

벤질트리알킬암모늄계 양이온성 계면활성제가 리포솜 제조와 특성에 미치는 영향

정연석 · 정노희[†]

충북대학교 공과대학 공업화학과
(2016년 7월 19일 접수; 2016년 8월 10일 수정; 2016년 8월 30일 채택)

Effects of Benzyltrialkylammonium Type Cationic Surfactants on the Preparation and Properties of Liposome

Yeonseok Jung · Noh-Hee Jeong[†]

*Department of Engineering Chemistry, Chungbuk National University
Cheongju 28644, Korea
(Received July 19, 2016; Revised August 10, 2016; Accepted August 30, 2016)*

요약 : 본 연구에서는 알킬체인의 길이가 서로 다른 benzyltrialkylammonium chloride계 화합물을 합성하여 리포솜 제조에 응용하였다. 제조된 리포솜의 평균 입도분포, 제타전위, 방출거동 및 항균성을 조사하였으며, 사슬 길이에 따른 특성을 비교하였다.

리포솜의 평균 입도는 120~140 nm의 크기분포를 가졌으며 소수성 사슬의 길이가 증가할수록 큰 입자크기를 가졌다. 리포솜 용액의 제타전위는 양이온성 계면활성제인 benzyltrialkylammonium chloride를 첨가함에 따라 +80~90 mV의 값을 가지며 향상된 분산 안정성을 보였다. 방출거동에서는 사슬 길이에 따라 방출 속도를 조절할 수 있었으며 긴 사슬의 계면활성제를 첨가한 리포솜은 증가된 서방형 방출특성을 보였다. 또한, 리포솜의 포집효율은 25.9~27.5% 이었다.

Abstract : In this study, benzyltrialkylammonium chlorides with different alkyl chain length were synthesized and applied to liposome. Prepared cationic surfactant embedded liposomes were measured particle size, zetapotential, release property and antibacterial activity. The average particle size of liposomes was 120~140 nm. As alkyl chain length was increased, the liposome size was increased. Zetapotential for the solution of liposomes added cationic surfactants were in the range of +80~90 mV. In release test, collagen release rate could be controlled by alkyl chain length. liposome embedded long alkyl chain surfactant had enhanced sustained release property. Entrapment efficiency of hydrophilic collagen were 25.9~27.5%.

Keywords : cationic surfactant, particle size, liposome, zeta potential, release property

[†]Corresponding author
(E-mail: nhjeong@chungbuk.ac.kr)

1. 서론

리포솜은 인지질이 물에 분산되면서 분자의 극성 부분이 물 쪽으로 향하고 비극성 부분은 소수성 상호작용을 통해 응집함으로써 형성되는 구형의 소포체를 말한다[1]. 리포솜은 인체에 무해하고 소수성 물질과 친수성 물질을 모두 포집할 수 있기 때문에, 약물전달체, 표적형 치료제로의 응용이 연구되고 있다[2, 3]. 또한, 리포솜에 포집한 물질은 포집되지 않은 물질보다 700배 이상 체내 흡수에 효과적이라는 연구결과도 리포솜의 약물 전달체로서의 응용에 큰 이유가 되고 있다[4]. 그러나 리포솜은 생체 내 흡수가 빨리 이루어져 짧은 반감기를 가지며, 리포솜의 구성 성분인 인지질은 용이한 가수분해성을 가지고 있어 안정성이 낮고 장기간 보관이 어렵다는 단점이 있다[5].

리포솜의 안정성 향상을 위해 첨가하는 물질 중 콜레스테롤은 반데르발스 결합 또는 수소결합으로 세포막 내의 지방산 사슬을 안정화시키는 작용을 하여 세포막의 유동성을 감소시키며 견고성을 부여하는 기능을 담당한다[6]. 최근 양이온성 계면활성제를 첨가하여 리포솜을 제조하는 연구들은 DNA 전달 및 치료 분야와, 피부 투과성을 향상시키는 리포솜에 대한 연구가 주를 이루고 있다[7, 8]. 그러나 양이온성 계면활성제의 항균성을 이용하여 제조한 리포솜에 대한 연구는 상대적으로 자료가 부족한 실정이다.

