

마이크로니들을 이용한 5-FU의 경피투과 거동

김명진¹ · 박정수¹ · 김윤태¹ · 이준희¹ · 안식일¹ · 박종학¹ · 모종현¹ · 이태완² · 이한구² · 강길선^{1*} · 이해방³

¹전북대학교 BK-21 고분자 BIN융합연구팀, ²(주)대화제약 중앙연구소, ³한국화학연구원 나노생체재료연구팀

(2008년 1월 15일 접수 · 2008년 2월 13일 승인)

Transdermal Permeation Behavior of 5-FU using Microneedle

Myoung Jin Kim¹, Jung Soo Park¹, Yun Tae Kim¹, Jun Hee Lee¹, Sik Il Ahn, Jong Hak Park, Jong Hyun Mo¹,
Tae Wan Lee², Han Koo Lee², Gilson Khang^{1*} and Hai Bang Lee³

¹BK-21 Polymer BIN Fusion Research Team, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin Dong 1Ga, Dukjin, Jeonju, 561-756, Korea

²Research Center, Daehwa Pharm. Co. Ltd., 1056-17 Namhyun-dong, Gwanak, Seoul 151-802, Korea

³Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon, 305-600, Korea

(Received January 15, 2008 · Accepted February 13, 2008)

ABSTRACT – 5-Fluorouracil (5-FU) is an antimetabolic of the pyrimidine derivatives that is used in chemotherapy for the treatment of several types of cancer. 5-FU have poor oral absorption and short biological half-time and strong side effects. Microneedle introduced to find a solution of problems. Microneedle device with roll was manufactured for transdermal delivery of various drugs. 5-FU was mixed in non-ionic surfactant such as tween 20 and tween 80. Camscope was used to analysis the permeation magnitude of treated skin by microneedle and trypan blue staining. The 5-FU solution with surfactant measured by ZETA-potential analysis system for stability of solution. The skin permeation rate of 5-FU determined by HPLC. We confirmed that cross treated skin was dyed more deeply than parallel treated skin through trypan blue staining. The results indicate that skin permeation rate of 5-FU was increased with the treatment types and treatment times.

Key words – Transdermal, 5-FU, Tween 20, Tween 80, Microneedle

현재 야외에서 자외선에 노출되는 레저생활이 보편화되고 있으며 평균수명의 연장으로 인하여 노인 인구가 많아지고 있어 국내에서 피부암 환자가 과거에 비하여 빠르게 증가하고 있다.^{1,2)} 대표적인 피부암은 악성흑색종³⁾과 비흑색종 피부암(Non-melanoma skin cancers; NMSC)^{4,5)}인 기저세포암⁶⁾과 편평상피세포암⁷⁾로 나뉘며 원인의 60~90%가 자외선에 의한 것이며 이외에 화상이나 외상에 의한 흉터, 장기간 반복적인 피부감염, 환경과 음식물에서 발암물질의 노출 증가가 그 이유로 밝혀지고 있다.

이러한 피부암을 치료하기 위한 방법으로는 종양의 종류, 크기, 위치, 암의 진행정도, 환자의 나이, 전신 건강 상태에 따라 치료형태가 달라지게 되며 외과적 절제, 국소치료, 방사선 치료 및 화학요법이 이용되고 있다. 현재 항암제를 이용하는 화학요법은 외과적 절제가 어려운 경우 또는 외과적 절제 후에 보조요법으로 시행되고 있다.

경구 투여시 흡수가 불규칙하여 주로 정맥으로 투여되는

5-플루오로우라실(5-Fluorouracil, 5-FU)은 정맥 투여시 혈중 반감기가 10~20분으로 비교적 혈장 제거율이 빠르고 뇌척수액(Cerebrospinal fluid, CSF)으로도 잘 이행된다. 5-FU는 지방, 위장관의 암종에 일시적인 효과가 있으며, 간장, 난소, 자궁 경부, 방광, 전립선, 췌장, 구강, 인두 부위 등의 암종에도 유효하다고 알려져 있다.⁸⁻¹²⁾ 또한 피부의 전암성 각화증과 다발성 표면 기저세포암에 국소 적용으로 효과가 있다. 현재 피부암을 치료하기 위해 판매되고 있는 항암제는 유니온플루오로우라실주[®], 유토랄주[®], 중외5-에프유주[®]이 있으며 정맥이나 동맥내에 카테터를 이용하여 주입하는 형식으로 이용할 수 있다. 주사제로서 항암제를 전달시킬 경우 약물이 전신으로 작용하게 되어 환부에 극소량이 전달되는 문제점과 표적부위에 소실되는 약물의 양을 고려하여 과량의 약물을 투여함으로써 발생하는 부작용이 존재하게 된다.

