

Iron Oxide(II, III)와 Valine을 이용한 키토산 나노입자의 약물전달 연구

장소현 · 강익중[†]

가천대학교 화공생명공학과
13120 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342
(2021년 8월 9일 접수, 2021년 9월 29일 수정본 접수, 2021년 10월 1일 채택)

Drug Delivery Study on Chitosan Nanoparticles Using Iron Oxide (II, III) and Valine

So-Hyeon Jang and Ik-Joong Kang[†]

Department of Chemical and Biochemical Engineering, Gachon University, Seongnam-daero 1342,
Sujeoung-Ku, Seongnam-Si, Geonggi-Do, 13120, Korea
(Received 9 August 2021; Received in revised from 29 September 2021; Accepted 1 October 2021)

요 약

나노입자에 기초한 약물 전달 시스템(DDS, Drug Delivery System)은 약물 방출의 매개체로서 약물의 방출량을 조절하고 적합한 장소에 전달하여 효능을 향상시키기 위해 사용되어왔다. 독성이 없고 생 분해성인 Chitosan은 좋은 생체 적합성을 가지고, 뛰어난 흡착력을 가져 약물전달체로 제조할 수 있다. 기본 아미노산 중 하나인 Valine은 근육의 성장과 조직의 회복을 돕는 물질이며 다른 아미노산과 함께 혈당 수치를 낮추고 성장호르몬 생산을 증가시키는 필수 아미노산이다. 본 연구에서는 Valine을 약물 흡수가 가능한 자성 Chitosan에 흡착시켜 TPP (tripolyphosphate)와의 cross-linking을 통해 약물전달체를 제조한 후, 흡수 및 방출 경향성에 대해 알아보았다. 안정성이 비교적 높은 Fe₃O₄를 사용하여 약물전달체가 자성을 띠게 만들어 표적 부위로 약물을 전달할 수 있도록 하였다. 최적의 조건에서 제조한 약물전달체를 아미노산의 정색반응인 Ninhydrin test를 통해 흡수 및 방출 경향성을 UV-Vis로 분석하여 확인하고 입자의 크기를 측정함으로써 약물전달체로 적합한 것을 확인하였다.

Abstract – A drug delivery system (DDS) based on nanoparticles has been used as a mediator to improve the efficacy of a drug by controlling the amount of drug released and delivering it to a target place. Chitosan, which is non-toxic and biodegradable, has good biocompatibility and excellent adsorption, so it can be used as a drug delivery vehicle. Valine, the essential amino acids, helps muscle growth and tissue recovery, and along with other amino acids. It lowers blood sugar levels and increases growth hormone production. In this study, Valine was adsorbed on magnetic chitosan which is capable of drug absorption, and Fe₃O₄-Valine CNPs was prepared through cross-linking with TPP (Tripolyphosphate). And then absorption and release trends of valine were investigated with the Fe₃O₄-Valine CNPs. Fe₃O₄, which has relatively high stability, is used to make the drug carrier magnetic so that the drug can be delivered to a target place. At optimal conditions, the absorption and release tendency of Fe₃O₄-Valine CNP was confirmed by analyzing by UV-Vis through the Ninhydrin test which is the color reaction of amino acids and by measuring the size of the particles, it was confirmed that it is suitable as a drug carrier.

Key words: DDS, Valine, Fe₃O₄, Chitosan nanoparticles

1. 서 론

약물 전달 시스템(Drug Delivery System, DDS)은 나노입자에 기초하여 약물을 안전하게 수송할 수 있도록 하는 시스템으로 각종

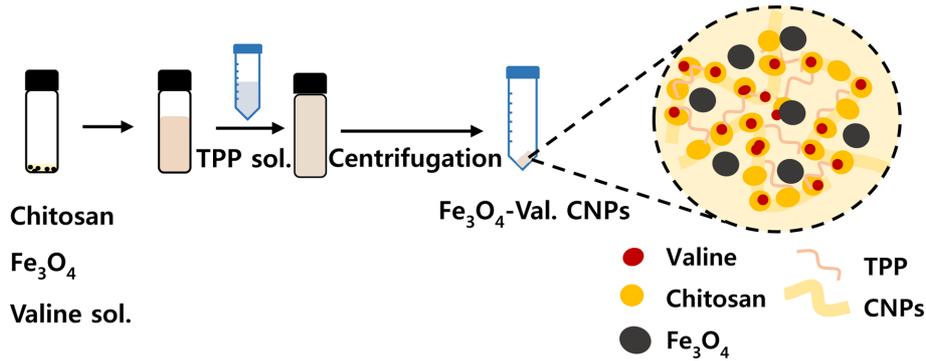
질병의 치료 목적뿐만 아니라 진단까지 수행할 수 있는 나노 기술이 개발되고 있다. 약물을 선택적으로 원하는 부위에 효율적으로 전달하고, 흡수가 용이하게 하여 약물 전달의 효과를 극대화하는 장점을 가진다. 의약품의 부작용을 최소화하면서도 약물 형태가 아닌 방법으로 목적지까지 약물을 전달하는 연구가 이루어지고 있다 [1-4].

