

PNIPAM 형성이 금 나노 입자 담지 나노 젤의 제작에 미치는 영향

폰사왓 바이페이와드 · 박예은 · 김윤경 · 박한수[†]

중앙대학교 융합공학부

(2016년 1월 8일 접수, 2016년 3월 8일 수정, 2016년 3월 25일 채택)

Effect of PNIPAM Formulation on Fabrication of Nanogels Containing Gold Nanoparticles

Phornsawat Baipaywad, Ye-eun Park, Yunkyung Kim, and Hansoo Park[†]

School of Integrative Engineering, Chung-Ang University, 221 Heukseok-Dong, Dongjak-Gu, Seoul 06911, Korea

(Received January 8, 2016; Revised March 8, 2016; Accepted March 25, 2016)

초록: 금 나노 입자(AuNPs)는 바이오센서와 유전자 또는 단백질의 전달 등 많은 생물의학적 응용분야에 적용이 다양하게 연구되고 있으며 최근에 기능성 부여하고 안정성을 증가시키기 위해 고분자 복합체 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이 연구에서, 우리는 다양한 공량체를 기반으로 하는 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAM) 기반의 나노 젤을 제작하고 AuNPs는 상이한 pH 값 조건 하에서 HAuCl₄의 환원에 의해 나노 젤에 담지 하였으며 공단량체에 따른 PNIPAM의 형성이 AuNPs 담지 나노 젤의 제작에 미치는 영향을 연구하였다. AuNPs 담지 나노 젤은 주사전자현미경(TEM)을 통해 그 형태를 관찰하였고, 동적광산란법(DLS), 자외-가시광분광법(UV-Vis)으로 크기 및 흡수강도를 측정하였다.

Abstract: Gold nanoparticles (AuNPs) have been investigated for various biomedical applications such as biosensors and genes or proteins delivery. Recently, they were modified with peptides or incorporated with polymers to increase cell penetration, specificity to targets, and stability in aqueous medium. In this study, we prepared poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) based nanogels systems containing AuNPs and examined the effect of PNIPAM formulation on the formation of AuNPs encapsulated in nanogels by using different comonomers. AuNPs were embedded into nanogels through the reduction of HAuCl₄ at different pHs after PNIPAM-based nanogels were formed by a conventional radical polymerization. The morphology characterized by transmission electron microscopy (TEM) confirmed multiple non-aggregated AuNPs in PNIPAM based nanogels. Dynamic light scattering (DLS) showed the size of nanogels containing AuNPs changed with temperature and pH. UV-Vis measurements exhibited different intensity depending on PNIPAM formulations, since different amounts of gold nanoparticles were embedded in nanogels.

Keywords: poly(*N*-isopropylacrylamide), nanogels, gold nanoparticles, comonomers, biomedical applications.

서 론

금, 은, 철, 실리콘 그리고 탄소재료 등 다양한 종류의 무기재료들은 유전자, 약물 또는 단백질 등을 전달하는 전달체로써 개발 및 연구되어 왔다.¹ 특히 금 나노 입자(AuNPs)는 다양한 기능성과 뛰어난 생체적합성을 가지고 있으며 유기 재료를 이용하여 재생 가능하도록 쉽게 개질될 수 있다는 특성과 표면이 물리적 특성의 변화 없이 표적화를 위한 펩타이드/DNA 등이 쉽게 결합될 수 있다는 부분에 있어서 관심있게 연구되었다.^{1,2}

여러 고분자 재료들이 무기 물질과 결합되어 사용되고 있으며 이 중 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAM) 공유결합, 수소결합, 반데르발스결합 또는 물리적 얽힘에 의해 가교될 수 있는 온도 감응성 고분자이다.^{3,4} PNIPAM은 하부임계공용온도(LCST)에서 체적상전이를 보이며 이로 인해 LCST 이하에서 PNIPAM은 물속에서 구조를 유지하며 팽창하고 친수성을 갖는 반면에 LCST 이상에서는 소수성을 띠며 부피가 급감한다.^{3,7} 이러한 온도 감응성으로 인해 화학분리, 촉매, 콘택트렌즈, 바이오센서, 약물전달 그리고 세포 지지체 등 생물 의학적 응용분야에서 많은 관심을 받으며 개발되고 있다.^{4,5,8-10}

