

단백질 약물 전달을 위한 Inverse-mini-emulsion Polymerization 방법으로 제조하는 나노크기의 수화젤(나노젤)의 제조 및 특성평가

강수용 · 오돈치메 문크자갈 · 김성철 · 박아름 · 심영기 · 이우경[†]

인제대학교 공과대학 나노공학부

(2010년 1월 6일 접수 · 2010년 2월 1일 수정 · 2010년 4월 2일 승인)

Preparation and Characterization of Nano-sized Hydrogels (nanogels) Using Inverse-mini-emulsion Polymerization Method for Protein Drug Delivery

Soo-yong Kang, Odonchimeg Munkhjargal, Seong-cheol Kim, Ah-reum Park, Young-Key Shim and Woo-kyoung Lee[†]

School of nano engineering, Inje university, Gimhae, Korea

(Received January 6, 2010 · Revised February 1, 2010 · Accepted April 2, 2010)

ABSTRACT – Hydrogels are thought to be a promising delivery carrier for protein drugs because of their favorable aqueous environment compared with nano/micro-particles of hydrophobic polymer such as PLGA. In this study, nano-sized hydrogels (nanogels) were fabricated using inverse-mini-emulsion polymerization method. The mean size of nanogels in range of 90-160nm and affected by the preparation parameters such as sonication time and concentration of monomer. While longer sonication time and lower concentration of acrylamide monomer showed a tendency to produce smaller nanogels and to have lower lysozyme activity, variation of bis-methylene acrylamide concentration made no difference. Although both longer sonication time and lower acrylamide concentration increased in vitro release rate, acrylamide concentration was more effectively affected to the control of protein release rate, which indicated that the release rate of protein from nanogels affected by not only their size but also internal structure. In conclusion, nanogels prepared by inverse-mini-emulsion can be a useful carrier for application of protein drug, because of simple process, minimum contact of organic solvent and high protein activity.

Key words – Hydrogel, Nanogels, Protein drug delivery, Inverse mini-emulsion polymerization, Lysozyme

최근 유전자 치료, 면역치료등과 관련하여 단백질약물의 중요성이 증가하고 있으며 그 시장은 2006년 기준으로 437억 달러에 규모에 이르고 있고, 앞으로 계속 증가할 것으로 추측된다.¹⁾ 하지만 단백질 약물의 경우 가격이 다른 약물에 비해 비싸고, 주위 환경에 의해 쉽게 변성이 일어나며 생체 내에 존재할 수 있는 수명이 짧기 때문에 반복투여가 필수적이다. 또한, 호르몬 약물처럼 미세한 양에 의해서 생체의 생리활성이 조절되는 경우에는 특히 생체 내에 존재하는 단백질 약물의 농도를 보다 미세하게 조절하는 것이 필수적이다.²⁾ 예를 들어 thyroid 호르몬의 경우 건강한 성인남자에게서 인체 내에서 하루에 100 µg~125 µg을 필요로 하는데, 그 양이 과다하면 Basedow's disease를 일으키고, 결핍이 되면 cretinism이 발생하게 된다.³⁾ 이와 같은 이유로 인해 단백질 약물을 지속적이면서 일정한 농도를 유지할 수 있도록 하는 효과적인 전달체의 개발이 요구되어 왔고 그에 대한 필요성