Chitosan은 갑각류의 껍질에 존재하는 Chitin을 탈 아세트화하여 가공한 천연 고분자로, 독성이 없고 생분해성이라 좋은 생리 활성을 가져 약물 전달체로 이용될 수 있다. Chitosan은 금속과의 흡착성

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ijkang@gachon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Scheme 1. Process and molecule structure of Fe_3O_4 -Valine CNPs.

이 뛰어나 인체 내 부위를 표적화하여 전달할 수 있어 다양하게 합성되어 연구된다. Chitosan의 아미노기(- NH_2)와 산화철이 잘 결합할 수 있고 산화철은 인체에 대한 독성이 낮고 자성을 가지기 때문에 약물의 표적 전달에 응용될 수 있다[5-9].

Valine은 필수아미노산 중 하나로 체내에서 합성할 수 없는 아미노산으로 단백질의 기본 구성단위이다. Valine은 페니실린 생합성 경로의 전구체이며, 근육 성장과 조직 복구를 촉진하며 근육 조직 회복을 돕는 역할을 한다. Leucine, Isoleucine과 함께 Valine은 혈당수치를 낮추고 성장호르몬에도 관여를 하고, Valine의 결핍은 신체 성장과 근육조직의 회복에 치명적일 수 있다. Valine의 일일 섭취량은 체중 kg 당 26 mg으로 권장된다. Chitosan은 다른 물질에 대한 흡수, 흡착력이 우수하다. Chitosan을 이용한 나노입자를 제조하여 Fe_3O_4 를 흡착하고 Valine과 같은 약물을 흡수한다면, 이것은 좋은 자성 약물전달체가 될 수 있다[10-12].

Ninhydrin은 많은 생물시스템에 이용되는데, 그 중 아미노산의 농도를 분석하기 위해 사용된다. Ninhydrin은 α -아미노기와 발색반응을 하기 때문에 정량반응 값을 양론적으로 계산할 수 있다. 반응 메커니즘은 Scheme 2에 나타내었다. Ninhydrin과 아미노기와와의 반응은 'Ruhemann's purple'의 생성물을 유도한다. 'Ruhemann's

purple'의 색상 강도는 아미노 그룹의 수와 농도에 따라 달라지는데 전체 반응에 대한 최적 pH는 5.5이고 'Ruhemann's purple'은 약 570 nm에서 최대 스펙트럼을 갖는다[13,14].

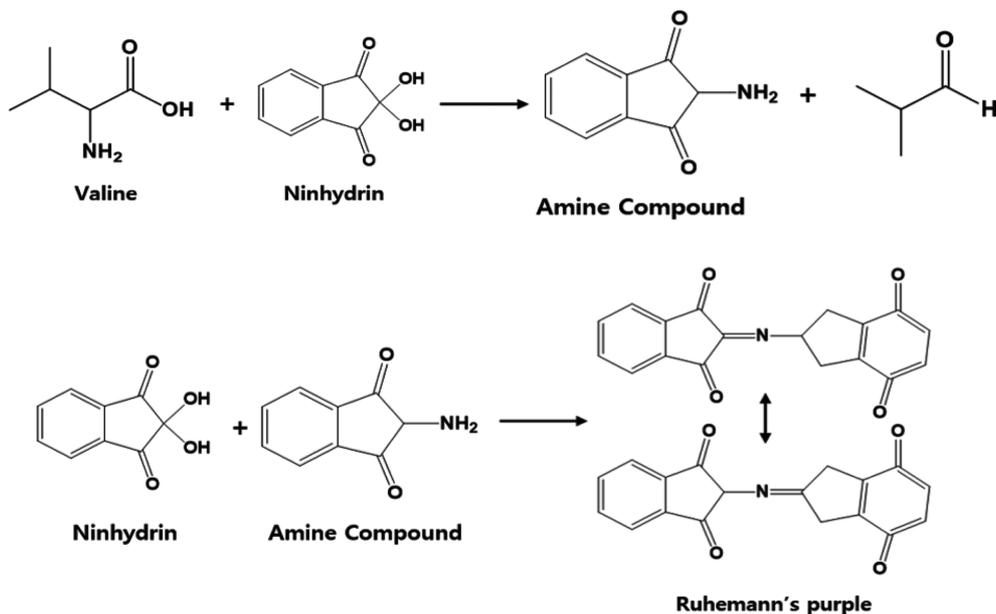
Chitosan과 TPP (Tripolyphosphate)를 사용하여 자성을 가진 키토산 나노입자를 제조하고 약물전달체로 이용할 수 있다. TPP는 낮은 농도에서는 생화학 시스템에 유해하지 않으며, chitosan끼리 가교결합을 만들어주는 가교역할로 Cross-Linking Process를 거쳐 이온성 겔화반응을 통해 CNPs가 제조된다[15-18].

