

Alginate Bead를 이용한 약물전달시스템

박함용 · 이병철 · 김우식*

연세대학교 공과대학 화학공학과 및 생물산업소재 연구센터
(1996년 7월 4일 접수, 1996년 12월 11일 채택)

Drug Delivery System Using Alginate Beads

Ham-Yong Park, Byung-Cheol Lee and Woo-Sik Kim*

Department of Chemical Engineering and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
(Received 4 July 1996; accepted 11 December 1996)

요 약

Sodium alginate를 이용하여 제조한 alginate bead에 음이온성 약물인 sodium salicylate와 양이온성 약물인 lidocaine·HCl을 함유(loading)시키고, 약물이 함유된 bead의 방출특성을 개선하기 위하여, 자외선과 glutaraldehyde로 각각 bead의 표면을 가교시켰으며, chitosan으로 표면을 coating시켜 약물방출실험을 행하였다. 약물방출실험결과 음이온성 약물의 경우 표면처리 방법에 대해 glutaraldehyde crosslinking, chitosan coating, U.V. crosslinking bead의 순서로, 그리고 alginate 농도에 대해서는 2%, 3%, 4%의 순서로 약물의 방출량이 증가하였으며, 양이온성 약물의 방출경향은 bead 표면처리에 대해서는 음이온성 약물과 같은 경향을 보였으나, alginate 농도변화에 대해서는 음이온성 약물의 경우와 반대로 4%, 3%, 2%의 순서로 방출량이 증가하는 결과를 보였다. 또한 양이온성 약물의 경우 최종 방출량이 전체적으로 음이온성 약물에 비해 50% 정도에 그쳤는 바, 이러한 차이는 bead와 약물간의 정전기적 상호작용 때문이었다. Glutaraldehyde crosslinking bead의 경우에는 약물의 전하와 상관없이 zero order의 좋은 방출특성을 보여 본 실험에서의 alginate bead에 대한 표면처리방법 중 가장 우수한 것으로 나타났다.

Abstract—For the controlled release of drug, beads were prepared using sodium alginate which is bioerodible natural polymer. Drugs which have different ionic charge, sodium salicylate and lidocaine·HCl, were loaded into beads via swelling loading method. The surface of beads was modified by ultra-violet crosslinking, chitosan coating and glutaraldehyde crosslinking, respectively. To examine the effects of ionic charge of drugs and surface modification on release characteristics, release experiments of sodium salicylate and lidocaine·HCl from unmodified and three modified beads were carried out. Released amount of anionic drug, sodium salicylate was increased with the increase in the amount of alginate in bead, due to ionic repulsive force between anionic charges of alginate and sodium salicylate. For the case of cationic drug, lidocaine·HCl, released amount is decreased with the increase in alginate concentration for electrostatic attractive force between alginate and lidocaine·HCl. Among the three surface modified beads, surface crosslinking with glutaraldehyde beads showed zero-order release kinetics for both anionic and cationic drugs.

Key words : Alginate, Glutaraldehyde Crosslinking, Ionic Drug

1. 서 론

최근 화학공업이 여러 분야로 발전되면서 약물전달시스템(drug delivery system; DDS)에 관한 연구가 국내외에서 많이 진행되고 있다. 약물전달시스템은 약물이나 다른 생리활성물질을 원하는 기간 동안, 원하는 농도로 일정하게 투여하는 것을 의미한다.

DDS는 1950년대에 농업 분야에 있어서 비료, 살충제, 방청제 등의 투여에 사용되었으며[1], 그후 1960년대에는 의료분야로 발전하기 시작하여[2,3], 1970년대 중반에 이르러 고분자 약물(poly peptides)에 적용되기 시작하였다[4].

최근의 DDS에 대한 화학공학적인 주요 관심사는 새로운 약물의 개발보다는 약물 수송체의 연구에 집중되어 있으며, 이를 위해 우수한 생분해성 고분자 물질의 개발, 소화기관의 특정한 부위에서만 선택적으로 투여되는 system의 개발과 가수분해 작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

약물 수송체의 개발에 있어 생분해성 천연 고분자 물질은 생분해성 합성 고분자 물질과 함께 활발한 연구대상이 되고 있다[5-7]. 이중 특히 천연 고분자 물질은 독성이 적어서 생체 적합성이 우수하고, 합성 고분자 물질에 비해 경제성이 있는 장점을 가진다.