은 점점 부각 되고 있다.⁴⁾

단백질 약물을 전달하는 방법의 하나로 PLGA와 같은 소수성 및 생분해성 고분자로 이루어진 마이크로 또는 나노입자를 이용하는 방법이 연구되고 있다.⁵⁾ 하지만 이와 같은 고분자 마이크로 및 나노입자를 이용해 단백질 약물을 전달하는 경우에는, 고려해야 할 몇 가지 문제점이 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 입자를 제조하기 위해서는 고분자를 녹이기 위한 유기용매의 사용이 필수적인데, 이 과정에서 단백질이 유기용매에 접촉하게 되면 변성이 일어날 수 있게 된다. 또한 유기용매가 제거되고 입자가 제조되면 단백질은 소수성인 고분자와 접촉할 기회가 생기게 되고 이 또한 단백질 변성의 한 요인이 될 수 있다. 뿐만 아니라 PLGA의 ester결합이 가수분해되면서 carboxylic acid가 생성되고 이로 인해 가수분해는 더욱 촉진되면서 극부적으로 낮은 pH를 형성하게 되는데, 이와 같은 산성환경 역시 단백질 변성을 유도할 수 있다. 따라서, PLGA 마이크로 또는 나노입자를 이용한 단백질 전달의 경우 PLGA의 높은 생체적합성이 가지는 큰 장점에도 불구하고 이러한 문제점을 극복하기 위해 다양한 시

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 055)320-3875, E-mail : wlee@inje.ac.kr
DOI : 10.4333/KPS.2010.40.2.073

도들이 연구되고 있다.⁷⁾ 이에 반해 친수성 고분자의 가교결합에 의해 제조되는 수화젤의 경우에는 그 내부가 대부분 물로 이루어져 있어 친수성인 단백질 약물을 포함하기 쉽고, 단백질이 생체 내에서 존재하는 조건과 유사한 조건을 조성할 수 있기 때문에 단백질 약물의 안정성을 높일 수 있는 장점이 존재한다. 또한 100 nm급 이하의 입자로 생성하면 세망내피계와 대식세포의 회피를 기대할 수 있어, 생체 이용률을 높일 수 있기 때문에, 단백질 약물 전달 시스템에 있어서 하나의 좋은 수단으로 여겨지고 있다.⁸⁻¹⁰⁾

수화젤 입자의 제조는 유기용매치환방법과 inverse-mini-emulsion polymerization 방법이 크게 이용되고 있다.¹¹⁾ 그 중 inverse-mini-emulsion polymerization 방법의 경우 입자의 크기가 고르며 그 크기조절도 생성 조건에 따라 설계가 가능하며, 유기용매의 선택이 비교적 용이하기 때문에 100 nm급의 친수성 입자제조에는 inverse miniemulsion polymerization 방법이 사용되고 있다. 또한 단백질 약물은 수용액 층에 포함되어 있어 유기용매와 접촉되는 경계면을 제외하면 유기용매에 의한 변성을 피할 수 있다. 하지만 일반적인 inverse-mini-emulsion polymerization 방법의 경우, 공정과정에서 사용되는 유기용매를 제거하기 위해 증발시키는 과정을 동반하게 되는데 그 시간이 오래 걸리고 시간을 단축하기 위해서는 높은 온도를 사용해야 하기 때문에 단백질 약물의 안정성을 떨어뜨릴 수 있다.

따라서 본 연구는 단백질 약물을 함유하는 나노크기의 수화젤(나노젤)을 제조하는데 있어서 inverse miniemulsion 방법을 사용하되 짧은 시간 내에 제조하고 유기용매를 증발시킬 필요 없이 젤을 회수할 수 있도록 하는 방법을 사용함으로써, 기존의 공정시간보다 줄이면서 포함된 단백질 약물의 안정도를 높일 수 있는 지 여부를 조사하고자 한다. 또한 제조된 수화젤의 제조 조건에 따라 그 물리화학적 특성과 약물 방출 양상을 비교함으로써 제조된 나노젤이 단백질 약물의

전달체로 활용할 수 있는 지 그 가능성을 연구하고자 한다.

실험 방법

시약

나노젤을 제조하기 위해 N-heptane, span80, acrylamide, bis-methylene acrylamide, ammonium persulfate (AP), N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine (TEMED)과, 모델약물로서 라이소자임 (lysozyme)을 사용하였으며, 라이소자임 활성도 평가를 위해서 *Micrococcus lysodeikticus* 박테리아를 사용하였다. 이들 모두 Sigma-Aldrich Korea Inc. (Seoul)에서 구입하였으며 다른 화학적 처리 없이 사용하였다. 라이소자임을 제외한 모든 재료는 실험 30분전에 4°C에서 보관하여 사용하였다.