본 연구에서는 TPP의 농도에 따라 제조된 CNPs의 크기를 측정하고, Fe_3O_4 의 양에 따른 CNPs의 특성을 측정하여 자성 약물전달체를 완성하였고, Valine을 약물로 정하여 Fe_3O_4 -Valine CNPs의 흡수 및 방출 효과를 측정할 수 있다. 흡수 및 방출량은 Ninhydrin test를 이용한 검량선에 대입하여 Fe_3O_4 -Valine CNPs가 약물전달체로서 적합하다는 것을 확인할 수 있었다.

2. 재료 및 방법

2-1. 시약 및 기구

본 실험에서 사용된 Sodium Tripolyphosphate, Iron (II, III)



Scheme 2. Ninhydrin reaction mechanism for Valine.

oxide는 시그마-알드리지사(순도 99.9%, USA)에서 구입하였고, HPLC Water(순도 99.9%), Sodium hydroxide는 Duksan사(순도 99.9%, Korea)에서 구입하였다. Glacial acetic acid, Sodium acetate anhydrous, Hydrochloric acid는 Daejung(순도 99%, Korea)의 제품을 사용하였다. PBS (Phosphate Buffered Saline)은 Welgene(순도 99%, Korea)의 제품을 사용하였고, Ninhydrin (Triketohydrindene Hydrate)은 Wako(순도 99%, Japan)의 제품을 사용하였다. 구입한 시약들은 추가 정제 과정 없이 사용하였다.

실험 시 pH를 측정하기 위하여 pH meter (Thermo, USA), 나노 입자의 크기를 측정하기 위하여 Electrophoretic Light Scattering (ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan), 표면 및 성분 분석을 위하여 Scanning Electron Microscope - Energy Dispersive Spectrometer (S-4700, Hitachi's, Japan)를 사용하였다. 작용기 분석을 위하여 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Vertex70, Bruker, German), 결정구조를 분석하기 위하여 High resolution X-ray diffractometer with high-temperature stage (Smartlab XRD, Rigaku, USA), Ninhydrin test 시 흡광도 측정을 위하여 Ultraviolet-Visible Spectroscopy (HP 8453, Agilent Technologies, USA)을 사용하였다.

2-2. CNPs (Chitosan nanoparticles)의 제조

50 ml vial에 Chitosan powder 0.06 g, Acetic acid 30 μ l를 골고루 첨가한 후, HPLC water 29.91 ml를 넣고 60 $^{\circ}$ C, 1500 rpm으로 1시간 동안 교반한다. 0.1 wt% TPP solution 20 ml를 제조하여 뷰렛을 이용하여 천천히 일정한 속도로 떨어뜨리고 1시간 동안 교반한다. 20 $^{\circ}$ C, 5500 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후, 상등액과 분리하여 HPLC water 29.91 ml에 분산시키면 CNPs를 얻을 수 있다[19].

2-3. Fe₃O₄ CNPs의 제조

50 ml vial에 Chitosan powder 0.06 g와 0.001 g, 0.005 g의 Fe₃O₄ powder를 각각 넣고, HPLC water 1 ml를 넣고 잘 섞어 4 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 냉장보관을 해준다.

Acetic acid 30 μ l와 HPLC water 28.91 ml를 넣고 60 $^{\circ}$ C, 1500 rpm으로 1시간 동안 교반한다. 이후 0.1 wt% TPP solution 20 ml를 뷰렛을 이용하여 천천히 일정한 속도로 떨어뜨리고 1시간 동안 교반한다. 20 $^{\circ}$ C, 5500 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후, 상등액과 분리하여 HPLC water 29.91 ml에 각각 분산시키면 0.001 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄ CNPs를 얻을 수 있다[20-21].

2-4. Fe₃O₄-Valine CNPs의 제조

50 ml vial에 Chitosan powder 0.06 g와 Fe₃O₄ powder 0.005 g을 넣고, 고농도 Valine solution (0.5 g Valine/1ml solution) 1 ml를 넣고 잘 섞어 4 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 냉장보관을 해준다. Acetic acid 30 μ l와 HPLC water 28.91 ml를 넣고 60 $^{\circ}$ C, 1500 rpm으로 1시간 동안 교반한다. 이후 0.1 wt% TPP solution 20 ml를 뷰렛을 이용하여 천천히 일정한 속도로 떨어뜨리고 1시간 동안 교반한다. 20 $^{\circ}$ C, 5500 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후, 상등액과 분리하여 HPLC water 29.91 ml에 각각 분산시키면 0.005 g Fe₃O₄-Valine CNPs를 얻을 수 있다.

