

## 향오일을 함유한 키토산 마이크로캡슐의 제조 및 방출 특성

박수진<sup>†</sup> · 이윤목

한국화학연구원 화학소재연구부  
305-600 대전시 유성구 장동 100  
(2005년 1월 18일 접수, 2005년 6월 30일 채택)

### Preparation and Release Behaviors of Chitosan Microcapsules Containing Fragrant Oil

Soo-Jin Park<sup>†</sup> and Yun-Mok Lee

Advanced Materials Division, Korea Research Institute of Chemical Technology,  
100, Jang-dong, Yuseong-go, Daejeon 305-600, Korea  
(Received 18 January 2005; accepted 30 June 2005)

#### 요 약

본 실험에서는 다중 유화법과 calcium chloride를 사용한 가교반응에 의해 향오일이 함유된 키토산 마이크로캡슐을 제조하였고, 향오일의 농도와 교반속도 변화에 따른 마이크로캡슐의 특성을 조사하였다. 마이크로캡슐의 크기와 형태는 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다. 실험 결과, 마이크로캡슐의 평균 입자크기는 교반속도가 증가함에 따라 작아지는 것을 확인할 수 있었다. 키토산 마이크로캡슐에 대한 심물질의 함입은 FT-IR에 의해  $1,460\text{ cm}^{-1}$ 와  $2,960\text{ cm}^{-1}$ 에서 향오일의 특정 피크를 통하여 확인하였다. 또한, 마이크로캡슐의 향오일 방출 거동을 살펴보기 위해 UV/vis. 흡광광도법으로 흡광도를 측정하여 방출 거동을 관찰하였다. 향오일의 방출 거동은 향오일 농도의 경우 함유량이 증가할수록 방출량은 증가하였고 pH의 경우 pH가 감소할수록 방출량은 증가하였다.

**Abstract** – In this work, the crosslinked-chitosan microcapsules containing fragrant oil were prepared by oil-in-water-in-oil (O/W/O) multi-emulsion method. The effects of concentration of fragrant oil and stirring rates on the preparing of the microcapsules were investigated. The diameter and form of the microcapsules were observed by scanning electron microscope (SEM). As a result, the average particle size of microcapsules was decreased with increasing the stirring rate. The formation of chitosan microcapsules was confirmed by FT-IR. The inclusion of fragrant oil into chitosan microcapsules was determined in the presence of specific peak of fragrant oil, i.e.,  $1,460\text{ cm}^{-1}$ ,  $2,960\text{ cm}^{-1}$ . Also, the release behavior or profile of fragrant oil from chitosan microcapsules was examined with UV/vis spectra. Released amounts of fragrant oil were increased with increasing as the content of fragrant oil and decreasing the pH.

Key words: Microcapsule, Chitosan, Fragrant Oil, Oil-in-Water-in-Oil Mult- Emulsion Method

#### 1. 서 론

마이크로캡슐이란 고체, 액체 또는 기체상의 미소한 심물질이 연속적인 고분자 벽재물질로 둘러싸인 직경이 수·수백  $\mu\text{m}$  정도의 입자상 물질을 말한다. 마이크로캡슐화법은 휘발성 액체나 활성 물질들의 보호, 냄새, 촉감차폐 및 캡슐화된 물질의 외부로의 방출 시기와 속도 등을 조절할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 기능성 물질의 마이크로캡슐화에 관한 연구는 의약, 농약, 화장품은 물론 섬유산업 분야 등으로 널리 확대되고 있다[1, 2].

마이크로캡슐의 심물질은 연속상에서 유화능력과 안정성이 우수해야 하고, 벽재물질은 건조 중 미세하고 조밀한 망상구조가 형성

될 수 있어야 한다[3]. 마이크로캡슐의 벽재물질로는 전분, 아라비아 검, 셀룰로오스, 키토산 그리고 카라기난 등의 천연 고분자 및 합성 고분자들이 주로 사용되어 진다고 알려져 있다[4]. 또한, 고분자 벽재물질은 체내에서 생체독성, 자극 및 항원으로서의 기능성이 적어야 하며 생체적합성이 우수해야 한다. 그리고 약물을 체내의 특정 부위에 적절히 방출시킬 수 있는 물리화학적 구조가 요구되어 진다.

셀룰로오스와 함께 지구상에 가장 많이 존재하는 것으로 알려진 천연 고분자 키토산은 신기능성 소재로 최근에 널리 알려져 왔으며, 키토산의 N-아세틸기를 탈아세틸화하여 아미노기로 치환시켜 얻어지는 키토산은 유기용매에 대한 용해성이 양호하여 화학적 변형과 성형 가공성이 용이하기 때문에 산업적으로 다양하게 사용되고 있다[5]. 최근 키토산의 이와 같은 성질을 이용하여 마이크로캡슐, 마이

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: psjin@kriict.re.kr

크로비드 그리고 멤브레인 등의 형태로 성형하여 이들을 약물전달체, 중금속 분리용 담체, 분리막 등의 분야에 응용한 문헌들이 발표되고 있다[6].