PNIPAM은 하이드로겔 형태 외에도 바이오 연구 분야에 있어서 나노 및 마이크로 입자의 형태로도 제조되어 사용되어 왔으며 물성 조절을 위하여 아크릴 산등 다양한 단량체와

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: heyshoo@gmail.com

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

같이 합성이 진행되어 왔다.^{4,6,11-13} 이런 공중합체는 단량체의 종류와 비율에 따라 팽윤특성의 변화, 하부임계 공용 온도 변화, 그리고 표면 전하의 특성을 변화시킬 수 있으면 이를 이용하여 높은 유연성을 가진 PNIPAM 기반 나노/마이크로 입자를 제조할 수 있다.^{13,14}

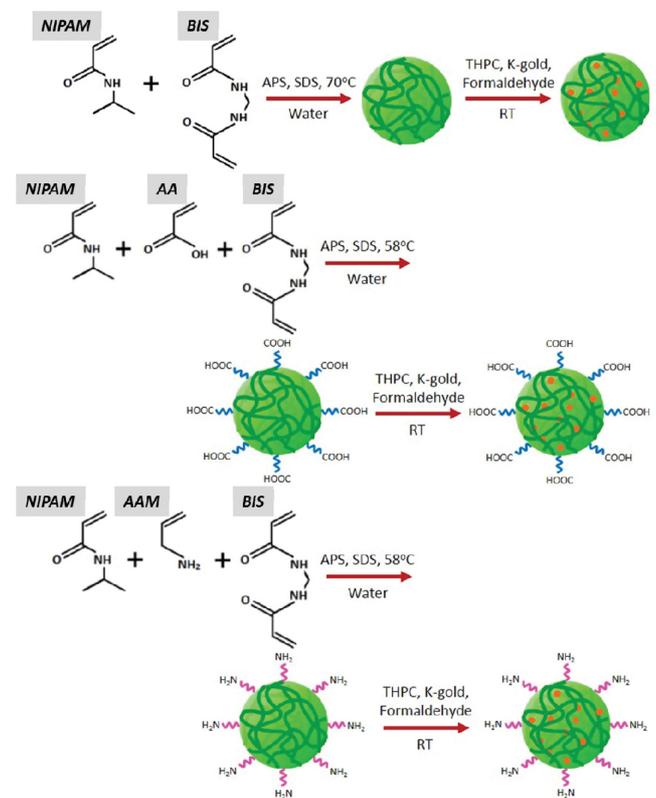
이러한 PNIPAM 나노/마이크로 입자는 자체적으로도 약물 전달이나 유전자 전달들의 연구에 많이 사용되었으며 최근에는 여러 다른 종류의 유기 재료 및 무기재료와 복합체 형태로도 제조되어 활발히 연구되고 있다. 본 연구에서는 금 나노 입자가 결합된 PNIPAM, PNIPAM-co-AA 그리고 PNIPAM-co-AAM의 나노 젤의 합성에 대해 연구하였다. 실온에서 이 나노 젤 고분자 입자들 형성 이후 젤 내부에 AuNPs를 결합시켰으며 형성과정에 있어서 단량체의 변화에 따른 작용기의 변화가 금입자에 미치는 영향을 연구하였다. 추가적으로 접종과 K-gold 용액에 의한 금입자의 크기조절도 확인하였다. 이러한 복합체의 경우 AuNPs의 특성을 유지하며 고분자 나노 입자의 특성을 띠기 때문에 다양한 목적의 약물전달 시스템으로 활용이 가능하다.

실 험

재료. 단량체 *N*-isopropylacrylamide(NIPAM; 99%, Acros)는 사용하기 전에 hexane을 사용하여 재결정하였다. 공단량체인 아크릴산(AA; 99%), 알릴아민(AAM, 98%, Sigma Aldrich)과 가교제 *N,N'*-methylenebisacrylamide(BIS; 99%), ammonium persulfate (APS; $\geq 98\%$), sodium dodecyl sulfate (SDS; $\geq 99.0\%$), gold (III) chloride trihydrate($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\geq 99.9\%$), sodium hydroxide (NaOH; $\geq 97.0\%$), tetrakis (hydroxymethyl) phosphonium chloride(THPC; 80% in H_2O), potassium carbonate(K_2CO_3 ; $\geq 99.0\%$), formaldehyde solution(37% in H_2O), 그리고 염산(1 M HCl)은 모두 Sigma-Aldrich에서 구매하여 사용하였다. 모든 반응에 사용된 물은 불순물을 제거하기 위해 18 M Ω 의 저항 이하에서 0.22 μm 의 막막을 사용하여 여과되었다. 또한 실험에 사용된 모든 초자류는 염기조에서 왕수를 사용하여 세척하였고, 정제된 물로 수세하였다.