본 연구에서는 현재 주사제로 이용되고 있는 플루오로우라실의 부작용을 해결하고 피부암을 치료하기 위하여 국소적 화학요법으로 마이크로니들¹³⁻¹⁶⁾을 이용하고자 하였다. 약물의 효율적 피부투과에 사용되는 비이온성 계면활성제인 Tween 20¹⁷⁾과 Tween 80¹⁸⁾을 사용하여 피부 투과율의 변화를 측정하고 농도에 대한 영향을 확인하고자 하였다. 또한

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 063)270-2336, E-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr

Table I-Preparation condition and treatment type of 5-FU solution for transdermal delivery

| Batch no | Treatment type | | 5-FU (w/v%) | Tween 20 (w/v%) | Tween 80 (w/v%) |
|----------|----------------|-------|----------------|--------------------|--------------------|
| | Parallel | Cross | | | |
| None. 1 | - | - | 0.1 | 1.25 | - |
| None. 2 | - | - | 0.1 | - | 1.25 |
| 1 | 10R | - | 0.1 | 1.25 | - |
| 2 | 10R | - | 0.1 | 2.50 | - |
| 3 | 10R | - | 0.1 | 5.00 | - |
| 4 | 10R | - | 0.1 | - | 1.25 |
| 5 | 10R | - | 0.1 | - | 2.50 |
| 6 | 10R | - | 0.1 | - | 5.00 |
| 7 | - | 10R | 0.1 | 1.25 | - |
| 8 | - | 10R | 0.1 | 2.50 | - |
| 9 | - | 10R | 0.1 | 5.00 | - |
| 10 | - | 10R | 0.1 | - | 1.25 |
| 11 | - | 10R | 0.1 | - | 2.50 |
| 12 | - | 10R | 0.1 | - | 5.00 |

효율적 경피약물전달을 위하여 지속적 방출 거동을 갖는 서방형 약물제제로서 이용 가능성을 확인하고자 하였다.¹⁹⁻²¹⁾

실험방법

시약

본고에서 사용한 항암제로서 5-FU는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 피부투과율을 촉진시키기 위하여 사용한 비이온성 계면활성화제인 Tween 20(폴리옥시에틸렌 20 소비탄 모노라우레이트)과 Tween 80(폴리옥시에틸렌 20 소비탄 모노올레이트)은 Showa Chemical Co.(Ehtlaud, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 마이크로니들로 처리한 피부형태를 확인하기 위하여 사용한 trypan blue 0.4% solution은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이외에 사용한 시약은 HPLC 등급을 사용하였다.

기기

HPLC를 통한 용출률 및 함량측정은 UV 검출기(UVIS-201, Linear Instrument, USA)로 수행하였으며 펌프는 Thermo Separation Products(P2000, USA)의 제품을 사용하였다. 용출실험에 사용된 Franz 확산셀은 내부부피가 8 mL인 형태로 제작하여 사용하였다. 마이크로니들은 직경이 1.43 cm이며 길이가 2.8 cm인 원통형 막대에 마이크로 크기의 니들이 장착된 것을 사용하였다. 손상된 피부의 형태를 확인하

기 위하여 Camscope(Sometech, 한국)를 이용하였다.

피부 전처리

실험에 사용되는 피부는 무모쥐(type SKH, 6주령, Orient Co., Ltd., Korea)의 것을 사용하였으며 구입한 후 사용하기 하루 전에 머리 부분과 다리 부분사이의 피부 중 복부 및 등 피부를 모두 적출하여 -4°C에서 냉동보관 하였다. 생체 방출거동 실험 직전에 적출한 피부를 0.9 w/v% NaCl 수용액에 30분동안 피부내의 조직에 동일한 조건을 갖추게 하기 위하여 등장시킨 후 실험에 사용하였다.