DDS에 이용되는 천연 고분자 물질인 다당류 중 특히 alginate는

생체 적합성이 우수하고 2가의 양이온과 반응하여 gel을 형성하는 성질이 있어, chloramphenicol[8, 9], sulfadiazine[10], sulfamethoxazole[11], diazepam[12]과 같은 약물의 미립자 coating과 지속성 정제의 matrix[13]로서의 이용이 보고되었다. 또한 Simon[14] 등은 부분적으로 에스테르화된 alginate 압축정제로부터 theophylline 방출이 주변 방출액의 pH가 낮을수록 지연되는 것을 보였고, Polk[15] 등은 chitosan과 alginate가 혼합된 matrix에서의 albumin 방출이 matrix내의 alginate농도가 높아질수록, chitosan의 분자량이 높을수록 지연됨을 보고한 바 있으며, Iannuccelli[16] 등은 구형의 carboxymethyl-cellulose bead 표면을 alginate로 coating한 결과 표면 coating 두께에 따라 약물의 방출이 늦어짐을 보고하였다.

이에 본 연구에서는 효과적인 제어투약을 위한 약물전달시스템의 개발을 위해 천연고분자인 alginate를 이용하여 각기 다른 이온성을 가진 약물을 함유하는 제어투약용 제제를 제조하여 U.V. crosslinking, chitosan coating 그리고 glutaraldehyde를 이용한 surface crosslinking 등의 방법으로 표면을 처리하고, 이들 bead를 이용한 방출실험을 행하여 약물의 이온성 및 bead의 표면처리가 약물방출에 미치는 영향을 고찰하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

Bead 제조에는 sodium alginate(Katayama Chemical, Japan), calcium chloride dihydrate(Duksan Pharm. Co., Korea)와 phosphate buffered saline(Sigma, USA)을 사용하였다. Glutaraldehyde에 의한 표면가교는 glutaraldehyde solution(25 %)(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)을 사용하였으며, bead coating에는 chitosan(Sigma, USA)과 chitosan의 gel화를 위해 sodium tripolyphosphate(Katayama Chemical, Japan)을 사용하였다.

약물은 수용액 중에서 양이온성을 띠는 lidocaine · HCl(Hongsung Pharm. Co. Ltd., Korea)과 음이온성을 띠는 sodium salicylate(Katayama Chemical, Japan)를 사용하였다. 이상의 재료들은 chitosan(practical grade)을 제외하고 모두 시약급이었으며, 실험에 사용한 모든 재료는 정제없이 사용하였다.

2-2. Alginate bead 제조

Phosphate buffered saline solution(PBSS) 100 g에 각기 다른 양의 sodium alginate를 용해시켜 2, 3, 4 wt%의 sodium alginate 용액을 각각 제조하고, 제조된 용액을 각 농도별로 micro tubing pump를 이용하여 3 wt% CaCl₂ 용액속으로 적가하고 gel화시켜 구형의 bead를 제조하였다. 제조된 bead는 감압여과시키며 증류수를 가하여 세척하였다.

2-3. 약물 함유(loading)

Alginate bead를 일정농도의 sodium salicylate 또는 lidocaine · HCl 수용액속에 48시간 동안 정지시켜 충분한 팽윤이 일어나서, bead 내외의 약물농도가 평형에 이르도록 하였다. 이렇게 약물이 함유된 alginate bead를 감압여과시키며 증류수로 bead 표면에 존재하는 약물을 세척하여 burst effect를 최소화한다. 함유된 약물의 양은 함유 전 · 후의 질량을 측정하여 그 차이로부터 결정하였다[17].

2-4. Bead의 표면처리

2-4-1. 표면가교결합

약물이 함유된 alginate bead를 glutaraldehyde solution 50 mL 중에서 magnetic stirrer를 사용하여 10분간 교반하여 bead 표면을 가교시

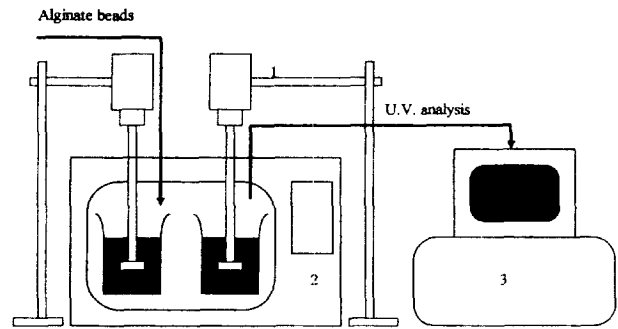


Fig. 1. Schematic diagram of drug release experiment apparatus.

1. Direct stirrer
2. Water bath
3. Spectrophotometer

켰다.

2-4-2. Chitosan 코팅

약물을 함유한 alginate bead를 1 % chitosan용액에 담근 후 다시 이를 sodium tripolyphosphate 4 % 수용액에서 gelation시켜 약물을 함유한 chitosan coating alginate bead를 제조하였다.

