

코아 가교 양친성 고분자 나노입자를 이용한 고함량 유용 약물 담지 고분자 나노입자 제조

김나혜 · 김주영[†]

강원대학교 기능소재공학과
(2015년 8월 30일 접수, 2015년 10월 22일 심사, 2015년 11월 19일 채택)

Preparation of Valuable Compounds Encapsulated Polymer Nanoparticles with High Payload Using Core-crosslinked Amphiphilic Polymer Nanoparticles

Nahae Kim and Juyoung Kim[†]

Department of Materials engineering, Kangwon National University, Samcheok 25913, Korea
(Received August 30, 2015; Revised October 22, 2015; Accepted November 19, 2015)

초 록

본 연구에서는 반응성 비닐기를 가지고 있는 반응성 양친성 고분자 전구체(Reactive Amphiphilic Reactive Polymer Precursor) (RARP)를 이용하여 제조된 소수성 세그먼트들이 가교된 코아 가교 양친성 고분자(Core-crosslinked Amphiphilic Polymer) (CCAP) 나노입자와 나노침전법을 사용하여 소수성 유용물질을 고함량으로 담지할 수 있는 새로운 공정을 제안하였다. 극성이 각기 다른 유기용매(에탄올, 아세톤, 테트라하이드로퓨란(THF))들과 소수성 세그먼트 분자량이 다른 CCAP를 사용하여, 모델 유용 약물인 α -tocopherol의 담지 효율, 담지량 및 약물 담지 나노입자의 크기와 안정성 변화를 조사하였다. 소수성 세그먼트 분자량이 큰 CCAP와 소수성 용매인 THF를 용매로 사용한 경우에 가장 높은 유용 약물 담지량, 담지 효율을 나타내는 안정한 나노입자가 형성이 되었다. 즉 CCAP 나노입자들의 물리적 화학적으로 견고한 나노 구조로 인해서 33 wt%의 높은 담지량과 97% 이상의 담지 효율을 가지면서 물속에서 70 nm의 크기의 안정한 유용 약물 담지 고분자 나노입자를 제조할 수 있었다.

Abstract

In this study, core-crosslinked amphiphilic polymer (CCAP) nanoparticles prepared using a reactive amphiphilic polymer precursor (RARP) were used for preparing some valuable compounds encapsulated polymer nanoparticles with high payload through nanoprecipitation process. Various solvents (acetone, ethanol, and THF) having different polarity and CCAP nanoparticles prepared using different amphiphilicity were used for the preparation of α -tocopherol encapsulated polymer nanoparticles to investigate their effects on the encapsulation efficiency, payload, nanoparticle size, and stability. CCAP dissolved in hydrophobic solvent, THF, could form α -tocopherol encapsulated polymer nanoparticles dispersed in water with the high payload of α -tocopherol and encapsulation efficiency. Because of their physically and chemically robust nano-structure originated from crosslinking of the hydrophobic core, CCAP nanoparticles could encapsulate α -tocopherol with the high payload (33 wt%) and encapsulation efficiency (97%), and form 70 nm-sized stable nanoparticles in water.

Keywords: amphiphilic polymer, nanoparticles, α -tocopherol, nano-encapsulation, nanoprecipitation

1. 서 론

최근 유용 약물(Valuable Compounds)에 대한 관심이 증대함에 따라 유용 약물을 전달체에 담아 생리활성(Bioactivity)과 효능을 극대화하기 위하여 나노 크기의 전달체(Nano-carrier)를 제조하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 나노입자(Nanoparticles)는 마이크로 입자(Microparticles)보다 작은 크기와 큰 표면적을 가지며, 생체 장벽에 대한 우수한 투과성

을 갖기 때문에 선택적 약물 전달을 유용하게 할 뿐만 아니라 담지된 약물의 보호와 방출 조절 향상으로 보다 지속적으로 약물의 효과를 유지시킬 수 있는 것으로 잘 알려져 있다[1-2].

천연 추출물(Natural extracts), 약물, 비타민, 항산화 물질(Anti-oxidant) 등과 같은 유용 약물은 일반적으로 빛, 산소, 수분, 온도 등의 외부요인으로부터 영향을 받아 변질되거나 쉽게 파괴될 뿐만 아니라 가공 및 유통과정 동안 안정성이 저하되어 활성이 감소하게 된다. 또한 유용 약물은 직접 섭취 시 낮은 투과성(Permeability)과 위장(Gastrointestinal track) 내의 산성조건, 효소(Enzyme) 등 다양한 요인들에 의하여 안정성이 감소하게 되어 이들이 보유한 생리활성에 제한을 주게 된다[3-4]. 이러한 유용 약물의 보호와 저장 안정성을 향상시키기 위한 방법으로 캡슐화(Encapsulation)가 가장 일반적인 방법으로 알려져

[†] Corresponding Author: Kangwon National University,
Department of Materials engineering, Samcheok 25913, Korea
Tel: +82-33-570-6566 e-mail: juyoungk@kangwon.ac.kr

있으며[5-6], 캡슐화를 통하여 화학적, 생물학적 반응을 최소화하는 물리적 장벽을 제공해 줌으로써 외부 환경으로부터 보호하고 섭취 후 생체 내 원하는 곳에서 흡수, 이용될 때까지 활성이 유지될 수 있다. 캡슐화에 의해 다양한 나노 단위의 입자 크기를 갖는 나노 캡슐의 제조를 위하여 열안정화 공정 또는 가교 과정을 포함하는 분무 건조법(Spray drying)[7]과 유화/용매 확산법(Emulsion/Solvent Diffusion)[8], 상분리법(Coacervation), 탈용매(Desolvation)법 등이 전통적으로 사용되어져 왔으나, 사용할 수 있는 고분자가 제한되어있고 독성을 갖는 가교제(Crosslinking agent) 및 유화제(Surfactant)의 사용에 의한 고분자 물질의 변성과 시간 경과에 따른 입자의 안정성 저하를 일으키는 단점이 있어 제한적으로 사용되어져 왔다[9]. 따라서 손쉽고 보다 효율적인, 안정성 있는 나노입자들을 제조하기 위해서 나노침전법(Nano-precipitation)이 널리 사용되고 있다[7,10-11].

Fessi의 연구팀(Fessi et al., 1989, 1992)에 의해 최초로 개발된 나노 침전법은 다양한 유기 용매에 고분자와 유용 약물을 용해시킨 후 이를 비용매인 물에 적하·분산시켜서 나노입자를 얻는 방법으로, 두 용매는 혼합될 수 있어야 하지만 고분자와 유용 약물은 비용매에서 용해되지 않아야 하는 것으로 알려져 있다[11]. 유화/용매 확산법과는 대조적으로, 독성 효과를 일으키거나 표면 특성에 영향을 미치는 첨가제 및 높은 온도, 장시간의 초음파처리 공정이 필요하지 않고, 모든 절차가 단일 공정으로 수행되며, 좁은 단분산 분포를 갖는 나노입자의 생산이 가능하다는 이점이 있다. 나노침전법에 사용되는 고분자로는 Poly(ϵ -caprolactone) (PCL), Poly(lactide) (PLA), Poly(L-glutamic acid)(PGA), Poly(lactide-co-glicolide) (PLGA) 및 Poly(N-acryloylamide), Poly(vinylene), Poly(methylmethacrylate) (PMMA), Poly(vinyl carbazole) (PVK), poly(vinyl acetate) (PVAc), Pluronic F68 등이 사용되고 있으며, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Dimethylacetamide (DMA), Dimethylformamide (DMF) 및 1-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP) 등과 같은 교반이나 가열 증발에 의해 쉽게 제거되지 않는 비휘발성 용매를 사용할 수 있다는 큰 장점이 있다[12-15]. 그러나 기존에 연구된 나노침전법은 소수성 고분자의 나노입자 제조에 주로 사용되었으며, 고분자의 소수성은 수용성 약물과 양립하지 못하여 생물학적 활성을 잃게 하는 단백질과 핵산 약물의 Unfolding 효과를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다[16-17]. 이를 보완하기 위하여 친수성 고분자를 사용함으로써 면역체계로부터 보호하고, 나노입자의 순환시간을 증가시킬 뿐만 아니라 수용액에서의 분산성을 크게 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[18].