나노 젤의 제작. 300~500 nm의 지름을 갖는 나노 젤 단독 중합체 입자들은 전형적인 선형중합 방법으로 제작되었다.^{15,16}

이 고분자 입자는 나노 젤 매트릭스 내에 AuNPs를 성장시키기 위한 캡슐화의 템플레이트로서 사용되었다(Scheme 1). 구체적으로는, Table 1과 같이 단량체, 공단량체, 가교제 그리고 계면활성제(SDS)를 함유한 용액을 195 mL의 정제된 Milli-Q 물에 용해시키고, 아르곤 가스의 주입을 위해 삼구 둥근 플라스크에 배치하였다. 그 혼합 용액은 아르곤 분위기에서 58-70 °C 온도로 가열하며 한시간 퍼징되었고, 그 후에 중합 반응의 개시를 위해 APS(0.12 g/5 mL of water)를 가열된 혼합물에 첨가하였다. 반응은 4-7시간 동안 진행되었다. 아르곤 가스는 반응시간 동안 반응기를 차단하고 중합반응을 방해할 수 있는 산소를 제거하기 위해 용액을 통해 버블링되었다. 위 과정들을 마친 후, 용액은 7일 동안 탈이온수에 대한 투석을 통해 정제되었다. 제작된 나노 젤은 동결건조를 통해 수분을



Scheme 1. Synthesis procedures of nanogels containing gold nanoparticles by the conventional radical polymerization methods.

Table 1. Conditions of PNIPAM Formulation to Form Nanogels

Samples	NIPAM:BIS:Comonomer (Molar ratio)	SDS (g)	T (°C)	RT (h)	Functional group
PNIPAM	200:1:0	0.0275	70	7	-
PNIPAM-AA	100:1:9	0.0600	58	4	Carboxyl
PNIPAM-AAM	200:1:18	0.0600	58	4	Amine

T: Reaction temperature, RT: Reaction time.

제거한 후 실온에 저장하였다.

금 나노 입자 담지 나노 젤의 제작. 사전에 형성된 나노 젤에서 HAuCl_4 를 환원시키기 위해 THPC를 사용하여 다량의 AuNPs가 담지된 나노 젤 제작을 모색하였다.¹⁷ 우선 1 mL의 THPC 금 용액에 1 mL의 나노 젤 용액을 첨가하여 나노 젤 입자 내에 THPC 금 나노 시드의 부착을 유도하였다. 이 혼합물은 THPC 금 나노 시드의 표면 커버리지를 최대화하기 위해 실온에서 밤새 보관되었다. 최종적으로 나노 시드로 덮인 나노 젤 입자 내의 포름알데히드와 K-금 용액의 환원으로부터 AuNPs의 성장이 유도되었다. 상이한 pH 값의 조건에 따른 AuNPs 담지 나노 젤의 형성에 미치는 PNIPAM의 영향을 연구하기 위해 나노 젤 내의 AuNPs의 성장 전에 0.1 HCl, 0.1 NaOH을 각각 K-금 용액에 첨가하여 pH \approx 5와 9의 상태를 조성하였다. K-금 용액은 0.025 g의 K_2CO_3 를 함유한 100 mL의 물에 1.5 mL의 1 wt% HAuCl_4 를 첨가하고 자성 교반하여 준비되었다. 용액의 색상은 나노 젤 내의 AuNPs의 크기에 따라 수 분 이내에 적색에서 무색으로 변화하였다. 반응 종료 후 용액은 미반응 물질, 나노 젤 외부에 형성된 작은 금 나노입자 그리고 나노 입자를 담지하지 않은 순수 중합체를 제거하기 위해 25 °C에서 30분 동안 5000 rpm에서 원심 분리하였다. 최종 침전물은 순수한 Milli-Q 물로 희석되었고, 추후 사용을 위해 실온에서 보관하였다.

