

초음파 분쇄 리포솜(liposome)의 혼탁도와 안정도

김진구·김종득

한국과학기술원 화학공학과
(1987년 9월 11일 접수, 1988년 2월 19일 채택)

Turbidity and Stability of Sonicated Lecithin Liposomes

Jin-Gu Kim and Jong-Duk Kim

Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of
Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea
(Received 11 September 1987; accepted 19 February 1988)

요 약

혼탁한 egg yolk phosphatidylcholine의 다층 거대 액포를 cuphorn 시스템으로 초음파 분쇄하여 단층 소액포 리포솜을 제조하고 그 안정도를 검토하기 위하여 흡광도를 측정하였다. 단층 소액포 수용액은 가시광선 영역에서 Rayleigh 산란이론을 잘 만족하였으며 Smoluchowski의 이론에 따라 빠르게 결집체를 형성한다고 가정하여 흡광도 변화를 예측하였으며, 입자의 크기, 수 그리고 형태가 변해가고 있으며 혼합체의 표면적이 일정하다는 가정으로 실험자료를 설명하였다.

Abstract—The stability of a small unilamellar liposome, prepared by sonication from the turbid aqueous solutions of egg yolk phosphatidylcholine with the cuphorn ultrasonic system, were investigated by measuring the absorbance of visible light in the range of wavelengths from 425 nm to 750 nm. The absorbance of the freshly sonicated and centrifuged liposome solution followed the linear relationship with $1/\text{wavelength}^4$ of the Rayleigh scattering theory. For the incubated liposomal dispersions, a transient turbidity model was proposed in order to explain the change of turbidity by combining with Smoluchowski fast flocculation, and the model has been shown to be appropriate for the prediction of the changes of liposomal particles, i.e., number, size and shape.

1. 서 론

리포솜은 인지질을 물에 팽윤시켰을 때 형성되는 인조액포(synthetic vesicle)를 지칭하는 것으로, 생체막의 기본구조와 유사한 인지질 이중층(bilayer) 구조를 갖기 때문에 생체막의 모사연구와 생리학적 활성물질의 생체 전달 매개체로서 많이 이용된다[1, 2]. 전달 기구로서는 단백질을 비롯한 거대분자로 부터 항종양제 등과 같이 부작용이 심한 약제를 두루 포집하여 사용할

수 있으며 친수성이나 소수성분자 모두에 이용할 수 있다. 또한, 방출지연(sustained release), 국소적 작용(localized action), 특정 기능세포에 대한 적중화(targeting)가 가능하며 면역성이나 부작용을 고려할 때 만족할만한 성질을 갖기 때문에 현존하는 약전달 시스템 중 가장 뛰어난 것의 하나로 인정받고 있다[3, 4, 5].

리포솜의 분류방법에는 여러가지가 있으나 크기와 형태에 따라서 분류하면[6, 7], 여러 겹의 이중층으로 이

루어져 있으며 100-5000 nm의 크기를 갖는 다층 거대 액포(multilamellar large vesicle, MLV), 한겹의 이중층으로 되어 있고 크기가 20-50 nm인 단층 소액포(small unilamellar vesicle, SUV)와 100-1000 nm의 직경을 갖는 단층 대액포(large unilamellar vesicle, LUV)로 나눌 수 있다. 이 중에서 SUV는 MLV나 LUV에 비하여 포집효율이 낮다는 단점이 있으나 생체 내에서의 정화속도가 낮고, 안정도가 크며, 크기가 매우 작고 균일하다는 장점이 있다. 또한, 비세망내피계와 특정 조직에 대한 적중화에 좋은 결과를 갖기 때문에 약의 제어방출 시스템으로서의 잠재력을 높이 평가 받고 있다[8]. 그러나, 앞에서 언급한 것과 같이 리포솜은 약전달기구로서 매우 유용하지만 리포솜간의 상호작용, 혹은 혈액내의 여러가지 물질들과 상호작용으로 서로 합체되거나 소거되어 약전달 시스템으로 사용시 그 안정도가 문제되고 있다[5].

리포솜에 대한 안정도는 전자현미경, 광산란(dynamic light scattering) 등에 의해 계속 연구되어오고 있으며, 본 연구는 리포솜, 특히 초음파 분쇄에 의해 만들어진 SUV의 안정도에 관한 연구로, 가시광선 영역에서 측정된 흡광도를 Rayleigh 이론과 비교하여 SUV의 물리적 안정도를 관찰하였다.