계면활성화제를 포함한 5-FU 수용액 제조

Table I에서 제시한 배치에 따라 계면활성화제를 정량한다. 정량한 계면활성화제에 8 mg 5-FU를 첨가하여 교반기를 이용해 균일하게 분산시킨 후 인산염완충용액(0.1 M PBS, pH 7.4) 4 mL을 첨가하여 균일하게 혼합 후 용액을 제조한다.

5-FU 수용액의 제타전위 측정

배치에 따라 비이온 계면활성화제와 5-FU가 포함된 수용액의 전하를 측정하기 위하여 전기영동 광산란 측정기(Electrophoretic Light Scattering & Zeta-Potential Analyzer, ELS-8000, Photal, Otsuka Electronics, Japan)²²⁾를 사용하여 제타전위를 측정하였다. 비이온 계면활성화제와 5-FU를 용해시키기 위하여 3차증류수를 이용하였으며 측정시 2 mL을 추출하여 사용하였다.

Trypan blue 염색을 통한 손상된 피부 확인

전처리된 피부에 마이크로니들을 사용하여 직렬 10회(세로 또는 가로 10회), 병렬 10회(세로 5회와 가로 5회) 처리한 후에 0.04% trypan blue 수용액을 손상된 피부에 적하한 후 손상된 세포를 염색시키기 위하여 1시간동안 방치하였다. 그 후 Camscope를 사용하여 손상된 피부에 염색된 형태를 확인할수 있었다.

In vitro 피부투과 거동

전처리된 피부에 마이크로니들을 사용하여 직렬 10회(세로 또는 가로 10회), 병렬 10회(가로 5회와 세로 5회) 처리한 후 2개의 Franz 확산셀 중심에 피부를 고정시켰다. 그 후, 진피층을 향하고 있는 확산셀에 4 mL의 PB5를 넣고 각 질층을 향하고 있는 확산셀에 계면활성화제와 5-FU를 포함하는 4 mL의 인산염완충용액을 넣었다. 37°C의 인큐베이터에서 일정한 시간간격으로 진피층을 향하고 있는 확산셀의 인산염완충용액을 채취하였다.

HPLC 분석

일정한 시간간격으로 채취된 시료의 5-FU 용액의 피부투과 거동을 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 측정하였다. 이동상은 50 v/v% 아세트니트릴을 이용하였으며 사용 전에 항상 초음파분쇄기를 이용하여 잔존가스를 제거한 후 사용하였다. 5-FU의 검출 파장은 250 nm로 하였으며 분석에 이용한 컬럼으로는 ProntoSIL Eurobond C₁₈(4.0×150 mm, 5 μm) Bischoff Chromatography사 제품을 이용하였다. 유속은 0.8 mL/min, 시료 주입량은 20 μL로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

마이크로니들 처리

본 연구에서 사용한 마이크로니들은 Figure 1에서 볼 수 있듯이 원통형의 모양을 하고 있으며 직경은 1.43 cm이고 길이는 2.8 cm로 이루어져 있다. 롤러를 구성하고 있는 바늘은 총 3360개이며 바늘 하나의 높이는 230 μm이고 바늘의 끝부분의 직경은 56 μm이다.

방출 약물의 피부 투과도와 피부 손상도를 확인하기 위해서 6주령 암컷 무모쥐의 피부를 절개하여 냉동보관하였다. 이렇게 채취한 피부를 이용하여 준비된 마이크로니들로 피부의 각질 표면에 각각 직렬 10회(가로 또는 세로 10회) 및 병렬 10회(가로 5회와 세로 5회)처리하였다.