본 연구에서는 양이온성 계면활성제를 첨가한 리포솜의 최적 제조조건을 찾아내기 위해 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), benzyltrialkylammonium chloride (BTAC), 제미니 타입인 1,3-propane-bis(N-tetradecanoxylethyl-N,N-dimethyl) ammonium bromide (GE)를 사용하여 리포솜을 제조하였다. 그 중 우수한 항균성을 나타내는 BTAC를 본 연구의 대상 화합물로 선택하여, 소수성 사슬길이를 변화시켜 합성하면서 FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ 을 통해 구조를 분석하였다. 또한, 리포솜은 얇은막수화법으로 제조 후, 폴리카보네이트 막을 통과시키는 압출법으로 제조하였으며[9], 소수성 사슬길이에 따른 리포솜의 평균 입도분포, 포집효율 및 방출특성을 기존 레시틴과 콜레스테롤만 사용한 리포솜과 비교 및 분석하였다.

2. 실험

2.1. 시료, 시약 및 기기

BTAC를 합성하기 위해 benzyl chloride (98%, Sigma Aldrich), N,N-dimethylhexadecylamine (98%, Sigma Aldrich), N,N-dimethyltetradecylamine (98%, Sigma Aldrich), N,N-dimethyldodecylamine (98%, Sigma Aldrich)를 사용하였다. 용매는 디클로로메탄 (DCM, 99.5%, Samchun Chemical), 촉매로는 염산 (36~38%, SK Chemical)을 사용하였다. 리포솜을 제조하기 위해 레시틴 (85%, CNA Biotech, Korea)과 콜레스테롤 (99%, Sigma Aldrich), 합성한 화합물을 사용하였다. 용매로는 클로로포름 (99.5%, Samchun Chemical)과 메탄올 (99.5%, Samchun Chemical)을 7 : 3의 혼합 비율로 사용하였다.

합성화합물 분석에는 녹는점 측정기 (IA9100, Electrothermal), FT-IR (480 plus, Jasco)과 $^1\text{H-NMR}$ (Bruker, Avance 400 MHz)을 사용하였으며, 리포솜 분석에는 원심분리기 (CF-100, Wisepin), 입도분석기 (Zetasizer Nano S, Malvern Co.), UV/VIS spectrometer (Lambda 35, Perkin Elmer)를 사용하였다.

2.2. BTAC의 합성

500 mL 용량의 4구 둥근바닥 플라스크에 benzyl chloride 70 g (0.55 mol)과 N,N-dimethylhexadecylamine 135 g (0.5 mol), 혹은 N,N-dimethyltetradecylamine 121 g (0.5 mol), 또는 N,N-dimethyldodecylamine 107 g (0.5 mol)을 투입한다. 용매로는 DCM을 사용하며, 염산 40 mL를 적하깔때기를 통하여 천천히 적하시키며 약 4시간 동안 반응시킨다. 반응 후 감압 회전증발기를 이용하여 용매를 제거한 다음 재결정하여 N-benzyl-N,N-dimethyldodecylammonium chloride (AC-C12), N-benzyl-N,N-dimethyltetradecylammoniumchloride (AC-C14), N-benzyl-N,N-dimethylhexadecylammonium chloride (AC-C16)의 합성화합물을 얻었다.

2.3. BTAC의 분석

합성하여 얻은 화합물의 특성을 확인하기 위해 녹는점과 산기를 측정하였으며, HLB 값의 산정은 Davies 방법을 사용하여 산정하였다. 또한, 합성화합물의 작용기와 구조를 확인하기 위하여 FT-IR과 $^1\text{H-NMR}$ 을 사용하였다.