나노젤의 제조

Inverse-mini-emulsion polymerization 방법을 이용한 나노젤의 제조과정은 Figure 1에서 나타내었다. Acrylamide와 bis-methylene acrylamide의 농도 및 초음파처리의 시간에 따라 다양한 나노젤을 제조하였으며 각 제조조건은 아래 Table I과 같다. 주어진 농도의 acrylamide, bis-methylene acrylamide 및 라이소자임을 녹인 수용액 10 mL (수용액층)를 50 mL의 튜브에 넣은 후, 0.5%(v/v) span80을 포함하는 유기용매층(N-heptane) 30 mL를 첨가하였다. 1%(w/v)의 AP 수용액 40 µL과 TEMED 20 µL를 첨가한 후 sonicator (HD2070, Sonoplus)를 이용하여 정해진 시간에 따라 초음파처리(출력 90%) 하였다. 초음파가 처리되는 동안 고분자 중합반응이 완료되어 나노젤이 형성되며, 초음파처리가 끝난 후 일정시간 안정화 시키면 다시 층 분리가 일어나게 되고 나노젤은 하부층인 수용액층에 모이게 된다. 라이소자임의

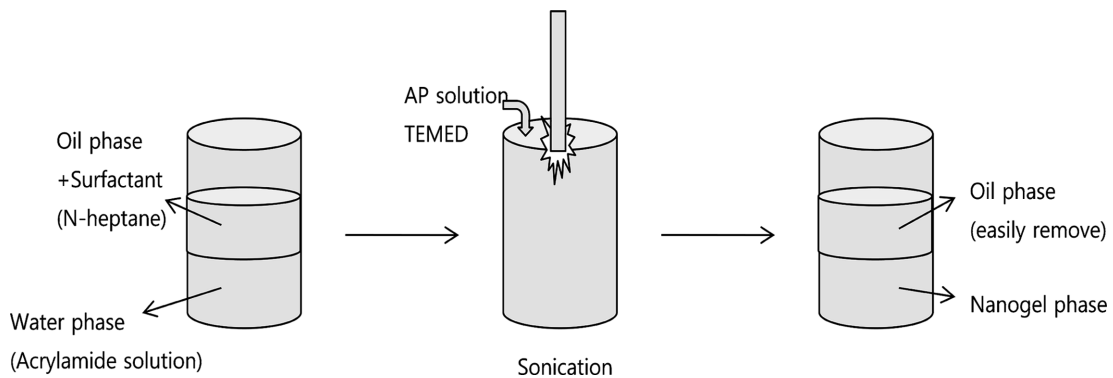


Figure 1—Inverse miniemulsion polymerization method for preparation of nano-sized hydrogel (nanogel).

Table I—Preparation conditions for nanogels

Sample	Acrylamide monomer	Bis-Acrylamide monomer	Sonication time
A30-B3-S10	30 %	3 %	10 sec
A30-B3-S20	30 %	3 %	20 sec
A30-B3-S30	30 %	3 %	30 sec
A30-B3-S60	30 %	3 %	60 sec
A30-B1-S30	30%	1%	30 sec
A30-B5-S30	30%	5%	30 sec
A30-B10-S30	30%	10%	30 sec
A5-B3-S30	5%	3%	30 sec
A10-B3-S30	10%	3%	30 sec
A50-B3-S10	50%	3%	30 sec

활성을 유지하기 위해 상기의 실험과정은 저온(4°C)을 유지한 상태에서 진행하였으며, 특정하게 언급되지 않은 경우, 하부층에서 취한 나노젤을 즉시 사용하였다.