2. 이론적 배경

인지질을 물에 뿜은 분산시키면 조성과 온도에 따라 여러가지의 상전이 현상을 나타내며 그 개략적인 상태도와 구조를 Fig. 1에 나타내었다. 특히, 소량의 인지질의 분산상은 액정상의 구조를 형성하는데 이것은 초음파 분쇄에 의하여 구형의 SUV가 된다[9]. 리포솜은 인지질의 종류와 배향, 온도의 증가에 따른 겔-액정 상전이, 극성 분자단 주변의 물분자의 섭동, 농도의 변화 전해질이나 치환기의 첨가, pH 등에 따라 그 안정도가 달라지게 된다[10]. 리포솜은 이중층액포(bilayer vesicle)로서 보통 마이셀과는 달리 미세에멀션(microemulsion)과 유사하며 마이셀이 동적 평형 상태에 있는 것에 비해 비평형 변형에 의해 에멀전제가 파괴되어 연속상 중의 분산상의 구조가 변하게 된다. 수용액 중에서 SUV의 상호작용은 지질의 단분자 상호교환, 상호결집과 용해를 포함한다. 그러나, 마이셀의 동적균형이 주로 단분자 교환에 의하여 이루어지는 것에 비해[11], 리포솜은 상호결집과 융합에 주로 영향을 받는다[12].

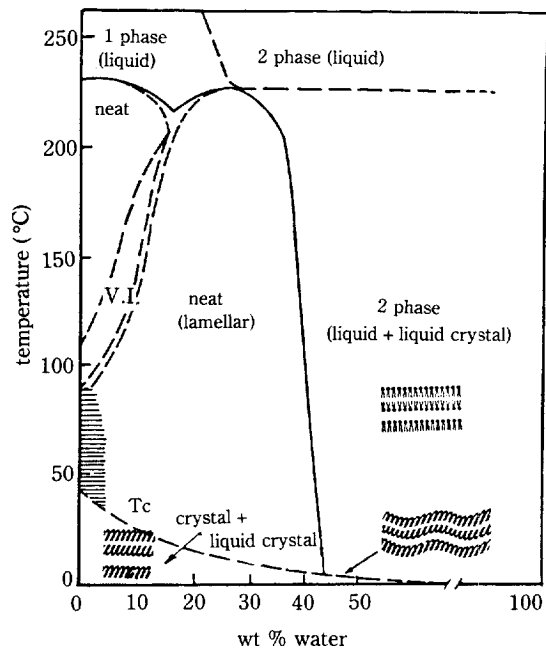


Fig. 1. Simple phase diagram of pure egg yolk PC-water system.

V.I. is the viscous isotropic phase (face-centered cubic). Tc is the defined boundary of the crystal/mesophase transition. The hatched area is poorly defined zone in which the lamellar liquid crystalline may coexist with another mesophase.

2-1. 리포솜의 결함

초음파 분쇄에 의해 만들어진 SUV가 초기 N_0 개의 균일한 크기를 갖고, 접촉전까지는 상호간에 작용하는 인력이 없으며 비가역적으로 달라 붙고, 합체되는 속도가 입자의 확산에 지배를 받으며, 빠른 합체를 한다고 가정하면 Smoluchowski의 이론[13]에 따라 시간이 경과하면서 입자들의 크기분포가 변하게 되는데 경과한 시간 t 에서 입자의 총수 N 은

$$N = \frac{N_0}{1 + k N_0 t} \quad (1)$$

가 되며, 여기서 k 는, 입자의 확산계수가 D 이고 반경이 r 일 때 $8\pi Dr$ 의 값을 갖는다. 이때 초기 액포 i 개가 결합하여 형성된 i -mer의 수 N_i 는 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$N_i = \frac{N_0 (k N_0 t)^{i-1}}{(1 + k N_0 t)^{i+1}} \quad (2)$$

이 i -mer의 수는 $t = (i-1)/2kN_0$ 일 때 최대치를 갖으

며 그 후에는 감소하며 입자의 크기는 점점 커지게 된다.