특성분석. 나노 젤과 AuNPs 담지 나노 젤의 크기와 열 반응성 거동은 레이저입자분석시스템을 이용한 dynamic light scattering(DLS, NANO ZS, Malvern instruments Ltd., UK)을 통해 조사하였다. He-Ne 레이저가 광원으로 사용되었고 그 파장은 633 nm, 측정각도는 173°였다. 제타 전위의 측정 은 희석된 콜로이드 분산액을 25 °C에서 Malvern Zetasizer NANO ZS를 이용해 측정하였다. 나노 입자의 UV-vis 스펙트럼은 용액상태에서 마이크로 플레이트 리더(Synergy™ H1, BioTek instruments Inc.)를 사용해 측정하였다. 나노 젤과 AuNPs 담지 나노 젤의 형태는 전계방출형 주사전자현미경(FESEM, SUPRA 55VP, Carl Zeiss, Germany)과 에너지 여과 투과전자현미경(TEM, JEOL Ltd., JEM-2100F)을 이용해 확인하였다. 탄소로 코팅된 구리 상판에 나노 젤, AuNPs 담지 나노 젤의 희석된 분산액을 적하하고 건조시킨 후 시험 전에 2% 우라닐 아세테이트 용액을 적하하여 샘플을 준비하였다.

결과 및 토론

나노 젤과 AuNPs 담지 나노 젤의 팽윤거동은 DLS로 측정하였다. Figure 1(a)를 통해 25~37 °C 사이의 각각 다른 온도 조건에서 PNIPAM 기반 나노 젤 크기의 유체 역학적 변화를 확인할 수 있다. 그 유체역학적 지름은 상온에서 약 400-500 nm였다. 모든 종류의 PNIPAM 기능기는 LCST 이상의

온도에서 체적 상전이 되었다. 이는 이전의 연구결과와 일치한다.^{18,19}

상온에서 나노 젤은 팽윤에 의해 크기와 부피가 증가하였으며, 37 °C까지 온도를 증가시키는 동안 유도되는 온도 감응성으로 인해 그 크기와 부피는 감소하였다. 순수한 PNIPAM 샘플의 온도에 따른 크기 감소가 PNIPAM-AA, PNIPAM-AAM에 비해 명확하였다. Figure 1(b)에서 보이는 것과 같이 세가지 나노 젤의 제타 전위를 각각 측정하였다. PNIPAM 나노 젤은 개시제(APS)의 전하로 인해 pH \approx 7.0에서 약 -15 mV의 음의 값을 나타내었다.^{9,14,20} PNIPAM-AA 용액은 -34 mV

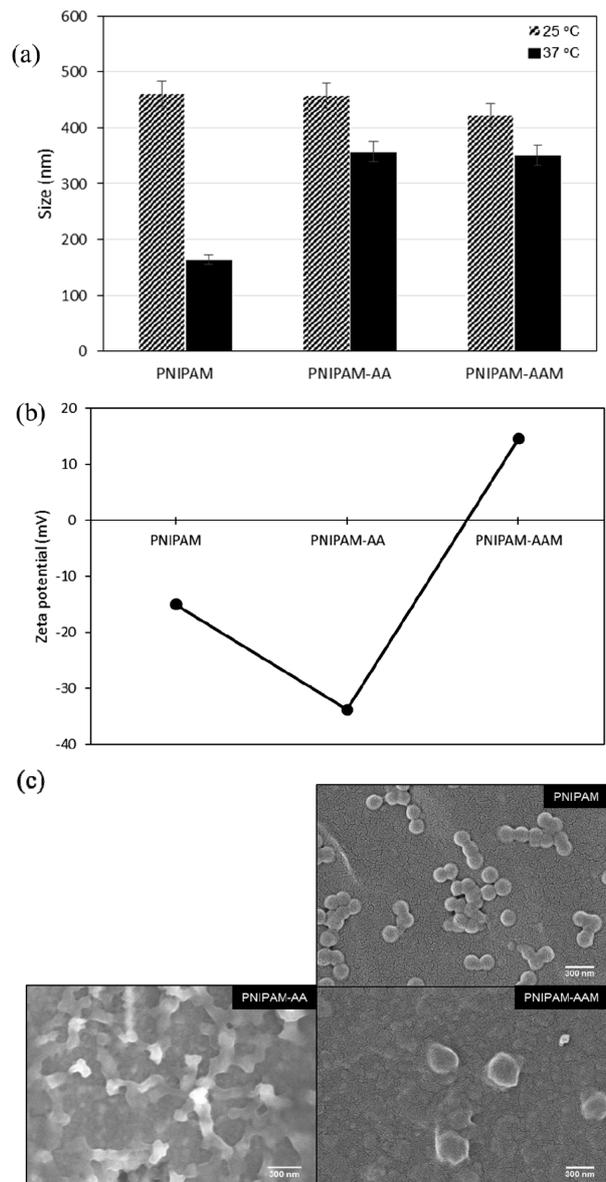


Figure 1. Average sizes (a); zeta potential (b) of different types of nanogels in aqueous at pH \approx 7; SEM images (c) of different types of nanogels in dry state.

