Zeta potential of colloids in water and waste water. ASTM Standard D4178-82, West Conshohocken, PA, USA.
2. Bangham, A. D., Standish, M. M., and Watkins, J. C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen

- phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
3. Choi, Y. W. and Hahn, Y. H. (1992) Polymer-coated liposomes for oral drug delivery (I): stability of polysaccharide-coated liposomes against bile salts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 211-217.
4. Jeun, Y. S. and Yang, E. J. (2005) Studies on the using liposome cosmetics formulation technology. *J. Kor. Soc. Make-up Design.* **1**, 15-19.
5. Jin B. S. and Yoo J. Y. (2001) A study on the characteristics and stability of liposomes, *Dongduk J. Life Science Studies.* 74-81.
6. Kang, K. C., Lee, D. H., Wang, S. H., Lee, C. I., Pyo, H. B., and Jeong, N. H. (2004) Development of nano-liposome with unsaturated lecithin. *Applied Chem.* **8**, 1-4.
7. Kheadr, E. E., Vuilleumard, J.C., and El-Deeb, S.A. (2003) Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Res. Int.* **36**, 241-252.
8. Kim, M., Oh, S., and Durst, R. A. (2003a) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using combined procedure of immunomagnetic separation and test strip liposome immunoassay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 509-516.
9. Kim, M., Kim, W. J., Shin, W. S., Shon, D. H., and Cha, S. K. (2003b) Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria, *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* **23**, 278-283.
10. Kulkarni, S. B., Betageri, G. V., and Singh, M. (1995) Factors affecting microencapsulation of drug in liposomes. *J. Microencapsul.* **12**, 229-246.
11. Lee, D. H., Lee, S. W., Yoo, I. S., Park, K. P., and Kang, I. T. (2005) Drug delivery effect using biopolymer chitosan nanoparticles. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **16**, 790-793.
12. Lee, J. K., Kim, S. C., Kim, H. J., Lee, C. G., Ju, C. H., and Lee, L. C. (2003) A Study on the zeta potential measurement and the stability analysis of nano fluids using a particle image processing system. *J. ILASS-Kor.* **8**, 16-22.
13. Nam, D. E., Han, H. D., Park, Y. J., Kim, Y. A., and Shin, B. C. (2004) Release profile and stability of anionic liposomes. *J. Kor. Pharm. Sci.* **34**, 305-310.
14. Shin, J. and Kim, M. (2008) Development of liposome immunoassay for *Salmonella* spp. using immunomagnetic separation and immunoliposome. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1689-1694
15. Siebert, S. T. A., Reeves, S. G., and Durst, R. A. (1993) Liposome immunomigration field assay device for alachlor determination. *Anal. Chim. Acta.* **282**, 297-305.
16. SPSS (2006) Statistical package for the social sciences 14.0 for windows. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.
17. Thompson, A. K., Haisman, D., and Singh, H. (2006) Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6490-6497.
18. Thompson, A. K. and Singh, H. (2006) Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *J. Dairy Sci.* **89**, 410-419.