2-2. 광산란 이론

SUV가 분산된 리포솜 용액에 빛을 통과시키면 액상의 성질에 따라 투과광의 세기가 변화한다. 매질을 통과하는 빛의 세기의 감소는 Beer의 법칙에 따라[14] 광투과 길이의 대수함수로써 표시할 수 있다. 즉,

$$I_o / I = \exp(-\tau l) \quad (3)$$

여기서 I_o , I 는 각각 입사광과 투과광의 세기이며 τ 는 탁도, l 은 시료의 길이이다. 탁도 τ 는

$$\tau = N(C_{abs} + C_{scat}) \quad (4)$$

로 표시되며, 여기서 N 은 단위부피당 입자수이며 C_{abs} 와 C_{scat} 는 각각 흡수와 산란에 의하여 소실된 에너지에 의한 것이며 면적의 단위를 갖는다. Rayleigh 이론에 의하면 입자의 크기(a)가 입사광의 파장의 크기(μ)에 비해 충분히 작을 때($a \leq \mu/20$), C_{scat} 는 다음과 같이 표시된다[15].

$$C_{scat} = \frac{24 \pi^3 V^2}{\mu^4} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (5)$$

여기서, μ 는 파장, V 는 입자의 부피이고, m 은 연속상에 대한 분산상의 상대굴절율이다. SUV 분산상이 단분산성이며 이량체를 이룰 때까지는 Rayleigh 이론을 만족하고 삼량체 이상이 되면 파장에 무관하게 일정량의 투과광을 흡수하며, 상대굴절율 m 이 크기에 관계없이 일정하고 가시광선 영역에서 C_{abs} 가 C_{scat} 에 비해 대단히 작다고 가정하면 일정한 시간이 지났을 때, SUV 분산상의 탁도는 (4)와 (5)식에 의해

$$\tau = \frac{N_1 V_1^2}{\mu^4} C + \frac{N_2 V_2^2}{\mu^4} C + C_{scat} \sum_{i>2} N_i \cdot i \quad (6)$$

와 같이 쓸 수 있으며 C 는 식 (5)에서 상대굴절율에 따른 항과 상수의 곱으로 표시된 상수이다. 한편, 단량체로부터 이량체로 합체된 리포솜의 경우 그 표면적의 변화가 없다고 가정하면 이량체의 부피(V_2)는 단량체의 부피(V_1)로 표시되며

$$V_2 = 2^{3/2} V_1 \quad (7)$$

이다. 그리고, (2)식과 (7)식을 (6)식에 대입하여 정리하면

$$\tau = a' / \mu^4 + b' \quad (8)$$

이 되며, 여기서 a' 은

$$a' = \frac{a_o(1+9k N_o t)}{(1+k N_o t)^3} \quad (9)$$

이며, (9)식 중의 a_o 는

$$a_o = 24 \pi^3 V_1^2 N_o \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (10)$$

로서 초기 조건 및 상수들로서 일정하며, b' 는

$$b' = N_o C_{scat} \left(1 - \frac{1+3k N_o t}{(1+k N_o t)^3} \right) \quad (11)$$

이다. 따라서, τ 의 변화는 a' 과 b' 의 시간의 함수로써 표시할 수 있다.

3. 실험

3-1. 시료 및 기기

사용한 인지질은 egg yolk phosphatidylcholine (PC, 99%)을 Sigma Co.에서 구입하여 더 이상 정제하지 않고 사용했으며 증류수는 실험할 때마다 두번 증류하여 사용하였다. MLV를 SUV로 전환시키기 위한 초음파 분쇄기는 Sonics & Material Inc.의 Model 250B로서 Fig. 2와 같이 초음파 방사면의 지름이 51 mm인 cuphorn을 연결하여 사용하였다. 시료의 흡광

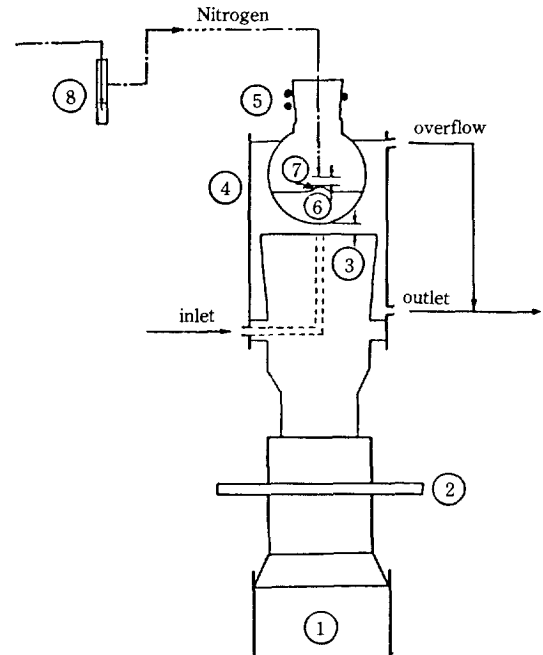


Fig. 2. Cuphorn system for liposome sonication.