나노젤의 크기 측정

제조된 나노젤 입자의 크기 분석은 particle size analyzer (BI-90 Plus, Brookhaven, USA)를 이용하여 분석하였다. 10 mL의 큐벳에 나노젤을 10%로 증류수를 이용하여 희석하였으며, 나노젤의 크기를 측정하기 직전에 10초동안 초음파(30 Hz)처리를 거쳐 입자의 크기를 측정하였다. 입자의 사이드는 1분간 10초 간격으로 6번 측정하였다.

In-vitro 약물 방출 실험

라이소자임이 포함되어 있는 나노젤 입자 10 mL를 50 mL phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.4)에 넣어 37°C의 인큐베이터에서 intelli-mixer (MyLab, SLRM-2M)를 이용하여 흔들며 보관하였다. 정해진 시간마다 1 mL를 뽑아낸 후 10000 rpm로 1분간 원심분리(Biospin, Hanil)하여 상층부를 추출하였고 UV/VIS spectrometer (S-3100, Scinco)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상층부에 포함된 라이소자임의 농도는 아래의 Warburg-Christian방법¹²⁾을 이용하여 결정하였다.

$$\text{Warburg-Christian Assay} = (1552 \times A_{280}) - (757.3 \times A_{260})$$

라이소자임 활성도 평가

Phosphate buffer solution (0.1 M, pH 6.2)을 이용하여 제조된 0.01 % (w/w)의 *Micrococcus lysodeikticus* 박테리아

수용액 5 mL에 나노젤 입자 100 μL를 첨가하였다. 4°C를 유지한 상태에서 UV/VIS Spectrometer (S-3100, Sinco)를 이용하여 2분 동안 10초 간격으로 450 nm에서 감소하는 흡광도(A)의 변화(ΔA/min)를 측정하였으며,¹³⁾ 첨가된 라이소자임의 질량에 대한 흡광도의 변화율(ΔA/min/mg)을 라이소자임 활성도(lysozyme activity)로 정하였다. 상대적인 라이소자임 활성도(relative lysozyme activity, %)는 순수한 라이소자임의 활성도(대조군)에 대한 나노젤에 포함된 라이소자임의 활성도(실험군)를 비교하여 계산하였으며 그 식은 아래와 같다.

$$\text{Relative lysozyme activity (\%)} = \frac{\text{나노젤에 포함된 라이소자임 활성도(실험군)}}{\text{순수한 라이소자임 활성도(대조군)}} \times 100$$

결과 및 고찰

나노젤의 입자크기 및 초기의 라이소자임 활성도 평가

나노젤의 생성 조건에 따른 입자의 크기와 제조된 직후에 측정된 초기의 라이소자임 활성도를 측정하였고 그 결과는 Table II에 나타내었다. 입자크기의 경우 약 90-160 nm의 크기를 가졌다.

라이소자임 활성도의 경우에는 모든 경우에 90% 이상의 활성도를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 제조과정에 유기용매를 사용하였음에도 90% 이상의 높은 활성도를 가졌다는 것은 본 연구에서 제시된 제조과정을 이용하게 되면 유기용매의 영향을 최소화할 수 있다는 것을 보여준다. 다시 말해, 초음파처리를 통해 에멀전이 생성되는 짧은 시간(10초-60초)동안만 에멀전의 표면에서 유기용매를 접촉할 기회가 있으며, 또한 빠른 시간 안에 수용액층으로 다시 모이게 됨으로써 단백질의 활성도를 최대한 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

Table II— Mean size and lysozyme activity of nanogel

Sample	Size (nm)	lysozyme Activity (%)
A30-B3-S10	162 ± 21	99 ± 2
A30-B3-S20	138 ± 41	97 ± 2
A30-B3-S30	97 ± 37	95 ± 3
A30-B3-S60	94 ± 27	91 ± 4
A30-B1-S30	96 ± 26	94 ± 3
A30-B5-S30	99 ± 33	93 ± 4
A30-B10-S30	101 ± 28	91 ± 5
A5-B3-S30	81 ± 37	97 ± 2
A10-B3-S30	92 ± 24	96 ± 2
A50-B3-S10	127 ± 23	90 ± 5