키토산은 생체내 소화효소에 의해 분해되지 않고 lysozyme와 같은 특정 효소에 의해 선택적으로 가수분해되는 특성이 있으므로 약물의 선택적 방출에 효과적이라 볼 수 있다[7]. 또한, 키토산은 생체친화성이 우수할 뿐만 아니라 손상을 입은 생체의 상처회복을 촉진하는 성질이 있는 것으로도 보고되고 있다[8]. 이외에 키토산의 가수분해 생성물인 키토산 올리고당은 항균성, 항종양성, 면역기능 향상 등의 생리활성이 있는 것으로 알려져 있어 약물전달체로서의 키토산의 응용 및 연구는 더욱 가속화되고 있다.

따라서 본 연구에서는 O/W/O 다중 유화법에 의해 향오일이 함유된 키토산 마이크로캡슐을 제조하였고, 향오일의 농도와 교반속도의 변화에 따른 마이크로캡슐의 형태, 입자크기 및 열적 특성에 대해서 알아보고 pH 2와 pH 9에서 향오일 농도에 따른 향오일 방출 거동에 대해 고찰하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 재료

본 연구에서는 벽재물질로서 천연 고분자의 하나인 chitosan(Mw: 50,000-100,000, viscosity: 20,000 cps, Aldrich Co.)을 사용하였고, 심물질로는 fragrant oil((주) 보락)을 사용하였다. 벽재물질과 심물질을 위한 공용매로는 각각 acetic acid(Showa Chem. Co.)와 dichloromethane(DCM, Junsei Co.)을 사용하였으며, 유화제로서 Span 80(Showa Chem. Co.)과 Tween 20(Showa Chem. Co.)을 사용하였다. 가교제로는 calcium chloride( $\text{CaCl}_2$ , Junsei Co.)를 사용하였다. 그 밖에 soybean oil(Yakuri Pure Chem. Co.)과 petroleum ether(Jin Chem. & Pharmaceutical Co.) 등을 사용하였다. 본 실험에 사용된 키토산의 화학구조를 Fig. 1에 나타내었다.

### 2-2. 키토산 마이크로캡슐의 제조

2 wt% 키토산 용액에 Tween 20을 녹인 다음 향오일이 용해된 DCM 용액을 첨가하고 homogenizer를 이용하여 11,000 rpm으로 고

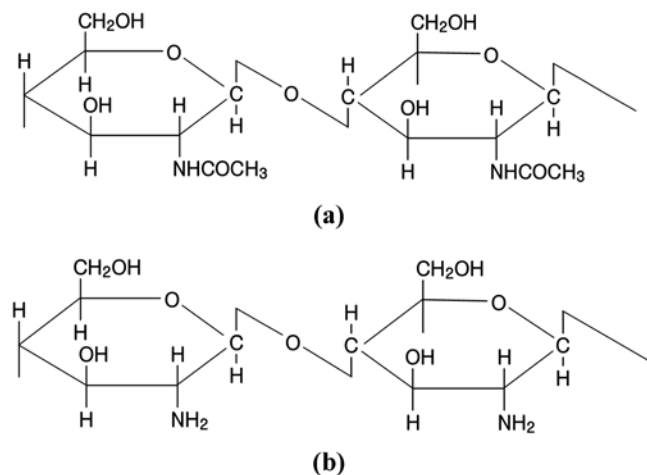


Fig. 1. Chemical structures of chitin and chitosan; (a) chitin and (b) chitosan.

속 교반을 하여 O/W 에멀전을 만들었다. 또한, 제조된 O/W 에멀전은 soybean oil에 Span 80을 녹인 용액에 첨가하고, DCM을 증발시키기 위해 50-60 °C로 증탕가열하며, 900 rpm으로 1시간 동안 교반하여 O/W/O 에멀전을 만들었다. 온도를 상온으로 낮춘 후, O/W/O 에멀전 용액에  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 가하여 pH 8의 상태로 만든 다음 가교제로서  $\text{CaCl}_2$ (3 wt%)를 넣어주고 2시간 동안 교반하였다. 이 반응 용액을 증류수와 petroleum ether로 세척 후 건조하여 마이크로캡슐을 제조하였다.

### 2-3. FT-IR 분석 및 마이크로캡슐의 형태

다중 유화법에 의해 제조된 마이크로캡슐에 심물질의 함유여부를 확인하기 위하여 키토산, 향오일 그리고 제조된 마이크로캡슐을 KBr 법을 이용하여 샘플을 제작하였고, Fourier transform infrared spectrophotometer(FT-IR, Digital FRS-80, Bio-Rad scan range, 400-4,000  $\text{cm}^{-1}$ )를 이용하여 비교 분석하였다. 또한, Scanning electron microscope(SEM, JSM-840A, JEOL. Co.)를 사용하여 제조된 마이크로캡슐의 형태 및 크기를 관찰하였다.