- | | |
|--------------------------------------|-------------------|
| 1. converter | 2. splash shield |
| 3. radiating face | 4. cuphorn vessel |
| 5. sample holder | 6. sample |
| 7. fluctuation, cavitation umbrellar | |
| 8. N ₂ flow detector | |

도는 Beckman spectrophotometer Model 35를 사용하여 측정하였으며, cuvette는 광투과길이가 1cm이고 용량이 3m/인 규소유리제품을 사용하였다.

3-2. 실험방법

3-2-1. SUV의 제조

SUV를 제조하기 위해 사용된 초음파 발생 장치는 Barrow와 Lentz[16]가 사용한 cuphorn이며 시료용기는 vial 대신 50m/ 둥근 바닥 플라스크(Pyrex, Corning)를 사용하였다. Chloroform 혼합용액 상태로 저장된 PC(100 mg of PC/ 1 ml of stock solution) 0.2-1.0 m/를 취하여 50 m/ 플라스크에 넣고 감압하여 chloroform을 증발 제거시키고 PC를 플라스크의 벽에 얇은 막으로 침전시킨다. PC가 침전되고 용매인 chloroform이 시야에서 사라진 뒤 진공 중에 8시간 이상 건조시켜서 남아 있는 용매를 완전히 제거한다. 다음 질소를 5-10분간 흘려 보내고 여기에 PC의 전체 농도가 1.0 wt%가 되도록 50°C의 증류수를 가한다. 팽윤시간은 20분 정도였으며 이렇게 얻은 유백색의 MLV 분산용액을 초음파 분쇄하였다. 시료를 담고 있는 플라스크는 Fig. 2와 같이 clamp로 고정하고 외부의 정온수조로부터 50°C의 물을 순환시켜 PC의 상전이점 이상에서 초음파 분쇄를 실시함으로써 SUV의 구조적 결함을 예방하였다[17]. 초음파 분쇄 중의 산화에 의한 인지질의 분해를 막기 위해 시료의 표면에 계속 질소를 공급하여 질소막이 형성되도록 하였으며 순환 유체내의 불순물의 존재로 인한 초음파 분쇄 효과의 감소를 막기 위해 순환수를 자주 갈아주었다. 전체 분쇄시간은 45-70분 정도였으며 이렇게 얻은 SUV의 분산용액을 4600 rpm으로 1시간 정도 원심분리하여 MLV를 제거한 다음 4°C 항온조에 보관하였다.

3-2-2. 흡광도의 측정

흡광도는 제조된 SUV를 cuvette에 2-3 m/정도 채우고 순수한 물을 기준으로 하여 측정하였다. 측정온도는 20°C이며 750-400 nm의 가시광선 영역에서 25 nm 혹은 50 nm단위로 측정하였다.

4. 결과 및 검토

MLV 분산상의 초음파 분쇄 현상은 초음파가 유체의 매질을 통과할 때 생기는 국부진공 현상(cavitation) 때문이다[18]. Fig. 2의 cuphorn 시스템은 침형

(probe type)과 욕조형(bath type)의 절충형으로 타액의 오염을 방지할 수 있고 기포의 발생을 억제할 수 있으며 MLV가 SUV로 전환되는 과정을 눈으로 직접 확인할 수 있고, 온도조절이 매우 용이하다는 장점이 있다. 분쇄 효율에 영향을 미치는 인자는 순환 유체의 성분, 시료의 위치와 접촉면적, 용기의 재질 등이 있다.

Cuphorn 시스템에 물을 순환시키면서 초음파를 가하면 내부에 국부진공우산(cavitation umbrellar)이 관측된다. Barrow와 Lentz[16]는 vial을 시료용기로 사용하여 시료를 국부진공우산의 머리부분에 집중시켰을 때 최대의 효율을 얻었다고 보고한 바 있으나 둥근 바닥 플라스크를 사용한 본 실험의 결과 오히려 초음파 방사표면에 가까이 밀착시켰을 때 최적의 효율이 나타났다. 즉, 최대의 효율을 얻으려면 시료용기 내부에 생기는 유도국부진공을 최대로 하는 조건이 만족되어야 하는데 본 실험의 결과 이러한 조건이 만족될 때 시료 표면의 중심부가 Fig. 2의 7과 같이 둥그런 돌출이 관측되었다. 이 경우 약 15분이 지나면서 시료가 투명해지기 시작했으며 45분이 지난 후에는 매우 깨끗한 SUV가 얻어졌다.