나노젤의 제조조건에 따른 입자의 크기 및 초기의 라이소자임 활성 평가

먼저 초음파 처리시간(10초-60초)에 따른 나노젤의 평균 입자크기를 관찰하였을 때, 초음파 처리시간이 길어질수록 평균입자의 크기는 작아지는 것을 관찰할 수 있었다. (Figure 2 (A)) 비록 오차의 범위를 고려하였을 때 유의미한 차이를 보이지 않는 경우도 있었으나 초음파 처리시간과 평균 입자 크기의 상관 관계 및 그 경향성은 충분히 관찰할 수 있었다. 특히 초음파 처리를 10초간 한 것과 60초간 한 것을 비교

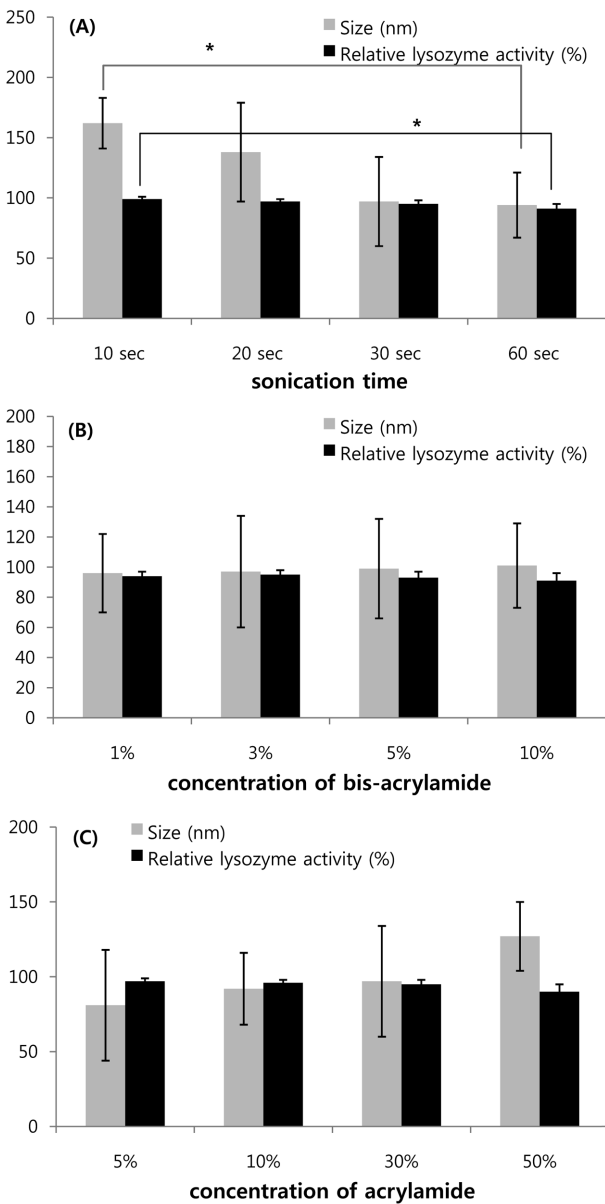


Figure 2—Mean size and relative lysozyme activity of nanogel depending on (A) duration of sonication (B) concentration of Bis-methylene acrylamide and (C) concentration of acrylamide.

하였을 때는 유의미한 차이를 나타내었다. ($p < 0.05$) 이는 초음파 처리시간이 길어질수록 생성되는 에멀전의 크기가 작아지고 이에 따라 최종 생성되는 나노젤의 크기 또한 작아지게 되는 것이라 판단된다. 반면에 초음파처리 시간이 길어질수록 초기 라이소자임의 활성도를 떨어지는 것으로 관찰되었다. 이는 초음파가 직접적으로 라이소자임의 활성에 직접 영향을 미쳤거나 초음파를 가했을 때 발생하는 열에 의해 라이소자임이 손상되었을 수도 있었다고 생각된다.