계면활성화제에 따른 전하차이 확인

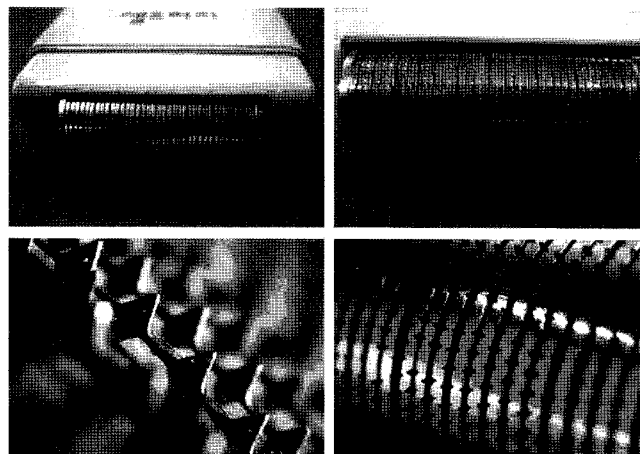


Figure 1-The structure of microneedle system.

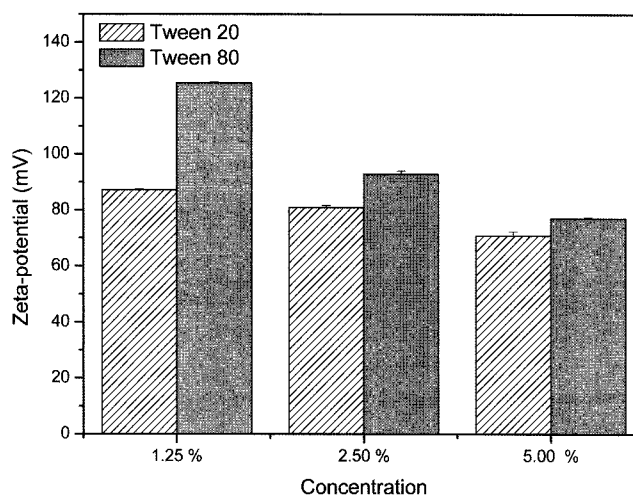


Figure 2-The zeta potential of 5-FU solution using tween 20 and tween 80.

배치에 따라 제조한 수용액의 전하에 따른 피부투과 거동의 영향을 확인하기 위하여 제타전위를 측정하였다. 제타전위의 크기를 통하여 용액의 안정성을 확인할 수 있다. 일반적으로 값이 더 큰 음전하나 양전하가 용액상태에서의 안정성이 높아진다.²³⁻²⁵⁾ Figure 2에서 볼 수 있듯이 비이온 계면활성화제의 농도를 증가시킬수록 높은 양전하에서 음전하로 더 많이 하전되는 경향을 확인할 수 있었다. Tween 20 1.25 w/v%는 87.2 mV, 2.50 w/v%는 80.8 mV, 5.00 w/v%는 70.83 mV이었으며 Tween 80 1.25 w/v%는 125.4 mV, 2.50 w/v%는 92.76 mV, 5.00 w/v%는 77 mV이라는 값을 보면 알 수 있듯이 Tween 20과 Tween 80은 농도를 증가시킬수록 상대적으로 낮은 제타전위를 가진다. 이러한 결과를 바탕으로 피부투과에서도 높은 안정성을 가지는 낮은 농도의 Tween 20과 Tween 80이 더 좋은 피부투과도를 나타낼 것으로 예상할 수 있었다.