### 2-4. 마이크로캡슐의 열적 특성

향오일의 농도 변화에 따른 마이크로캡슐의 열적 특성을 알아보기 위하여 질소 분위기하에서 10 °C/min의 속도로 30-250 °C의 온도 범위에서 Differential scanning calorimetry(DSC, Perkin Elmer DSC-6)로 측정하였고, 0-600 °C의 온도 범위에서 Thermogravimetric analysis(TGA, Du pont, TGA-2950)를 사용하여 열적 안정성을 관찰하였다.

### 2-5. 약물함량 측정 및 약물방출 실험

향오일의 마이크로캡슐 0.1 g을 취하여 5% 초산수용액 20 ml에 용해시키고, 이를 36.5 °C에서 교반하여 24시간 동안 방치한 후 Ultraviolet-visible spectrophotometer(UV-Vis, Shimadzu Co. UV-2,550) 흡광광도계를 사용하여 328 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성된 검량선으로부터 담지된 약물의 함량을 정량하였다. 또한, 약물방출 특성을 실험하기 위해 pH 2와 pH 9의 완충용액 20 ml에 마이크로캡슐 0.1 g을 넣어 36.5 °C로 조절된 진탕기에 넣고, 서서히 교반하면서 일정한 시간마다 시료용액을 취하여 분석하였다. 채취한 시료용액은 UV/Vis. 흡광광도계를 사용하여 328 nm에서 흡광도를 측정하여 작성된 검량선으로부터 약물 방출량을 정량하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. FT-IR에 의한 심물질 분석

다중유화법에 의하여 제조된 마이크로캡슐에 심물질의 함유 여부를 확인하기 위하여 FT-IR을 사용하였고, 키토산, 향오일 그리고 마이크로캡슐의 FT-IR 분석 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

키토산과 제조된 마이크로캡슐을 비교하면 3,400  $\text{cm}^{-1}$  부분에서 키토산의 N-H결합 신축진동 피크와 1,640  $\text{cm}^{-1}$  부근에서 amide의 C=O결합에 의한 신축 진동 피크를 확인할 수 있었다. 또한, 심물질인 향오일에서만 나타나는 2,960  $\text{cm}^{-1}$  부분의 강한  $\text{CH}_2$  결합 피크와 1,460  $\text{cm}^{-1}$  부분의 C-H 신축진동 피크가 제조된 마이크로캡슐의 IR 피크에서도 나타난 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 심물질이 마이크로캡슐의 내부에 함유되었음을 확인하였다.

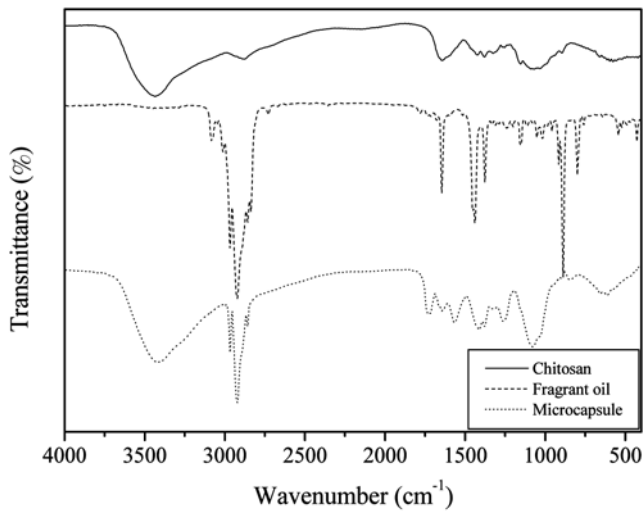


Fig. 2. FT-IR spectra of chitosan, fragrant oil, and chitosan microcapsules containing fragrant oil.

### 3-2. 교반속도에 대한 영향

마이크로캡슐이 적용되는 여러 분야에서 입자 형태 및 크기는 매우 중요한 요소이다. 입자의 형태 및 크기를 제어하는 가장 일반적인 방법에는 교반속도를 제어하는 방법이 있으며, 캡슐화 효율성도 교반속도에 많은 영향을 받는다고 알려져 있다[9]. 마이크로캡슐 입자의 형태 및 크기를 비교 분석하기 위하여 키토산의 농도를 2 wt%, 향오일의 농도를 2 wt%로 고정하고, 동일 시간 동안 교반속도를 400, 600 그리고 900 rpm으로 각각 변화시켜 마이크로캡슐을 제조하였다.