최근에는 양친성 블록 공중합체를 기반으로 나노침전법을 통하여 수분산이 가능한 소수성 유용 약물이 담지된 나노입자를 제조하는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 고크량의 소수성 유용 약물을 담지하는 것이 어렵고, 양친성 블록 공중합체는 매우 복잡한 합성 과정을 통해서 제조되므로 가격이 고가이고 실용화되기 어려운 단점이 있다[19-21]. 또한 양친성 블록 공중합체 나노입자들도 계면활성제와 마찬가지로 일종의 물리적 회합을 통해서 형성되기 때문에, 극한 환경이나 외부 환경에 의해서 그 나노 회합구조가 쉽게 파괴되는 피할 수 없는 단점이 존재한다. 따라서 고크량의 소수성 유용 약물 담지와 수분산이 동시에 가능한 나노입자를 형성시킬 수 있으면서도 물리적으로 매우 견고한 나노 구조를 가지는 새로운 형태의 양친성 고분자 나노입자의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 상대적으로 간단한 합성 공정을 통해서 다양한 친수성/소수성 세그먼트 비율을 가지고 있는 새로운 형태의 양친성 고분자 전구체를 합성하고, 이를 이용하여서 상대적으로 높은 담

지효율을 나타낼 수 있는 새로운 양친성 고분자 나노입자 제조를 제안하였다. 또한 극한 환경이나 외부 환경 변화에서도 나노 회합구조가 파괴되지 않는 나노입자를 제조하기 위해서, 양친성 고분자 나노입자의 소수성 코어 부분이 화학적으로 가교된 새로운 형태의 코아 가교 양친성 고분자 나노입자를 제조하였다. 이를 위해서 폴리에틸렌 옥사이드(Polyethylene oxide) (PEO) 기반 친수성 세그먼트와 폴리프로필렌 옥사이드(Polypropylene oxide) (PPO) 기반 소수성 세그먼트를 가지고 있으면서 반응성 비닐기를 가지고 있는 반응성 양친성 고분자 전구체(Reactive Amphiphilic Reactive Polymer Precursor, 이하 RARP로 명명)를 합성하고, 이를 전형적인 나노침전법을 통하여서 수분산이 가능하면서 고크량의 소수성 유용 약물의 담지가 가능한 새로운 형태의 코아 가교 양친성 고분자 나노입자(Core Crosslinked Amphiphilic Polymer, 이하 CCAP로 명명)를 제조하는 공정을 제안하였으며, 소수성 유용 약물인 α -tocopherol의 담지효율 및 나노입자 제조시 제조 조건의 변화에 따른 나노입자들의 크기, 담지량 및 방출거동 등에 영향을 미치는 인자들을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 시약

RARP 물질의 합성에는 Glycerol Propoxylate (GP, Mw = 260, 725, 1000 g/mol, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), 2,4-Toluene Diisocyanate (2,4-TDI, Mw = 174.16 g/mol, Junsei Chemical Co., Ltd, Japan), Glycerol (GC, Mw = 92.09 g/mol, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), 2-Hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), 그리고 Polyethylene Glycol (PEG, Mw = 1000, 1500, 2050 g/mol, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA), 용매로는 아세톤(Acetone), 에탄올(Ethanol), 테트라하이드로푸란(Tetrahydrofuran) (THF), 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide) (DMSO) 및 클로로포름(Chloroform, Sigma Aldrich Co., Ltd, USA)을 사용하였고, CCAP 나노입자의 제조 시 사용된 개시제(Initiator)는 2,2'-Azobis-(2-methylpropionitrile) (AIBN)를 사용하였으며, 소수성 유용물질로는 α -tocopherol을 Sigma Aldrich Co., Ltd, USA에서 구입해 사용하였다. GP와 PEG는 합성 24 h 전 80 °C에서 감압 하에 건조 후 사용하였고, 그 외의 시약은 별도의 정제과정을 거치지 않고 사용하였다.

2.2. RARP의 합성

RARP는 3단계 합성 공정을 통해서 제조되었으며, 기계교반기, 질소 유입구, 온도계가 장착된 3구 유리 반응기 내에서 진행하였다. 질소 분위기 하에 GP와 2,4-TDI를 반응 몰비 1 : 3으로 70 ~ 80 °C에서 12 h 동안 교반 반응시켜 우레탄 결합을 형성시킨다. 앞서 합성된 프리폴리머 (Prepolymer)에 2-HEMA를 반응 몰비 1 : 2로 첨가하여 50 °C에서 다시 6 h 교반 반응시킨다. 상기 과정으로 얻어진 합성물에 분자량이 1500 g/mol인 PEG를 1 : 1 첨가 후 12 h 동안 반응시켜 최종적으로 비닐기가 도입된 RARP를 합성하였다. 합성된 비이온성 반응성 전구체인 RARP의 자세한 분석 및 분자량 측정은 이전의 논문에서 자세하게 기술하였으며[56-58], RARP의 예상되는 화학 구조는 Figure 1에 나타내었다. RARP 합성에는 각기 다른 분자량을 가지고 있는 3 종류의 GP (260, 700, 1000 g/mol)을 사용하였으며, 합성 시 사용된 GP의 분자량에 따라서 RARP 260, RARP 700, RARP 1000으로 각각 명명하였다.

Table 1 Physico-chemical Characteristics of the Solvents and of the Polymer Used in the Preparation of Nanoparticles

Solvents	Polarity	Dielectric constant ϵ at 20 °C	Dipole moment (debye)	Solubility in water (g/mL)	Relative polarity	Surface tension σ (mN/m) at 20 °C
Acetone	5.1	21.70	2.88	Miscible	0.355	25.20
Ethanol	5.2	24.30	1.69	Miscible	0.654	22.10
THF	4	7.52	1.63	30	0.207	26.40
Water	9	78.54	1.84	-	1.000	72.80

This table was originally from: Prof. Murov's Orgsoltab, which was edited and reposted by Erowid.

Table 2. Size of Nanoparticles Prepared Using Various Molecular Weight of PPO-based Hydrophobic Segment and Solvents

Sample	Solvent	PPO-based hydrophobic segment molecular weight (g/mol)	PEO-based hydrophilic segment molecular weight (g/mol)	Particle size (nm)
RARP	260-A	Acetone	260	42.64
RARP	260-E	Ethanol	260	68.35
RARP	260-T	THF	260	46.98
CCAP	260-A	Acetone	260	42.28
CCAP	260-E	Ethanol	260	47.69
CCAP	260-T	THF	260	45.59
RARP	1000-A	Acetone	1000	40.53
RARP	1000-E	Ethanol	1000	44.03
RARP	1000-T	THF	1000	35.73
CCAP	1000-A	Acetone	1000	41.81
CCAP	1000-E	Ethanol	1000	49.05
CCAP	1000-T	THF	1000	30.31

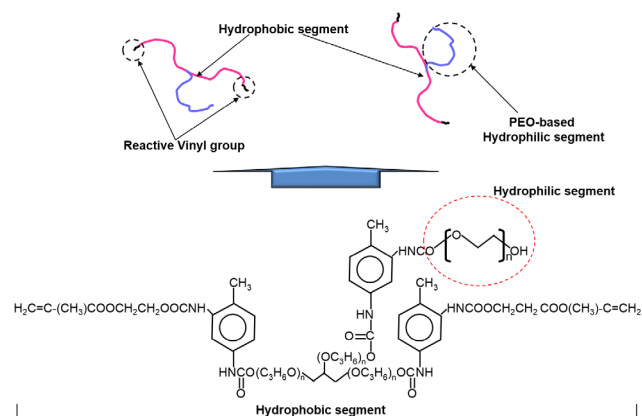


Figure 1. Schematic presentation for nonionic amphiphilic reactive oligomer, RARP.