2-4-3. 자외선에 의한 가교결합

약물을 함유하는 alginate bead에 30분간 자외선을 조사하여 약물을 함유한 U.V. crosslinked alginate bead를 제조하였다. 이렇게 각각 세 가지 방법으로 표면 처리한 alginate bead들을 진공건조 오븐에서 50 °C로 36시간 동안 진공건조시켰다.

2-5. 방출실험

500 mL tall beaker내에 300 mL의 증류수와 약물이 함유된 alginate bead를 투입한 후, mechanical stirrer를 이용하여 400 rpm의 일정한 속도로 교반하여 방출된 약물의 농도 경계층을 제거하였으며, 방출 실험장치는 항온조내에 설치하여 실험 중 체온과 같은 온도인 37.5 ± 0.5 °C를 유지하도록 하였다. Sample 채취는 microsyringe를 이용하여 0.3 mL씩 하였으며, 방출액의 sink condition을 유지하기 위하여 sample 채취 후 즉시 같은 온도의 증류수를 동량 보충하였다.

Fig. 1에 약물방출실험 장치를 나타내었다.

2-6. 약물농도 분석

방출된 약물의 농도는 U.V. spectrophotometry(Shimadzu U.V. 160A, Japan)를 사용하여 분석하였으며, sodium salicylate는 296 nm, lidocaine · HCl은 263 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의해 농도를 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Alginate bead로부터 음이온성 약물(Sodium salicylate)의 방출거동

제조된 alginate bead는 모두 완전한 구형으로 직경 4 mm 내외였으며, 사용한 alginate의 농도가 증가할수록 약간씩 커지는 경향을 보였지만 micro tubing pump의 속도 조절을 통해 일정한 크기의 bead를 성형할 수 있었다.

Fig. 2는 각각 2, 3, 4 % alginate bead로부터 시간에 따른 sodium salicylate의 누적 방출량을 나타낸 것이다.

표면처리에 따른 총 방출량의 변화는 alginate bead, U.V. crosslinking bead, chitosan coating bead, glutaraldehyde crosslinking bead의 순으로 감소하는 경향을 나타내었고, 방출시작 6시간 후에 2 % alginate의 경우는 함유된 약물의 72.6 %, 59.7 %, 51.8 %, 20.5 %가 방

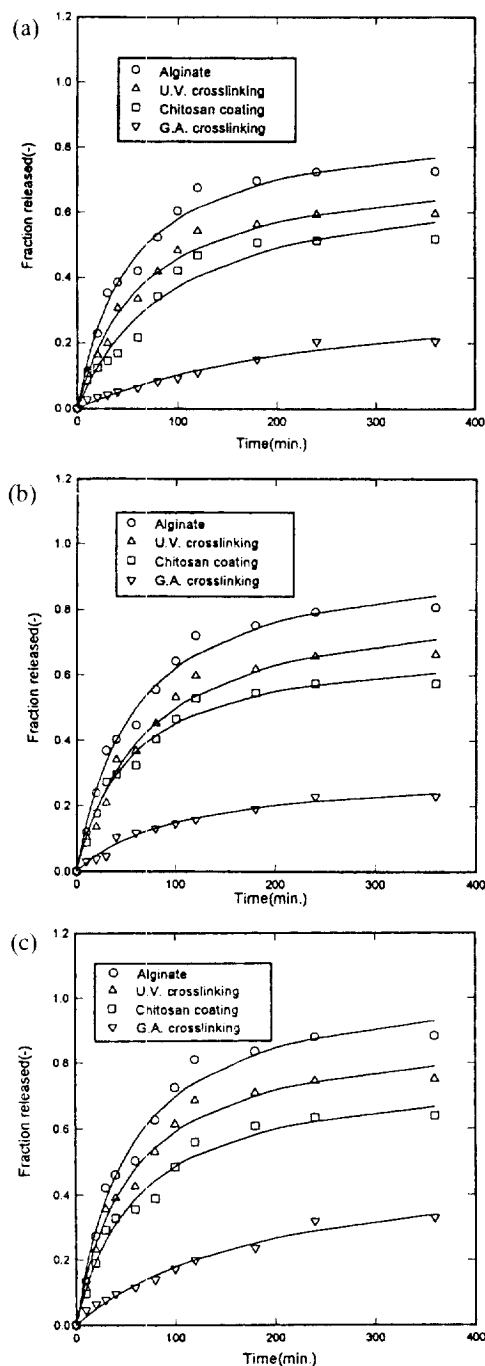


Fig. 2. Fraction released of sodium salicylate from alginate beads.

(a) 2% alginate beads, (b) 3% alginate beads, (c) 4% alginate beads.