Fig. 3은 주사전자현미경을 사용하여 교반속도의 증가에 따라 제조한 마이크로캡슐의 형태와 크기를 관찰한 것으로서 교반속도가 증가할수록 구형의 형태를 가지는 마이크로캡슐이 많아짐을 확인할 수 있었다. 400 rpm과 같이 낮은 교반속도로 마이크로캡슐을 제조한 경우에는 Fig. 4에서 확인한 바와 같이 평균 6-8  $\mu\text{m}$ 의 비교적 큰 입자들이 생성되고 교반속도가 900 rpm으로 증가함에 따라 마이크로캡슐의 평균 입자크기는 3-4  $\mu\text{m}$ 까지 감소하였으며, 이로부터 교반속도가 증가함에 따라 작은 평균 입자크기를 갖는 마이크로캡슐이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 교반속도 증가에 따른 입자의 전단 응력의 증가로 인한 표면장력의 저하로

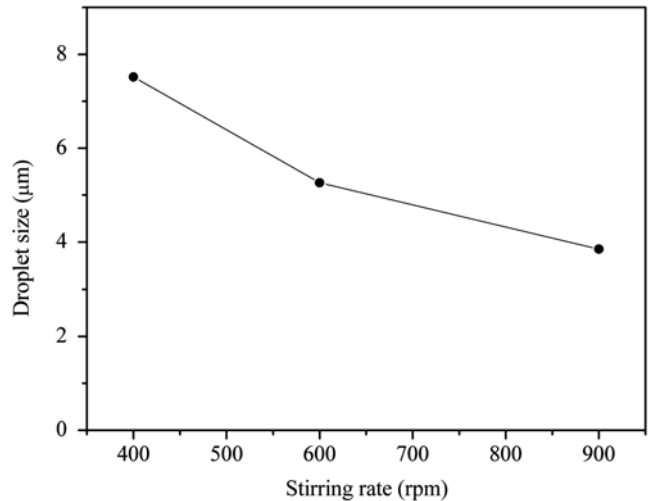


Fig. 4. The average particle size of microcapsules prepared by different stirring rates.

보다 안정한 캡슐을 형성하기 위해 입자의 크기가 감소하는 것으로 판단된다[10].

### 3-3. 향오일 농도에 의한 영향

향오일의 농도가 마이크로캡슐의 형태에 미치는 영향을 알아보기 위하여 교반속도를 900 rpm, 키토산의 농도를 2 wt%로 고정하고 향오일의 농도를 2 wt%와 4 wt%로 변화시켜 마이크로캡슐을 제조하였다. 그리고 SEM을 이용하여 마이크로캡슐의 형태를 관찰한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에서 볼 수 있듯이 향오일의 농도가 2 wt%일 때와 4 wt%일 때의 마이크로캡슐의 형태 및 입자크기는 큰 변화 없이 거의 비슷하다. 이는 2 wt%를 사용하였을 경우에는 4 wt%를 사용하였을 때보다 심물질을 둘러싸는 키토산이 심물질의 표면에 더 많이 흡착되어 키토산의 두께가 증가하며 이와는 대조적으로 향오일이 4 wt%로 더 많은 양을 사용하였을 경우에는 사용된 키토산에 대한 심물질의 양이 많아 심물질을 둘러싸는 키토산의 두께가 감소하기 때문으로 보인다[11]. 결과적으로 향오일 농도에 의한 마이크로캡슐의 형태 및 평균 입자크기의 변화는 거의 없는 것으로 판단된다.

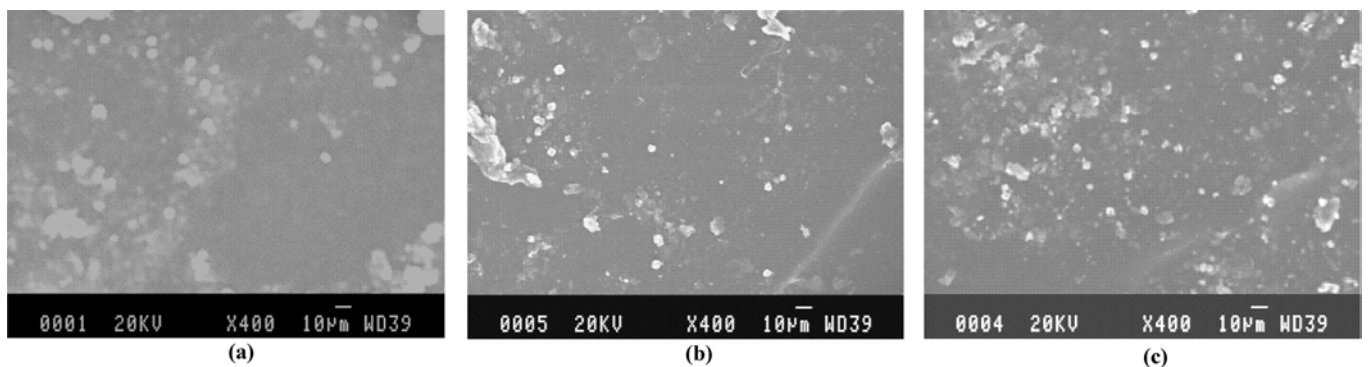


Fig. 3. SEM photographs of microcapsules prepared with different stirring rates; (a) 400 rpm, (b) 600 rpm, and (c) 900 rpm.