2.3. 비이온성 전구체 나노입자 및 CCAP 나노입자의 제조

RARP를 이용하여서, 다양한 용매와 교반 및 중합함으로써 양친성 나노입자와 CCAP 나노입자가 포함된 용액을 제조하였다. 먼저, RARP 3 g을 아세톤, 에탄올, THF 각각의 유기 용매 20 g에 용해시킨 후, 탈이온 증류수에 서서히 적하하면서 격렬하게 교반시켜 RARP 나노입자가 분산된 나노 콜로이드 용액을 제조하였다. Table 1에 사용한 용매에 대한 물리 화학적 특성을 나타내었다.

CCAP 나노입자의 제조는 용액 중합공정을 통해서 제조하였다. 용

액 중합은 질소 주입구, 냉각기, 시료 주입구가 장착된 500 mL 파이렉스 3구 유리반응기에서 진행하였으며, Table 2에 CCAP 나노입자 제조를 위한 반응 조성을 제시하였다. 앞서 합성된 전구체인 RARP 3 g을 20 g의 아세톤, 에탄올, THF와 각각 혼합하여 교반하면서 완전히 용해시킨 후, RARP에 존재하는 비닐기를 활성화시켜 라디칼 중합을 수행하기 위해서 대표적인 유용성 라디칼 중합 개시제인 AIBN을 0.02 g 첨가 용해시켰다. 상기 용액을 300 rpm으로 일정하게 교반하면서 질소를 주입하고, 50~65 °C로 유지되는 오일 중탕기에 유리 반응기를 잠그게 하여 중합반응을 개시하였으며, 약 6 h 동안 교반 반응시킨 후 중결하였다. 상기 용액을 탈이온 증류수에 서서히 적하하면서 격렬하게 교반시켜서 CCAP 나노입자가 분산된 콜로이드 용액을 제조하였다. 최종적으로 제조된 CCAP 나노입자의 크기는 사용된 RARP 종류 및 사용된 용매에 따라서 다양하게 조절할 수 있었다 (Table 2).

중합 조건을 용매가 20 g일 때 RARP를 3 g으로 고정한 이유는 RARP를 3 g 이상으로 첨가하여 중합하였을 경우, 모든 용액에서 젤 (Gel)이 되었기 때문에 용액 중합 시 최적의 조합은 RARP 3 g, 용매 20 g으로 판단하여 수행하였다.

2.4. 나노침전법을 이용한 α -tocopherol 담지 양친성 나노입자 및 CCAP 나노입자 제조

아세톤, 에탄올, THF에 RARP를 각각 용해시킨 후, 소수성 유용 약 물질 α -tocopherol을 RARP에 대해서 각각 9, 23, 33 wt%되는 양을 첨가하여서 상온에서 약 10 min간 교반하여 균일한 용액을 제조한

Table 3. Relative Viscosity of RARP and CCAP Nanoparticles Prepared Using Various Solvents

Polymer	Solvent	$[\eta]$ (mL/g)
RARP	Acetone	1.301
	Ethanol	1.022
	THF	1.713
CCAP	Acetone	1.426
	Ethanol	1.306
	THF	1.971

후, 상기 용액을 탈이온 증류수에 적하하면서 격렬하게 교반시켜 침적시킴으로써 α -tocopherol이 담지된 양친성 나노입자를 제조하였다. CCAP 나노입자를 사용하여서 α -tocopherol을 담지하는 경우에는, 전술한 것처럼 우선 아세톤, 에탄올, THF 각각의 유기 용매에 RARP를 용해시킨 후, 라디칼 중합용 개시제인 AIBN을 첨가하여서 라디칼 중합을 수행하여 중합된 RARP 사슬이 존재하는 용액을 제조한다. 이 용액에 중합된 RARP에 대해서 각각 9, 23, 33 wt%의 α -tocopherol과 혼합 후, 탈이온 증류수에 서서히 적하시키면서 격렬하게 교반시켜 α -tocopherol이 담지된 CCAP 나노입자가 분산된 콜로이드 용액을 제조하였고, 자세한 조성표는 Table 4에 나타내었다.

2.5. 고분자 나노입자 크기, 미세구조 및 점도

제조 조건의 변화에 따른 고분자 나노입자의 입자크기 변화를 확인하기 위하여 동적광산란광도계(Dynamic Light Scattering; DLS, Zeta-sizer Nano ZSP, Malvern Instrument, UK)를 사용하여 제조된 고분자 나노입자의 입자 크기를 측정하였으며, 한 시료에 대하여 3회씩 측정하여 평균값을 사용하였다. 제조된 CCAP 나노입자의 미세구조는 Cryo transfer specimen holder (Gatan사 : Model 626 DH)를 40 ℃ 이하로 냉각시킨 후에 냉동 고정을 위하여 액체 질소에 저장 준비된 grid 시료를 냉각된 specimen holder에 장착하여 초저온전자현미경 (Cryo-electron Transmission Microscopy; Cryo-TEM, FEI Tecnai F20/USA)을 사용하여서 관찰하였다.

라디칼 중합 전후, 아세톤, 에탄올, THF에 용해된 RARP와 CCAP의 상대 점도 측정은 Ubbelohde 점도계(0.78 mm diameter)를 사용하여 상온(25 ℃)에서 수행되었다. 측정 이전에, 모든 용액은 24 h 이상 교반 후, 필터를 이용하여 여과시켰다(filtering). 고분자 농도의 범위 내에서, 유동 시간의 비율은 동적 점도의 것과 동일한 것으로 간주되었으며, 한 시료에 대하여 5회씩 측정하여 평균값을 사용하였다. 고유 점도($[\eta]$ in L/g)와 Huggins' coefficient (KH)는 다음과 같은 선형 방정식을 사용하여 결정되었다.

$$\eta_{red} = [\eta] + KH[\eta]^2C$$

위 식에서 C는 고분자의 농도(g/L)이고, η_{red} 는 $\eta_{red} = \eta_{rsp}/C = \eta / \eta_s C$ 에 의해 정의된 환원점도(L/g)이다. 여기서 η 는 고분자 용액의 점도이고, η_s 는 순수 용매의 점도이다.

2.6. 고분자 나노입자들의 α -tocopherol 담지효율

나노입자 내에 담지시킨 α -tocopherol의 담지효율을 분석하기 위하여, 먼저 나노침전법을 사용하여 α -tocopherol이 담지된 나노입자들이 물속에 분산된 콜로이드 용액을 제조하였다. 나노입자에 포함된 α -tocopherol의 양은 2 mL의 콜로이드 용액에 5 mL의 클로로포름을 첨

Table 4. Particle Size and Loading Efficiency Based on Payload

α -tocopherol payload : 9 wt%				
Sample	Payload (wt%)	Loading Efficiency (%)	Particle size (nm)	
RARP	260-A	9	-	Coagulation
RARP	260-T	9	-	Coagulation
CCAP	260-A	9	74.21	118.80
CCAP	260-T	9	87.37	48.10
RARP	1000-A	9	-	Coagulation
RARP	1000-E	9	-	Coagulation
RARP	1000-T	9	-	Coagulation
CCAP	1000-A	9	96.02	123.18
CCAP	1000-E	9	94.42	171.35
CCAP	1000-T	9	98.41	32.87
α -tocopherol payload : 23 wt%				
Sample	Payload (wt%)	Loading Efficiency (%)	Particle size (nm)	
RARP	260-A	23	-	Coagulation
RARP	260-T	23	-	Coagulation
CCAP	260-A	23	-	Coagulation
CCAP	260-T	23	-	Coagulation
RARP	1000-A	23	-	Coagulation
RARP	1000-E	23	-	Coagulation
RARP	1000-T	23	-	Coagulation
CCAP	1000-A	23	91.05	179.70
CCAP	1000-E	23	75.26	118.95
CCAP	1000-T	23	91.58	36.58
α -tocopherol payload : 33 wt%				
Sample	Payload (wt%)	Loading Efficiency (%)	Particle size (nm)	
RARP	260-A	33	-	Coagulation
RARP	260-T	33	-	Coagulation
CCAP	260-A	33	-	Coagulation
CCAP	260-T	33	-	Coagulation
RARP	1000-A	33	-	Coagulation
RARP	1000-E	33	-	Coagulation
RARP	1000-T	33	-	Coagulation
CCAP	1000-A	33	-	Coagulation
CCAP	1000-E	33	-	Coagulation
CCAP	1000-T	33	97.25	69.91