2.4. BTAC를 첨가한 리포솜의 제조

합성한 BTAC를 첨가하여 리포솜을 제조하였다. Stefanutti의 연구결과를 인용하여 양이온성 계면활성제를 레시틴과 함께 사용할 때 레시틴과 양이온성 계면활성제인 CTAB가 8:2의 물 비율로 사용하면 생체막에 유해한 영향을 끼치지 않는 것을 참고 하였고[10], 실험을 통해 레시틴과 콜레스테롤, 양이온성 계면활성제가 2 : 0.8 : 0.5 의 물 비율일 때, 작은 크기의 리포솜이 제조 되는 것을 확인하며, 이 때의 물 비율을 리포솜 제조의 최적 조건으로 결정하였다.

합성한 계면활성제 0.5 mmol, 콜레스테롤 0.031 g (0.8 mmol), 레시틴 0.152 g (2 mmol) 과 콜라겐 10 mg을 CHCl_3 과 MeOH의 혼합 용매 10 mL를 첨가하여 용해시킨다. 용해된 용액을 감압 회전증발기를 이용하여 60°C에서 1시간 동안 유기용매를 증발시키면 플라스크 벽면에 얇은 막이 형성된다. 이 후 20 mL의 PBS 완충용액을 넣고 20분 수화시키고, 60°C에서 3분간 초음파처리 후, 압출기 내의 0.1 μm 세공의 폴리카보네이트 막을 통과시켜 일정한 크기분포를 갖는 리포솜을 제조한다.

2.5. 리포솜의 특성 분석

양이온성 계면활성제를 첨가하여 제조한 리포솜의 항균성 실험은 paper disc method를 사용하였다[11]. 포도상구균을 tryptic soy broth (TSB)배지에 1 colony를 접종하여 배양하고, 멸균된 paper disc에 리포솜을 각각 50 μL 씩 흡수시켰다. 대조군은 양이온성 계면활성제를 첨가하지 않은 리포솜을 사용하며 32°C에서 24시간 배양 후 disc 주변에 생성된 생육저해환 (inhibition zone) 의 직경을 측정하여 항균활성 정도를 비교 분석하였다.

합성한 AC-C12, 14, 16을 첨가한 리포솜의 평균 입자크기는 입도분석기를 사용하여, 25°C에서 3회 측정 후 평균값으로 하였으며, 분산 안정성 확인은 zetasizer를 사용하여 4°C, 25°C에서

30일 동안 측정하였다. 리포솜의 콜라겐 포집효율 및 방출특성은 UV/VIS spectrometer를 사용하여 흡광도를 통해 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. BTAC의 분석

BTAC는 benzyl chloride와 dimethylalkylamine을 사용하여 친핵성치환반응으로 합성하였다. 반응 후, AcOEt를 사용해 재결정하여 백색의 고체를 얻었다. 수율과 녹는점, 산가, HLB 값은 Table 1에 정리하여 나타내었다. 산가측정 결과 AC-C12, AC-C14, AC-C16의 산가는 각각 0.89, 0.81, 0.83 이었으며, 이를 통해 재결정 후 촉매로 사용된 염산이 거의 남아있지 않음을 확인하였다. HLB 값은 6~8의 값을 나타냈으며 항균성을 지닌 물질로서의 응용뿐만 아니라 W/O형 에멀전의 유화제와 습윤제로서 사용이 가능한 것으로 보인다[12].

합성한 BTAC의 FT-IR 분석결과를 Fig. 1에 나타내었다. 스펙트럼에서 변화된 피크를 살펴보면 benzyl chloride의 C-Cl 결합인 750~800 cm^{-1} 에서의 피크가 사라지는 것을 확인하였고, 이를 통해 목적으로 하는 양이온성 계면활성제가 합성된 것을 확인하였다. BTAC의 $^1\text{H-NMR}$ 분석 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 세 가지 계면활성제에 존재하는 스펙트럼은 동일하게 측정되었으며 1.77 ppm에서 관측되는 장쇄 메틸렌기 스펙트럼의 적분 값은 탄소사슬의 길이가 12개에서 16개로 증가함에 따라 각각 18.3, 21.8, 26.2의 값을 가지는 것을 확인하였다. 이와같이 FT-IR과 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 통해 목적인 BTAC가 합성되었음을 확인하였다.

