

초임계 반응매 침전법에 의한 라이소자임이 내포된 폴리감마글루탐산의 미세입자 제조 및 특성

이동일 · 능 윤 · 성문희* · 박일현†

금오공과대학교 고분자공학과, * 국민대학교 화학과

(2007년 2월 8일 접수, 2007년 3월 20일 채택)

Preparation and Characterization of Microparticles of Poly(γ -glutamic acid) Containing Lysozyme by means of Supercritical Anti-Solvent (SAS) Precipitation Process

Dong Il Lee, Yun Ling, Moon Hee Sung*, and Il Hyun Park†

Department of Polymer Science and Engineering,

Kumoh National Institute of Technology, Gumi, Gyungbuk 730–701, Korea

* Department of Chemistry, Kookmin University, Seoul 136–702, Korea

(Received February 8, 2007; accepted March 20, 2007)

초록 : 라이소자임이 내포된 폴리감마글루탐산(PGA)의 서브-마이크론 크기의 미세입자를 압력, 온도, 노즐내 경, 농도 등을 변화시켜가면서 초임계 반응매 침전법(SAS)으로 제조하였다. SAS법의 전체적인 결과는 압력이 클수록, 온도가 낮을수록, 노즐 내경이 작을수록, 농도가 묽을수록 작은 입자가 얻어졌다. FT-IR로 분석한 결과, 본래 초기의 PGA:라이소자임=50 : 50의 조성비는 SAS 공정을 거치면서 최종 분말 입자 내에서는 33 : 67로 변화하였다. 이것은 PGA가 라이소자임보다 탄산가스/디메틸설폭사이드(DMSO) 혼합용매에 더 높은 용해도를 가지기 때문인 것으로 추측된다. 또 이러한 용해도 특성 때문에 생성 입자는 핵-겉질 구조를 갖고 있으며, 핵 부분은 라이소자임이 구성하는 것으로 여겨진다. 생성된 분말 입자 내에는 7.8×10^{-3} wt%의 농도로 미량의 DMSO가 잔존하고 있음이 밝혀졌다.

Abstract : The sub-micron particles of poly(γ -glutamic acid) (PGA) containing lysozyme have been prepared using supercritical antisolvent (SAS) precipitation process at various experimental conditions such as pressure, temperature, inner diameter of nozzle, and concentration. As overall results of the application of SAS process to this system, the smaller size powder has been produced as (i) increasing pressure, (ii) decreasing temperature, (iii) decreasing the inner diameter of nozzle, and (iv) decreasing the concentration of PGA and lysozyme. It is found by means of FT-IR analysis that during SAS process, the composition has changed from the original composition of PGA : lysozyme=50 : 50 into PGA : lysozyme=33 : 67 at final product powder. It means that PGA has higher solubility for the mixed solvent of carbon dioxide and dimethyl sulfoxide (DMSO). Due to such difference of solubility, this particle forms the core-shell structure of which the core consists mainly of lysozyme. It is also found that the residual DMSO amount of 7.8×10^{-3} wt% exists inside the powder.

Keywords : supercritical anti-solvent, poly(γ -glutamic acid), lysozyme, microparticle, core-shell structure.

서 론

초임계 유체를 이용하여 미세 입자를 제조하는 방법들 중의 하나로써 초임계 유체가 용질을 녹일 수 없는 경우에는 초임계 반응매 침전법(supercritical anti-solvent precipitation, SAS)이 주로 사용된다.¹⁻⁵ 이 방법에서는 일반 유기용매에 용질을 우선 녹인 뒤 초임계 유체를 반응매(anti-solvent)로 사용함으로써 용질을 침전

시켜 입자를 만드는 법이다. 이 SAS법은 침전 유도 용매로 초임계 유체를 사용하므로 용액에서 침전물이 쉽게 생성되고, 최종적으로 매우 건조한 입자들이 얻어질 수 있다. 특히 이때 초임계 유체와 유기용매와의 상호 작용 및 입자형성 과정에 대한 이론도 상당히 밝혀졌기 때문에 입자의 크기를 온도와 압력을 이용하여 쉽게 조절할 수 있다는 것이 SAS법의 커다란 장점이다.^{1,2} 주로 SAS법에서는 초임계 유체로 탄산가스를 사용하는데 이러한 이유는 가격이 저렴하고 독성이 없기 때문이다.

최근에 이러한 SAS법으로 만들어진 미세 입자들의 화학종들을

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ilhyun@kumoh.ac.kr

조사해 보면, Gao 등은 Red Lake C 라는 염료를 아세톤에 녹인 뒤 SAS법으로 구형 입자를 제조하였는데 특히 노즐의 내경을 5~500 μm 로 변화시킬 때 1 μm 이하의 매우 미세한 파우더를 만들 수 있었다고 보고하였다.⁴ 또한 Reverchon 등은 Disperse Red 60라는 염료의 미세입자를 제조하였는데,⁶ 이때 최종 생성 입자의 크기는 유체와 용매간의 혼합 비, 농도, 온도 등에 의하여 조절될 수 있다고 보고하였다. 이 실험에서 주로 수백 nm의 구형 입자를 얻었지만 일부 조건에서는 바늘과 같은 긴 결정 형태도 얻어질 수 있다고 보고하였다.

Kim 등은⁷ SAS법의 일종인 초임계 유체에 의한 용액분산촉진 (solution enhanced dispersion by supercritical fluid, SEDS) 공정을 사용하였는데 이 기술은 coaxial nozzle을 통해 단백질 용액과 이산화탄소를 침전조 속으로 동시에 주입하는 것이다. 이는 단백질 용액과 이산화탄소를 동시에 분사, 혼합해 주기 때문에 빠른 과포화와 입자 핵형성으로 인한 미세하고 빠른 입자 형성의 장점이 있다. 모델 단백질 약물로 라이소자임(lysozyme)을 폐 흡입형 제제에 적합한 입자로 제조하기 위하여 온도, 압력, 용매조성과 같은 공정변수가 생성된 입자의 크기 및 구 형성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.⁷ 또한 Park 등의 2007년 논문에서는⁸ SAS 장치를 사용하여 fluconazole의 입자를 온도 60~80 $^{\circ}\text{C}$, 압력 80~160 bar에서 디클로로메탄(dichloromethane), 아세톤 또는 에탄올 등의 용매를 사용하여 재결정 입자를 만든 후 물성을 DSC(differential scanning calorimetry), TGA(thermo gravimetry analysis), 파우더 XRD(powder X-ray diffraction), FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy), SEM(scanning electron microscopy) 등의 장치를 사용하여 분석하였다. Vatanara 등은⁹ 초임계 탄산가스 내에서 의약품의 일종인 salbutamol sulphate의 미세 입자를 제조하였고 일부에서는 침상 모양의 입자도 발견되었으며, 입자의 크기는 노즐의 내경 및 주입되는 용액의 속도에 매우 의존한다는 것을 밝혔다. Tsivintzelis 등은¹⁰ SAS 장치를 사용하여 poly(L-lactic acid) (PLLA)의 입자를 제조하였으며 압력이 증가할수록 온도가 감소할수록 입자의 크기가 작아지는 것을 보고하였고, Tenorio 등은¹¹ 의약품인 ampicillin의 입자를 제조하였는데 특히 사용되는 용매의 종류와 압력에 따라 입자의 크기와 분포가 바뀌어 질 수 있고, 압력이 증가할수록 구형의 입자가 늘어났다고 보고하였다.