한편, 아래의 실험 결과에서는 앞에서 언급한 혼탁도 대신 spectrophotometer에서 측정된 흡광도를 직접

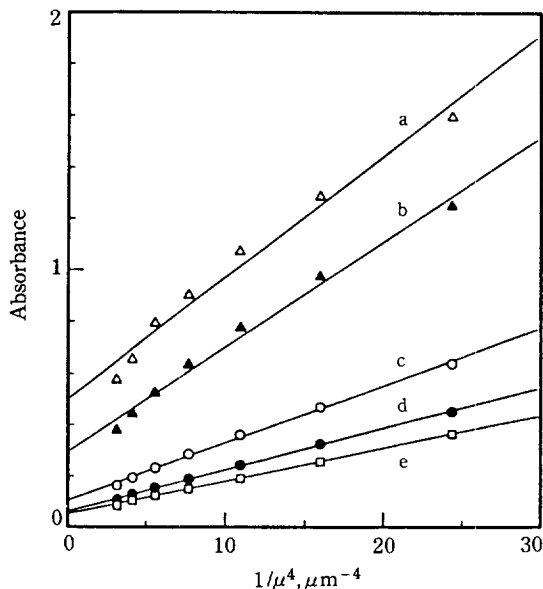


Fig. 3. Absorbance of liposomal dispersions sonicated with cuphorn system during a) 20, b) 30, c) 45, d) 60, e) 75 min.

사용하여 설명하였는데 흡광도 (absorbance, $A = \tau / 2.303$)는 식 (3)의 혼탁도의 식과 유사한 형태이며 다음과 같이 정의된다.

$$A = \log(I_0 / I) \quad (12)$$

Fig. 3은 분쇄시간에 따라 측정된 시료의 흡광도 (absorbance)를 파장의 4제곱의 역수에 대해 도시하고 Rayleigh 이론과 비교한 것이다. 여기서 실선은 각 시간에서의 데이터를 최소 제곱법에 의해 1차식으로 나타낸 것이며 분쇄시간이 경과함에 따라 점차 아래쪽으로 이동하여 식 (8)의 선형 1차식과 일치하는 것을 보여준다. 그러나 충분히 분쇄하였음에도 불구하고 파장이 무한히 증가할 때 잔존하는 흡광도가 있기 때문에 절편이 0으로 수렴하지 않고 Rayleigh 이론으로 부터 벗어난다. 특히 이 그림의 흡광도 특성은 식 (8)에 의하면 이들의 기울기(slop)와 절편(intersection)에 따라 특징지워지며 경사도와 절편이 감소하고 있다. 용액 내부의 구조적 특성이 MLV와 그 혼합 액체에서 SUV의 투명한 액상으로 바뀌고 있음을 나타낸다. Fig. 4의 a는 50분동안 초음파 분쇄를 실행한 후의 데이터이고 Fig. 4의 b는 이것을 4600 rpm으로 1시간 정도 원심분리하였을 때 측정된 흡광도 데이터가 b이다. 원심분리에 의하여서는 기울기의 크기는 거의 변하지 않는 반면

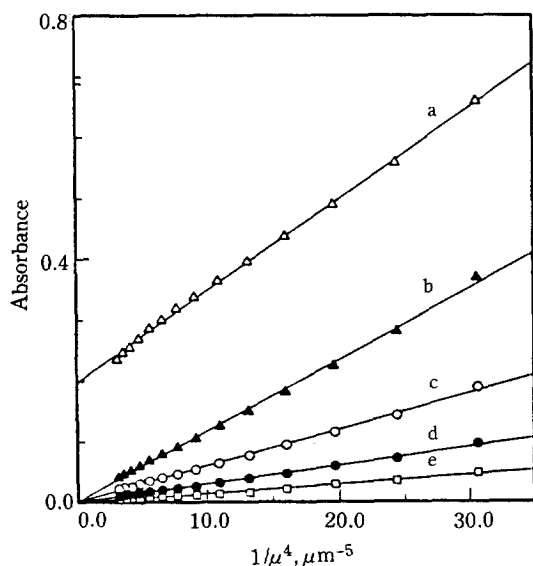


Fig. 4. Absorbance of liposomal dispersions.