가하여 강하게 교반 혼합한 후, 원심분리기(Centrifuge 5418, Eppendorf, Germany)를 사용하여 5 min 동안 13,000 rpm으로 3회 원심 분리하여 나노입자에 포함되지 않는 α -tocopherol을 제거한 후 얻어진 분산 용액에서 상등액 2 mL를 취하여 자외선/가시광선 분광광도계(UV-vis

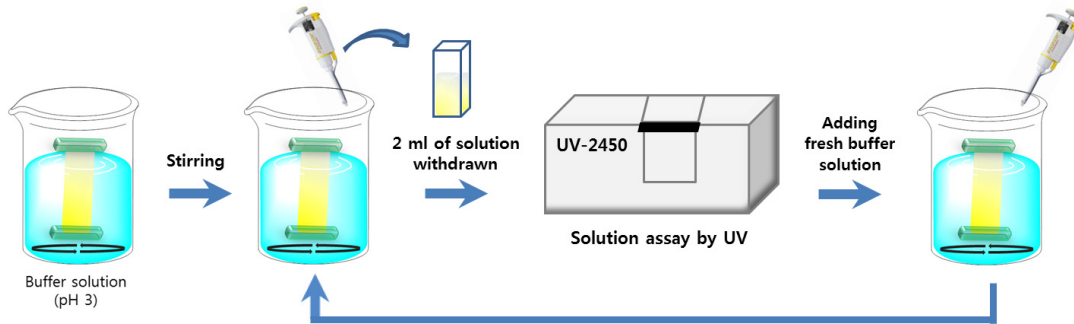


Figure 2. Release experiment of α -tocopherol loaded nanoparticles.

spectrophotometer, UV-2450, Shimadzu, Japan)를 이용하여 흡수과장 275 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때의 흡광도를 아래의 계산식에 적용하여 α -tocopherol의 담지효율(Loading efficiency; LE)로 환산하였다.

$$\text{담지효율(LE) (\%)} = \frac{(\alpha\text{-tocopherol의 처음 농도} - \text{흡광도에서의 농도})}{\alpha\text{-tocopherol의 처음 농도}} \times 100$$

2.7. α -tocopherol이 담지된 고분자 나노입자들의 방출거동

CCAP 제조에 사용된 소수성 세그먼트인 GP의 분자량이 고분자 나노입자로부터 α -tocopherol의 방출거동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 상기 제조된 α -tocopherol 담지된 CCAP 콜로이드 용액에서 2 mL를 취하여 투석막(Dialysis tube)에 넣는다. 이 투석막을 Buffer solution (pH 3) 98 mL가 든 항온조에 정치하고 상온에서 교반하면서, 일정 시간에 따라 방출 용액을 2 mL를 취하여 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 275 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 후, 표준화 곡선을 이용하여 방출된 α -tocopherol의 농도를 결정하였다. 이때, 약물이 방출된 Buffer solution (pH 3)은 새로운 Buffer solution (pH 3)으로 완전히 교환하면서 진행하였으며, Figure 2에 진행 절차 모식도를 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 나노침전법에 의한 양친성 고분자 나노입자 형성 및 용매 종류에 따른 양친성 고분자 나노입자의 입자크기 변화

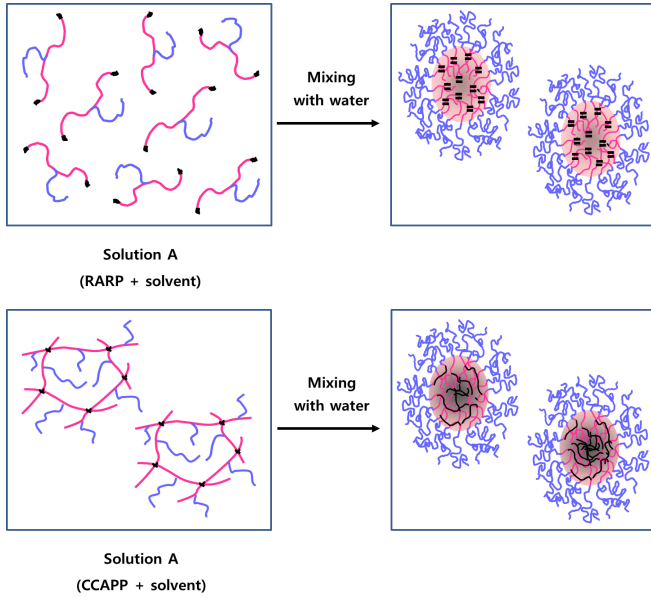
극성이 각기 다른 유기 용매(아세톤, 에탄올, THF)에 RARP 및 가교 중합된 양친성 고분자를 각각 용해시킨 용액을 비용매인 물에 적하하면, 혼합물은 나노입자의 형성을 나타내듯이 순간적으로 혼탁해졌는데, 이는 고분자 용액이 물에 첨가될 때 고분자의 빠른 탈용매화에 의해 나노 침전이 발생하고, 용매 확산 중에 생성된 계면 난류(Interfacial turbulence)에 의한 것으로 설명될 수 있다. 이후 용매 간의 상호 섞임 때문에 급격한 퍼짐이 관찰되며, 나노 크기의 용매 액적은 계면에서 파괴되어 용매의 확산이 종료되고 고분자의 응집이 발생한 후 양친성 고분자 나노입자가 형성되는 것으로 생각된다[22-25].

일종의 올리고머 형태인 RARP의 경우, 유기용매에 용해된 상태로 물에 적하하면 전술한 메커니즘을 통해서 전형적인 양친성 물질인 계면활성제나 양친성 블록 공중합체들처럼 물리적으로 자가 조립(Self-assembly)을 통해서 마이셀과 같은 양친성 나노입자를 물속에

형성시키는 것으로 생각된다. 즉 상기 언급한 아세톤, 에탄올, THF는 RARP의 소수성 세그먼트와 친수성 세그먼트를 모두 용해시킬 수 있으므로, RARP는 유기용매에 완전히 용해되어서 균일한 용액상태로 존재하다가, 친수성 세그먼트만을 용해시킬 수 있는 물과 혼합되게 되면 물과 혼화가 가능한 유기용매들이 수상으로 확산 이동함에 따라서 RARP의 소수성 세그먼트들은 “Hydrophobic interaction”으로 인해서 서로 회합하게 되고 친수성 세그먼트들은 소수성 세그먼트들과 미세상분리(Microphase-separation)되어서 수상으로 이동하게 된다. 이러한 과정을 통해서 RARP 사슬들은 자가 조립되어서 양친성 고분자 나노입자를 형성시키는 것으로 생각된다[26-29].