최근의 이러한 입자 제조에 관한 연구동향을 보면 마이크로 크기에서 한 단계 더 작은 sub-micro, 즉 나노 크기의 입자를 만드는 데 초점이 모아지고 있으므로, 본 연구에서는 Gupta 등의^{12,13} 연구 보고에 근거하여 초음파 발진기를 고압의 SAS 장치에 부착시켰다. 이 장치는 초임계 유체 상태에서 규칙적인 진동을 주어 초임계 유체에 들어간 액체들이 보다 미세하게 액체 입자로 분산되도록 하여 그 결과로 얻어진 고체 입자의 직경을 작게할 수 있고 입자의 분포도도 좁아질 수 있다는 것이다. 이와 같이 초음파 발진기가 부착된 SAS 법은 습식방법으로 생산하는 공정보다 친환경적이고, 크기 조절 및 미세 입자 제조도 가능하고, 용매 회수가 용이하다는 점에서 보다 효율적인 방법이라고 말할 수 있을 것이다. Gupta의 논문에서는 초음파 부착 SAS 장치가 배치(batch)식으로 디자인되었는데¹³ 본 연구에서는 연속식 SAS로 개조하여 자체 제작하였고

이를 이용하여 입자 제조에 사용하였다는 것이 Gupta와의 차별화된 점이다.

또한 본 연구에서는 이러한 SAS 장치를 이용하여 라이소자임(lysozyme)이 내포된 폴리감마글루탐산(poly(γ -glutamic acid): PGA) 입자 제조에 적용하여 보았다. 여기서 라이소자임은 단백질계의 의약품 모델 화학종으로 사용되었고 PGA는 이러한 라이소자임을 둘러싸고 지지하는 물질로 사용하였다. 현재까지 보고된 결과로는 단일 라이소자임 물질만의 입자 제조는 SAS법에 의하여 비교적 많은 연구가 진행되어 왔으나^{7,13} 초임계법에 의한 라이소자임이 내포된 고분자 입자 제조는 최근에 들어와서 본격적으로 연구되기 시작하였다. 한 예로써 2005년에 Shakesheff 등은¹⁴ 건조된 라이소자임 분말과 가소화시킨 poly(lactic acid) (PLA)를 초임계 탄산가스에서 혼합 후 분무함으로써 라이소자임을 핵으로 PLA를 껍질로 구성된 입자를 만들었으나 그 크기는 10~300 μm 로써 나노입자로 볼 수는 없겠다. 특히 순수한 PGA와 다른 단백질을 함께 이용하여 핵-껍질(core-shell) 구조의 나노 입자의 제조에 관한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다. 여기서 참고로 PGA는 식용이 가능한 단백질 고분자로서 청국장 등의 주성분인 생물고분자이므로 인체에 전혀 해가 없다. 그러므로, 본 연구의 중요한 응용은 라이소자임을 단백질계의 의약품으로 대체하여 약제를 제조한다면 우리 신체에는 PGA를 분해하는 효소가 있으므로 의약품이 서서히 방출될 수 있는 DDS(drug delivery system)의 매우 좋은 하나의 예가 될 수가 있겠다. 따라서 초음파 장치가 부착된 SAS 법에 수반된 여러 공정 파라미터들을 조합하여 최적의 입자 제조 및 제조된 입자 내에서의 두 성분의 구성비 및 입자 구조를 밝히는 것이 이 논문의 주된 목적이다.

실 험

재료. 본 실험에서 약물을 감싸주는 역할을 하는 지지체로써 사용된 폴리감마글루탐산(poly(γ -glutamic acid); PGA, Bio-Readers)은 식용 가능한 고분자로서 분자량은 256000 g/mol 이었고, 단백질 계통의 의약품의 모델 화합물로서 라이소자임(lysozyme, Sigma)이 사용되었으며 이에 대한 자세한 물질 및 용해도는 Table 1에 기록하였다. PGA와 라이소자임을 모두 용해시키며 동시에 초임계 탄산가스에서 커다란 팽창도를 갖고 있는 용매로서 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO, Aldrich)가 실험에 사용되었다. 다음으로 라이소자임의 생체활성(bioactivity) 실험 목적으로 사용된 박테리아로는 micrococcus lysodeikticus

Table 1. The Solubility of Two Solutes in Two Solvents at 25 $^{\circ}\text{C}$ and Their Morphology in Untreated State

Solute	MW (g/mol)	Morphology*	Solubility in DMSO at 25 $^{\circ}\text{C}$	Solubility in Water at 25 $^{\circ}\text{C}$
Poly(γ -glutamic acid)	256000	Spherical particle	○	×
Lysozyme	14000	Irregular flat crystal	○	○

○ : dissolved × : non-dissolved. * It was shown in Figure 1.

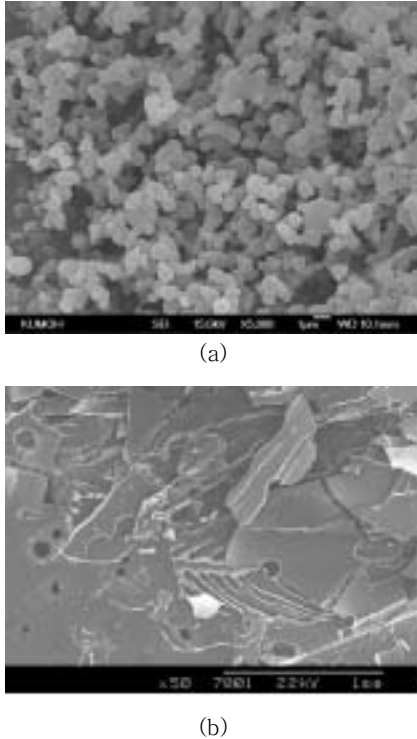


Figure 1. Original SEM images of two solutes of (a) poly(γ -glutamic acid) and (b) lysozyme in untreated state.

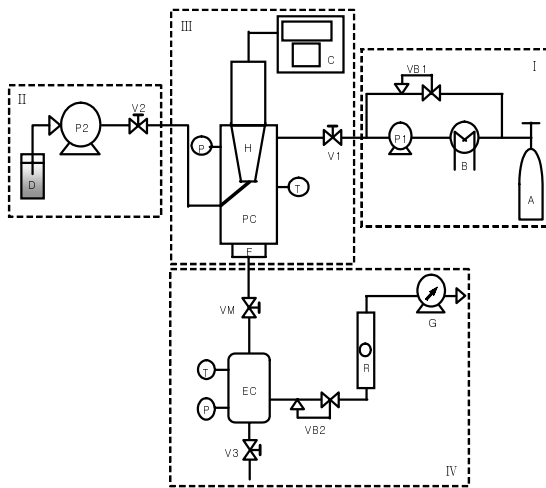


Figure 2. Schematic representation of our SAS apparatus. A, CO₂ siphon tank; B, cooler; C, ultrasonic generator; D, polymer solution; F, steel frit; G, wet gas test meter; H, horn of ultrasonicator; P, pressure gauge; T, temperature gauge; R, rotameter; P1 and P2, high pressure liquid pumps; VB1 and VB2, back pressure regulator; V1, V2 and V3, control valves; VM, micro-metering valve; PC, precipitation chamber; EC, expansion chamber.

(Sigma)가 문헌에 따라 선택되었다.^{13,22}

두 시료의 본래의 형태에 대한 SEM 사진은 Figure 1에서 보여 주는 것 같이 PGA는 서로 엉겨 붙어 있는 구형 모양이나 라이소자임은 판상의 결정 모양이었다.