Table 1. Properties of Synthetic Surfactants

Surfactant	Melting point (°C)	Acid value	Yield (%)	HLB
AC-C12	48	0.89	83.2	8.3
AC-C14	53	0.81	87.4	7.4
AC-C16	60	0.83	85.8	6.3

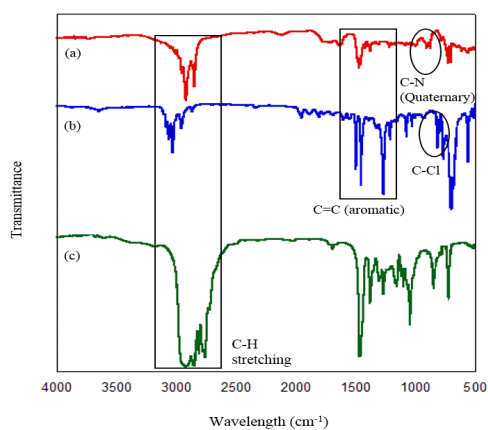


Fig. 1. FT-IR spectra of (a) AC-C14, (b) Benzyl chloride and (c) Dimethyltetradecylamine.

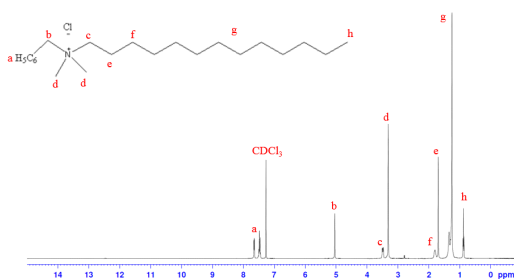


Fig. 2. ¹H-NMR spectrum of AC-C14.

3.2. 양이온성 계면활성제를 첨가한 리포솜의 항균성

Paper disc method를 통해 실시한 항균성 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. 레시틴과 콜레스테롤만 사용하여 제조한 리포솜과 GE 계면활성제를 첨가한 리포솜에서는 생육저해환이 측정되지 않았으며, CTAB와 AC-C16을 첨가한 리포솜에서는 각각 11, 23 mm 크기의 생육저해환이 관찰되었다. 세포막에 피해를 주지 않는 농도에서는 CTAB와 AC-C16의 계면활성제가 황색포도상구균의 세포벽 생성을 저해하는 효과가 나타난 것으로 보이며, GE 계면활성제에서 항균 특성을 보이기 위해선 더 높은 농도가 필요한 것으로 보인다[13]. 이를 통해 4급 암모늄계 계면활성제가 우수한 항균성을 가지는 것을 확인하였고, 그 중에 친수성 분자에 벤질기가 포함되어 있는 계면활성제가 세포벽과 흡착하여 항균성을 나타내는 과정에서 우수한 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

Table 2. Inhibition Zone of Synthesized Surfactant Embedded Liposomes by Paper Disc Method

Surfactant	Inhibition zone (mm)
Control(none)	-
GE	-
CTAB	11
AC-C16	23

3.3. 소수성 알킬 체인의 길이에 따른 리포솜의 평균 입도분포 및 콜라겐 포집효율

소수성 사슬의 길이가 서로 다른 BTAC를 첨가하여 제조한 리포솜의 평균 입도분포와 포집효율은 Table 3에 나타내었다. 소수성 사슬의 길이가 증가할수록 평균 입자크기가 증가함을 확인하였으며, 이는 소수성 사슬의 길이가 증가함에 따라서 같은 물 수의계면활성제가 들어가더라도, 리포솜의 지질이중층에서 소수성 사슬의 길이에 의해 차지하는 면적이 증가하면서 나타나는 현상으로 보인다.