- a) after sonication (50 min)
- b) after centrifugation
- c) after dilution to 1/2 initial PC concentrations
- d) after dilution to 1/4 initial PC concentrations
- e) after dilution to 1/8 initial PC concentrations

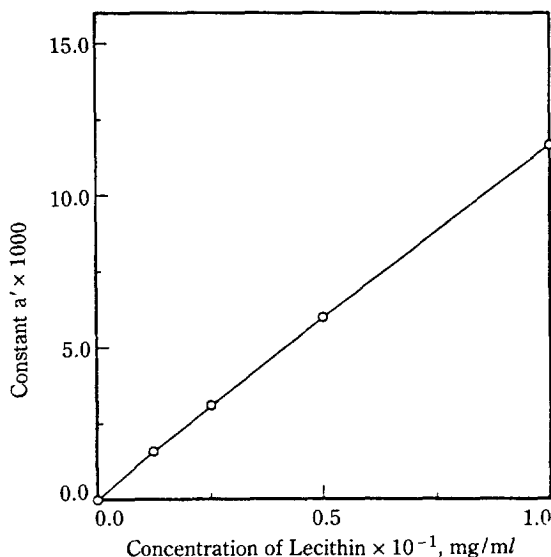


Fig. 5. Absorbance constant(a') for different PC concentrations at initial time.

절편의 크기는 변하였다. 이러한 현상은 원심분리에 의하여 분리 가능한 거대 입자들이 분리되어 나옴으로써 용액의 흡광도를 크게 감소시킨 결과이다. 따라서 이러한 원심력은 미소입자(SUV)의 입경에는 큰 변화를 주지 않으면서 큰 입자를 분리하고 잔여입자들은 Rayleigh 산란 이론에 잘 적용되고 있음을 보여준다. 또한, c, d, e는 b를 1/2, 1/4, 1/8로 희석한 것인데 이것들은 모두 파장이 무한대로 갈 때 흡광도가 0으로 수렴하며 이것은 Rayleigh 이론과 잘 일치함을 알 수 있다. 이 농도에 따른 변화를 농도에 따라서 그 경사도를 그려보면 Fig. 5와 같이 나타나며 이것은 식 (4)의 가정을 잘 만족하고 있음을 나타낸다.

Fig. 6부터 Fig. 8까지는 Fig. 4의 시료들에 질소를 채우고 4°C에서 일정한 시간동안 보관하였다가 20°C에서 흡광도를 측정하여 그 변화를 보인 것이다. Fig. 6은 Fig. 4의 b를 저장한 경우이며 Fig. 3과는 반대로 저장시간이 경과함에 따라 탁도가 증가하여 위쪽으로 편향하고 있다. 특히, 직선의 절편이 크게 변화하는데 이것은 빛을 산란 혹은 흡수하는 정도가 변화하고 있음을 나타내고 있다. Fig. 7과 Fig. 8의 각 점들은 측정된 흡광도의 파장의 4제곱의 역수에 대한 값들을 최소 제곱법에 의해 얻은 기울기(a')와 절편(b')을 경과한 시간에 대해 그린 것이다. 이들 그림에서의 일점쇄선은 실험 값들을 연결한 것이며, 실선은 식 (8), (9) 그리고 (11)에 어떤 kN_o 와 $N_o \cdot C_{scat}$ 값을 대입하여 실

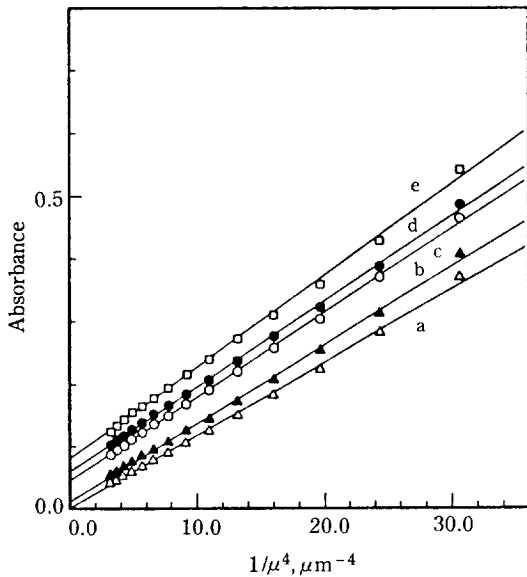


Fig. 6. Absorbance of liposomal dispersion incubated at 4°C for a) 0, b) 24, c) 48, d) 72, e) 96 hrs. upward.