장치. SAS 장치가 4 종류의 주요 부분으로 구성되고 있음을 Figure 2에서 보여주고 있다. 우선 part I에서는 이송을 위하여 CO₂를 냉각기로 액화시키고, 고압 펌프(Lab Alliance: Series II)를 이용하여 액체의 이동 속도를 조절한다. 고압 펌프에 의해 CO₂가 part III의 침전실(PC)내로 들어간 후 초임계 유체 상태가 되도록 온도와 압력이 조절되며, 이때 침전실의 압력은 back-pressure 조절기(VB1)로 원하는 압력이 일정하게 유지되도록 한다. Part I은 용질 시료가 녹아있는 액체 용액을 침전실로 주입시키는 부분이다. 역시 같은 종류의 고압 펌프를 사용하여 가는 바늘 모양의 노즐을 통하여 침전실로 액체 시료를 보내며, 이 침전실(PC)에 부착된 초음파 발진기의 세기는 초음파 발진 조절기(Kodo Technic Research)에 의해 조절된다. CO₂에 의해 수 100% 이상 부피 팽창을 한 유기 용매는 미세 고체 입자를 만든 뒤 탄산가스와 함께 steel frit(일종의 필터)을 통하여 part IV의 낮은 압력의 팽창실(EC)로 빠져나가며, 사용된 유기 용매는 팽창실 바닥에 회수 목적으로 고이게 되고, 탄산가스만 대기 중으로 내보내지게 된다. 이때 SAS법에 의해 생성된 미세입자 분말들을 침전실(PC) 바닥 및 벽면에 모여지게 된다. 침전실과 팽창실의 압력과 온도는 모두 디지털 압력계(Setra C206)로, 온도는 Pt 100 Ω 센서로 측정하였다. 이때 침전실의 온도를 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 이내에서 조절 유지하기 위하여 항온조의 물이 침전실 외벽을 순환하도록 디자인 되었다.

시료 주입 및 건조. 시료를 녹인 액체 용액은 바늘형 노즐을 통해 침전실로 들어가며, 이 때 노즐의 끝을 초음파 발진기 표면에 약하게 접촉시킴으로써 용액을 미세 분산화시킬 수 있었고, 용액의 분사 속도는 기본적인 흐름 속도 약 0.5 mL/min로 30~45분 동안 주입하였다. 이때 시료 용액의 주입이 끝난 후에도 완전히 건조된 입자를 얻기 위해 CO₂를 90분 이상 계속 흘려보내 잔존의 유기용매를 최대한 제거하여 주었다.

입자의 크기 분석 및 조성 분석. 제조된 입자 시료는 주사형 전자 현미경(SEM, JEOL 6500F)으로 입자를 측정하였고, 이때 입자의 크기 분석을 용이하게 하기 위하여 상 해석 소프트웨어(TDI Scope eyes, Techsan)를 사용하였다. 또한 제조된 입자 내에서 PGA와 라이소자임 혼합물의 조성비는 FT-IR(JASCO 300E)를 사용하였으며 이 방법의 타당성은 SAS법으로 얻은 미세 입자를 다시 증수소로 치환된 DMSO에 녹여 NMR(Bruker DPX-200 MHz)로 재차 분석하였다.

라이소자임의 생체활성(Bioactivity) 측정. Micrococcus lyso-deikticus 박테리아 용액은 phosphate 완충용액(pH=7) 90 mL와 NaCl(1 wt%) 10 mL에 박테리아 20 mg의 비율로 섞어 만들었으며, 라이소자임 용액은 같은 완충용액(pH=7) 100 mL에 라이소자임 4 mg을 녹여 만들며, 박테리아 용액 2.5 mL에 라이소자임 용액 0.25 mL를 혼합한 뒤 UV-가시광선 흡광계(Ocean Optics, DH-2000)를 이용하여 파장 450 nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다.^{13,22}

파우더 안의 DMSO 잔량조사. 미세 입자 안에 존재하는 DMSO의 잔량은 flame ionization detector(FID) 감지기가 장착된 모세관 기체 크로마토그래피(Shimadzu GC-2010)로 분석하였다. 운반기체(carrier gas)로 수소가스가 사용되었으며, 이때 컬럼(Agilent, DB-5 capillary column) 내의 유속은 1.53 mL/min

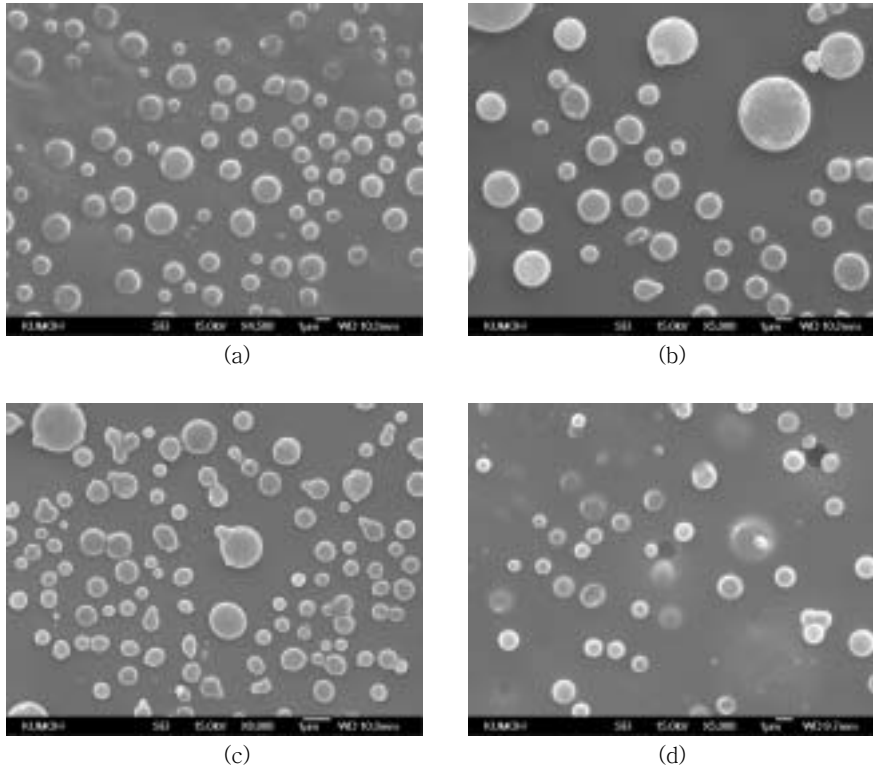


Figure 3. SEM images showing the effect of pressure and temperature at C=0.5 wt% and PGA:Lysozyme=5:5. The operating conditions are (a) 80 bar at 30 °C, (b) 80 bar at 35 °C, (c) 100 bar at 30 °C, and (d) 100 bar at 35 °C.

으로 하였다.

결과 및 토론

압력과 온도에 대한 영향. 문헌에 따르면 입자의 크기는 압력과 온도에 가장 많은 영향을 받는다고 보고되었는데,^{1,10,15-17} 본 실험에서는 압력은 80 bar와 100 bar, 온도는 30 °C와 35 °C를 각각 선정해서 이들의 조합인 80 bar와 30 °C, 80 bar와 35 °C, 100 bar와 30 °C, 100 bar와 35 °C의 네 가지 조건에서 실험을 행하였다. 여기서 80 bar와 30 °C의 실험 조건은 엄밀히 말해 초임계 조건이 아니라 탄산가스의 임계점 부근이라고 할 수 있겠다. 이 실험 조건은 정확히 초임계 조건이 아니더라도 입자 생성이 가능한가를 조사하기 위하여 선택하였다. 우선 압력이 증가할수록, 온도가 낮아질수록, 입자 크기가 작아짐을 알 수 있는데 문헌에서 보고한 바와 비슷한 경향을 보여 주고 있다.^{2,10,15-17} 이러한 이유는 압력이 증가할수록 또는 온도가 낮아질수록 DMSO의 팽창도가 증가하고,^{1,18,19} 결국 팽창도가 커질수록 유기용매 방울은 미세하게 깨어져 분산되는 것이다. 이와 같이 온도와 압력에 따른 입자 크기의 변화 양상은 기존의 대부분의 실험적 경향과 좋은 일치를 보여 주고 있다. 참고로 Yeo 등의 논문에 의하면¹⁹ CO₂ 내에서 압력에 따른 DMSO의 팽창도 실험 결과를 살펴보면, 온도 35 °C, 압력 70 bar에서는 약 150% 부피 팽창이, 같은 온도 75 bar에서는 370% 정도로 부피 팽창이 기하급수적으로 증가함을 보여 주고 있다. 따라서 그들이 보고한 도표에 의하면^{1,19} 우리 실험 조건에서의 DMSO 부피 팽창도는 80 bar에서는 적어도 600% 이상, 100 bar