다음으로, Figure 2 (B)에서 볼 수 있듯이 나노젤의 가교 결합에 관여하는 bis-methylene acrylamide 농도(1, 3, 5, 10%)에 따른 변화를 관찰하였을 때 bis-methylene acrylamide의 농도 즉, 가교결합의 정도는 제조된 나노젤의 크기와 초기 라이소자임 활성에 있어서 큰 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다.

마지막으로, 단량체로 사용된 acrylamide 농도(5, 10, 30, 50%)를 변화시키면서 그 특성을 관찰하였다. Figure 2 (C)에서와 같이, acrylamide의 농도가 높아질수록 대체로 나노젤 입자의 크기는 더 커지고 라이소자임의 활성도는 더 작아지는 경향을 관찰할 수 있었으나 오차의 범위를 고려하였을 때 유의미한 변화는 아니었다. 다만 acrylamide의 농도가 높으면 그 점성이 높아져, 초음파를 처리하였을 때 보다 큰 에멀전이 생성되고 이는 보다 큰 나노젤의 생성으로 연결될 수 있는 가능성이 있다.¹⁴⁾ 그리고 acrylamide의 농도가 높아질수록 젤 가교결합에서 일어나는 발열반응 때문에 라이소자임의 활성도는 떨어진다고 판단된다.

In-vitro 약물방출 평가

제조된 나노젤의 라이소자임 방출특성을 평가하였으며 그 결과는 Figure 3과 같다. Figure 3 (A)에서 보는 바와 같이 초음파의 처리시간(10초-60초)이 길어질수록 라이소자임의 방출속도가 증가하고 있음을 관찰할 수 있었다. 입자크기에 서와 같이, 오차 범위를 감안하면 비록 그 차이가 유의미하지 않은 경우도 있으나 그 경향은 관찰할 수 있으며, 10초와 60초의 경우를 비교하면 의미 있는 차이를 관찰할 수 있었다. ($p < 0.05$) 이는 나노젤 입자크기의 결과와 관계가 있다고 판단된다. 즉, 초음파의 처리시간이 길어질수록 보다 작은 나노젤이 생성되고 따라서 그 표면적이 크기 때문에 빠른 방출을 나타낸다고 볼 수 있다.

다음으로, Figure 3 (B)에서 보는 바와 같이 bis-methylene acrylamide의 농도에 따른 방출특성을 비교하였을 때, bis-methylene acrylamide의 농도에 따라 방출속도에 거의 차이를 나타내지 않았으며, 이는 나노젤 입자크기의 결과와도 일치하였다. 반면에, acrylamide의 농도에 따른 방출특