Table 3. Average Particle Size and Entrapment Efficiency of Liposomes

Surfactant	Particle size (nm)	Entrapment efficiency (%)
AC-C12	120	25.9
AC-C14	127	26.5
AC-C16	139	27.5

리포솜의 포집효율은 탄소수가 12개에서 16개로 증가함에 따라 각각 25.9%, 26.5%, 27.5%의 값을 보였으며 사슬길이에 따른 포집효율의 변화는 크지 않았다. Manosroi의 연구결과에 따르면 알킬 사슬의 길이가 12개에서 18개로 길어지면 친유성 약물의 포집효율이 최대 2배 가까이 증가하는 것을 알 수 있는데[14], 본 실험의 결과는 최대 6%가량 증가한 결과값을 보였다. 이러한 결과는 소수성 사슬의 길이가 친수성 약물 보다 소수성 약물의 포집효율에 더 큰 영향을 주는 것으로 확인되며, Mahale의 연구결과에서 경향성을 볼 수 있었다[15]. 이는 콜라겐 수용액이 리포솜의 지질 이중층 구조가 아닌 친수성 공간에 포집이 되면서 소수성 사슬의 길이에 큰 영향을 받지 않았기 때문이다.

3.4. 양이온성 계면활성제를 첨가한 리포솜의 제타전위

리포솜의 제타전위는 콜레스테롤과 레시틴을 넣고 제조한 리포솜을 제외하고 모두 + 제타전위 값을 가졌다. 이는 Davidsen의 연구에서 4급 암모늄계 양이온성 계면활성제를 첨가하여 리포솜을 제조했을 때, 지질과 head 그룹 사이의 상호작용을 통해 제타전위가 + 값을 띠는 결과와 같은 경향을 가졌다[16]. 30일 동안 4°C, 25°C 조건에서 제타전위를 측정 한 결과, 레시틴과 콜레스테롤만 사용하여 제조한 리포솜은 -30 mV의 값을 가진 것에 반해, 양이온성 계면활성제를 첨가한 리포솜의 제타전위는 14일이 지나도 +50 mV이상의 값을 가지며 안정한 모습을 보였으며 측정 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 일반적으로 제타전위가 절대값 30 mV이상을 나타낼 때 콜로이드 입자가 안정된 상태라고 하는데, 제타전위가 감소하면 안정성이 낮아지는 현상은 Ostwald ripening 현상에 따라 분산계의 작은 입자가 더욱 작게 되거나 보다 큰 입자가 성장하는 현상으로 인한 응집현상으로 설명할 수 있다[17]. 따라서, 양이온성 계면활성제를 첨가함에 따라 +80 mV 이상의 값을 가지는 리포솜은 상호간 발생하는 반발력에 의해 응집이 억제되는 것이다[18].

3.5. 소수성 사슬 길이에 따른 리포솜의 콜라겐 방출특성

소수성 알킬 사슬의 길이에 따른 방출특성은 Fig. 4에 나타내었다. 소수성 알킬 사슬의 길이가 길어질수록 방출 속도가 낮아지고 동일한 시간에 방출되는 콜라겐의 양도 적었다. AC-C12를 첨가한 리포솜은 8~12시간 범위에서 방출이 끝났

으며, 사슬이 길어질수록 지속적으로 방출되는 시간이 최대 32시간까지 증가하는 것을 관찰하였다. Shi의 연구결과를 인용하면 이러한 현상은 콜라겐의 방출이 이뤄질 때, 지질 이중층의 알킬체인 밀도가 높아지는 현상으로 방출이 이뤄지는 과정에서 방해받기 발생하여 방출이 지연되는 것으로 볼 수 있다. 보호막이 응집 및 입자크기의 증가를 억제함과 동시에 막을 단단하게 유지하며 방출을 억제하는 역할을 하는 것으로 보인다[20]. 위 결과를 통해 물질의 방출 속도는 리포솜 자체의 서방형 방출특성 이외에도 함께 사용한 계면활성제의 소수성 사슬의 길이를 통해 조절이 가능한 것을 확인하였다.