PNIPAM-AAM 용액은 +15 mV로 각각 음과 양의 전하를 보였다. 이는 첨가된 공단량체로 인함으로 여겨진다.²¹

Figure 1(c)의 SEM 사진을 통해 PNIPAM 기반 나노 젤과 다른 종류의 공단량체가 합성된 구형의 형상을 확인하였으며, 우리는 다른 온도 조건에서 AuNPs 담지 PNIPAM 기반 나노 젤의 특성을 연구하였다. Figure 2(a)와 (b)는 AuNPs 담지 나노 젤의 크기 및 제타 전위의 변화를 나타낸다. 나노 젤에 AuNPs를 담지한 후, PNIPAM-Au와 PNIPAM-AAM-Au 입자의 열 반응성 팽창 특성은 PNIPAM 기반 나노 젤 입자와 유사하게 유지되었다. 25 °C일 때, AuNPs와 나노 젤 사이의 상호작용으로 인한 유사가교를 형성하기 때문에 AuNPs가 로딩된 입자의 크기는 로딩되지 않은 나노 젤 입자보다 작았고,^{19,22} 37 °C로 온도를 증가시키는 동안에도 PNIPAM-AAM-Au의 수축의 경향은 여전히 작았다. 반면에, Figure 2(a)에 보이는 것 같이, PNIPAM-Au 입자는 순수한 나노 젤보다 컸다. 그러나 PNIPAM-AA의 나노 젤은 나노 젤 내에 카복실기(-COOH)와 AuNPs 표면의 동일한 음성전하로 인한 반발 상호작용의 발생으로 AuNPs와 반응하지 않았고, 이는 Figure 2(b)에서 처럼 제타 전위 값에 의해 확인되었다. AuNPs 담지 PNIPAM계 나노 젤의 제타 전위의 값은 AuNPs의 존재로 인해 순수한 나노 젤보다 점점 음으로 하전되었다.²¹

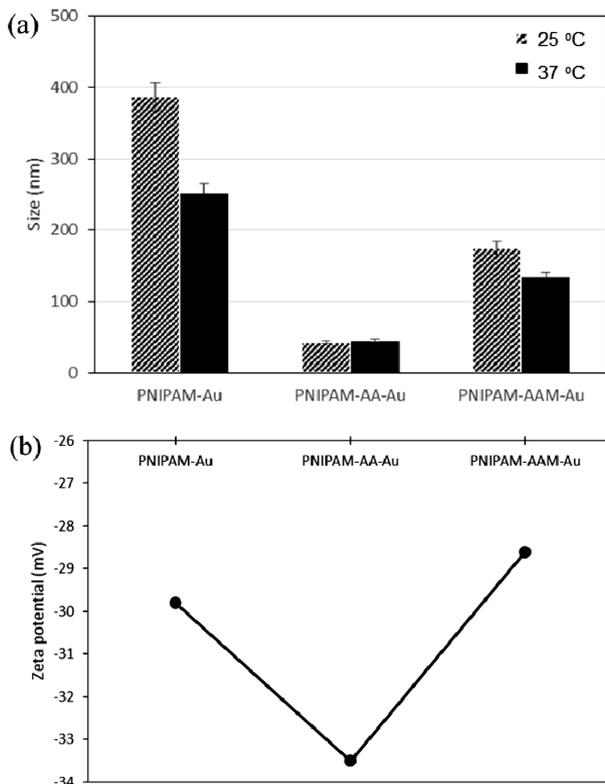


Figure 2. Average size of different temperatures (a); zeta potential (b) of different comonomer nanogels containing AuNPs in aqueous at pH≈7.