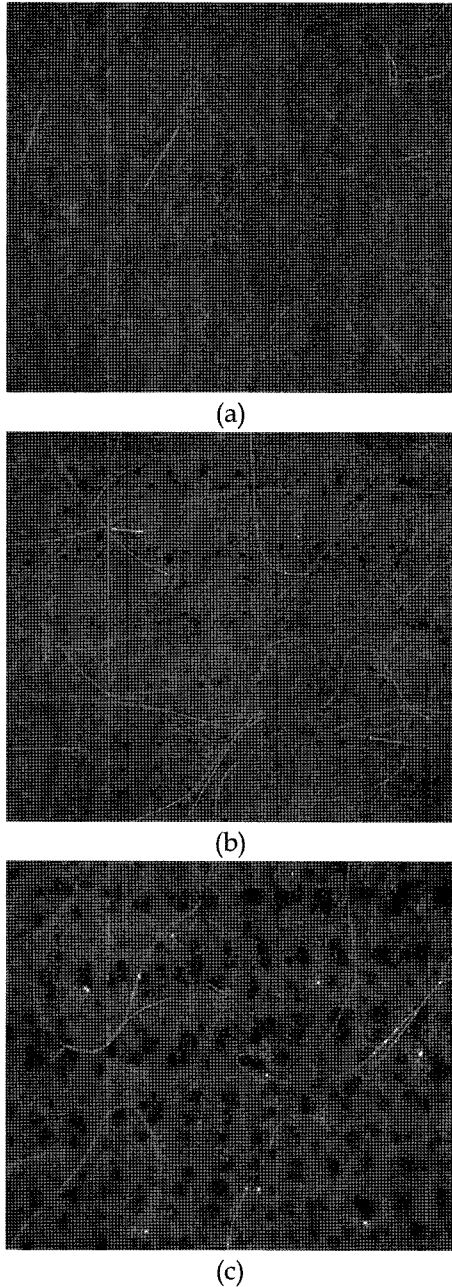


Figure 3—The staining image of trypan blue, (a) none treatment, (b) 10R parallel and (c) 10R cross (magnification: ×40).

Trypan blue를 사용한 피부 손상도 확인

피부침으로 처리된 피부 표면에 친수성인 trypan blue 0.04 w/v%를 도포하여 마이크로니들에 의해 형성된 각질층 구멍을 통과하여 소수성인 각질층을 투과하여 친수성인 진피층으로 염색된 것을 확인할 수 있었다. Figure 3의 (b)에서 볼 수 있듯이 직렬로 10회 처리한 피부는 가로로 일정하게 염색된 것을 확인할 수 있었다. Figure 3의 (c)는 Figure 3의 (b) 및 (a)와 달리 무질서하게 소수성인 각질층을 투과하

여 친수성인 진피층을 염색된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 처리형태에 따라서 친수성인 5-FU를 소수성인 각질층을 통과시켜 친수성인 진피층으로 효율적으로 전달시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.²⁶⁻²⁷⁾

계면활성화제에 따른 In vitro 피부 투과도 확인

Table I에 제시한 실험조건에 따라서 12시간 동안 생체의 약물의 피부 투과율을 측정할 수 있었다. Figures 4와 5은 채취한 피부에 마이크로니들을 이용하여 각각 직렬로 10회(가로 또는 세로 10회) 및 병렬 10회(가로 5회와 세로 5회) 처리한 후 계면활성화제의 종류와 농도에 따라서 피부 투과율을 측정할 수 있었다.

Figure 4의 (a)는 Tween 20의 농도에 따라 피부 투과도를 나타낸 그림이다. 결과에서 볼 수 있듯이 Tween 20의

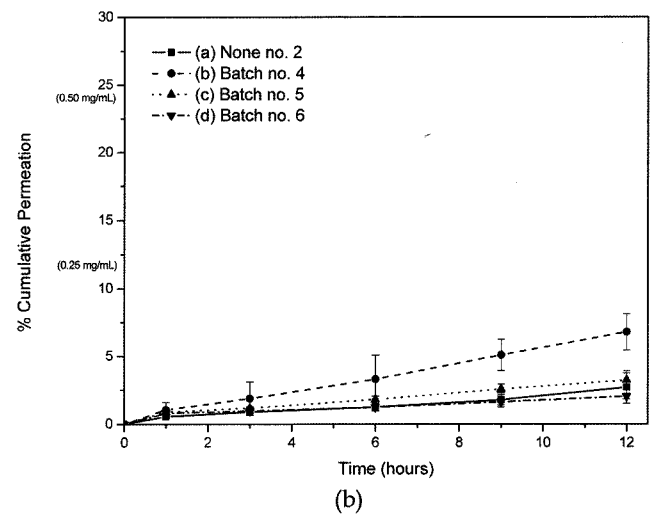
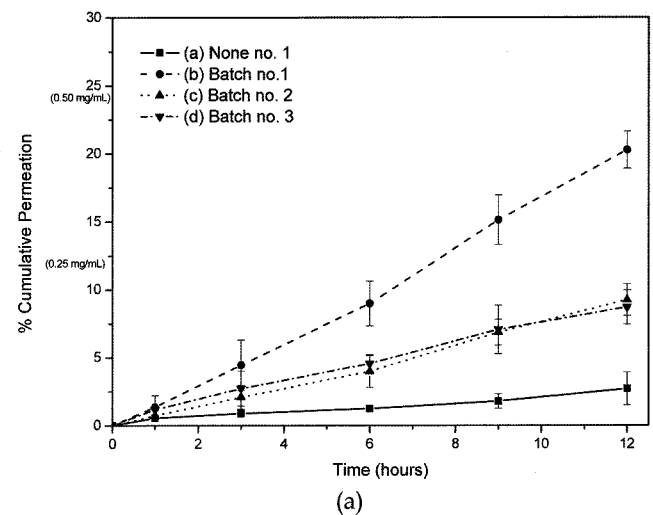