출되었으며, 3% alginate의 경우는 함유된 약물의 80.7%, 66.3%, 57.6%, 23.0%가, 4% alginate의 경우는 함유된 약물의 88.2%, 75.0%, 63.9%, 33.0%가 방출되어, bead내의 alginate양이 증가할수록 방출량이 많아지는 경향을 보였다. 이는 alginate가 두 가지 산의 혼합체이므로 방출액 중에서 음이온성을 띄고 있어 alginate가 많아질수록 같은 음이온성의 약물에 대한 정전기적 반발력으로 인해 약물의 방출을 촉진시키기 때문인 것으로 사료된다.

한편, glutaraldehyde crosslinking bead를 제외한 나머지 bead들은 초기 100분 안에 대부분의 방출이 이루어지며, glutaraldehyde crosslinking bead만이 전시간대에 대해서 일정한 방출량을 보였다. 이로

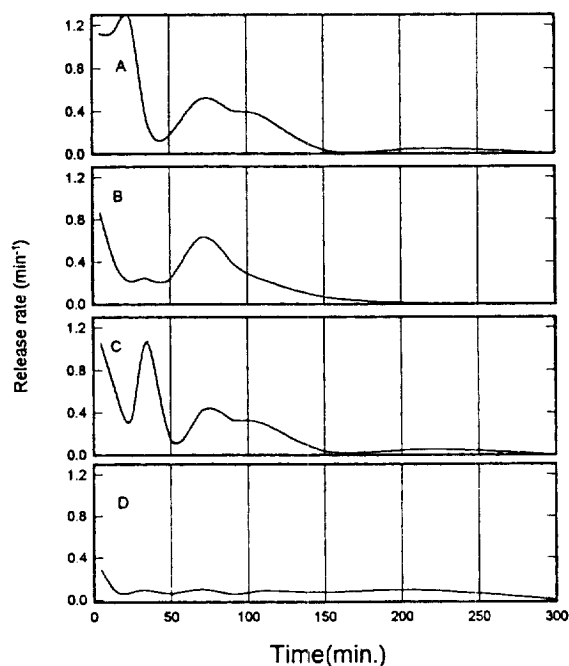


Fig. 3. Release rate of sodium salicylate from 2% alginate beads as a function of time.

(A: alginate bead, B: U.V. crosslinking bead, C: chitosan coating bead, D: G.A. crosslinking bead)

부터 alginate bead에 대한 U.V. crosslinking, chitosan coating 등의 표면처리는 약물의 방출에 대한 지연효과는 있지만, 전시간대에 걸쳐 일정하게 방출속도를 제어하지는 못하는 것을 알 수 있으며, glutaraldehyde crosslinking bead의 경우에는 zero order에 가까운 경향을 보여 방출제어능력이 가장 뛰어난 것을 알 수 있었다.

각 시간대별로 방출속도의 변화를 알아보기 위하여 시간에 대한 약물의 방출속도의 변화를 Fig. 3-5에 bead의 alginate %별로 나타내었다. 이때 시간대별 약물의 방출속도는 각 sample 채취시간마다의 구간 방출량을 sample 채취 시간간격으로 나누어 구하였다. 그 결과 alginate bead와 세 가지 표면처리된 bead 모두 초기 방출속도가 큰 것으로 나타났으며, 이로부터 약물의 burst effect가 나타나는 것을 알 수 있었다. 전체적인 방출거동은 네 가지 bead 모두 초기 약 60분까지는 방출속도가 일정치 않다가 점차 일정한 속도로 안정화되어 가는 경향을 나타내고 있지만, glutaraldehyde crosslinking bead의 경우는 방출속도의 변화폭이 매우 작아 방출시간 내내 거의 일정한 속도로 방출이 이루어져 zero order에 가까운 방출특성을 보이고 있다.

특히 alginate bead의 경우 초기의 빠른 방출속도가 크게 낮아졌다가 다시 어느정도 높아진 후 서서히 감소하는 경향을 보이고 있는 바, 이는 방출초기 bead의 표면과 표면근처에 존재하는 약물이 일기에 방출된 후, bead내부 및 중심부에 분포된 약물이 bead표면까지 확산되어 이후, 남아있는 약물의 양에 비례해서 방출속도가 서서히 떨어지기 때문인 것으로 사료되며 이는 Ko[18] 등의 실험에서 alginate bead에서 cell growth factor가 초기의 매우 빠른 방출에 이어 일정한 방출이 이어지다가 서서히 느려지는 방출경향을 보인 것과 일치하는 결과를 보여준다.

이러한 현상은 U.V. crosslinking bead에서 어느정도 줄어들었지만, 방출속도가 역시 크게 진동하고 있어, U.V. crosslinking에 의한 방출속도의 지연효과는 그리 크지는 않은 것을 알 수 있다.