AuNPs가 담지된 PNIPAM 기반 나노 젤의 형태는 TEM에 의해 가시화되었다. Figure 3 이미지의 샘플은 pH≈7에서 제작되었다. Figure 3(a)와 (c)에 각각 도식화된 것처럼 PNIPAM 반복 단위와 다른 작용기 없이 아민 기능기(-NH₂)와 이루어진 나노 젤 입자의 주사술의 경우, 직경 5-40 nm의 다양한 AuNPs는 물리적 포획^{15,21,23} 및 정전기적 상호작용을¹⁹ 통해 나노 젤 내에 담지되었다.

작은 흰색 점들을 감싸는 구형의 밝은 코로나는 PNIPAM 폴리머 입자를 나타내며, PNIPAM 네트워크 내부의 작은 흰색 점은 담지된 AuNPs를 나타낸다. 하지만, 건조 중에 변형이 일어나기 때문에 TEM 이미지는 축소된 구형 젤의 실제 치수를 표시하지 않는다.²¹ 반면에, 입자 내에 AuNPs가 담지되지 않은 PNIPAM 기반 나노 젤과 카복실기의 관능기를 Figure 3(b)에서 관찰하였다. 음성 표면전하를 띠는 PNIPAM의 나노 젤은 젤 내부에 골고루 분산된 AuNPs를 담지할 수 없으며 이는 열반응성 팽윤 거동 및 제타 전위 측정과 일치한다.

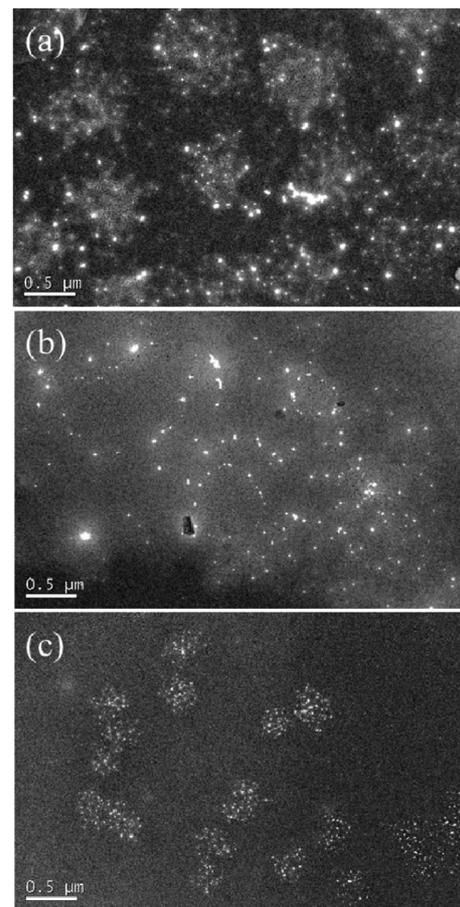


Figure 3. TEM images of different comonomer nanogels containing AuNPs at pH≈7 (a) PNIPAM-Au; (b) PNIPAM-AA-Au; (c) PNIPAM-AAM-Au.

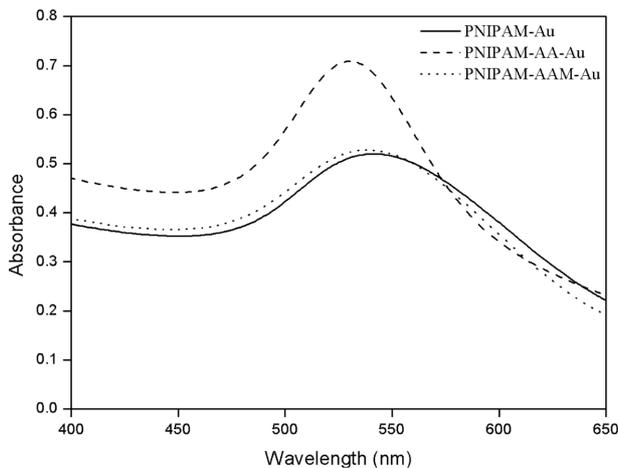


Figure 4. UV-vis spectra of nanogels containing AuNPs at pH \approx 7.