Figure 4—Release behavior of 5-FU from hairless mouse skin of parallel treatment, (a) Tween 20 and (b) Tween 80.

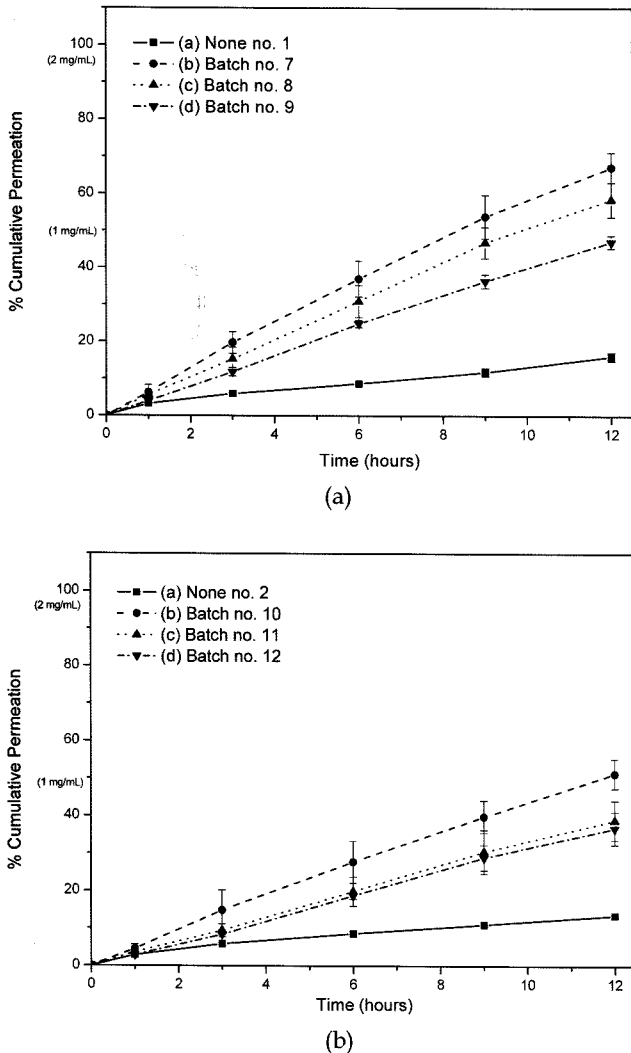


Figure 5—Release behavior of 5-FU from hairless mouse skin of cross treatment, (a) Tween 20 and (b) Tween 80.

농도를 증가시키기에 따라서 투과도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 Figure 4의 (b)의 Tween 80의 농도에 따라 피부 투과도를 확인할 결과 (a)의 결과와 유사하다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 Figure 4의 (a)와 (b)를 비교하였을 때 (a)는 최고 20.2% 투과율을 보인것에 비해 (b)는 최고 6.7%를 보이고 있었다. 이것은 Tween 80의 HLB(친수친유기평형)²⁸⁻²⁹가 15이고 Tween 20의 HLB가 16.7이므로 HLB값이 큰 Tween 20이 더 친수성인 성질을 가지므로 친수성인 5-FU의 진피층으로의 투과를 촉진시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 이것은 Figure 5의 (a)와 (b)를 비교했을 때 (a)는 최고 67.1%이며 (b)는 최고 51.3%의 투과도를 나타내고 있어 Figure 4의 결과와 유사한 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 친수성인 약물인 5-FU의 투과 촉진제로서 비이온성 계면활성화제를 이용하였을 때 HLB