가교 중합된 RARP 즉 CCAP가 용해되어 있는 용액을 물에 적하하는 경우에도 자가 조립 메커니즘을 통해서 물속에 양친성 고분자 나노입자를 형성하는 것으로 생각된다. 그러나 RARP와는 달리, CCAP는 가교 중합된 양친성 고분자 사슬들이므로 유기 용매상에서 선형 분자들이 용해된 상태로 존재하는 것이 아니라 가교 구조의 고분자 사슬 형태로 용매상에 존재하는 것으로 생각된다. 실험 부분에서 언급한 것처럼, 유기용매에 다량의 RARP를 용해시킬 수 있지만, CCAP의 경우에는 유기 용매에 용해시킬 수 있는 양이 제한되었다. 즉 유기용매 10 g에 RARP를 용해시키는 경우에는 20 g 이상을 용해시켜도 젤(Gel)이 되지 않으며 다소 점도가 높은 용액이 형성되었다. 그러나 유기용매 10 g에 RARP 3 g 이상을 용해시키고 가교 중합을 수행하면 수 시간 내에 유동성이 전혀 없는 젤로 변화되었다. 유기용매 20 g에 RARP 3 g 미만을 용해시키고 라디칼 개시제인 AIBN을 첨가하고 가교 중합을 수행하는 경우에는 유동성이 있는 용액을 제조할 수 있었다. 이렇게 제조된 용액에는 RARP 사슬이 가교 중합된 CCAP가 일종의 나노 젤(Nano-gel) 형태로 용매에 존재하는 것으로 생각된다. RARP 사슬에서 비닐기들은 소수성 세그먼트에만 존재하므로 라디칼에 의한 가교 중합은 소수성 세그먼트에서만 발생할 것으로 생각되므로, 가교 중합 후에는 RARP 사슬의 소수성 세그먼트들이 화학적으로 가교된 구조로 유기 용매 내에 존재할 것으로 생각된다. 즉, 가교 중합된 RARP 사슬은 마치 “Fishing net (어망 구조)” 형태로 유기 용매에 존재하다가 나노침전법을 통해서 코어 가교된 양친성 고분자 나노입자 형태로 전환되는 것으로 생각된다. RARP와 CCAP가 용매에 용해된 상태와 나노입자 형성 메커니즘을 모식도로 Scheme 1에 나타내었다.

RARP와 이들의 가교 중합체인 CCAP가 동일한 농도로 용해되어 있는 용액을 나노침전법으로 물속에 양친성 나노입자가 성공적으로 형성되었고, Table 2에 나타낸 것처럼 입자 크기는 30-68 nm 범위에 있었으며, 사용된 RARP의 종류와 사용된 유기 용매의 종류에 따라서 형성되는 양친성 고분자 나노입자 크기가 변화하였다. 즉, Table 2에



Scheme 1. Schematic presentation for amphiphilic reactive precursor, RARP and core-crosslinked amphiphilic polymer (CCAP) nanoparticles dispersed in water.

나타낸 것처럼 분자량이 상대적으로 작은 소수성 세그먼트(260 g/mol)를 가지고 있는 RARP 260을 사용하여 제조된 용액들의 경우에는 아세톤을 용매로 사용한 RARP 260-A와 CCAP 260-A 용액에서 가장 작은 나노입자들이 형성되었고, 분자량이 상대적으로 큰 소수성 세그먼트(1000 g/mol)를 가지고 있는 RARP 1000을 사용한 경우에는 THF를 용매로 사용한 RARP 1000-T와 CCAP 1000-T 용액에서 가장 작은 나노입자들이 형성되었다. 이러한 결과들은 RARP 및 CCAP 사슬에 대한 유기용매들의 용해도와 용매와 물과의 친화도로 설명될 수 있을 것으로 생각된다.

전술한 것처럼 나노침전법이 수행되는 동안, 고분자 용액은 수용액 상과 혼합된 후 형성된 액적 계면에서 용매의 확산이 일어나는데 [7-11], 물과 용매의 상호작용이 강할수록 빨리 혼합되어 용매가 수상으로 확산되므로 상대적으로 극성이 큰 에탄올, 아세톤에서는 물과의 상호작용이 강하여 수상으로 이동하는 속도가 빨라 크고 불안정한 나노입자가 형성되고, 상대적으로 극성이 낮은 THF에서는 물과의 상호작용이 제일 약하여 혼합되는 속도가 느리므로 THF가 수상으로 천천히 이동함으로써 작은 크기의 안정적인 나노입자가 형성되는 것으로 해석된다. 그러나 상대적으로 분자량이 작은 소수성 세그먼트(260 g/mol)를 사용하여 합성된 RARP 260을 사용하여 나노입자를 제조하는 경우에는 아세톤(polarity 5.1)을 용매로 사용(RARP 260-A)하였을 때 가장 작은 크기의 나노입자가 얻어졌는데, 이는 사용한 세 가지 용매 중에서 중간 극성을 갖는 아세톤과 RARP 260이 다른 용매보다 더 강한 상호작용을 하기 때문인 것으로 생각된다. 용매로 에탄올(polarity 5.2)을 사용한 경우(RARP 260-E)에는 너무 극성이 강해 오히려 RARP 260에 대한 용해도가 감소되어서 상대적으로 큰 나노입자가 형성되는 것으로 생각되며, 상대적으로 비극성인 THF (polarity 4)를 용매로 사용한 경우(RARP 260-T)에는 아세톤 다음으로 작고 안정한 나노입자가 형성되었다. 또한 CCAP 260에서도 마찬가지로 아세톤을 용매로 사용한 경우에 가장 작은 나노입자가 형성되었다. 따라서 RARP 260의 가교 중합체인 CCAP 260도 아세톤이 가장 큰 상호

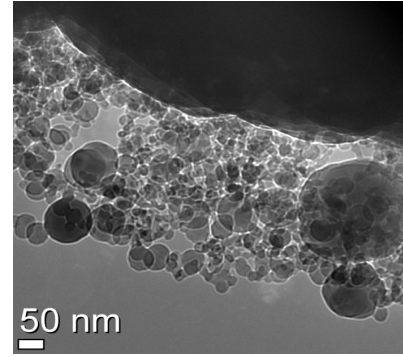


Figure 3. Cryo-TEM images of CCAP nanoparticles.

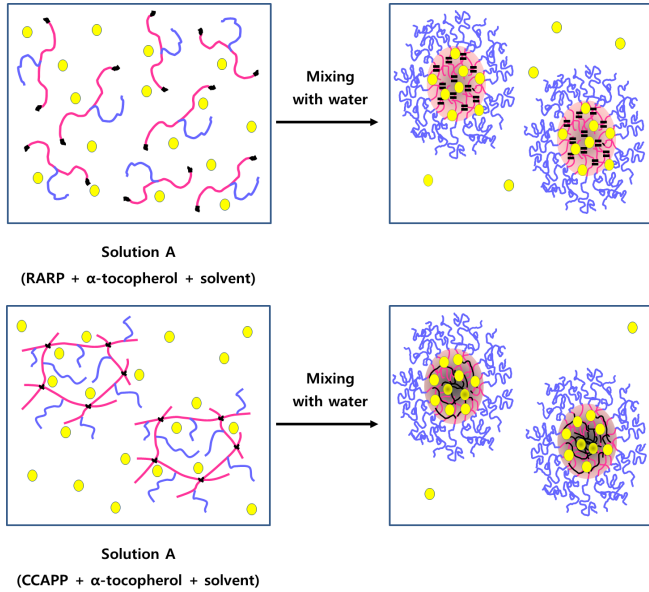
작용을 가지고 있는 양용매임을 확인할 수 있었다.