2-5. 최적의 조건에서 Valine solution의 Ninhydrin test

Valine solution에 대한 Ninhydrin test는 pH 3.5, 4.5, 5.5의 0.1 M

Acetate buffer에 각 농도별 Valine solution과 Ninhydrin solution을 넣고 85, 90, 95 $^{\circ}$ C에서 8, 10, 12, 15분의 물중탕을 해보며 Valine solution의 Ninhydrin test에서 pH 5.5, 95 $^{\circ}$ C, 15분이라는 최적의 조건을 찾았다.

각 10 ml vial에 0.1 M pH 5.5 Acetate buffer 3 ml, Valine solution (0.02 wt% ~ 0.10 wt%) 1 ml, 1 wt% Ninhydrin solution 1 ml를 넣고 잘 섞어준 후 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 물중탕하여 UV-Vis로 흡광도를 측정하면 standard curve를 얻을 수 있다

Fe₃O₄-Valine CNPs 제조 시 원심분리 후의 상등액을 위와 같은 조건에서 Ninhydrin test를 진행한다. UV-Vis로 흡광도를 측정하여 standard curve에 대입하면 Fe₃O₄ CNPs이 흡수한 Valine의 양과 흡수율을 구할 수 있다. 원심분리 후의 나노입자는 PBS (Phosphate Buffered Saline) 29.91 ml에 분산시켜 37 $^{\circ}$ C, 1000 rpm으로 교반시키며 일정시간마다 1 ml씩 Ninhydrin test를 진행한다. UV-Vis로 흡광도를 측정하여 standard curve에 대입하면 Fe₃O₄-Valine CNPs의 방출된 Valine의 양과 흡수율에 따른 방출율을 구할 수 있다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 CNPs, Fe₃O₄, Fe₃O₄ CNPs, Fe₃O₄-Valine CNPs의 작용기를 FT-IR을 이용하여 확인하였다. CNPs는 3700-3584 cm^{-1} , 3550-3200 cm^{-1} , 1420-1330 cm^{-1} 에서 O-H, 3350-3310 cm^{-1} , 1650-1580 cm^{-1} 에서 N-H, 3000-2840 cm^{-1} 에서 C-H, 1124-1087 cm^{-1} 에서 C-O, 3700-3584 cm^{-1} , 1080-764 cm^{-1} 에서 P-O 결합을 확인하였다. P-O 결합은 chitosan에는 없는 특징이기 때문에 Chitosan과 TPP 수용액의 가교가 잘 일어나 CNPs가 만들어진 것을 확인하였다. Pure Fe₃O₄는 570-500 cm^{-1} 에서 특징적인 그래프가 나타났는데 peak가 겹쳤지만 CNPs와 Fe₃O₄ CNPs의 분명한 그래프의 차이가 있기 때문에 Fe₃O₄가 CNPs에 흡착되었다고 판단하였다.

Fe₃O₄ CNPs에서 산화철의 양에 변화를 주었는데, 뚜렷한 peak를

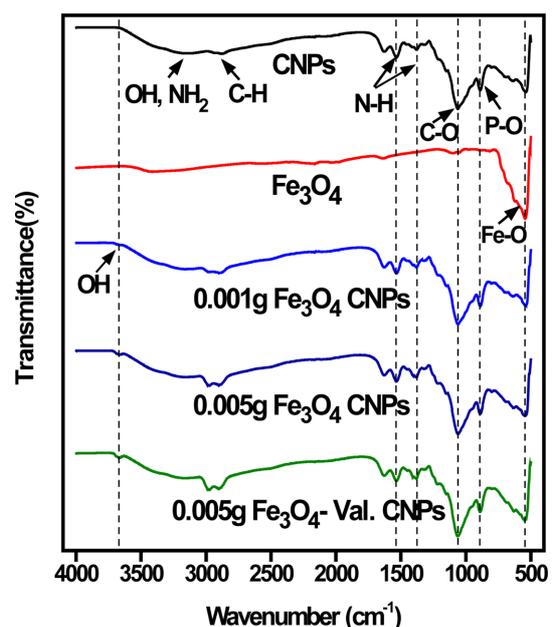


Fig. 1. FT-IR spectra for CNPs, Fe₃O₄, 0.001 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005g Fe₃O₄-Valine CNPs.