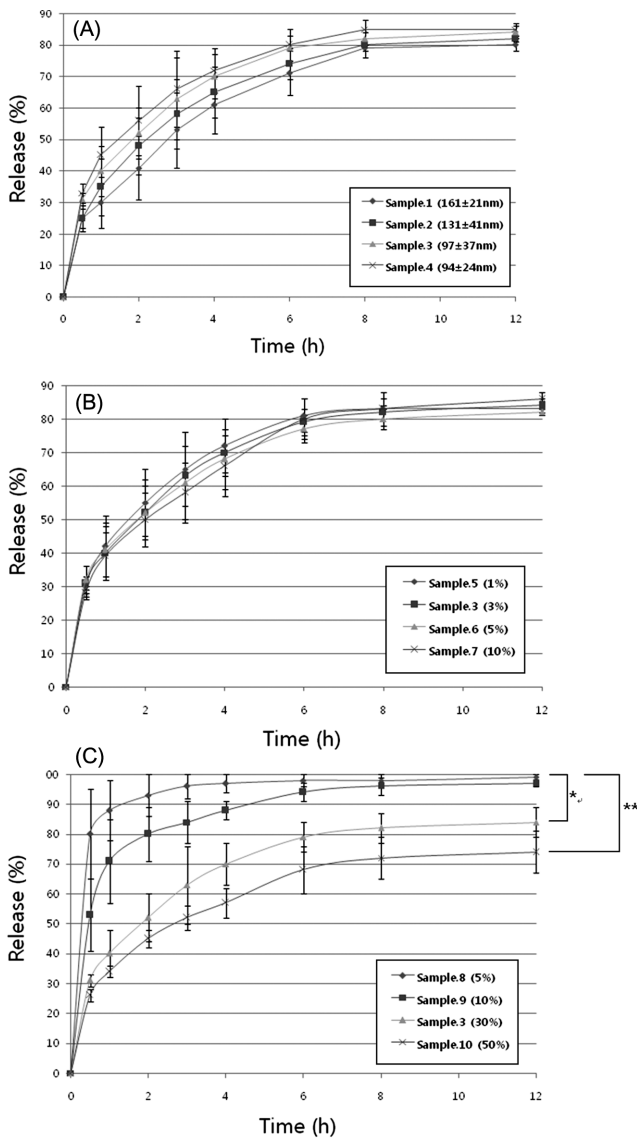


Figure 3—In vitro release of lysozyme from nanogel depending on (A) duration of sonication (B) concentration of Bis-methylene acrylamide and (C) concentration of acrylamide.

성을 비교하였을 때, acrylamide의 농도가 변함에 따라 보다 현저한 방출속도의 차이를 관찰할 수 있었다 (Figure 3 (C)). 즉, acrylamide의 농도가 높을수록 보다 현저하게 느린 방출속도를 나타내었다. 앞서 언급한 대로 acrylamide의 농도가 높을수록 입자의 크기가 커지는 경향이 있기 때문에 이에 대한 영향으로 볼 수도 있다. 하지만 입자의 크기가 방출속도의 변화에 주요한 요인이라고 가정한다면, 초음파 처리시간에 따른 입자 크기의 변화가 acrylamide 농도에 따른 입자 크기의 변화보다 컸기 때문에 초음파 처리 시간에 따른 방출속도의 차이가 더 현저해야 한다. 하지만 실험결과에서는 acrylamide 농도에 따른 방출속도의 차이가 더욱 현저

하였으며, 따라서 acrylamide 농도에 따른 방출속도의 현저한 변화는 입자크기에 의한 것으로만 보기에 어려움이 있다. 다시 말해, 입자크기보다는 내부 구조의 차이가 방출속도에 더 큰 영향을 미쳤다고 판단된다.

라이소자임이 나노젤로부터 방출되기 위해서는 상호가교된 acrylamide 수화젤이 이루는 고분자 사슬 사이의 공간을 통해 확산되어야 한다. 따라서 고분자 사슬 사이의 공간 크기가 확산속도에 영향을 미치게 되며 이는 본 연구에 사용된 단백질 약물처럼 약물의 크기가 클수록 그 영향은 더욱 커지게 된다.¹²⁾ 따라서 acrylamide 농도가 증가할수록 입자의 크기가 커질 뿐만 아니라, 수화젤 내부의 고분자 사슬 사이의 공간이 좁아져 크기가 큰 단백질 약물의 확산속도를 떨어뜨리게 되어 방출속도는 더욱 느려지게 된다고 판단된다.