반면에, 상대적으로 분자량이 큰 소수성 세그먼트(1000 g/mol)를 사용하여 합성된 RARP 1000과 이 전구체의 가교 중합체인 CCAP 1000을 사용하여 나노입자를 제조하는 경우에는 THF를 용매로 사용하였을 때 가장 작은 크기의 나노입자가 얻어졌는데, 이는 소수성 세그먼트 분자량이 증가함에 따라 소수성이 강해지므로 상대적으로 극성이 낮은 THF와 RARP, CCAP 사슬들과의 상호작용이 강하므로 작은 나노입자가 형성된 것으로 생각된다. 나노침전법 메커니즘 및 이전 문헌에 따르면, 입자 크기에 영향을 미치는 인자는 고분자-용매 간의 상호작용으로 알려져 있다. 즉, 고분자와 용매와의 상호작용의 크고 작음에 따라서 용매가 수상으로 확산되어 가는 속도가 결정된다[69]. RARP 260과 CCAP 260 사슬들은 아세톤과 가장 큰 상호작용을 가지고 있으므로, RARP 260과 CCAP 260 사슬들은 아세톤에 용해시키고 물속에 적하하면, 아세톤이 물속으로 확산되는 속도가 상대적으로 느리므로 RARP 260과 CCAP 260 사슬들이 자가 조립을 통해서 나노입자를 형성하는 충분한 시간을 가질 수 있고, 이로 인해서 작고 안정한 양친성 나노입자들을 형성할 수 있는 것으로 생각된다.

즉, 전술한 것처럼 RARP와 CCAP는 유기용매에 완전히 용해되어서 균일한 용액상태로 존재하다가, 친수성 세그먼트만을 용해시킬 수 있는 물과 혼합되게 되면 물과 혼합이 가능한 유기용매들이 수상으로 확산 이동함에 따라서 RARP의 폴리프로필렌 옥사이드 기반 소수성 세그먼트들은 “Hydrophobic interaction”으로 인해서 서로 회합하게 되고 폴리에틸렌 옥사이드 기반 친수성 세그먼트들은 소수성 세그먼트들과 미세 상분리되어서 수상으로 이동하게 된다. 이러한 과정을 통해서 RARP와 CCAP 사슬들은 자가 조립되어서 양친성 나노입자를 형성시키는 것으로 생각된다. 이러한 용매 교환 과정 중에서 고분자와 용매 간의 상호작용이 강할수록 용매가 수상으로 확산되는 속도가 상대적으로 느려서 안정한 나노입자들이 형성되는 것으로 생각된다. 따라서 RARP 260과 CCAP 260 사슬들은 아세톤과 상대적으로 큰 상호작용을 가지고 있으므로, 물과 혼합할 때, 용매인 아세톤이 수상으로 확산되는 속도가 상대적으로 느리므로 가장 작은 나노입자들이 형성되며, RARP 1000과 CCAP 1000 사슬들은 THF와 상대적으로 큰 상호작용을 가지고 있으므로, 물과 혼합할 때, 용매인 THF가 수상으로 확산되는 속도가 상대적으로 느리므로 가장 작은 나노입자들이 형성되는 것으로 해석될 수 있다.

3.3. 용매 종류에 따른 RARP 및 CCAP 용액의 상대점도 변화

고분자-용매 상호작용을 평가하는 가장 편리하면서 신뢰도가 높은 측정법이 고분자 용액의 상대점도를 측정하는 방법이다. 동일한 분자



Scheme 2. Schematic presentation for α -tocopherol-loaded amphiphilic reactive precursor, RARP and α -tocopherol-loaded core-crosslinked amphiphilic polymer (CCAP) nanoparticles dispersed in water.

량과 동일한 화학 구조를 가지고 있는 고분자를 여러 가지 용매에 동일한 농도로 용해시킨 용액의 상대점도의 크기는 특정 고분자의 용매 내에서의 유체역학적인 부피(Hydrodynamic volume)의 크기와 매우 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다[28-29]. Table 3과 Figure 4에 RARP 1000과 가교 중합된 RARP 1000 즉, CCAP 1000이 동일한 농도로 아세톤과 THF에 용해된 용액들의 상대점도를 나타내었다. 모든 농도 범위에서 RARP 1000과 CCAP 1000은 아세톤보다는 THF에서 훨씬 더 큰 상대점도를 나타내었다. 이 결과가 나타내는 것은 아세톤보다는 THF에서 RARP 1000과 CCAP 1000 사슬들이 더 크게 팽창되어서 더 큰 부피를 가지고 있다는 것이다. 즉 RARP 1000과 CCAP 1000 모두 아세톤보다는 THF와 더 큰 상호작용을 가지고 있다는 것이다. 따라서 RARP 1000과 CCAP 1000 사슬들을 THF에 용해시키고 나노침전법으로 나노입자를 제조할 때, 가장 작은 입자들이 형성되는 것은 RARP 1000과 CCAP 1000 사슬들과 THF의 상호작용이 다른 용매들에 비해서 강하기 때문이라는 것을 입증하는 결과로 생각될 수 있다.

동일한 용매에서 상대점도를 비교하면, RARP 1000보다는 CCAP 1000이 더 큰 상대점도 점도를 나타내고 있다. 이 결과가 나타내는 것은 RARP 1000의 용매 내에서의 부피는 가교 중합(CCAP 1000) 후에 증가한다는 것이다. 이러한 결과는 가교 중합을 통해서 사슬들의 소수성이 증가하여서 THF에 대한 상호작용이 증가하게 되고 이로 인해서 사슬이 더 크게 팽창하여서 상대점도가 증가하는 것으로 해석될 수 있다.

3.4. 유용 약물 담지 효율 및 방출 거동

3.4.1. α -tocopherol 담지 효율

Table 4에 소수성 세그먼트의 분자량이 각기 다른 RARP 및 CCAP를 이용하여서 각기 다른 양의 α -tocopherol 담지량과 효율을 조사한 결과를 나타내었다. 나노입자의 α -tocopherol 담지량과 효율도 역시 유기 용매와 소수성 세그먼트의 분자량에 영향을 받으며, 가장 높은 담지량과 효율은 CCAP 1000과 THF를 사용하여 제조된 나노입자에

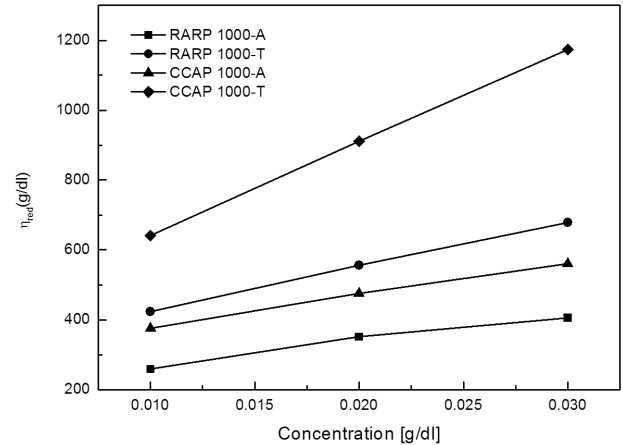


Figure 4. Variation of reduced viscosity according to various processing parameters.

서 나타났다. 즉 소수성 코어가 가교되지 않은 RARP의 경우, 가장 낮은 농도인 9 wt%의 α -tocopherol도 담지하지 못하고 나노침전법 공정 중에서 응집되거나 석출되었다. 이러한 결과가 나타난 것은 소수성 코어가 가교되지 않은 RARP 사슬들이 소수성 물질이며 액상인 α -tocopherol과 동일한 용매 내에서 혼합된 상태에서 물과 접촉하게 되면, 용매 교환과정 중에서 불안정하게 되어서 자가 조립 구조를 형성하지 못하고 파괴됨으로써 소수성 유용물질인 α -tocopherol을 담지한 나노입자를 형성할 수 없는 것으로 생각된다. 즉 소량이지만 소수성 액상인 α -tocopherol이 RARP와 혼합되어있으면, 용매 교환 과정에서 RARP 사슬들이 자가 조립되어 나노입자를 형성하는 것을 방해하여서 안정한 나노입자들을 형성하지 못하는 것으로 생각된다. 그러나 CCAP의 경우, 전술한 것처럼, 소수성 세그먼트가 화학적으로 가교되어 견고한 일종의 “Fishing net” 형태를 이루고 있어서, 소수성 물질이며 액상인 α -tocopherol과 혼합된 상태에서 용매 교환이 발생하여도 자가 조립 구조를 형성할 수 있으므로, 높은 담지효율로 매우 많은 양의 α -tocopherol을 담지한 나노입자를 형성할 수 있는 것으로 생각된다. CCAP 나노입자들이 소수성 물질 담지시 예상되는 메커니즘을 모식적으로 Scheme 2에 나타내었다.