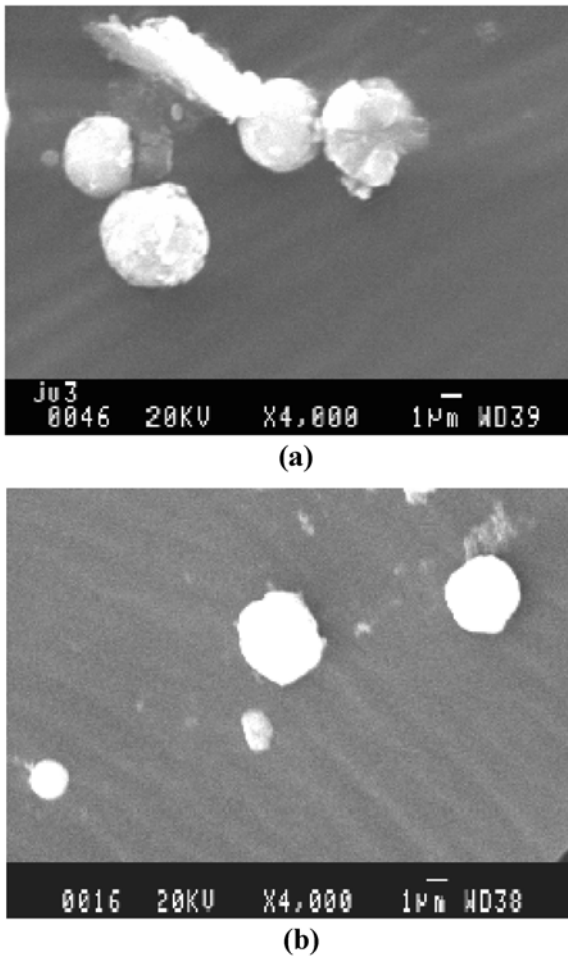


Fig. 5. SEM photographs of microcapsules prepared with different core concentrations; (a) 2 wt% and (b) 4 wt%.

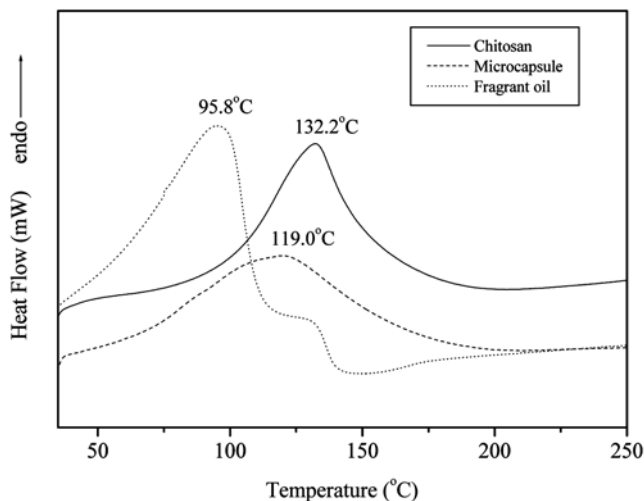


Fig. 6. DSC thermograms of chitosan/fragrant oil microcapsules.

### 3-4. 마이크로캡슐의 열적 특성

키토산 마이크로캡슐의 열적 특성을 알아보기 위하여 DSC와 TGA를 사용하였고, 순수 키토산, 향오일 그리고 키토산 마이크로캡슐의 DSC 열분석도를 Fig. 6에 순수 키토산과 키토산 마이크로

화학공학 제43권 제4호 2005년 8월

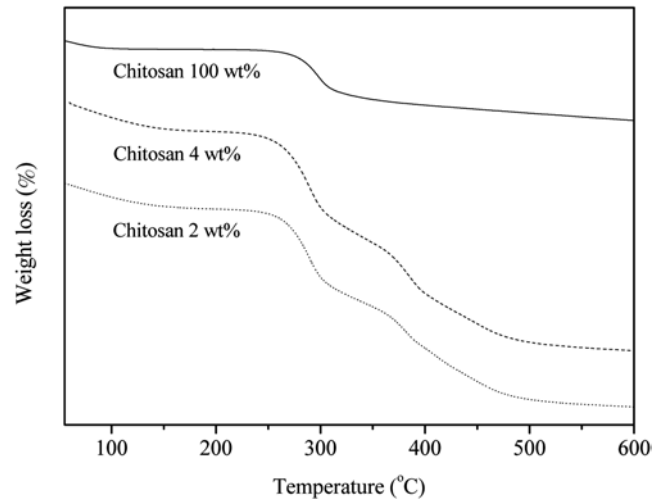


Fig. 7. TGA thermograms of chitosan/fragrant oil microcapsules.