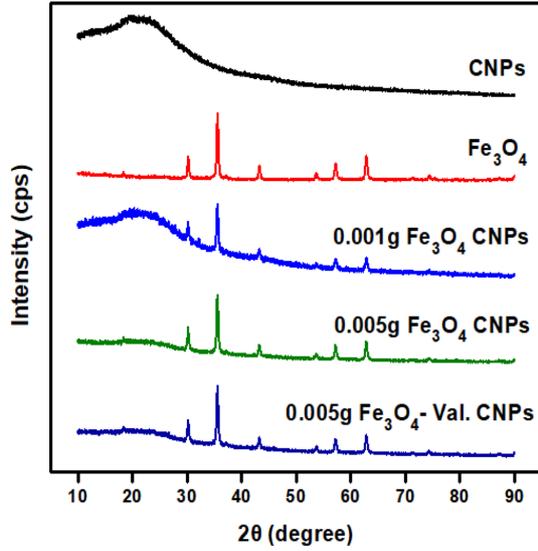


Fig. 2. XRD analysis of CNPs, Fe₃O₄, 0.001 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄-Valine CNPs.

나타내는 것은 0.005 g Fe₃O₄-Valine CNPs였다. 이후 명확한 실험 값을 얻기 위해 Fe₃O₄-Valine CNPs의 Fe₃O₄양은 0.005 g으로 정해 사용하였다.

Fig. 2는 XRD를 이용하여 CNPs, Fe₃O₄, Fe₃O₄ CNPs, Fe₃O₄-Valine CNPs의 결정구조를 분석하였다. CNPs는 특정한 결정이 없는 입자로 peak가 측정되지 않았으며, Fe₃O₄는 (220), (311), (400), (422), (511), (410)에서 peak가 나타났다. Fe₃O₄ CNPs의 경우, Fe₃O₄의 양을 0.001 g과 0.005 g로 제조를 하였다. 0.001 g Fe₃O₄ CNPs에서는 CNPs의 경향이 크게 나타났고, 0.005 g Fe₃O₄ CNPs는 Fe₃O₄의 peak가 더 뚜렷하게 관찰되었다. Fe₃O₄-Valine CNPs은 0.005g Fe₃O₄를 이용하여 제조하였고 뚜렷한 차이는 발견되지 않았다.

Fig. 3는 CNPs와 Fe₃O₄-Valine CNPs의 입자 크기를 DLS로 측정한 결과이다. TPP 수용액의 농도가 증가할수록 CNPs의 직경이 커지기 때문에 0.1 wt% TPP 수용액을 사용하였다. 일반적으로 약물 전달체는 100~300 nm 크기의 입자를 주로 사용하며, 제조된 입자의 평균 크기는 176.1nm, Valine을 흡수시킨 자성 키토산 나노입자의 크기는 229 nm로 측정 되어 약물 전달체로 적합하다는 것을

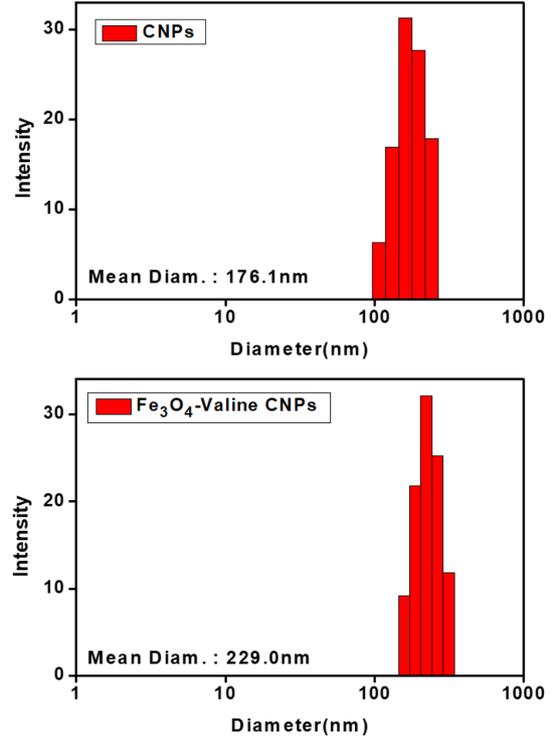


Fig. 3. Size Measurement of CNPs, Fe₃O₄-Valine CNPs.

확인하였다.

Fig. 4는 CNPs와 Fe₃O₄-Valine CNPs 표면의 모양과 크기를 알 수 있는 SEM의 결과이다. 약간 울퉁불퉁한 구형의 나노입자들이 관찰되었으며 CNPs의 크기는 약 100 nm, Fe₃O₄-Valine CNPs의 크기는 약 250 nm 정도로 관찰되었다. Fig. 1의 size measurement 값과 비슷한 결과가 나왔고 약물전달체로 적합하다는 것을 알 수 있었다.