Table 2. Particles' Diameter and Deviation Prepared at Various Operating Conditions

Temp. (°C)	Pressure (bar)	Needle Dia. (mm)	C (wt%)	Particle Dia. (μm)	Deviation (±μm)
30	80	0.26	0.5	1.22	0.17
35	80	0.26	0.5	1.52	0.31
30	100	0.26	0.5	0.65	0.12
35	100	0.26	0.5	0.95	0.11
30	100	0.13	0.7	1.35	0.26
30	100	0.26	0.7	1.61	0.24
30	100	0.51	0.7	2.00	0.40
35	100	0.26	0.3	0.72	0.22
35	100	0.26	0.5	1.01	0.42
35	100	0.26	0.7	1.12	0.38
35	100	0.26	1.0	1.14	0.32

에서의 1000% 이상 될 것으로 예측된다. 즉 Kordikowski 등이 발표한 논문에서¹⁸ 제시한 이론적 계산에 의하면 DMSO의 CO₂ 내에서의 팽창도는 압력이 증가할수록, 온도가 감소할수록, 팽창이 잘 일어나며 커다란 팽창은 결국 유기 용매의 미세 분산을 초래하면서 녹아 있는 용질이 미세 입자로 만들어 질 수 있는 것이다. 특히 온도와 압력이 불안정하여 주입된 용액이 초임계 CO₂와 혼합이 충분히 이루어지지 않으면 용액 자체가 그대로 침전될 바닥에 젖어 있는 상태로 나타나는 경우를 간혹 볼 수 있었다.

Figure 3에서 보여 주듯이 앞에서 언급한 온도, 압력 조건하에서 구형의 입자들이 잘 만들어지고 있으며, 다양한 공정 조건에서 만

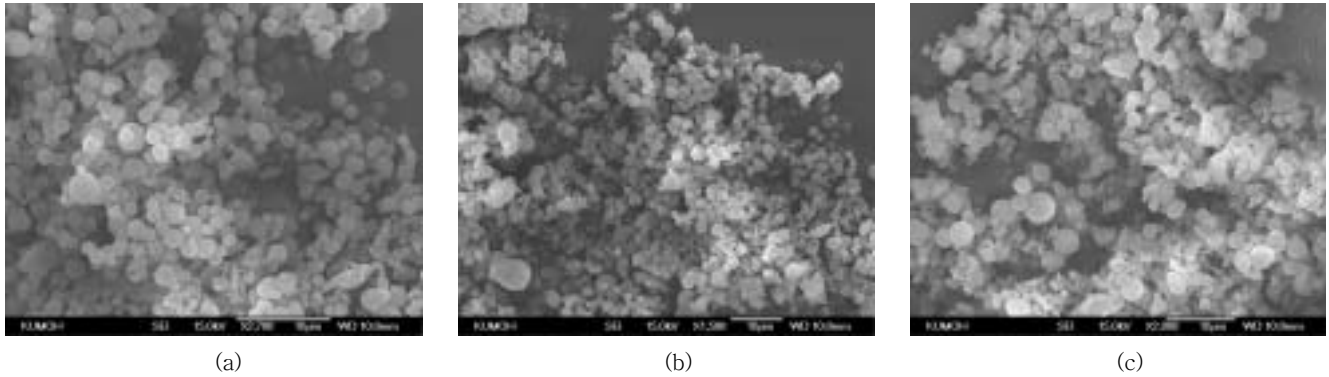


Figure 4. SEM images of SAS products prepared with various needle inner diameters. (a) 0.13 mm, (b) 0.26 mm, and (c) 0.51 mm.

들어진 모든 입자의 크기 및 편차에 대한 정보는 Table 2에 실었다. Figure 3과 Table 2를 살펴보면, 압력 80 bar에서 온도 5 °C 상승은 입자 크기 25%, 100 bar에서 온도 5 °C 상승은 45% 정도의 입자 크기의 증가를 초래하였다. 그러나 압력이 80 bar에서 100 bar로 압력 상승은 각각의 온도에서 대략 40% 정도의 입자 크기의 감소를 가져왔다. 이상의 네 가지 실험 결과를 종합하여 볼 때 초입계 조건뿐만 아니라 입계점 부근에서도 입자 생성이 가능하였고, 입자의 크기 조절은 온도와 압력만의 조정으로도 일정 범위 내에서는 매우 용이하게 할 수 있었고, 전반적인 입자의 크기 편차는 최대 크기의 입자와 최소 크기의 입자의 크기 차이가 ~1 μm 내외인 것으로 나타났다.

노즐 내경의 영향. 외경이 매우 굵은 노즐은 초음파 발전기 표면에 닿아도 진동 효과를 대폭 삭감시키므로 본 실험에서는 노즐 대응으로 외경이 가는 주사기 바늘이 사용되었다. 이때 사용된 바늘의 두께가 너무 얇으면 쉽게 마모되어 접촉 불량이라는 다른 문제점을 발생하므로, 대부분의 많은 실험은 내경이 0.26 mm, 바늘 벽의 두께가 0.13 mm인 주사기 바늘(gauge 25)을 사용하였다. 그 이유는 gauge 32처럼 내경이 너무 작으면 종종 침전물이 주사기 바늘을 막는 현상이 일어나 실험의 어려움을 야기하므로 너무 가는 내경의 주사기 바늘의 사용은 피하였다. gauge 25 주사기 바늘은 두께도 비교적 두꺼워 초음파 진동에 의해 쉽게 마모되지 않으면서 진동을 강하게 할 수 있고, 내경도 적당한 바늘이므로 선택하였으며, 이러한 결과로 입자의 크기도 일정하게 나오기 수득율도 좋았다. 이미 언급한 것처럼 대부분의 실험에서는 gauge 25 주사기 바늘이 노즐로써 사용되었으나, 주사기 바늘의 내경에 따라 입자의 크기가 어떻게 영향을 받는지를 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 이 실험은 입자 크기가 작게 생성되는 조건인 압력 100 bar, 온도 30 °C에서 행하였으며, 이때 용액 농도는 0.7 wt%로 고정시킨 후 노즐의 내경만 달리하여 실험을 행하였다. 우선 Figure 4에서 SEM 사진을 보면 구형 입자들이 서로 균락을 이루며 모여 있는 것을 확인할 수 있다. 이것은 보다 많은 시료 용액 주입과 아울러 frit 직경의 확대 등 장치의 개선이 이루어져 앞의 온도 압력의 실험 때보다 파우더의 수득률이 대폭 향상되었기 때문이다. Figure 4와 Table 2에서는 노즐의 내경이 0.13 mm로 제일 작은 경우로 입자의 평균 크기는 $1.35 \pm 0.26 \mu\text{m}$ 로 얻어졌다. 다음으로 노즐의 내경이 0.26

mm로 제조된 입자의 경우 $1.61 \pm 0.24 \mu\text{m}$ 로, 앞의 내경 0.13 mm 노즐에서 보다 더 크게 나올 수 있었다. 마지막으로 노즐 내경이 0.51 mm로 제조된 입자의 경우로써 평균 크기도 $2.00 \pm 0.40 \mu\text{m}$ 로 가장 크게 나타났다. 위의 실험 결과는 노즐의 내경 및 디자인에 따라 입자의 크기가 영향을 받는다는 문헌의 보고와^{4,10,20,21} 일치하는 경향을 보여준다. 특히 농도 0.7 wt%에서 내경(x)과 입자의 평균 크기(y) 사이의 관계식은 $y(\mu\text{m}) \approx 1.15 + 1.7x(\text{mm})$ 로 얻어졌으며, 이 식이 의미하는 것은 압력 100 bar, 온도 30 °C, 농도 0.7 wt%에서는 아무리 노즐 내경을 축소하여도 대략 1.15 μm 이하의 입자 제조가 불가능하다는 것이다. 이것은 입자의 절대적 크기를 감소시키려면 용액의 미세 분산 방울 안에 들어가 있는 용질의 절대량을 줄여야 하므로 이는 다음에서 검토할 농도 효과로써 매우 중요하다.