캡슐의 TGA 열분석도를 Fig. 7에 나타내었다.

DSC는 순수 키토산, 향오일 그리고 키토산 마이크로캡슐의 용융 온도를 살펴 보기 위해서 측정하였다. Fig. 6을 분석한 결과 순수 키토산, 향오일 그리고 키토산 마이크로캡슐은 각각 132.2, 95.8 그리고 119.0°C에서 용융되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 순수 키토산과 키토산 마이크로캡슐을 비교하였을 때 키토산 마이크로캡슐의 용융 온도가 더 낮은 것을 확인할 수 있었다[12]. 이는 순수 키토산이 향오일을 함유하고 있는 키토산 마이크로캡슐보다 분자간의 상호작용이 강하므로 이를 용융하기 위해서는 더 많은 에너지를 필요로 하기 때문인 것으로 판단된다[13]. 그리고 향오일을 함유한 키토산 마이크로캡슐의 흡열 피크가 넓어지는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 용융온도가 다른 향오일과 키토산 두 물질이 용융되기 때문으로 보인다.

Fig. 7은 순수 키토산, 키토산의 농도가 2 wt%인 마이크로캡슐 그리고 4 wt%인 마이크로캡슐의 열분석도를 나타낸 것으로서 분석 결과 순수 키토산은 260°C 이후부터 급격한 무게손실이 관찰되었고, 600°C에서 잔존량은 31.70 wt% 이었다. 그리고 키토산의 농도가 2 wt%인 마이크로캡슐과 4 wt%인 마이크로캡슐의 경우에는 250-300°C와 370-400°C의 두 구간에서 큰 무게손실이 관찰되었고, 600°C에서 2 wt% 마이크로캡슐의 잔존량은 27.27 wt%, 4 wt%인 마이크로캡슐의 경우에는 31.07 wt%로 관찰되었다[14]. 위의 결과에서 키토산의 농도가 감소할수록 잔존량이 감소하는 것을 알 수 있었으며, 이를 통해 키토산의 함량이 적어지면 마이크로캡슐의 분해가 더 잘 되는 것을 확인할 수 있었다.

### 3-5. 향오일 방출 거동

심물질의 농도에 따라 제조된 마이크로캡슐의 방출 거동을 비교하기 위하여 심물질의 농도를 2 wt%와 4 wt%으로 하여 키토산 마이크로캡슐을 제조하였고, 키토산 마이크로캡슐로부터 방출되는 향오일의 농도는 다음의 식 (1)에 의하여 계산하였다[15].

$$\text{Cumulative release (\%)} = \frac{N_t}{N} \times 100 \quad (1)$$

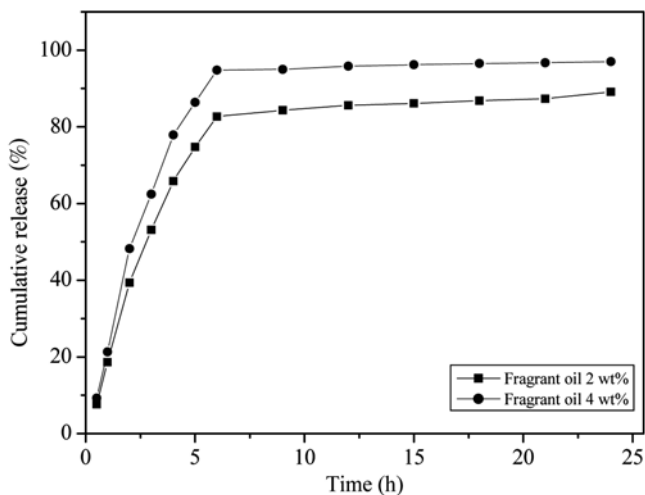


Fig. 8. Release behaviors of chitosan/fragrant oil microcapsules in the buffer solution of pH 2.

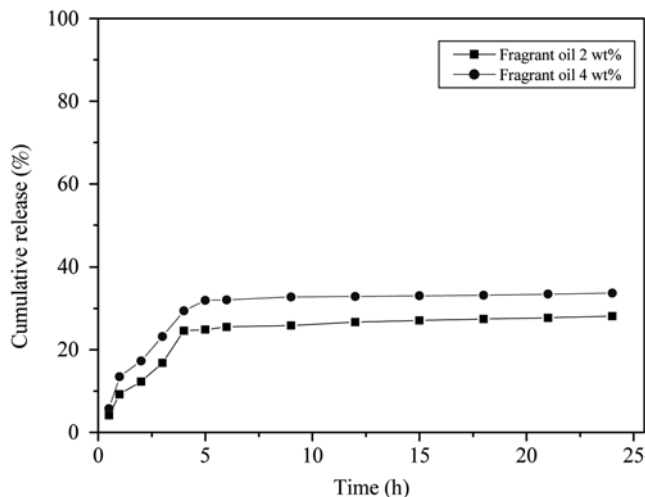


Fig. 9. Release behaviors of chitosan/fragrant oil microcapsules in the buffer solution of pH 9.