Fig. 5는 CNPs, Fe₃O₄, Fe₃O₄ CNPs, Fe₃O₄-Valine CNPs의 구성 원소를 분석한 EDX Analysis이다. CNPs는 C, H, O, P의 원소로, Fe₃O₄는 Fe, O, Fe₃O₄-Valine CNPs는 C, H, O, N, P, Fe의 원소로 이루어져 있는데, EDX 분석 시 상대적으로 가볍고 peak가 약한 Nitrogen과 Hydrogen의 경우 측정되지 않아 관찰이 불가능하였다. 나머지 구성 원소들의 종류(C, O, P, Fe)와 비율을 알 수 있었고 Phosphorus의 존재로 보아 Chitosan과 TPP 수용액의 가교가 잘 이

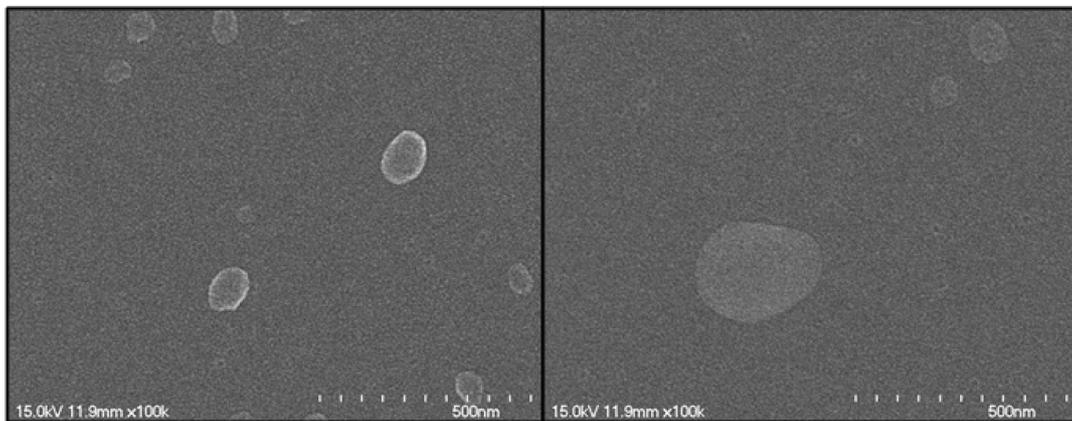


Fig. 4. SEM image of CNPs and Val-Fe₃O₄ CNPs.

CNPs	Weight%	Atomic%	Fe ₃ O ₄	Weight%	Atomic%
Element			Element		
C	29.50	36.19	Fe	36.65	66.88
O	68.02	62.63	O	63.35	33.12
P	2.48	1.18			
Totals	100.00		Totals	100.00	

Fe ₃ O ₄ CNPs	Weight%	Atomic%	Fe ₃ O ₄ -Val. CNPs	Weight%	Atomic%
Element			Element		
C	56.33	64.95	C	23.76	35.45
O	37.95	32.84	O	37.13	41.59
p	3.97	4.74	p	6.69	3.87
Fe	1.75	2.09	Fe	4.58	1.47
Totals	100.00		Totals	100.00	

Fig. 5. EDX analysis of CNPs, Fe₃O₄, Fe₃O₄ CNPs, Fe₃O₄-Valine CNPs.

루어졌다는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 6은 Thermogravimetric analysis를 이용한 CNPs, 0.001 g