결론

본 연구에서는 나노젤을 형성하기 위해 이용하는 inverse-miniemulsion 방법을 사용하였고 나노 크기의 수화젤 및 높은 라이소자임 활성도를 얻을 수 있었다. 이는 일반적으로 유기용매를 제거하기 위해 사용되는 증발방법을 생략하게 되고 짧은 시간 안에 입자의 제조가 완료됨으로써 가능하였다고 판단된다. 입자의 크기에서는 초음파 처리 시간이 길어질수록, 입자의 크기가 작아지며, acrylamide의 농도가 증가할수록 입자의 크기가 증가한다. 방출테스트에 있어서는 초음파 처리 시간이 길어질수록 그리고 acrylamide 농도가 감소할수록 빠른 방출이 있어났으며, acrylamide 농도의 변화가 더 큰 효과를 나타내었다. 이는 크기의 변화와 수화젤 내부 구조의 차이에 기인한다고 판단된다. 라이소자임 활성도에 있어서는 초음파 처리시간이 짧은 수록 높은 활성도 수치를 나타내었으며, acrylamide와 bis-methylene acrylamide의 농도가 높을수록 라이소자임의 활성도가 저하됨을 확인하였다. 이는 높은 농도의 단량체가 고분자중합 반응동안 더 많은 열을 생성하게 되고 이는 라이소자임 활성도에 부정적인 영향을 미쳤다고 판단된다. 결론적으로 본 연구에 제시된 inverse miniemulsion방법은 비교적 공정이 간단하고, 약물 봉입을 위한 2차 공정을 필요치 않으며, 신속하게 유기용매 제거가 가능하다는 면에서 유기용매에 예민한 단백질을 전달하기 위한 나노젤을 제조하는 방법으로 유용한 방법이라고 생각된다. 다만 아직 약물의 방출속도가 비교적 빠르기 때문에 이를 적절히 조절하기 위한 추가적인 연구가 필요하다고 판단되며, 동물실험 등의 추가적인 연구를 통해 그 유용성을 확인할 필요가 있을 것이다.

참고문헌

- 1) E.J. Oh, J.A. Yang, S.Y. Yang, J.K. Kim and S.K. Hahn, Drug Delivery System for Protein Therapeutics, *Polym. Sci. Technol.*, **18**, 444-449 (2007).
- 2) J.L. Clelanda, O.L. Johnsonb, S. Putney and A.J. Jonesc, Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 71-84 (1997).
- 3) D.A. Fisher, Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations, *Clin. Chem.*, **42**(1), 135-139 (1996).
- 4) R. Pawar, A. Ben-Ari and A.J. Domb, Protein and peptide parenteral controlled delivery, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **4**(8), 1203-1212 (2004).
- 5) J.L. Li, N. Wang, and X.S. Wu, A Novel Biodegradable System Based on Gelatin Nanoparticles and Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres for Protein and Peptide Drug Delivery, *J. Pharm. Sci.*, **86**(8), 891-895 (1997).
- 6) R.E. Eliaz and J. Kost, Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins, *J. Biomed. Mat. Res. Part A*, **50**(3), 388-396 (2000).
- 7) V.P. Torchilin and A.N. Lukyanov, Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions, *Ther. Focus*, **8**(6), 259-266 (2003).
- 8) K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z.G. Chen and D.M. Shin, Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1310-1316 (2008).
- 9) K.Pica, R. Tchao, C.M. Ofner 3rd. Gelatin-methotrexate conjugate microspheres as a potential drug delivery system, *J. Pharm. Sci.*, **95**(9), 1896-1908 (2006).
- 10) M. Elhassan Imam and A. Bernkop-Schnürch, Controlled Drug Delivery Systems Based on Thiolated Chitosan Microspheres, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **31**(6), 557-565 (2005).
- 11) M. Hamidi, A. Azadi and P. Rafiei, Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1638-3649 (2008).
- 12) A. Budhian, S.J. Siegel and K.I. Winey, Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content, *Int. J. Pharm.*, **336**(2), 367-375 (2007).
- 13) D. Moelans, P. Cool, J. Baeyens and E.F. Vansan, Immobilisation behaviour of biomolecules in mesoporous silica materials, *Catal. Commun.*, **6**(9), 591-595 (2005)
- 14) Z.L. Jiang and G.X. Huang, Resonance scattering spectra of micrococcus lysodeikticus and its application to assay of lysozyme activity, *Clini. Chim. Acta*, **376**(1), 136-141 (2007)
- 15) J.P. van Zyl André, W.R. Deon de, D. Ronald, Sandersona, and B. Klumperman, The role of surfactant in controlling particle size and stability in the miniemulsion polymerization of polymeric nanocapsules, *Eur. Polym. J.*, **40**(12), 2717-2725 (2004)