값이 높을수록 친수성인 진피층을 투과하여 효율적으로 체내에 5-FU를 전달할 수 있음을 확인할 수 있었다.³⁰⁻³²⁾

결론

본 연구에서는 마이크로니들과 비이온성계면활성화제를 사용하여 5-FU의 피부 투과율을 확인하였으며 비이온성계면활성화제의 농도에 따른 피부 투과도를 측정하였다. trypan blue 염색을 통하여 직렬보다 병렬로 처리하였을 때의 피부 손상도가 더 심하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 제타전위 측정을 통하여 실험에 사용한 비이온성 계면활성화제의 제타전위가 클수록 농도에 따른 5-FU의 피부투과 거동에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 마이크로니들을 이용하여 소수성인 각질층을 제거하여 친수성인 약물을 진피층으로 효과적으로 투과시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 현재 마이크로니들을 이용하여 친수성인 5-FU의 생체 내 실험을 수행중이다.

감사의 말씀

본 연구는 산업자원부 차세대성장동력사업(KMOCIE, 10016551)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) J. Reichrath, Sunlight, skin cancer and vitamin D: What are the conclusions of recent findings that protection against solar ultraviolet (UV) radiation causes 25-hydroxyvitamin D deficiency in solid organ-transplant recipients, xeroderma pigmentosum, and other risk groups?, *J. Steroid Biochem.*, **103**, 664 (2007).
- 2) H.M. Gloster and K. Neal, Skin cancer in skin of color, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **55**(5), 741 (2006).
- 3) M. Kavekos, Site specific therapy: An integrative approach to treating melanoma, *Med. Hypotheses.*, **64**(6), 1097 (2005).
- 4) S.T. McGillis and H. Fein, Topical treatment strategies for non-melanoma skin cancer and precursor lesions, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, **23**(3), 174 (2004).
- 5) T.W. Ridky, Nonmelanoma skin cancer, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **57**(3), 484 (2007).
- 6) S. Saleh, A.K. Lam, P.G. Buettner, M. Glasby, B. Raasch and Y.H. Ho, Telomerase activity of basal cell carcinoma in patients living in North Queensland, *Hum. Pathol.*, **38**(7), 1023 (2007).
- 7) A. Hawrot, M. Alam and D. Ratner, Squamous cell carcinoma, *Curr. Probl. Dermatol.*, **15**(3), 91 (2003).
- 8) G. Khang, S.W. Kim, J.C. Cho, J.M. Rhee, S.C. Yoon and