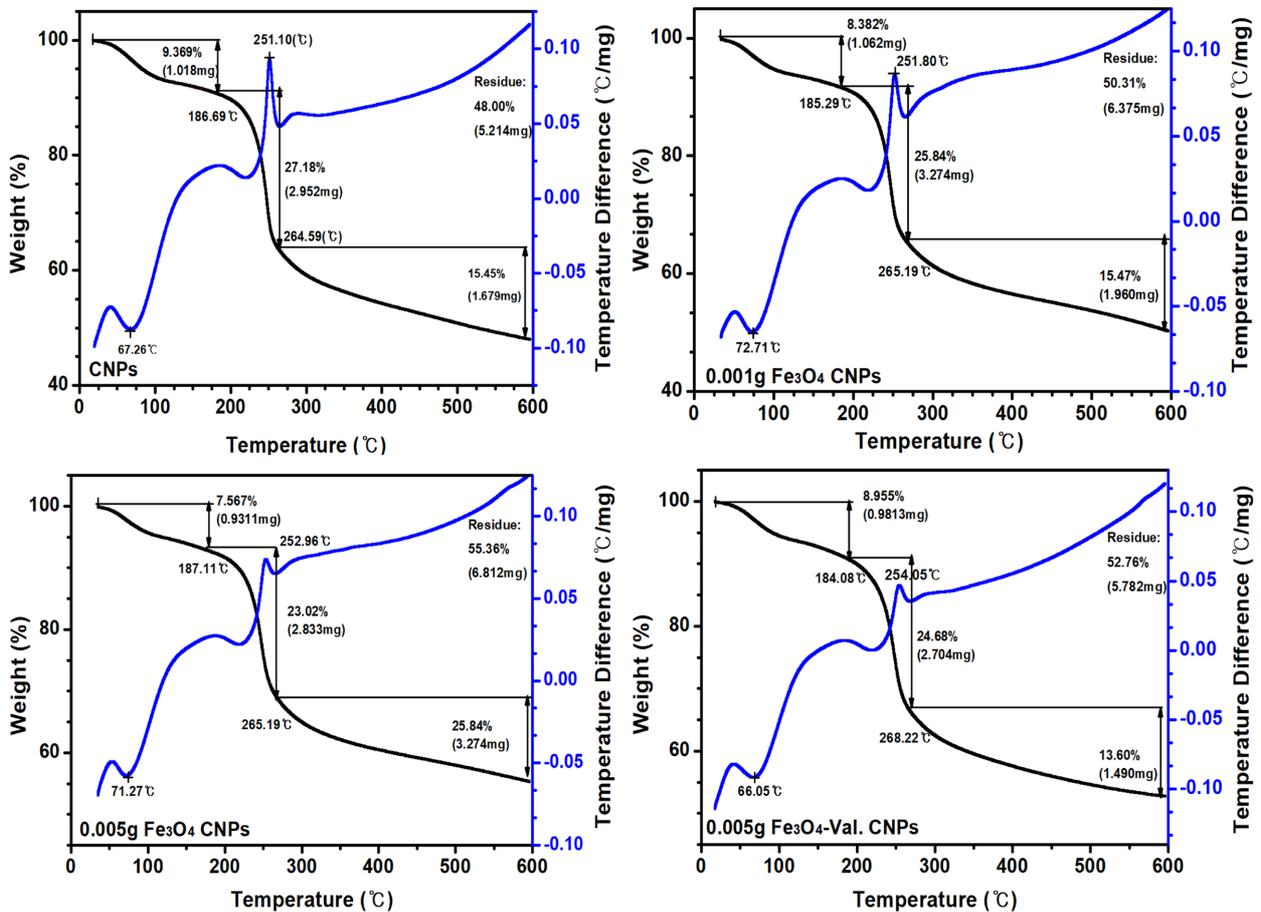


Fig. 6. TGA analysis of CNPs, 0.001 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄-Valine CNPs.

Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄ CNPs, 0.005 g Fe₃O₄-Valine CNPs의 분석 결과이다. 질소 분위기에서 분당 10 °C의 속도로 측정하였으며 구간은 0~600 °C으로 하였다. 결과의 변곡점이 시료의 열 분해 온도로 CNPs는 열 분해 온도 251.10 °C와 초기 무게의 48.00%의 잔여물, 0.001g Fe₃O₄ CNP는 열 분해 온도 251.80 °C와 초기 무게의 50.31%의 잔여물, 0.005 g Fe₃O₄ CNP는 열 분해 온도 252.96 °C와 55.36%의 잔여물, 0.005g Fe₃O₄-Valine CNPs은 254.05 °C의 열 분해 온도와 52.76%의 잔여물이 측정되었다. CNPs는 흡착되는 Fe₃O₄의 양에 따라 열 분해 온도가 증가하는 것을 알 수 있었고 잔여물의 양 또한 증가하였다. 결합하는 성분이 많아질수록 나노입자의 열 분해 온도가 증가하는 것 또한 Fe₃O₄-Valine CNPs을 통해 알 수 있다.

Fig. 7은 Valine의 양을 정량적으로 계산할 수 있게 해주는 Valine solution의 UV-Vis 결과이다. 파장에 따른 spectrum을 보았을 때 569 nm에서 가장 높은 peak가 나타나, 그에 따른 검량선을 작성하였다. $Y = 14.01856X - 0.32447$, $R^2 = 0.99046$ 의 Valine sol. 과 흡광도의 관계식을 얻었다.

Fig 8은 Fe₃O₄ CNPs에 50 mg의 Valine을 흡수시켜 제조한 Fe₃O₄-Valine CNPs의 Valine에 대한 방출을 UV-Vis를 이용하여 흡광도를 측정한 결과이다. 제조한 Fe₃O₄-Valine CNPs 제조 실험 시 원심분리 한 후의 상등액을 Ninhydrin test 하여 standard curve에 대입하면 흡수량을 계산하였다. Valine의 흡수량은 18.2895 mg으로 50 mg에 대한 Valine의 흡수율은 36.58%였다.