농도에 대한 영향. 앞의 노즐 실험에서 노즐의 내경의 조절만으로써는 입자의 직경을 줄이는데 한계가 있음을 보여 주고 있으므로 입자의 크기를 조절하는 또 다른 요인의 하나인 농도를 변화시켜 보았다. 이때 다른 실험조건인 압력은 100 bar, 온도는 35 °C, 노즐 내경은 0.26 mm로 고정시킨 뒤 농도만 0.3, 0.5, 0.7, 1 wt%로 변화시켜 가면서 농도에 따른 입자의 크기를 알아보았다. Figure 5와 Table 2에서는 4가지 다른 농도 조건에서 얻어진 입자들의 SEM 사진 및 크기와 분포도를 보여주고 있다. 모든 농도에서 미세한 구형 입자들이 잘 만들어지고 있음을 알 수 있었고, 이들 입자의 평균 직경은 Table 2에서 보여 주고 있다. 예측대로 농도가 가장 묽은 0.3 wt%에서 $0.72 \mu\text{m}$ 로써 가장 작은 입자 크기를 보여 주었고, 농도가 0.5 wt%로 증가함에 따라 크기도 $1.01 \mu\text{m}$ 로 증가하여 농도 효과가 뚜렷하였다. 이러한 경향은 Reverchon 등이 의약품 amoxicillin을 SAS법으로 입자화시킬 경우에 amoxicillin 농도의 증가에 따라 입자의 크기가 0.3에서 $1.2 \mu\text{m}$ 으로 증가한다는 보고와²⁰ 비슷함을 보여 주고 있다. 그러나 본 실험의 특이한 점은 농도가 0.7 wt%에서는 입자 직경이 $1.12 \mu\text{m}$ 로 농도 증가에 따른 크기 증가 효과는 단지 10% 수준에 머물렀고, 가장 진한 농도 1.0 wt%에서의 입자 크기는 $1.14 \mu\text{m}$ 수준으로써, 즉 어느 농도 이상에서는 농도의 증가가 더 이상 입자 크기에 영향을 주지 않고 일정하게 유지된다는 것이다.

농도가 진할 경우 농도에 무관하게 입자 크기의 상한선이 존재한다는 것은 주어진 온도와 압력 하에서 초음파 진동에 의해 만들

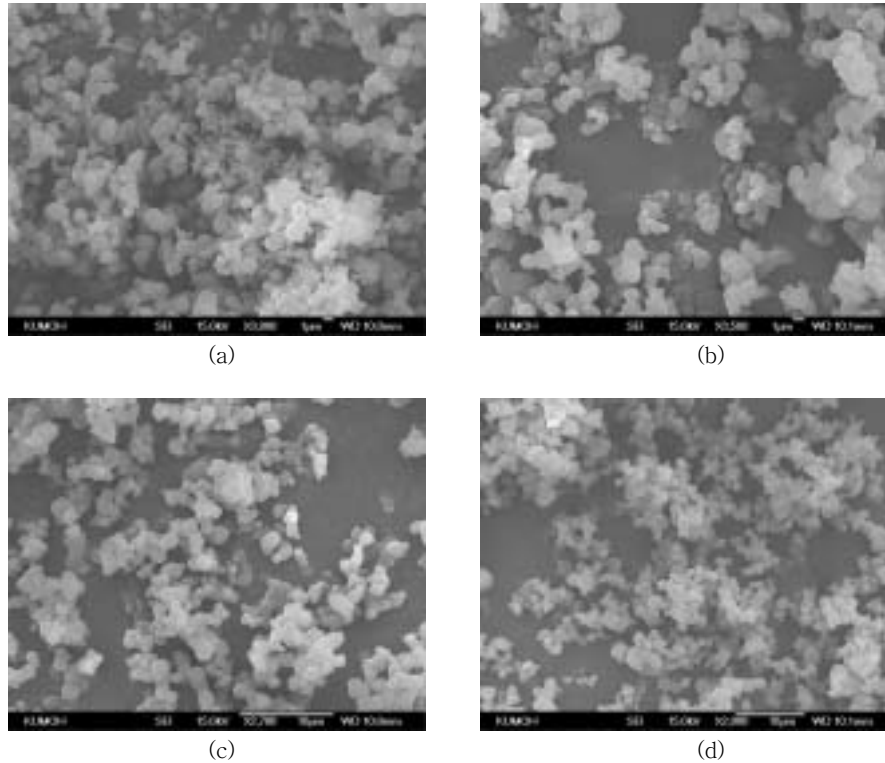


Figure 5. SEM images of SAS products obtained at various concentrations of poly(γ -glutamic acid) and lysozyme. (a) 0.3 wt%, (b) 0.5 wt%, (c) 0.7 wt%, and (d) 1 wt%.

어진 미세 액체 방울의 크기가 정해져 있어 용매가 다 빠져나가도 용질에 의한 고체 입자는 본래의 만들어진 액체 방울 크기보다 더 클 수 없기 때문인 것으로 추측된다.

초음파 발진기 세기에 대한 영향. 본 실험에 앞서 실시한 예비 실험에 의하면 폴리스티렌/dimethyl formamide 등의 시스템에서 초음파 발진기를 사용하지 않은 경우에는 $2\ \mu\text{m}$ 크기로 나왔으나 초음파 발진기를 사용할 경우에는 $0.5\sim 1\ \mu\text{m}$ 크기의 입자가 생성되는 것을 알 수 있었다.¹⁷ 이러한 근거로 하여 초음파 발진기를 사용하면 입자 크기를 대략 1/2~1/4 정도로 줄여 미세한 입자를 얻을 수 있었다. 본 실험에서는 미세 입자를 얻는 것이 목표이기 때문에 초음파 발진기를 항상 사용하였으며, 실제 실험에서는 초음파 발진기의 세기를 최소 수준에 고정시켜 실험을 하였다. 그 이유는 초음파 발진기의 세기를 높였더니 일부 파우더가 발진기의 에너지에 의해 검은색으로의 변색 및 분해 현상이 관찰되었기 때문이다. 따라서 현재 연구 시스템에서는 발진기의 세기를 최소화하여도 충분하다는 것을 알 수 있었다.