형치와 비교한 것이다. Fig. 7은 흡광도 데이터로부터 식 (8)의 a' 을 시간에 따라 도식한 경우인데 시간에 따라 증가하며 그 변화는 점점 완만해지고 있다. 이는 식 (9)에서처럼 산란체의 감소에 기인하나 식 (4) 혹은 식 (6)에서처럼 수의 감소는 혼탁도의 감소가 예상되기 때

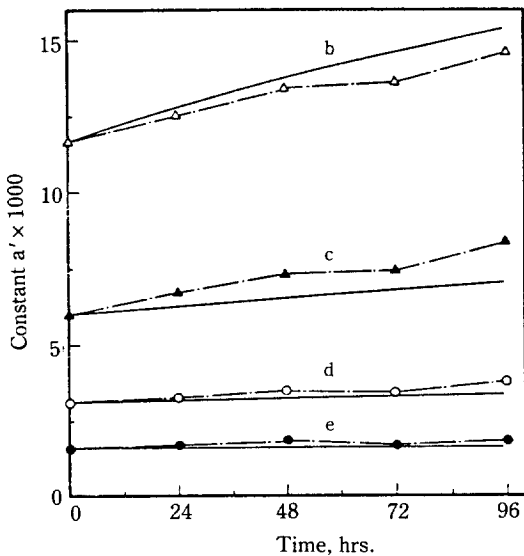


Fig. 7. Absorbance constant(a') of incubated liposomal dispersion with different PC concentrations.

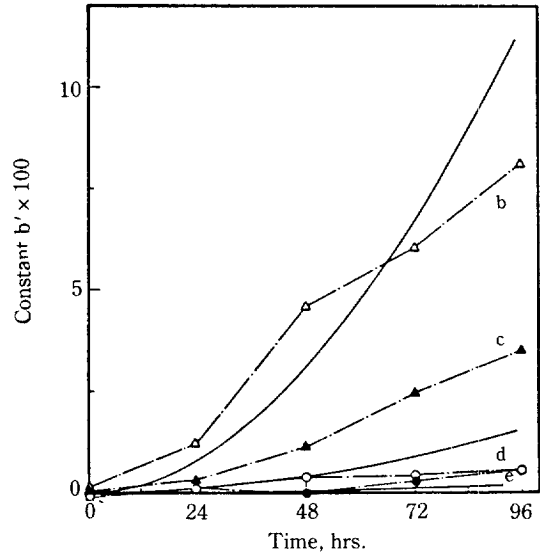


Fig. 8. Absorbance constant(b') of incubated liposomal dispersion with different PC concentrations.

문에 흡광도의 증가가 잘 설명되지 않은 것처럼 보이나 리포솜의 리피드 성분은 더 큰 리포솜으로 합체 결합할 때 모두 그 계면에 머물러 전체 표면적이 보존되므로 이량체 결합의 경우 식 (7)로 보정한 결과 그 경향을 잘 설명할 수 있었다. 즉, 이러한 혼탁도의 증가는 입자수의 감소와 입자크기의 변화가 동시에 영향을 끼치고 있다. 산란매체의 크기에서의 변화로 인하여 Rayleigh 이론의 적용범위를 벗어나게 되고 그 정도는 시간에 따라 증가하게 된다. 이러한 광의 전량 산란이 구형의 결집체의 크기에 따라 변화하고 그에 관여하는 갯수의 변화에 기인한다고 보면 실선과 같다. Fig. 7에서의 값을 이용하여 식 (11)에서처럼 삼량체 이상의 경우 입사광 전량이 통과하지 못한다고 가정하면 Fig. 8의 절편 b' 와 같이 일반적 경향을 설명할 수 있다. 그러나 이 가정은 입자가 결집할 때 2, 3량체로 증가하게 되고 이에 따라 산란광량에서 차이가 있고 3량체 이상이 흑체가 아니기 때문에 생기는 오차로 생각된다. 따라서 이러한 영향은 입자의 크기와 형태, 혹은 충돌기구 등에서의 차이를 적절히 반영하면 잘 설명되리라 생각된다.