Figure 4는 AuNPs가 담지된 나노 젤의 530 nm(일점쇄선)에서 542 nm(실선)과 539 nm(점선)로 적색 편이된 흡수 밴드를 나타낸다. 앞서 언급한 바와 같이 PNIPAM-AA 기반 나노 젤이 AuNPs와 잘 반응하지 않았기 때문이다. 따라서 나노 젤로 덮이지 않은 AuNPs의 흡수스펙트럼은 약 530 nm 파장에서 관찰되었다. PNIPAM-Au와 PNIPAM-AAM-Au의 피크 확장과 변이의 주 원인은 폴리머 나노 입자 내의 AuNPs 간 거리 감소이다. 이는 폴리머 층의 붕괴 시 굴절률의 증가보다는 표면 플라즈몬 공명의 결합의 영향을 받기 때문이다.^{15,24-26}

그리고 세가지 pH 값(pH 5, 7, 9)에서 HAuCl₄ 환원을 통해 AuNPs 캡슐화 나노 젤의 형성에 대한 PNIPAM 제제의 효과를 조사하였다. Figure 5(a)는 Figure 3에 기술된 바와 같이 물리적 포획을 통해 각각 다른 pH 값에서 AuNPs가 담지된 PNIPAM의 나노 젤의 전형적인 TEM 이미지를 보여준다. 나노 젤 내에 성장된 여러 AuNPs는 pH \approx 7과 5에서 명확하게 관찰되었다(직경 \sim 8-34 nm). 산의 첨가로 인해 양 전하는 증가하였고 AuNPs의 표면의 반응은 쉽게 감소하였다. 반면에, 높은 pH에서 음 전하의 AuNPs는 PNIPAM 기반 나노 젤의 내부에서 잘 성장하지 않았다. Figure 5(b)에 표시된 것처럼 상이한 pH 값 또한 하이브리드 PNIPAM AAM-계 나노 젤의 크기에 영향을 미친다. 나노 젤의 크기는 pH \approx 5와 9일 때 팽창에 의해 증가하였고, 이는 각각 양성화 양전하로 하전된 아미노기와 탈 비양자화 음전하 카복실기 사이 반발 상호 작용에 기인한다. 반면에, pH \approx 5일 때 고분자의 상을 뚜렷하게 확인하기 어려웠기 때문에 회색 선으로 표시하였다. 중성 pH \approx 7에서 양이온과 음이온 그룹은 상호적으로 끌어당기며 나노 젤의 수축을 주도하였다.¹⁹

결론

AuNPs을 담지한 PNIPAM 기반 나노 젤 시스템을 증명하

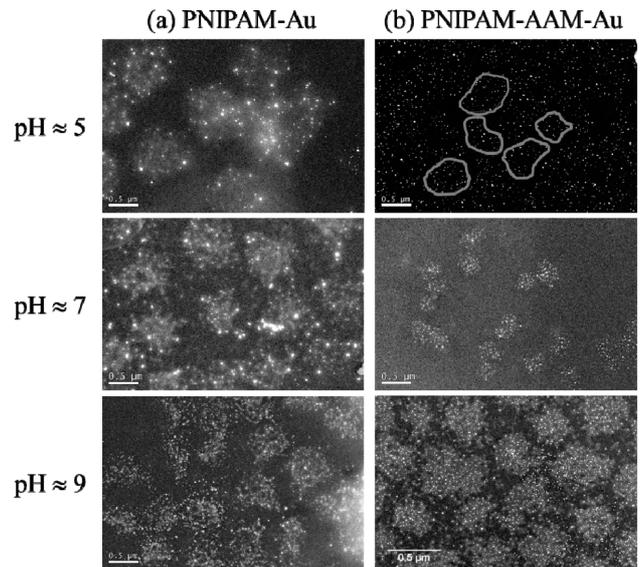


Figure 5. TEM images of nanogels containing AuNPs as a function of pH (a) PNIPAM-Au; (b) PNIPAM-AAM-Au.

기 위하여 여러 공단량체를 사용해 AuNPs를 담지한 다양한 PNIPAM 형성을 표면 전하에 따라 조사하였다. 양성과 중성의 표면전하 PNIPAM 나노 젤은 AuNPs를 내부에 잘 담지 하였지만, 음성 표면전하일 때는 젤 내에 AuNPs가 잘 분산 되지 않았다. AuNPs의 성장을 이끄는 성장 반응과 AuNPs 담지 나노 젤의 팽창과 수축은 pH에 따라 양 또는 음성 전하의 영향을 받았다. 추가로 나노 젤 내부의 AuNPs의 크기는 AuNPs와 화학용액에 대한 나노 젤의 비율에 따라 조절될 수 있었다. 이러한 복합 나노 입자는 용이하게 펩타이드 또는 DNA와 개질 혹은 결합되어 의료용 약물전달 응용으로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글: 본 연구는 산업통상자원부 및 한국산업기술평가위원회의 전략적핵심소재기술개발사업의 일환으로 수행하였음. [10050526, 바이오매스 유래 소재를 이용한 생분해성 고흡수성 고분자 수지 및 이를 적용한 disposable diaper 제품 개발] 또한 이는 2016년 중앙대학교 연구장학금을 수혜한 논문임. This work was supported by the Technology Innovation Program, 10050526, Development of disposable diaper based on biomass-oriented biodegradable super absorbent polymers) funded by the Ministry of Trade, Industry & Energy (MI, Korea) and the Chung-Ang University Research Scholarship Grants in 2016.