흥미로운 것은 PCL, PLGA, Chitosan, Cyclodextrin 등과 같은 일반적인 양친성 고분자를 이용하여서 α -tocopherol을 담지하는 경우에는 대부분 양친성 고분자 나노입자에 대해서 2-16%의 α -tocopherol만을 담지시킬 수 있지만[32-34], CCAP 나노입자들은 매우 높은 담지 효율(90% 이상)로 CCAP 1000 나노입자에 대해서 33 wt%까지 담지하고 70 nm 정도의 안정한 나노입자들을 물속에서 형성시킬 수 있었다. 이렇게 높은 담지 효율과 담지량을 나타내는 것은 CCAP의 특이한 나노구조로 해석될 수 있다. 즉 Scheme 2에 나타난 것처럼 유기 용매에 화학적으로 가교된 구조로 존재하다가 유기 용매가 수상으로 확산하는 과정에서 구조가 파괴되지 않고 마치 그물에 고기를 가두는 것처럼 α -tocopherol을 봉입할 수 있기 때문에, 매우 효과적으로 소수성 물질을 담지하면서도 물속에서 안정한 나노입자를 형성하는 것으로 생각된다.

동일한 CCAP 1000을 사용한 경우에는 소수성 유용 약물인 α -tocopherol의 담지 효율도 상대적으로 극성이 낮은 THF를 사용하였을 때 가장 높았으며(Table 4), 가교된 소수성 코어의 분자량이 클수록 고함량의 α -tocopherol을 담지 할 수 있었다. 특히, 담지량이 33

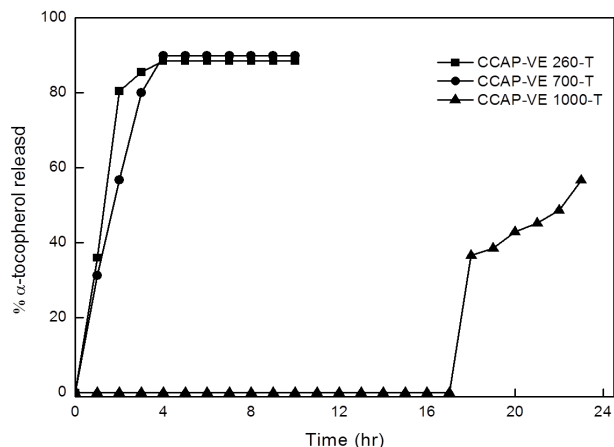


Figure 5. Release behaviors of α -tocopherol loaded CCAP nanoparticles prepared using various molecular weight of PPO.

wt%로 인 경우, 아세톤과 에탄올을 용매로 사용하여 제조된 CCAP 1000-A, CCAP 1000-E들은 α -tocopherol을 담지하지 못하고 구조가 파괴되었지만, THF를 용매로 사용하여 제조된 CCAP 1000-T는 안정하고, 높은 α -tocopherol 담지량을 보였다. Figure 4에 나타난 것처럼, CCAP 1000 사슬들은 THF에서 가장 많이 팽창된 구조를 형성하므로 소수성 용용물질인 α -tocopherol이 소수성 코어 부분에 가장 많이 함유할 수 있으므로 가장 높은 α -tocopherol 담지량을 가지는 것으로 생각된다. 또한, 동일한 용매(THF)에서 CCAP 260과 CCAP 1000의 α -tocopherol 담지량을 비교하면, 소수성 세그먼트 분자량이 상대적으로 큰 CCAP 1000이 더 높은 α -tocopherol 담지량을 나타내며, CCAP 260은 단지 9 wt%의 α -tocopherol만을 담지할 수 있었다. 이러한 결과는 소수성 세그먼트의 분자량이 상대적으로 큰 CCAP 1000이 동일한 용매 내에서 더 큰 소수성 도메인을 가지고 있으므로 소수성 물질인 α -tocopherol을 더 효과적으로 담지하는 것으로 생각된다.

CCAP 1000을 사용하여서 나노침전법을 통하여서 α -tocopherol 담지된 CCAP 나노입자의 Cryo-TEM 이미지는 Figure 3에 나타내었다. 예상했던 바와 같이, 고분자 나노입자는 구형의 모습을 하고 있었으며, 코아 가교된 소수성 도메인 안에 소수성 유용 약물이 담지된 것으로 생각된다.

3.4.2. α -tocopherol의 방출거동

α -tocopherol의 표준검량곡선을 작성하기 위해 α -tocopherol의 최대 흡광도를 측정된 결과 275 nm에서 관찰되었으며, 상관계수(correlation coefficient, r)는 0.99866이었다. 선형관계는 정략적으로 다음 식으로 설명된다. Buffer solution (pH 3)에서 $Y = 0.35469 + 0.00196c$ 이고 여기서 Y는 흡광도, c는 α -tocopherol의 농도이다. 이렇게 해서 얻은 표준검량곡선을 바탕으로 일정시간마다 시료를 채취해서, 측정된 용액의 흡광도를 근거로 측정된 방출된 α -tocopherol의 농도는 Figure 5와 같이 누적 약물 방출 경향을 나타내었다. CCAP 나노입자의 방출 거동을 보면, CCAP 나노입자 제조에 사용된 소수성 세그먼트의 분자량에 따라 좌우되었다. 즉 분자량이 가장 작은 소수성 세그먼트를 사용하여서 제조된 CCAP 260-T의 방출 속도가 상대적으로 빠르며 초기 8 h 내에 담지된 α -tocopherol이 대부분 방출되었다. 그러나 담지효율 및 담지량 결과와 마찬가지로, 상대적으로 큰 소수성 세그먼트를 가지고 있는 CCAP 1000을 사용하여서 제조된 CCAP

1000-T 나노입자에서 α -tocopherol이 매우 천천히 방출되었다. 즉 CCAP 1000-T의 경우, 17 h까지는 α -tocopherol이 방출되지 않다가 17 h 이후부터 서서히 방출되었다. 이러한 결과는 CCAP 1000이 상대적으로 큰 소수성 세그먼트를 가지고 있으므로 α -tocopherol과 더 큰 친화력을 가지고 있으므로 효과적으로 담지하고 있어서 오랜 시간동안 물속으로 방출되는 것으로 방지할 수 있는 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 계면활성제나 분산제와 같은 첨가제를 사용하지 않고 단순한 나노침전법 공정으로도 33 wt%의 높은 담지량과 97%의 담지 효율로 소수성 유용약물인 α -tocopherol이 담지된 나노 입자들을 제조할 수 있었다. 기존의 연구와 비교하여서 상대적으로 높은 담지율과 담지 효율을 나타내는 것은 유용 약물 담지에 사용된 CCAP 나노입자들이 물리 화학적으로 매우 견고한 구조를 가지고 있기 때문인 것으로 생각된다. 사용된 RARP들은 가교 중합을 수행하기 전에는 일반적인 양친성 물질과 유사한 구조를 가지고 있으므로 많은 양의 소수성 물질을 담지하지 못하고 나노침전 공정 중에서 파괴되지만, 가교중합을 통해서 소수성 세그먼트들이 서로 화학적으로 결합된 CCAP는 용매 내에서 일종의 Nano-gel과 같은 형태로 존재하므로, 용매-비용매 교환이 급격하게 발생하는 나노침전 공정 중에서도 파괴되지 않고 다량의 액상 소수성 물질을 매우 효과적으로 담지할 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

CCAP의 소수성 물질 담지 성능과 안정성은 용매 내에서 Nano-gel 형태로 존재하는 CCAP의 Hydrodynamic volume이 클수록 상대적으로 우수하였고, 나노침전 공정 중에서 용매 교환이 천천히 발생할수록 안정하였다. 따라서 CCAP의 소수성 세그먼트의 분자량이 클수록, 용매의 극성이 낮을수록, 더 큰 부피를 가지는 Nano-gel이 형성이 되고 용매 교환이 상대적으로 느리게 발생하므로, 액상의 소수성 약물을 효과적으로 담지할 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

감 사

2015년도 강원대학교 대학회계 학술연구구조성비로 연구하였음(관리번호 : 201510052).