5. 결 론

혼탁한 egg yolk PC의 MLV 분산 수용액을

cuphorn 시스템을 이용하여 초음파 분쇄하여 SUV를 제조하고 그 안정도를 흡광도 측정에 의해 검토하였다. 제조된 SUV 분산용액을 원심분리하여 미분쇄 잔여분을 제거하였을 때 SUV 수용액은 가시광선 영역에서 Rayleigh 산란 이론을 잘 만족하는 균일한 입자임을 알 수 있었으며 이것을 일정 시간동안 보관하여 시료의 흡광도를 측정하고 SUV의 안정도를 관찰하였다. 입자간의 합체현상이 Smoluchowski의 빠른 결집체 형성 이론에 따른다고 가정하였고, 시간에 따른 흡광도의 변화를 Rayleigh 이론과 비교하여 SUV의 분산의 구조적 변화를 예측할 수 있는 모델로서

$$\tau = a' / \mu' + b'$$

를 제시하여 실험치와 비교하였다. 4°C에서 잘 보관된 리포솜의 시간에 따른 흡광도는 입자의 수, 크기에 따라 민감하게 변화하였으며 SUV가 서로 결합하여 LUV로 전환하는 과정을 흡광도의 측정에 의해 예측할 수 있다.

NOMENCLATURE

A	: absorbance
LUV	: large unilamellar vesicle
MLV	: multilamellar large vesicle
SUV	: small unilamellar vesicle
PC	: phosphatidylcholine
C_{abs}, C_{scat}	: absorption and scattering cross sections
I_0, I	: light intensities at origin and sample depth l
k	: a rate constant
V	: vesicle volume
m	: relative refractive index
N	: number concentration of vesicles
μ	: wavelength
τ	: turbidity (in figures)

REFERENCES

1. Bangham, A.D.: in *Liposomes*, ed. by Ostro, pp3, Marcel Dekker, New York, (1983).
2. Mysels, K.J.: *J. Gen. Physiol.*, **52**, 113 (1968).
3. Teitel, B.A.: *Arch. Roum. Path. Exp. Mic.*, **14**, 58 (1945-47).
4. Stokienius, W.: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 491 (1959).
5. Gregoriadis, G.: in *Liposomes in Biological Systems*, ed. by Gregoriadis and Allison, pp 25-86, John Wiley & Sons, Chichester, (1980).
6. "The Uses of Liposomes in Biology and Medicine", Proc. of The Conference of The New York Academy of Science, Sept. 14-16, (1977).
7. Szoka, F. Jr. and Papahadjopoulos, D.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 467 (1980).
8. Marcy, P. and Leserman, L.D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 313 (1983).
9. Fendler, J.H.: in *Membrane Mimetic Chemistry*, pp 136, John Wiley & Sons, New York, (1982).
10. Szoka, F. and Papahadjopoulos, D.: in *Liposomes: from Physical Structure to Therapeutic Applications*, ed. by C.G. Knight, pp 52-82, Elsevier/North-Holland, New York, (1981).
11. Vold, R.D. and Vold, M.J.: in *Colloid and Interface Chemistry*, pp 588-631, Addison-Wesley, London, (1983).
12. Parsegian, V.A., Rand, R.P. and Gingell, D.: in *Cell Fusion: Ciba Foundation Symposium 103*, pp 9-27, Pitman, London, (1984).
13. Vold, R.D. and Vold, M.J.: in *Colloid and Interface Chemistry*, pp 261-287, Addison-Wesley, London, (1983).
14. Kerker, M.: in *Scattering of Light and Other Electromagnetic Radiation*, Ch. 3, 4, 7, Academic Press, New York, (1969).
15. Farinato, R.S. and Rowell, R.L.: in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, ed. by Becher, V.I., pp 439-479, Marcel Dekker, New York, (1984).
16. Barrow, D. and Lentz, B.R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 92 (1980).
17. Barenholtz, Y., Gibbes, D., Litman, D.J., Goll, J., Thompson, T.E. and Carlson, F.D.: *Biochemistry*, **16**, 2806 (1977).
18. Walstra, P.: in *Encyclopedia of Emulsion Technology*, ed. by Becher, V.I., pp 57-127, Marcel Dekker, New York, (1984).