- H.B. Lee, Preparation and characterization of PHBV microspheres for the sustained release of 5-Fu, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **11**, 89 (2001).
- 9) D. Paolino, D. Cosco, R. Muzzalupo, E. Trapasso, N. Picci and M. Fresta, Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer, *Int. J. Pharm.*, in press (2007).
 - 10) S.W. Kim, G. Khang, J.M. Rhee and H.B. Lee, Effect of cosolvents on release profiles of 5-fluorouracil loaded poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres, *Macromol. Chem. Symp.*, **14**, 108 (2001).
 - 11) J.S. Park, J.H. Lee, M.G. Choi, J.M. Rhee, M.S. Kim, H.B. Lee and G. Khang, Effect of recrystallized PLGA on release behavior of 5-fluorouracil, *Polymer(Korea)*, **31**(5), 447 (2007).
 - 12) S.H. Cho, K.S. Kim, J.K. Kang and B.H. Cho, Preparation and antitumor activities of core-corona type poly(methacryloyloxymethyl-5-FU) prodrug, *Polymer(Korea)*, **18**(5), 877 (1994).
 - 13) W.Y. Jang, C.H. Lee, S.M. Seo, B. Lee, M.S. Kim, G. Khang, H.G. Lee and H.B. Lee, Transdermal delivery of FITC-ovalbumin with microneedle system, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**(6), 403 (2005).
 - 14) J.M. Mo, M.S. Kim, T.W. Lee, G. Khang, H.K. Lee, J.M. Rhee and H.B. Lee, Transdermal microneedle for drug delivery applications, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**(2), 174 (2007).
 - 15) M.R. Prausnitz, Microneedles for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 581 (2004).
 - 16) Y. Xie, B. Xu and Y. Gao, Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array, *Nanomed.*, **1**, 184 (2005).
 - 17) I.A. Alsarra, A.A. Bosela, S.M. Ahmed and G.M. Mahrous, Proniosomes as a drug carrier for transdermal delivery of ketorolac, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **59**, 485 (2005).
 - 18) Y.B. Huang, Y.H. Lin, T.M. Lu, R.J. Wang, Y.H. Tsai and P.C. Wu, Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles, *Int. J. Pharm.*, **349**, 206 (2008).
 - 19) J.H. Mo, M.J. Kim, Y.T. Kim, M.S. Kim, T.W. Lee, G. Khang, J.M. Rhee, H.K. Lee and H.B. Lee, The overcome of skin barrier for transdermal drug delivery system, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**(4), 525 (2007).
 - 20) R.J. Babu and J.K. Pandit, Effect of penetration enhancers on the release and skin permeation of bupranolol from reservoir-type transdermal delivery systems, *Int. J. Pharm.*, **288**, 325 (2005).
 - 21) A.P. Funke, C. Günther, R.H. Müller and R. Lipp, In-vitro release and transdermal fluxes of a highly lipophilic drug and of enhancers from matrix TDS, *J. Control. Release*, **82**, 63 (2002).
 - 22) H. Hyun, J.C. Yang, M.S. Kim, H.B. Lee and G. Khang, Synthesis of methoxy poly(ethylene glycol)/polyesters diblock copolymers and evaluation of micellar characterization as drug carrier, *Polymer(Korea)*, **30**(6), 464 (2006).
 - 23) A.A. Attama, B.C. Schike, T. Paepenmüller and C.C. Müller-Goymann, Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **67**, 48 (2007).
 - 24) J.Y. Fang, T.L. Hwang, Y.L. Huang and C.L. Fang, Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol, *Int. J. Pharm.*, **310**, 131 (2006).
 - 25) S. Nicoli, P. Santi, P. Couvreur, G. Couarraze and P. Colombo, Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration, *Int. J. Pharm.*, **214**, 31 (2001).
 - 26) C.T. Campbell, M. Prince, G.M. Landry, V. Kha and H.E. Kleiner, Pro-apoptotic effects of 1'-acetoxychavicol acetate in human breast carcinoma cells, *Toxicol. Lett.*, **173**, 151 (2007).
 - 27) J.J.H. Celestino, R.R. Santos, C.A.P. Lopes, F.S. Martins, M.H.T. Matos, M.A.P. Melo, S.N. Bão, A.P.R. Rodrigues, J.R.V. Silva and J.R. Figueiredo, Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue, *Anim. Reprod. Sci.*, in press (2008).
 - 28) M.H. Shah and A. Paradkar, Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **67**, 166 (2007).
 - 29) Y.W. Yang, A.C. Wei and S.S. Shen, The immunogenicity-enhancing effect of the dispersion type and antigen release rate-a revisit of the role of the hydrophile-lipophile balance (HLB) value, *Vaccine*, **23**, 2665 (2005).
 - 30) H. Wei, D. Qing, C.D. Ying, X. Bai and F.L. Fang, Study on colon-specific pectin/ethylcellulose film-coated 5-fluorouracil pellets in rats, *Int. J. Pharm.*, **348**, 35 (2008).
 - 31) C. Kucuk, M. Ozkan, H. Akgum, S. Muhtaroglu and E. Sozuer, The effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor on bacterial translocation after administration of 5-fluorouracil in rats, *J. Surg. Res.*, **128**, 15 (2005).
 - 32) T. Tomimatsu and T. Horie, Enhanced glucose absorption in the rat small intestine following repeated doses of 5-fluorouracil, *Chem. Bio. Interact.*, **155**, 129 (2005).