분말 입자 내에서의 두 성분의 조성. PGA와 라이소자임 두 성분이 함께 혼합되어 구형 입자가 제조되었으므로, 제조된 분말 내에서 두 성분의 조성비를 조사하였다. 우선 조성의 확인을 UV 흡광 스펙트럼으로 측정 시도하였으나, 두 물질의 흡광 영역대가 서로 겹치므로 UV 흡광법으로는 조성비 분석이 실질적으로 불가능하였다. 따라서 두 화학종의 조성 변화를 FT-IR로 분석하기 위하여, 먼저 PGA와 라이소자임의 무게 비를 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5의 비율로 함유된 표준 시료들을 가지고 우선 FT-IR를 측정

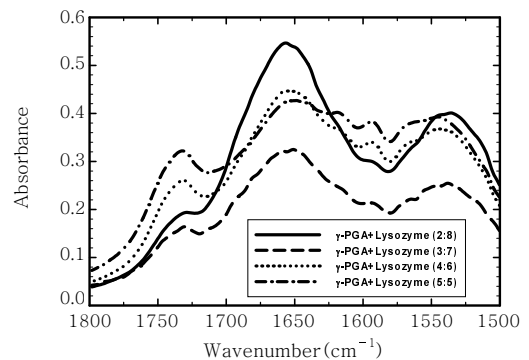


Figure 6. FT-IR absorbance spectra at various compositions of PGA. It shows that the value of $\delta A_{1730} (\equiv A_{1730} - A_{1710})$ strongly depends on the composition of PGA.

하여 보았다. 이때 FT-IR의 재현성을 높이기 위하여 시편 제작은 항상 KBr과 분석 시편의 양을 1 : 1로 같게 하여 발생 가능한 오차를 최대한도로 줄였다. Figure 6에서 보여주듯이 $1730\ \text{cm}^{-1}$ 부근에서의 피크 흡광도와 $1710\ \text{cm}^{-1}$ 부근에서의 골짜기(혹은 변곡선) 모양의 흡광도(실제로는 투과율로 얻어진 데이터를 흡광도로 변환하여 도시하였음) 모양이 두 성분의 상대적인 조성비에 따라 점진적으로 변화하는 것을 볼 수 있었고, 이를 근거로 조성 분석을 시도하여 보았다. 표준 검량선의 작성은 점진적으로 변화하는 모양을 정상화하기 위하여 1차적으로 식 (1)과 같이 두 파수 영역에서의 흡광도의 차이를 선택하였다.

$$\delta A_{1730} = (A_{1730} - A_{1710}) \tag{1}$$

식 (1)에서 A_{1730} 과 A_{1710} 은 각각 1730 cm^{-1} 과 1710 cm^{-1} 에서의 흡광도를 의미하며 이들의 차이인 δA_{1730} 은 조성의 비에 직접적으로 영향을 받는 물리량으로 가정하였다. 또 이러한 차이는 IR pellet 안에 있는 혼합체의 절대량에도 의존할 수 있으므로 이를 보정하기 위한 내부 표준을 설정하였다. 혼합 파우더의 절대량에 대한 내부 표준은 1660 cm^{-1} 의 가장 커다란 흡광 피크를 이용하여 보정하였다. 최종적으로 식 (2)와 같은 조성비를 결정할 수 있는, 즉 조성에 비례하는 흡광도 양인 dA_{corr} 를 실험적으로 유도할 수 있었다.

$$dA_{\text{corr}} = \delta A_{1730} - 0.06 \cdot (A_{1660} - 0.43) \tag{2}$$

우선 δA_{1730} 는 앞에서는 언급하는 바와 같이 파수영역 $1730 \sim 1710\text{ cm}^{-1}$ 대의 모양에 따라 결정되는 양이고, 두 번째 항의 괄호안의 식은 내부 표준 값으로 보정 역할을 담당하는 실험적인 항에 해당한다. 특히 “0.06”의 상수 값은 $(A_{1660} - 0.43)$ 양, 즉 내부 표준의 기여도가 실제로 별로 크지 않음을 의미한다. Figure 7에서 보듯이 dA_{corr} 와 PGA의 무게 wt%를 도시한 결과 매우 좋은 선형의 관계식을 얻을 수 있었다. SAS 장치에 투입된 DMSO 용액에서는 PGA : 라이소자임의 무게 비가 50 : 50이었으나, 위의 용액으로 미세 입자를 제조 후 미세 입자의 FT-IR을 위의 관계식으로 분석한 결과 PGA : 라이소자임의 조성비는 33 : 67로 얻어졌다(Figure 8 참조). 따라서 33 : 67의 조성은 24.6 : 50의 조성으로도 볼 수 있기 때문에 라이소자임의 회수율에 대한 PGA의 회수율은 약 49% (=24.6/50) 수준으로써 50% 이상이 회수되지 못하고 DMSO 용액과 함께 배출되고 있음을 의미한다.

위와 같은 방법으로 결정된 조성비를 재차 확인하기 위하여 미세 혼합입자를 d-DMSO에 녹인 뒤 $^1\text{H-NMR}$ 로 측정해 보았다. NMR 분석은 $\delta=0.74$ 피크는 라이소자임만의 피크이고, $\delta=8.0$ 부근의 피크는 라이소자임과 PGA가 모두 함께 기여하는 피크라는 사실에 기반을 두고 있다. 순수한 라이소자임만의 NMR 스펙트럼에서 $\delta=0.74$ 와 $\delta=8.0$ 의 면적 비를 먼저 알아낸 뒤 혼합입자의

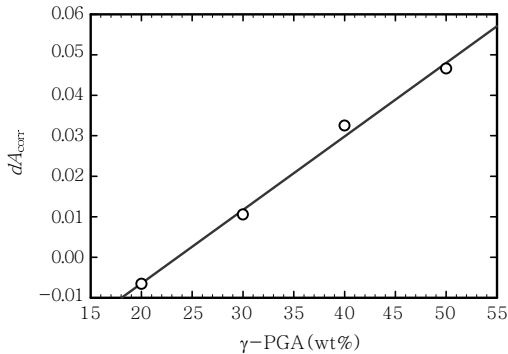


Figure 7. Standard calibration curve of FT-IR obtained with several fixed compositions of PGA. If the dA_{corr} value of the sample is obtained from FT-IR, the weight percentage of PGA can be calculated easily from this calibration curve.

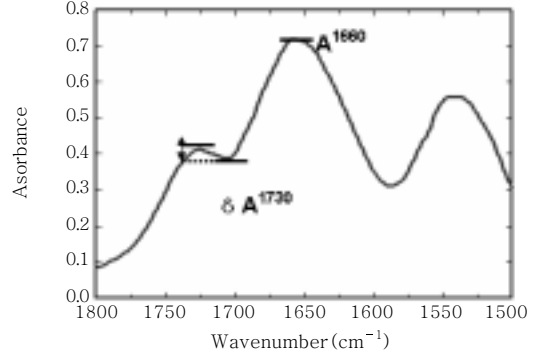


Figure 8. FT-IR spectrum of our powder product prepared by SAS process. The input composition was PGA : Lysozyme = 50 : 50 but the composition of the final product was found as PGA : Lysozyme = 33 : 67 using the standard calibration curve shown in Figure 7.

NMR에서 $\delta=0.74$ 와 $\delta=8.0$ 의 면적 비의 값으로부터 SAS법으로 제조된 입자 내에서의 PGA의 양과 라이소자임의 양을 조사해 본 결과, 두 성분의 무게%는 라이소자임이 81%, PGA 19%로 각각 계산되었다. FT-IR로 분석된 PGA 양 33%와 NMR 분석의 19% 사이에는 약 14% 정도 차이가 나타났다. 현재로서 이러한 차이는 NMR의 $\delta=0.74$ 와 $\delta=8.0$ 에서의 피크들은 상대적으로 매우 약한 피크이면서도, 완만한 곡선의 바탕선 위에 놓여 있고 ($\delta=0.74$ 피크의 경우), 때로는 폭이 매우 넓게 나타나므로 ($\delta=8.0$ 피크) 정확한 면적 계산이 용이하지 않아 이러한 오차를 발생시키는 것으로 생각된다. 물론 서로 다른 여러 조성에서 상대적으로 뚜렷하게 변화하는 피크들이 있다면 정확한 검량선을 만들 수 있겠으나 본 연구에서는 주어진 하나의 혼합 조성 NMR chart 내에서 조성의 비를 계산하였으므로 오차가 수반되었다고 볼 수 있겠다. 이에 FT-IR의 투과도 측정에서도 일부 오차가 있을 수 있겠으나 FT-IR의 경우에는 표준 검량선이 작성되었으므로 이하의 정량 분석에서는 FT-IR로 측정된 값을 사용하였다. 여기에서 FT-IR의 장점은 소량의 시료로 신속한 분석이 가능할 뿐만 아니라 고가의 d-DMSO 용매가 필요하지 않다는 것이다.