한편 chitosan coating bead의 경우에는 다른 bead와는 달리 초기 50분까지 방출속도가 매우 심하게 진동하는데 이는 방출이 40여분

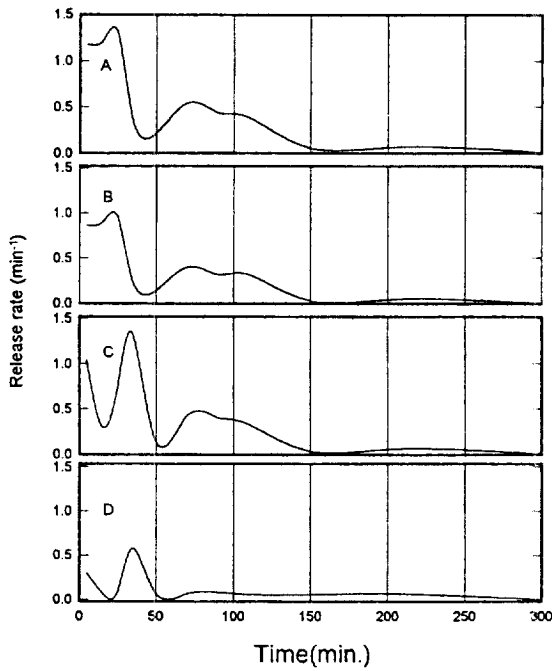


Fig. 4. Release rate of sodium salicylate from 3% alginate beads as a function of time.

(A: alginate bead, B: U.V. crosslinking bead, C: chitosan coating bead, D: G.A. crosslinking bead)

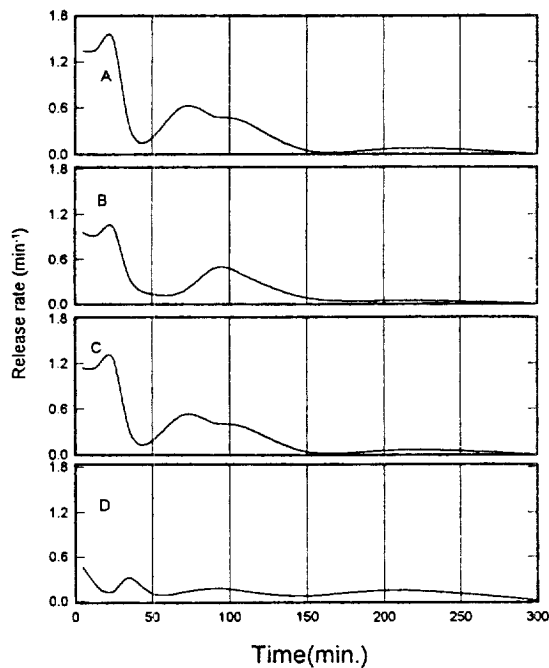


Fig. 5. Release rate of sodium salicylate from 4% alginate beads as a function of time.

(A: alginate bead, B: U.V. crosslinking bead, C: chitosan coating bead, D: G.A. crosslinking bead)

경과한 후에 표면의 chitosan coating이 파괴되면서 많은 양의 약물이 급격하게 방출되는 제2의 burst effect를 보이는 이유로 사료된다. 실제 방출이 모두 끝난 방출액을 살펴보면 chitosan이 alginate와는 분리되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이는 chitosan이 직접 alginate와 결합되어 있는 것이 아니라 다른 층의 막을 형성하였음을