여기서,  $N$ 은 약물담지량을 말하며,  $N_0$ 는 시간에 따라 방출된 약물의 양을 나타낸다. 위의 식 (1)을 통하여 pH 2에서 최대 약물방출률은 97.1%이고 pH 9에서 최대 약물방출률은 33.7%인 것을 확인할 수 있었다.

제조된 마이크로캡슐의 UV/vis. 흡광광도법에 의한 pH 2와 pH 9에서의 방출 거동의 변화를 Fig. 8과 Fig. 9에 각각 나타내었다. Fig. 8은 pH 2에서의 방출 거동을 나타낸 그림으로서 심물질이 2 wt%인 경우에는 6시간 안에 80% 이상이 방출되었다. 또한, 심물질이 4 wt%인 경우에는 6시간 안에 90% 이상이 방출되었다. Fig. 9는 pH 9에서의 방출 거동을 나타낸 그림으로서 심물질이 2 wt%인 경우에는 4시간 안에 20% 정도의 방출량을 보였고 심물질이 4 wt%인 경우에는 4시간 안에 30% 정도의 방출량을 보였다.

위의 결과를 통해 심물질이 많은 경우에 더 많은 양의 방출이 이루어지고 방출 속도도 더 빠른 것을 확인할 수 있었다. 이는 마이크로캡슐의 제조시 사용된 심물질의 양이 많은 경우, 벽재물질인 키토산에 대한 심물질의 함량이 많아 마이크로캡슐 생성시 키토산은

얇은 벽을 생성하며 심물질의 양이 적은 경우에는 심물질을 둘러싸는 키토산의 두께가 증가하여 상대적으로 키토산이 허물어지는데 걸리는 시간이 증가하기 때문에 생기는 결과로 판단된다.

또한, pH 2와 pH 9에서의 방출 거동을 비교해 보면 pH 2에서는 80-90% 이상의 방출량을 나타내는 것에 반하여 pH 9에서는 20-30% 정도의 방출량을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 키토산의 내부에 존재하고 있는 관능기 중  $-\text{CH}_2\text{OH}$ 기와  $-\text{NH}_2$ 가 산과 반응하면  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$ ,  $-\text{NH}_3^+$  등의 염상태를 유지하면서 용해될 수 있지만 키토산이 염기와 반응하면 용해성이 저하되고 그 결과 겔화될 수밖에 없다. 따라서 pH가 감소함에 따라 키토산 마이크로캡슐의 벽의 용해도가 증가하여, 마이크로캡슐이 붕괴하면서 훨씬 많은 양의 방출이 이루어지는 것으로 보인다[16, 17]. 체내에서 경구 투여된 키토산은 pH 2-3 정도의 산성으로 유지되고 있는 위 속에서는  $-\text{NH}_3^+$ 의 염상태를 유지하면서 용해될 수 있지만 장내에서는 pH 8-9 정도의 염기상태이므로 키토산의 용해성이 저하되어 겔화될 수밖에 없으므로 위에서 효과를 볼 수 있는 약물에 적용하는 것이 효과적이라고 판단된다.

#### 4. 결 론

본 실험에서는 향오일을 심물질로 함유하는 마이크로캡슐을 천연 고분자인 키토산을 벽재물질로 하여 O/W/O 다중 유화법으로 제조하였으며 향오일의 농도, 교반속도의 변화에 따른 마이크로캡슐의 형태, 입자크기, 열적 특성 및 향오일 방출 거동에 대하여 고찰하였다. 제조된 마이크로캡슐은 SEM을 통하여 교반속도가 증가함에 따라 입자의 크기가 감소함을 확인하였으며, FT-IR 측정을 통하여 향오일이 마이크로캡슐 안에 함유되었음을 확인하였다. 또한, DSC와 TGA 측정을 통하여 키토산 마이크로캡슐의 열적 특성을 관찰하였다. pH 2와 pH 9에서의 방출 거동을 비교해 보면 키토산이 산에서는 용해되고 염기에서는 응고되는 성질 때문에 pH가 감소함에 따라 키토산 마이크로캡슐의 벽의 용해도가 증가하여, pH 2에서 훨씬 많은 양의 방출이 이루어졌다. 그리고 경구 투여된 키토산은 액성이 산성으로 유지되고 있는 위 속에서는  $-\text{NH}_3^+$ 의 염상태를 유지하면서 용해될 수 있지만 장내에서는 그 액성이 염기상태이므로 키토산의 용해성이 저하되고 겔화로 발전하게 된다. 이를 통해 키토산 마이크로캡슐은 위에서 방출되어 효과를 볼 수 있는 약물 적용에 유용할 것으로 판단된다.