라이소자임의 생체활성 분석. 초음파 처리에 따른 라이소자임의 생체활성(bioactivity)의 변화를 분석하였다.^{13,22} 우선 박테리아 용액 2.5 mL와 어떠한 처리도 거치지 않은 본래의 라이소자임 용액 0.25 mL를 함께 혼합한 뒤 시간에 따른 흡광도를 조사한 결과 Figure 9에서 보여 주듯이 기울기가 $1.07 \times 10^{-3}\text{ sec}^{-1}$ 로 얻어졌다. 그러나 PGA의 혼합없이 라이소자임만의 용액으로 SAS법으로 입자를 만든 후 이 라이소자임의 용액의 기울기는 $7.81 \times 10^{-4}\text{ sec}^{-1}$ 로 측정되었다. 이 기울기 값이 생체활성도를 알려주는 실험적 측정량이므로 이를 근거로 SAS법으로 제조된 라이소자임의 활성은 약 73% 수준인 것으로 밝혀졌다. 이러한 수준은 Kim 등이 SAS법으로 처리한 라이소자임의 생체활성도가 본래의 $74 \pm 23\%$ 수준 안팎으로 얻어진 것과 비슷한 결과이다.⁷ 이렇게 낮아진 이유는 초음파로 미세 분산 용액이 만들어질 때 DMSO 용액 내에 있던 라이소자임의 조직들이 일부 손상되어 박테리아들과 제대로 반응하지 못하여 본래의 라이소자임의 기울

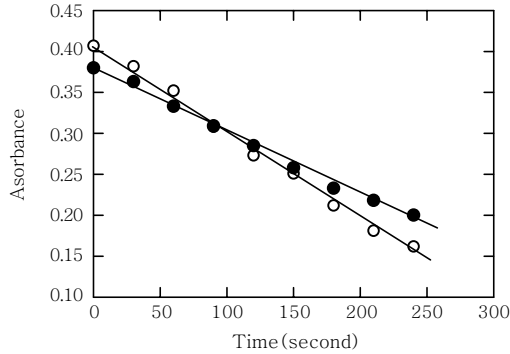


Figure 9. Change of absorbance at wavelength 450nm against time. (○) original lysozyme (slope: $1.067 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$), (●) lysozyme after treatment of SAS process (slope: $7.81 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$).

기보다 낮게 나온 것으로 추측된다. 이 문제의 해결은 앞에서 언급한 바와 같이 입자의 크기에 영향을 최소화하면서 초음파 진동의 세기를 낮추어 가면 해결할 수 있을 것으로 사료된다.

제조 입자내의 DMSO 미량 분석. PGA와 라이소자임의 혼합물의 미세 입자 제조 시 충분한 CO_2 를 흘려보냈으나 입자 내에 미량으로 존재할 수도 있는 DMSO의 양을 GC를 통해 분석하였다. 입자 내에 있는 DMSO 용매를 완전 추출하기 위하여 0.10 g의 미세 입자를 에탄올 7.6 g에 넣은 뒤 60 °C에서 3시간 이상 휘저어 주었다. 이때 선택된 에탄올은 PGA와 라이소자임을 전혀 녹이지 못하나 DMSO는 매우 잘 녹이며 동시에 GC에 사용되는 용매이기 때문이다. 추출액에서 DMSO의 농도를 조금이라도 높이기 위하여 넣어준 에탄올의 양의 부피가 초기 부피의 25% 정도가 될 때까지 가열 증발시켜 DMSO의 농도를 대략 4배 정도 높일 수 있었다. 가열하는 동안에 에탄올은 증발하였지만 DMSO는 높은 끓는점(bp=189 °C) 때문에 60 °C에서의 증기압이 6 mmHg 정도밖에 되지 않아 이 과정에서의 DMSO 증발에 따른 농도 오차는 무시할 수 있었다. 위와 같이 만들어진 DMSO 추출액을 5 μL 와 10 μL 의 두 가지 용량의 주사기로 GC에 각각 주입시켰을 때 얻어진 DMSO의 양은 각각 1.2 nmole과 2.5 nmole 수준인 것으로 얻어졌다. FID 감지기의 DMSO 최소 감지 함량은 0.1 nmole 수준이므로 측정 오차는 4% 정도이며, 이로부터 계산한 결과 미세 입자 내 존재하는 DMSO의 양은 약 $7.8 \times 10^{-3} \text{ wt}\%$ 로 얻어졌다. 따라서 매우 적은 양이지만 DMSO가 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 만약 이 정도의 양도 신체에 유해하기 때문에 DMSO의 잔량을 더 줄여야 한다면, 그 방안으로써는 SAS 공정에서 CO_2 세척시간을 늘리는 방법보다는 이미 제조된 분말을 상온의 진공상태에서 추가 건조시키는 방법이 보다 더 효과적일 것으로 생각된다.

PGA와 라이소자임 혼합물의 파우더 구조. 입자 내에서 PGA와 라이소자임의 혼합 형태에 따른 구조는 다음과 같이 세 가지가 가능하겠다. 즉, (i) 핵(core)에는 PGA, 껍질(shell) 부분에는 라이소자임이 분포하는 핵-껍질(core-shell) 구조, 역으로 (ii) 핵에는 라이소자임, 껍질부분에는 PGA가 존재하는 구조, 혹은 (iii) 두 물질이 랜덤한 형태로 분포하는 경우를 가정할 수 있겠다. PGA는 상온 25 °C의 물에 불용하나 라이소자임은 상온의 물에 잘 녹는다는

사실에 착안하여 PGA와 라이소자임의 조성비가 25 : 75, 50 : 50, 75 : 25인 3 종류의 혼합 용액을 SAS법으로 미세 분말을 만든 뒤 이들을 25 °C 증류수에 넣어 계속 휘저어 주면서 30분 간격으로 시료를 뽑은 뒤 0.2 μm 멤브레인 필터로 모든 녹지 않은 미세 입자를 여과한 용액을 파장 280 nm에서 흡광도를 측정 하였으나, 세 가지 조성의 여과된 분산 수용액들은 3시간이 지난 후에도 어떠한 흡광도도 감지되지 않았다. 따라서 3 가지 조성비로 만들어진 각각의 미세 입자들의 구조는 모두, 핵에는 라이소자임이 존재하고 껍질 층에는 PGA가 완전히 둘러싸고 있는 핵-껍질 구조를 확인할 수 있었다. 조성 분석에서 이미 언급한 바와 같이 PGA이 라이소자임보다 훨씬 적다는 것은 PGA가 고체 파우더로 침전되려는 경향이 라이소자임보다 훨씬 약하여 일부는 액상으로 빠져 나가고 나머지 PGA가 이미 침전되어 핵을 형성한 라이소자임의 둘레를 PGA가 주로 둘러싸고 있음을 의미한다.