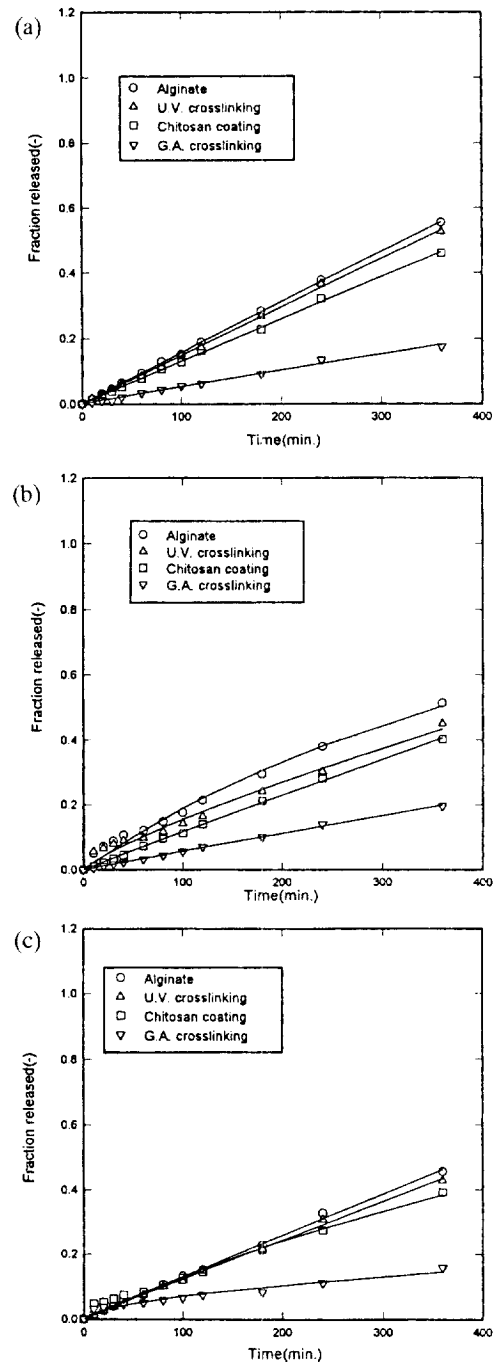


Fig. 6. Fraction released of lidocaine · HCl from alginate beads.

(a) 2% alginate beads, (b) 3% alginate beads, (c) 4% alginate beads.

나타내어 주며, chitosan coating의 파괴는 주로 임펠러에 의한 것으로 생각된다.

그러나 glutaraldehyde crosslinking bead의 경우는 초기의 급격한 약물방출인 burst effect도 그다지 크지 않으며, 방출초기부터 실험종료시까지 거의 일정한 방출속도를 나타내고 있어 가장 바람직한 표면처리 방법임을 알 수 있다.

Alginate bead로부터 음이온성 약물의 방출은 alginate의 농도가 증가할수록 많은 방출량 및 높은 방출속도를 보이고 있으며, alginate의 농도와 관계없이 전체적으로 glutaraldehyde crosslinking bead만이 zero order에 가까운 방출특성을 나타내는 것을 알 수 있다.

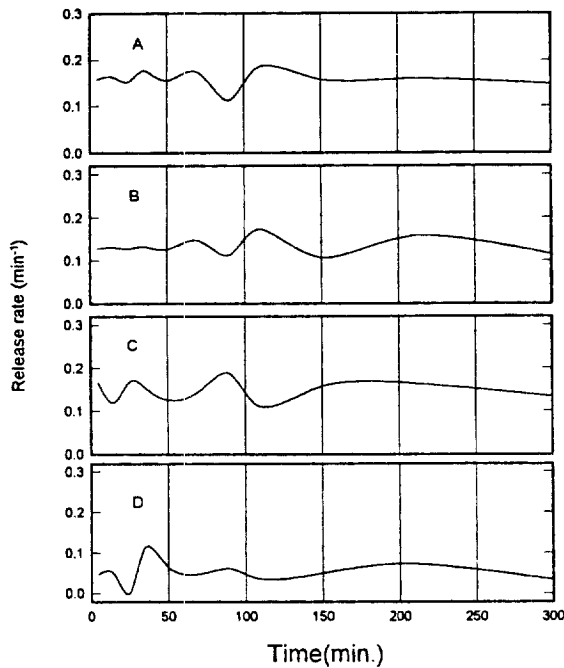


Fig. 7. Release rate of lidocaine · HCl from 2% alginate beads as a function of time.

(A: alginate bead, B: U.V. crosslinking bead, C: chitosan coating bead, D: G.A. crosslinking bead)

3-2. Alginate bead로부터 양이온성 약물(Lidocaine · HCl)의 방출 거동

Fig. 6에 2, 3, 4 % alginate bead로부터 양이온성 약물인 lidocaine · HCl의 방출거동을 각각 나타내었다. Bead의 표면처리에 의한 영향은 음이온성 약물과 마찬가지로 총 방출량이 alginate, U.V. crosslinking, chitosan coating, glutaraldehyde crosslinking bead의 순으로 감소하였다. 6시간의 방출이 진행된 후의 최종 방출분율은 alginate 2%의 경우가 각각 55.4%, 52.6%, 45.9%, 17.5%를 나타내었고, alginate 3%의 경우는 각각 51.2%, 45.0%, 40.1%, 19.5%를, alginate 4%의 경우는 각각 45.7%, 42.9%, 39.1%, 15.8%를 나타내어 표면처리에 관계없이 bead내의 alginate 양이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 alginate의 - 전하와 약물의 + 전하가 서로 인력으로 작용하기 때문으로 사료된다.