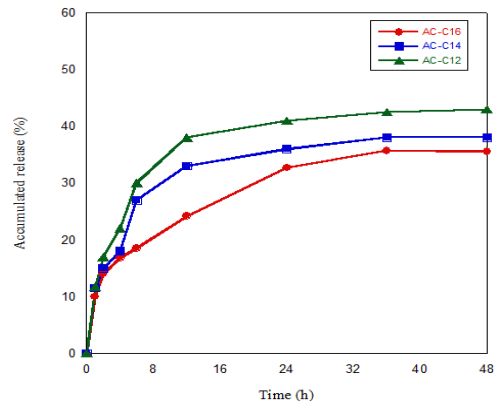


Fig. 4. In-vitro release of collagen from liposomes using different chain length AC for 48 h.

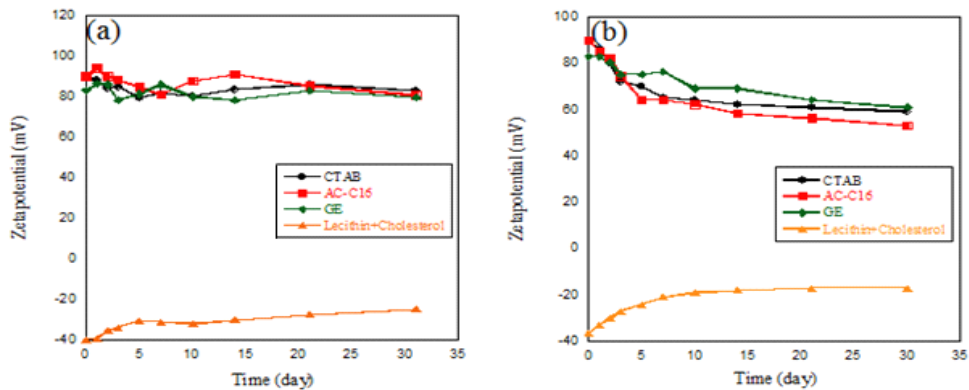


Fig. 3. Zeta potential of the liposomes at (a) 4°C and (b) 25°C storage temperature.

4. 결론

본 연구에서는 항균성을 갖는 리포솜을 제조하기 위해 양이온 계면활성제 3종을 합성하였으며, 이들 화합물을 이용하여 제조한 리포솜의 저장 안정성, 방출거동, 포집효율 등의 특성에 대해 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. FT-IR, ¹H-NMR 을 통한 구조분석을 통해 합성 여부를 확인하였다. 합성화합물은 상온에서 백색의 고체였으며, 수율은 AC-C12 83.2%, AC-C14 87.4%, AC-C16 85.8%이었다. 각 계면활성제의 녹는점은 각각 48°C, 53°C, 60°C로 측정되었고, Davies 법에 의해 산정된 HLB 값은 탄소수가 12개에서 14개, 16개로 증가할 때 각각 8.3, 7.4, 6.3의 값을 가졌다.
2. 합성화합물을 첨가한 리포솜의 평균 입자크기는 AC-C12, AC-C14, AC-C16 각각 120 nm, 127nm, 139 nm 였으며, 콜라겐의 포집효율은 각각 25.9%, 26.5%, 27.5%이었다.
3. 양이온성 계면활성제를 첨가한 리포솜의 제타전위는 +80 ~ +95 mV 으로 측정 되었으며 일반 리포솜에 비해 4°C와 25°C에서 40% 이상 향상된 저장 안정성을 나타냈다.
4. 리포솜에 포집된 콜라겐의 방출특성은 AC-C12를 첨가한 리포솜은 12시간, AC-C14는 24시간, AC-C16에서는 32시간에 걸쳐 방출이 일어났으며 사슬길이가 늘어날수록 향상된 서방형 방출특성을 확인하였다.