#### 참고문헌

1. Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. and Zou, X., "Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles," *Carbohydr. Res.*, **339**(16), 2693-2700(2004).
2. Park, S. J., Shin, Y. S. and Lee, J. R., "Preparation and Characterization of Microcapsules Containing Lemon Oil," *J. Colloid Interface Sci.*, **241**(2), 502-508(2001).
3. Park, S. J. and Lee, J. R., "Dispersive Stabilization of Liquid Crystal-in-Water with Acrylamide Copolymer/Surfactant Mixture: Nematic Curvilinear Aligned Phase Composite Film," *J. Colloid Interface Sci.*, **219**(1), 178-183(1999).
4. Park, S. J., Yang, Y. J. and Lee, H. B., "Effect of Acid-Base Interaction Between Silica and Fragrant Oil in the PCL/PEG

- Microcapsules," *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **38**(1/2), 35-40 (2004).
5. Majeti, N. V. and Kumar, R., "A Review of Chitin and Chitosan Applications," *Rea. & Fun. Polym.*, **46**(1), 1-27(2000).
  6. Urugami, T., Matsuda, T., Okuno, H. and Miyata, T., "Structure of Chemically Modified Chitosan Membranes and Their Characteristics of Permeation and Separation of Aqueous Ethanol Solutions," *J. Membrane Sci.*, **88**(2/3), 243-251(1994).
  7. Jiang, H. L., Park, I. K., Shin, N. R., Kang, S. G., Yoo, H. S., Kim, S. I., Suh, S. B., Akaike, T. and Cho, C. S., "In Vitro Study of the Immune Stimulating Activity of an Atrophic Rhinitis Vaccine Associated to Chitosan Microspheres," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **58**(3), 471-476(2004).
  8. Muzzarelli, R. A. A., "Biochemical Significance of Exogenous Chitins and Chitosans in Animals and Patients," *Carbohydr. Polym.*, **20**(1), 7-16(1993).
  9. Arriagada, F. J. and Asare, K. O., "Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant Molar Ratio and Ammonia Concentration," *J. Colloid Interface. Sci.*, **211**(2), 210-220(1999).
  10. El-Gibaly, I., "Development and in vitro Evaluation of Novel Floating Chitosan Microcapsules for Oral Use: Comparison with Non-Floating Chitosan Microspheres," *Int. J. Pharm.*, **249**(1/2), 7-21 (2002).
  11. Park, S. J., Kim, K. S. and Hong, S. K., "Release Behaviors of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Microcapsule Containing Tocopherol," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(8), 1104-1110(2003).
  12. Nunthanid, J., Laungtana-anan, M., Sriamornsak, P., Limmatvapirat, S., Lim, L. Y., Puttipipatkachorn, S. and Khor, E., "Characterization of Chitosan Acetate as a Binder for Sustained Release Tablets," *J. Control. Release*, **99**(1), 15-26(2004).
  13. Yang, J. M., Su, W. Y., Leu, T. L. and Yang, M. C., "Evaluation of Chitosan/PVA Blended Hydrogel Membranes," *J. Membr. Sci.*, **236**(1/2), 39-51(2004).
  14. Martins, A. O., Silva, E. L. D., Carasek, E., Laranjeira, M. C. M. and Fávere, V. T. D., "Sulphoxine Immobilized onto Chitosan Microspheres by Spray Drying: Application for Metal Ions Pre-concentration by Flow Injection Analysis," *Talanta*, **63**(2), 397-403 (2004).
  15. Agnihotri, S. A. and Aminabhavi, T. M., "Controlled Release of Clozapine Through Chitosan Microparticles Prepared by a Novel Method," *J. Control. Release*, **96**(2), 245-259(2004).
  16. Chellat, F., Grandjean-Laquerriere, A., Naour, R. L., Fernandes, J., Yahia, L., Guenounou, M. and Laurent-Maquin, D., "Metallo-Proteinase and Cytokine Production by THP-1 Macrophages Following Exposure to Chitosan-DNA Nanoparticles," *Biomaterials*, **26**(9), 961-970(2005).
  17. Muzzarelli, C., Stanic, V., Gobbi, L., Tosi, G. and Muzzarelli, R. A. A., "Spray-Drying of Solutions Containing Chitosan Together with Polyuronans and Characterisation of the Microspheres," *Carbohydr. Polym.*, **57**(1), 73-82(2004).