참고 문헌

1. Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, and A. B. Yu, *Chem. Eng. Sci.*,

- 61, 1027 (2006).
2. E. C. Cho, C. Glaus, J. Chen, M. J. Welch, and Y. Xia, *Trends Mol. Med.*, **16**, 561 (2010).
3. G. Huang, J. Gao, Z. Hu, J. V. St John, B. C. Ponder, and D. Moro, *J. Control. Release*, **94**, 303 (2004).
4. Y. Qiu and K. Park, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 321 (2001).
5. Y. X. Wang, J. Qin, Y. Wei, C. P. Li, and G. H. Ma, *Powder Technol.*, **236**, 107 (2013).
6. I. Mejac and C. D. Tran, *Anal. Chem.*, **83**, 3520 (2011).
7. N. Singh and L. A. Lyon, *Chem. Mater.*, **19**, 719 (2007).
8. Y. Lu, J. Yuan, F. Polzer, M. Drechsler, and J. Preussner, *ACS Nano*, **4**, 7078 (2010).
9. Y. P. Zhang, K. Liu, Y. Guan, and Y. J. Zhang, *RSC Adv.*, **2**, 4768 (2012).
10. M. Karg, S. Jaber, T. Hellweg, and P. Mulvaney, *Langmuir*, **27**, 820 (2011).
11. A. Hebeish, S. Farag, S. Sharaf, and T. I. Shaheen, *Carbohydr. Polym.*, **102**, 159 (2014).
12. T. Huang, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, **107**, 905 (2012).
13. M. Das, N. Sanson, D. Fava, and E. Kumacheva, *Langmuir*, **23**, 196 (2007).
14. M. Karg, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, T. Hellweg, and L. M. Liz-Marzán, *Small*, **3**, 1222 (2007).
15. K. Jun-Hyun, W. B. Brett, A. P. Julie, H. Jiayun, and B. Hongsik, *Nanotechnology*, **23**, 275606 (2012).
16. M. J. Snowden, B. Z. Chowdhry, B. Vincent, and G. E. Morris, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **92**, 5013 (1996).
17. X. Ji, R. Shao, A. M. Elliott, R. J. Stafford, E. Esparza-Coss, J. A. Bankson, G. Liang, Z.-P. Luo, K. Park, J. T. Markert, and C. Li, *J. Phys. Chem. C*, **111**, 6245 (2007).
18. Y. Lu, Y. Mei, M. Ballauff, and M. Drechsler, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 3930 (2006).
19. M. Das, L. Mordoukhovski, and E. Kumacheva, *Adv. Mater.*, **20**, 2371 (2008).
20. L. Bao and L. Zha, *J. Macromol. Sci. A*, **43**, 1765 (2006).
21. M. Kuang, D. Wang, and H. Möhwald, *Adv. Funct. Mater.*, **15**, 1611 (2005).
22. I. Gorelikov, L. M. Field, and E. Kumacheva, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15938 (2004).
23. M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, and S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 631 (2001).
24. T. Yushi, F. Hiroshi, H. Tomokatsu, and N. Masayuki, *IOP Conf. Ser., Mater. Sci. Eng.*, **18**, 082008 (2011).
25. R. Contreras-Cáceres, A. Sánchez-Iglesias, M. Karg, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, J. Pacifico, T. Hellweg, A. Fernández-Barbero, and L. M. Liz-Marzán, *Adv. Mater.*, **20**, 1666 (2008).
26. S. J. Barrow, A. M. Funston, D. E. Gomez, T. J. Davis, and P. Mulvaney, *Nano Lett.*, **11**, 4180 (2011).