한편 네 가지 bead 모두가 직선형태로서 zero order에 가까운 방출 특성을 보이고 있는 바, Fig. 7-9에 나타난 시간에 따른 방출속도 변화 그래프를 보면 확실히 알 수 있다. 각각의 경우 모두 6시간 동안의 약물방출속도는 약간의 진동을 보이기는 하나 전시간을 걸쳐 거의 일정한 값을 나타내고 있는 것을 알 수 있으며, 특히 alginate 3%의 glutaraldehyde crosslinking bead는 전 실험 시간대에 걸쳐 거의 변화없는 방출속도를 보이고 있어 방출속도가 시간의 함수가 아님을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 약물과 bead의 이온성 및 bead의 표면처리에 의한 약물방출특성은 음이온성 약물의 경우에는 alginate의 농도가 높을수록 최종 방출분율이 증가하고 양이온성 약물의 경우에는 alginate 농도가 낮을수록 최종 방출분율이 증가함을 알 수 있으며, 전체적으로 음이온성 약물의 방출량보다 양이온성 약물의 방출량이 적었는 바, 이는 alginate gel이 음전하를 띠는 carboxyl group을 가지고 있어서 양이온성 약물과는 정전기적 인력에 의해 방출이 지연되며 음이온성 약물의 경우에는 같은 전하의 척력이 작용하여 방출이 촉진되기 때문인 것으로 사료된다.

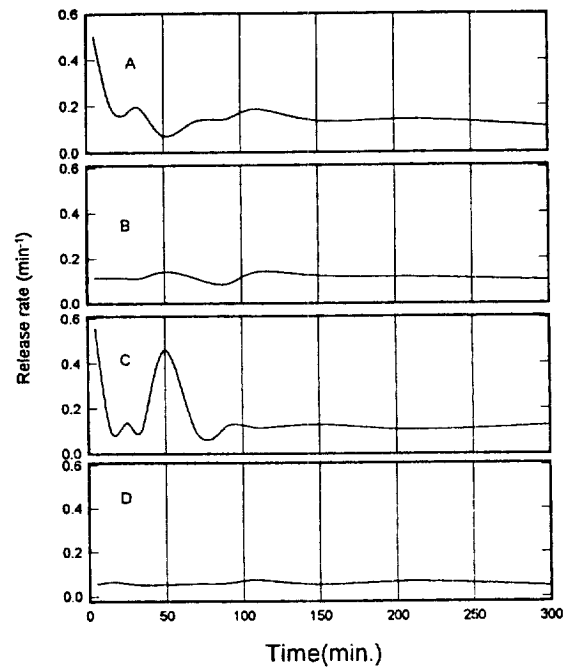


Fig. 8. Release rate of lidocaine · HCl from 3% alginate beads as a function of time.

(A: alginate bead, B: U.V. crosslinking bead, C: chitosan coating bead, D: G.A. crosslinking bead)

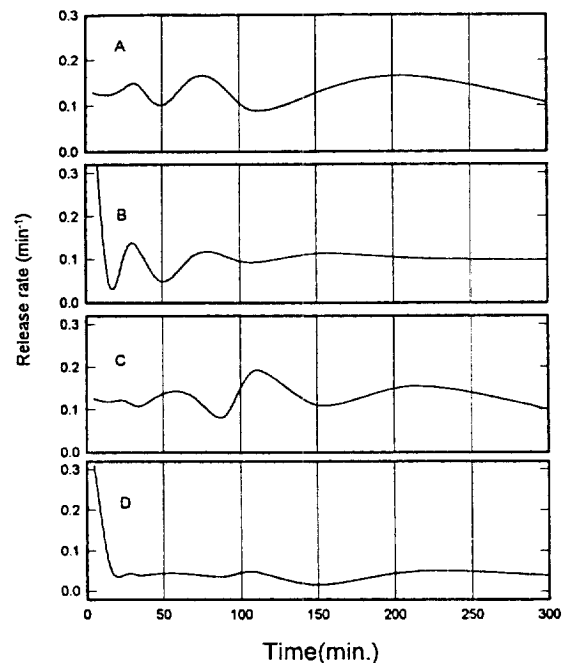


Fig. 9. Release rate of lidocaine · HCl from 4% alginate beads as a function of time.

(A: alginate bead, B: U.V. crosslinking bead, C: chitosan coating bead, D: G.A. crosslinking bead)

또한 실험결과로부터 coating이나 가교결합에 의한 약물방출의 제어는 U.V. crosslinking의 경우에는 가교전후의 차이가 미소하게 나타나며 chitosan coating의 경우는 전자보다는 약물의 방출이 지연되거나 coating membrane의 약한 기계적 강도로 인해 장기간의 약물방출제어 능력은 가지고 있지 못함을 보인다. 그러나 chitosan 등은 대

장에 존재하는 bacteria의 먹이가 되므로 특정부위에 대한 약물전달 시스템으로의 응용이 가능하다고 사료된다. Glutaraldehyde에 의한 가교결합은 확실한 방출제어능력을 가지고 있으며 양이온성, 음이온성 약물 모두 zero order의 방출 특성을 보인다. Coating이나 가교 결합에 의해 first order 방출특성이 zero order의 방출특성으로 변화하게 되며, 적절한 표면처리를 통해 효과적인 제어투약기구의 설계·제조가 가능함을 알 수 있다.