References

1. J. M. Yoo, S. Y. Kim, E. A. Cho, E. H. Cho, S. J. Choi, Y. J. Jeong, B. J. Ha and H. J. Chae, "Stabilization of Astaxanthin using Nanoliposome", *Journal of Korean Society Biotechnology and Bioengineering*, **25**(2), 130 (2010).
2. Y. Barenholz, "Liposome application: Problems and prospects", *Journal of Colloid and Interface Science*, **6**(1), 66 (2001).
3. C. Spuch and C. Navaro, "Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's Disease)", *Journal of Drug Delivery*, **2011**, 1 (2011).
4. Chapman Jr, W. L. Hanson, W. L. Alving, C. R. Hendricks, "Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimonate in the dog", *American journal of veterinary research*, **45**(5), 1028 (1984).
5. B. S. Jin and J. Y. Yoo, "A study on the characteristics and stability of liposomes", *Dongduk Journal Life Science Studies*, **74** (2001).
6. B. Nasser, "Effect of Cholesterol and Temperature in the Elastic Properties of niosomal membranes", *International Journal of Pharmaceutical*, **300**(1), 95 (2005).
7. W. Li, J. Shi, C. Zhang, M. Li, L. Gan, H. Xu and X. Yang, "Co-delivery of thioredoxin 1 shRNA and doxorubicin by folate-targeted gemini surfactant-based cationic liposomes to sensitize hepatocellular carcinoma cells", *Journal of Materials Chemistry B*, **2**(30), 4901 (2014).
8. S. Duangjit, P. Opanasopit, T. Rojanarata and T. Ngawhirunpat, "Evaluation of meloxicam-loaded cationic transfersomes as transdermal drug delivery carriers", *AAPS PharmSciTech*, **14**(1), 133 (2013).
9. F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail, and D. Papahadjopoulos. "Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **557**(1), 9 (1979).
10. E. Stefanutti, F. Papacci, S. Sennato, C. Bombelli, I. Viola, A. Bonincintro, F. Bordini, G. Mancini, G. Gigli and G. Risuleo, "Cationic liposomes formulated with DMPC and a gemini surfactant traverse the cell membrane without causing a significant bio-damage", *Journal*

- of Biochimica et Biophysica Acta*, **1838**(10), 2646 (2014).
11. H. Ericsson, G. Tunevall, and K. Wickman. "The paper disc method for determination of bacterial sensitivity to antibiotics: relationship between the diameter of the zone of inhibition and the minimum inhibitory concentration." *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* **12**(4), 414 (2010).
 12. R. C. Little, "Correlation of surfactant hydrophile-lipophile balance (HLB) with solubility parameter", *Journal of Colloid and Interface Science*, **65**(3), 587 (1978).
 13. T. Hamouda and J. R. Baker, "Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in electric Gram-negative bacilli.", *Journal of Applied Microbiology*, **89**(3), 397 (2000).
 14. A. Manosroi, P. Wongtrakul, J. Manosroi, H. Sakai, F. Sugawara, M. Yuasa, M. Abe, "Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **30**(2), 129 (2003).
 15. N. B. Mahale, P. D. Thakkar, R. G. Mali, D. R. Walunj, S. R. Chaudhari, "Niosomes: Novel sustained release nonionic stable vesicular systems - An overview" *Advances in Colloid and Interface Science*, **183**(1), 46 (2012).
 16. J. Davidsen, I. Rosenkrands, D. Christensen, A. Vangala, D. kirby, Y. Perrie, E. M. Agger, P. andersen, "Characterization of cationic liposomes based on dimethyldioctadecylammonium and synthetic cord factor from M. tuberculosis (trehalose 6, 6' -dibehenate)—a novel adjuvant inducing both strong CMI and antibody responses.", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1718**(1), 22 (2005).
 17. D. G. Fatouros and S. G. Antimisiaris, "Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin" *Journal of Colloid and Interface Science*, **251**(2), 271 (2002).
 18. J. Sabin, G. Prieto, J. M. Ruso, R. H. Alvarez and F. Sarmiento, "Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces.", *The European Physical Journal E*, **20**(4), 401 (2006)
 19. B. Shi, C. Fang, Y. Pei, "Stealth PEG-PHDCA niosomes: Effects of chain length of PEG and particle size on niosomes surface properties, in vitro drug release, phagocytic uptake, in vivo pharmacokinetics and antitumor activity", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **95**(9), 1873 (2006)
 20. M. J. Lawrence, "Sufactant: Microemulsions and Vesicles as Vehicles for Drug Delivery", *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **19**(3), 257 (1994)