파우더 절대 수득률. FT-IR로 상대적 조성비를 확인하는 과정에서 PGA가 라이소자임보다 많이 유출되어 회수되지 못한다는 것을 알았다. 그러므로 이번 단계에서는 SAS법에 의해 제조된 입자의 절대 수득률을 조사하여 보았다. 실험은 대표적인 실험 조건인 100 bar, 35 °C에서 혼합 입자 제조 실험을 행하였으며 분말 회수에 따른 오차를 최대한 줄이기 위한 방안으로 용액의 농도를 4배 이상 증가시켜 최대한 많은 양의 분말이 생성되도록 하였다. 2 wt% 농도의 용액을 가지고 총 3회의 실험이 연속적으로 행하여졌는데 실험 결과 첫 번째는 45%, 두 번째는 51%, 세 번째는 48%의 수득률이 얻어져 평균적으로 48%가 나왔다. 사실상 모든 분말을 완벽하게 수집한다는 것이 불가능하므로 실제 수득률은 대체로 50% 수준인 것으로 예상된다. 이보다 더 높은 수득률을 얻기 위한 SAS 장비의 개조는 앞으로 해결해야 과제임을 밝혀둔다.

결론

PGA와 라이소자임의 혼합 시료를 단일 용매 DMSO에 녹여 고분자 용액을 만든 뒤 연속식의 SAS 장치를 통하여 구형의 미세 입자를 얻을 수 있음을 확인하였고 중요한 결론들은 다음과 같다.

(1) SAS법에서는 압력이 증가할수록, 온도가 감소할수록, 그리고 노즐의 내경이 작을수록 보다 미세한 구형 입자를 얻을 수 있었다. 특히 농도에 따른 입자 크기 변화는 농도가 0.7 wt% 이상으로 증가할 경우에는 입자의 크기 증가가 거의 나타나지 않았다. 그 이유는 제조된 용질 입자 크기는 제조 과정상 나타난 액체 방울의 크기를 초과할 수 없기 때문인 것으로 생각된다. 본 실험의 조건 내에서 제일 작은 입자의 직경은 100 bar, 30 °C, 농도 0.5 wt%, 노즐 내경 0.26 mm 조건에서 약 0.65 μm 크기의 입자로 얻어졌다.

(2) PGA와 라이소자임의 무게 조성이 50 : 50 혼합용액으로부터 SAS법으로 만들어진 미세 입자의 조성을 FT-IR법으로 분석해본 결과 약 33 : 67로 얻어졌다. 이것은 상당량의 PGA가 DMSO와 함께 배출된다는 것을 의미하고 이러한 배출은 탄산가스과 DMSO의 혼합 유체에서 PGA가 라이소자임보다 높은 용해도를 갖고 있기 때문인 것으로 해석된다.

(3) 라이소자임을 DMSO에 녹인 뒤 초음파 처리 후 생체활성도의 변화를 알아본 결과, 본래 라이소자임의 생체활성도의 73% 수준인 것으로 나타났다. 이러한 이유는 라이소자임의 조직들이 손상되어 박테리아와 반응이 느려졌기 때문인 것으로 추측된다.

(4) SAS법으로 제조된 입자의 유해성을 야기시킬 수 있는 화학종인 DMSO가 파우더 입자 내에 얼마나 잔존하는지를 GC로 분석한 결과 매우 소량이지만 DMSO가 78 ppm($=7.8 \times 10^{-3}$ wt%) 농도로 존재하는 것으로 나타났다.

(5) 두 종류의 혼합체로서 얻은 미세 구형 분말의 구조를 확인하기 위하여 미세 분말을 25 °C 물에 3시간 동안 분산시킨 후 용해도 실험을 실시한 결과, PGA와 라이소자임의 어떠한 성분도 수용액상에서 검출되지 않는 것으로 보아 수용성 라이소자임이 핵 내부에 있고, 불수용성인 PGA가 라이소자임을 완전히 둘러싸고 있는 핵-겉질 구조가 예상된다.

(6) 마지막으로 수득률 측면에서는 총 3회에 걸쳐 비교적 큰 규모로 실험을 한 결과 약 48% 정도가 얻어졌다.

본 과제와 관련하여 앞으로의 연구 방향은 실제 산업계에서 활용도를 가질 수 있도록 보다 높은 수득률의 SAS법이 되도록 장치의 개선 및 개조가 필요하며 또한 PGA와 라이소자임의 두 화학종의 분말 구조를 다양하게 조절할 수 있는 방법 등은 앞으로의 실험에서 계속 보완할 것임을 밝혀둔다.

감사의 글 : 본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI04-01-04) 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. E. Reverchon, *J. Supercrit. Fluids*, **15**, 1 (1999).
2. E. Reverchon, G. Della Porta, A. Di Trolino, and S. Pace, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **37**, 952 (1998).
3. E. Reverchon, G. Della Porta, D. Sannino, and P. Ciambelli, *Powder Technol.*, **102**, 127 (1999).
4. Y. Gao, T. K. Mulenda, Y.-F. Shi, and W.-K. Yuan, *J. Supercrit. Fluids*, **13**, 369 (1998).
5. R. B. Gupta and J.-J. Shim, *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*, CRC, New York, 2006.
6. E. Reverchon, R. Adami, I. De Marco, C. G. Laudani, and A. Spada, *J. Supercrit. Fluids*, **35**, 76 (2005).
7. D. H. Kim, H. J. Park, S. H. Kang, S. W. Jun, M. S. Kim, S. Lee, J. S. Park, and S. J. Hwang, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**, 89 (2005).
8. H. J. Park, M. S. Kim, S. Lee, J. S. Kim, J. S. Woo, J. S. Park, and S. J. Hwang, *Int. J. Pharm.*, **328**, 152 (2007).
9. A. Vatanara, R. Najafabadi, K. Gilani, R. Asgharian, M. Darabi, and M. Rafiee-Tehrani, *J. Supercrit. Fluids*, **40**, 111 (2007).
10. I. Tsivintzelis, E. Pavlidou, and C. Panayiotou, *J. Supercrit. Fluids*, **40**, 317 (2007).
11. A. Tenorio, M. D. Gordillo, C. Pereyra, and E. J. Mart'inez de la Ossa, *J. Supercrit. Fluids*, **40**, 308 (2007).
12. R. B. Gupta and P. Chattopadhyay, U.S. Patent Application 60/206,644 (2000).
13. P. Chattopadhyay and R. B. Gupta, *AIChE, J.*, **48**, 235 (2002).
14. M. J. Whitaker, J. Hao, O. R. Davies, G. Serhatkulu, S. Stolnik-Trenkic, S. M. Howdle, and K. M. Shakesheff, *J. Control. Release*, **101**, 85 (2005).
15. R. Bodmeier, H. Wang, D. J. Dixon, S. Mawson, and K. P. Johnston, *J. Pharm. Res.*, **13**, 1211 (1995).
16. E. Reverchon, G. Della Porta, C. Celano, S. Pace, and A. Di Trolino, *J. Mater. Res.*, **13**, 284 (1998).
17. Yun Ling, Master Thesis, Kumoh National Institute of Technology, 2004.
18. A. Kordikowski, A. P. Schenk, R. M. Van Nielen, and C. J. Peters, *J. Supercrit. Fluids.*, **8**, 205 (1995).
19. S. D. Yeo, G. B. Lim, P. G. Debenedetti, and H. Bernstein, *Biotech. Bioeng.*, **41**, 341 (1993).
20. E. Reverchon, I. De Marco, G. Caputo, and G. Della Porta, *J. Supercrit. Fluids*, **26**, 1 (2003).
21. S. Mawson, S. Kanakia, and K. P. Johnston, *J. Appl. Polym. Sci.*, **64**, 2105 (1997).
22. D. Verhamme, J. Storck, L. Racchelli, and A. Lauwers, *Int. J. Pharm.*, **2**, 168 (1988).