4. 결 론

본 실험에서는 천연의 생분해성 고분자인 sodium alginate를 이용하여 bead를 제조하고, 제조된 bead에 음이온성 약물, sodium salicylate와 양이온성 약물, lidocaine·HCl을 loading하여 자외선과 glutaraldehyde로 표면가교 및 chitosan coating한 bead로부터의 약물방출특성을 고찰하였다. 본 실험결과는 기존의 alginate를 사용한 약물방출에 대한 연구가 alginate를 표면 coating 처리제로 사용하거나 [16], 다른 물질과의 혼합 matrix에서 혼합비율에 따른 방출 기동의 차이를 고찰한 경우[15, 19], 또는 방출액의 pH나 조성에 따른 영향 고찰[14, 15]에 중점을 둔 것에 비해 alginate bead 자체의 방출특성 개선을 위해 표면처리의 영향을 방법별로 비교, 고찰한 것으로 다음과 같이 요약할 수 있다.

Alginate bead를 통한 음이온성 약물의 방출은 glutaraldehyde crosslinking, chitosan coating, U.V. crosslinking bead의 순서로, 그리고 alginate 농도에 대해서는 2, 3, 4%의 순서로 증가함을 보였으며, 양이온성 약물의 방출경향은 bead 표면처리의 경우, 음이온성 약물과 같은 방출특성을 보였으나, alginate 농도변화에 대해서는 음이온성 약물의 경우와 반대로 4, 3, 2%의 순서로 방출량이 증가하였고, 전체적으로 음이온성 약물 방출의 50% 정도만이 방출되었다. Glutaraldehyde crosslinking bead의 경우에는 약물의 전하에는 상관없이 zero order에 가까운 좋은 방출특성을 보여 본 실험에 사용된 표면처리 방법 중 가장 우수한 것으로 나타났으며, chitosan coating bead는 생분해의 특성으로 가장 좋은 생체적합성을 가지며 생체내 bacteria의 작용으로 특정부위에 대한 약물전달시스템으로의 응용이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Lunt, O. R.: *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 797(1971).

2. Folkman, J. and Long, D. M.: *J. Surg. Res.*, **4**, 139(1964).
3. Desai, S. J., Simonelil, A. P. and Higuchi, W. I.: *J. Pharm. Sci.*, **54**(1965).
4. Langer, R. and Folkman, J.: *Nature*, **263**, 797(1976).
5. Rosen, H. B., Kohn, J., Leong, K. and Langer, R.: "Controlled Release Systems: Fabrication Technology", Hsieh, D. ed., CRC press Boca Raton, **2**(1988).
6. Illum, L. and Davis, S. S.: "Polymers in Controlled Drug Delivery", Wright, Bristol(1987).
7. Langer, R. and Peppas, N.: *J. Macromol. Sci.*, **23**, 61(1983).
8. Haug, A. and Smidsrod, O.: *Acta. Chem. Scand.*, **19**, 341(1967).
9. Salib, N. N., El-Menshawy, M. A. and Ismail, A. A.: *Pharm. Ind.*, **40**, 1230(1978).
10. Rak, J., Chalaabala, M., Heinrich, J. and Antoninova, K.: *Farm. Obz.*, **53**, 309(1984).
11. Badwan, A. A., Abumaloo, A., Sallam, E., Abuhafaf, A. and Jawan, A.: *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **11**, 239(1985).
12. Chowdary, P. K. and Suresh, K. V.: *J. Pharm. Sci.*, **50**, 173(1988).
13. Xi, N., Tu, Z., Pei, Y., Lui, D. and Ma, L.: *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **16**, 277(1981).
14. Simon, L. D., Ruizcardona, L., Topp, E. M. and Stella, V. J.: *Drug Dev. & Ind. Pharm.*, **20**(15), 2341(1994).
15. Polk, A., Amsden, B., Deyao, K., Peng, T. and Goosen, M. F. A.: *J. Pharm. Sci.*, **83**, 178(1994).
16. Iannuccelli, V., Coppi, G., Vandelli, M. A., Leo, E. and Bernabei, M. T.: *Drug Dev. & Ind. Pharm.*, **21**(20), 2307(1995).
17. Kim, J. H., Shim, J. K., Lee, Y. M. and Son, T. I.: *Membrane Journal*, **3**(2), 70(1993).
18. Ko, C., Dixit, V., Shaw, W. and Gitnick, G.: *Artificial Cells Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology*, **23**(2), 143(1995).
19. Miyazaki, S., Nakayama, A., Oda, M., Tanaka, M. and Attwood, D.: *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **17**(5), 745(1994).