References

1. C. P. Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, and F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2**, 8-21 (2006).
2. L. N. Bell, *Stability testing of nutraceuticals and functional foods*, In: *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, Wildman REC (ed), CRC Press, New York, 501 (2001).
3. R. C. Metha, B. C. Thanoo, and P. P. Deluca, Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(D,L-lactide-co-glycolide), *J. Controlled. Release*, **41**, 249-257 (1996).
4. R. Brigelius-Flohe and M. G. Traber, Vitamin E: function and metabolism, *FASEB Journal*, **13**, 1145-1155 (1999).
5. S. H. Yoo, Y. B. Song, P. S. Chang, and H. G. Lee, Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its

- controlled release properties, *Int. J. Biol. Macromol.*, **38**, 25-30 (2006).
6. K. A. Jhonson, Preparation of peptide and protein powders for inhalation, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **26**, 3-15 (1997).
 7. S. J. Park, Y. J. Yang, J. R. Lee, and H. B. Lee, Preparation and Characterization of Biodegradable Poly(ϵ -caprolactone) Microcapsules Containing Erythromycin by Emulsion Solvent Evaporation Technique, *Polymer(Korea)*, **26**, 326-334 (2002).
 8. B. O'Donnell and J. W. McGinity, Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Drug Deliv. Rev.*, **28**, 25-42 (1997).
 9. S. Takada, Y. Yamagata, M. Misaki, K. Taira, and T. Kurokawa, Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique, *J. Controlled Release*, **88**, 229-242 (2003).
 10. U. Bilati, E. Allemann, and E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 67-75 (2005).
 11. D. Q. Guerrero, E. Allemann, H. Fessi, and E. Doelker, Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from performed polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 1113-1128 (1998).
 12. H. S. Yoo, H. K. Choi, and T. G. Park, Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, **90**, 194-201 (2001).
 13. U. Edlund and A.-C. Albertsson, Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery, Albertsson, A.-C.(Ed), 157, 67, Degradable Aliphatic polyesters, *Advances in Polymer Science*, Springer-Verlag, Berlin (2002).
 14. N. B. Viswanathan, S. S. Patil, J. K. Pandit, A. K. Lele, M. G. Kulkarni, and R. A. J. Mashelkar, Morphological changes in degrading PLGA and PLA microspheres: implications for the design of controlled release system, *J. Microencapsul.*, **18**, 783-800 (2001).
 15. J. S. Chawla and M. M. Amiji, Int., Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen, *J. Pharm.*, **249**, 127-138 (2002).
 16. C. R. Miller, R. Vogel, P. P. T. Surawski, S. R. Corrie, A. Ruhmann, and M. Trau, Biomolecular screening with novel organosilica microspheres, *Chem. Commun.*, **14**, 4783-4785 (2005).
 17. Y. Yang, C. Hua, and C. M. Dong, Synthesis, Self-Assembly, and In Vitro Doxorubicin Release Behavior of Dendron-like/Linear/Dendron-like Poly(ϵ -caprolactone)-b-Poly(ethylene glycol)-b-Poly(ϵ -caprolactone) Triblock Copolymers, *Biomacromolecules*, **10**, 2310-2318 (2009).
 18. E. Chiellini, E. E. Chiellini, F. Chiellini, and R. Solaro, Targeted Administration of Proteic Drugs. I. Preparation of Polymeric Nanoparticles, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **16**, 441-465 (2001).
 19. A. Rosler, G. W. M. Vandermeulen, and H. A. Klok, Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **53**, 95-108 (2001).
 20. K. Letchford and H. Burt, Eur., A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, *J. Pharm. Biopharm.*, **65**(3), 259-269 (2007).
 21. F. Quaglia, L. Ostacolo, G. De Rosa, M. I. La Rotonda, M. Ammendola, G. Nese, G. Maglio, R. Palumbo, and C. Vauthier, Nanoscopic core-shell drug carriers made of amphiphilic triblock and star-diblock copolymers, *Int. J. Pharm.*, **324**(1), 56-66 (2006).
 22. G. A. Hussein and W. G. Pitt, Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **60**, 1137-1152 (2008).
 23. J. X. Zhang, K. Ellsworth, and P. X. Ma, Hydrophobic pharmaceuticals mediated self-assembly of β -cyclodextrin containing hydrophilic copolymers: Novel chemical responsive nano-vehicles for drug delivery, *J. Controlled Release*, **145**, 116-123 (2010).
 24. P. J. Gandhi and Z. V. P. Murthy, Solubility and Crystal Size of Sirolimus in Different Organic Solvents, *J. Chem. Eng. Data*, **55**, 5050-5054 (2010).
 25. L. Philippe, L. Sylviane, B. Amelie, G. Ruxandra, R. Wouter, B. Gillian, and V. Christine, Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, *Int. J. Pharm.*, **344**, 33-43 (2007).
 26. J. Y. Kim, D. H. Shin, K. J. Ihn, and C. W. Nam, Synthesis of Magnetic Nanocomposite Based on Amphiphilic Polyurethane Network Films, *Macromol. Chem. Phys.*, **203**, 2454-2462 (2002).
 27. J. Y. Kim, D. H. Shin, and K. J. Ihn, Synthesis of Poly(urethane acrylate-co-styrene) Films Containing Silver Nanoparticles by a Simultaneous Copolymerization/in situ Electron Transfer Reaction, *Macromol. Chem. Phys.*, **206**, 794-801 (2005).
 28. J. Y. Kim, H. M. Kim, D. H. Shin, and K. J. Ihn, Synthesis of CdS Nanoparticles Dispersed Within Poly(urethane acrylate-co-styrene) Films Using an Amphiphilic Urethane Acrylate Nonionomer, *Macromol. Chem. Phys.*, **207**, 925-932 (2006).
 29. J. Maia and M. Santana, The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process, *Brazilian J. Chem. Eng.*, **21**, 1-12 (2004).
 30. J. Y. Kim, J. Wainaina, J. H. Kim, and J. K. Shim, Use of Polymer Nanoparticles as Functional Nano-Absorbents for Low-Molecular Weight Hydrophobic Pollutants, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **7**, 4000-4004 (2007).
 31. J. Y. Kim, J. Wainaina, and J. S. Na, Synthesis of amphiphilic silica/polymer composite nanoparticles as water-dispersible nano-absorbent for hydrophobic pollutants, *J. Ind. Eng. Chem.*, **17**, 681-690 (2011).
 32. I. G. Zigoneanu, C. E. Astete, and C. M. Sabliov, Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: synthesis, characterization, and controlled release, *Nanotech.*, **19**, 105606-105613 (2008).
 33. T. B. Shea, D. Ortiz, R. J. Nicolosi, R. Kumar, and A. C. Watterson, Nanosphere-mediated delivery of vitamin E increases its efficacy against oxidative stress resulting from exposure to amyloid beta, *J. of Alzh. Dis.*, **7**, 297-301 (2005).
 34. Y. J. Byun, J. B. Hwang, S. H. Bang, D. Darby, K. Cooksey, P. L. Dawson, H. J. Park, and S. Whiteside, Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles, *LWT-Food Sci. and Tech.*, **44**, 24-28 (2011).