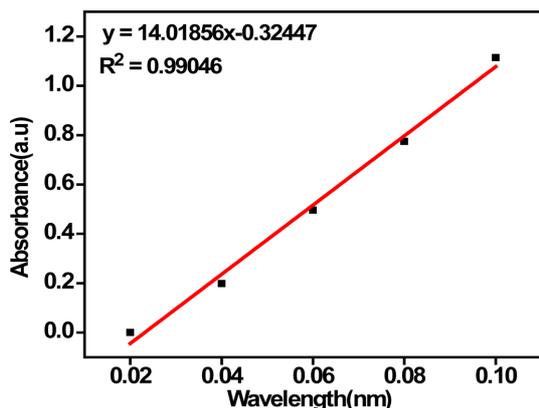


Fig. 7. Standard curve for Valine solution at 569 nm.

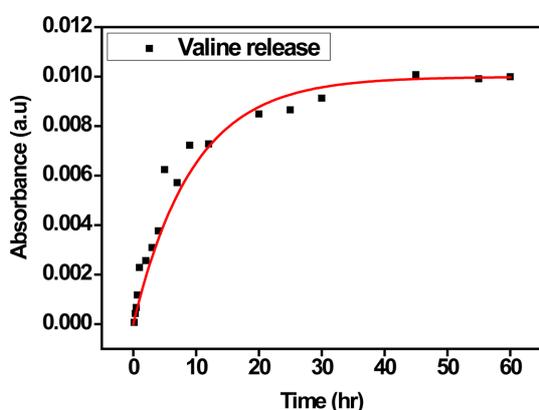


Fig. 8. UV spectra for Valine release of Fe₃O₄-Valine CNPs.

원심분리 후 나노입자들은 PBS 29.91 ml에 분산시켜 37 °C, 1000 rpm으로 교반시키며 일정시간마다 1 ml씩 Ninhydrin test를 진행하였다. 총 60시간동안 흡광도를 측정하였으며 약 40 시간이 지났을 때 일정한 흡광도가 나오기 시작하였다. UV-Vis로 흡광도를 측정하여 standard curve에 대입한 결과 방출량은 11.93 mg이었고 흡수율에 대한 방출률은 65.2% 이다.

4. 결 론

본 연구에서는 약물전달체로 활용할 수 있는 Chitosan nanoparticles 에 Fe₃O₄를 흡착시켜 자성을 띄게 하여 표적 위치에 도달할 수 있게 하였다. Fe₃O₄-Valine CNPs를 제조하여 CNPs가 약물을 흡수, 방출한 양을 측정하였다. CNPs의 평균 직경은 176.1 nm, Fe₃O₄-Valine CNPs는 229 nm으로 약물전달체로 적당한 크기로 측정되었다. SEM image 에서도 100~300 nm의 크기로 입자로 보여 진다. Fe₃O₄와 Valine이 잘 흡착, 흡수되었는지 확인하기 위해 EDX를 활용하여 나노입자의 구성을 분석하였고 FT-IR을 이용하여 산화철과 TPP와 같은 물질이 키토산 나노입자와 잘 결합되어 있는지 작용기를 파악해보았다. XRD를 이용하여 제조된 나노입자의 결정성을 알아보았고 TGA를 이용하여 온도에 따른 나노입자의 열에 대한 안정성을 알아보았다. 이런 기기들로 분석하여 약물전달체로 적합한 자성 키토산 나노입자가 제조되었다는 것을 확인하였고, Valine 을 흡수시킨 키토산 나노입자에 대해서도 똑같이 분석해보며 필수

아미노산인 Valine에 대한 흡수율, 방출율을 측정하였다. Valine에 대한 Ninhydrin test에서 최적의 조건은 95 °C에서 15분간 물증탕 하는 것이었으며, standard curve는 $y = 14.01856x - 0.32447$, $R^2 = 0.99046$ 를 얻었다. 이에 따른 Valine 50 mg 중 흡수량은 18.2895 mg, 흡수율은 36.57%, 이에 대한 방출량은 11.93 mg, 방출율은 65.2% 으로 계산되었다.

감 사

본 논문은 2015년도 가천대학교 교내연구비 지원에 의한 결과임(GCU-2015-0090).

Reference

1. Kingsley, J. D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H. E. and Destache, C. J., "Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System," *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, **1**, 340-350(2006).
2. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research 1(4): 201-213 (2011) ISSN 2249-3379 201 Yadav A., Ghune M., Jain D. K., "Nano-medicine Based Drug Delivery System," *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, **1**, 201-213(2011).
3. Singh, R. and Lillard, J. W., "Nanoparticle-based Targeted Drug Delivery," *Exp Mol Pathol*, **86**, 215-223(2009).
4. Farokhzad, O. C. and Langer, R., "Impact of Nanotechnology on Drug Delivery," *ACS Nano*, **3**, 16-20(2009).
5. Hirano, S., Seino, H., Akiyama, Y. and Nonaka, I., "Chitosan: A Biocompatible Material for Oral and Intravenous Administrations," *Progress in Biomedical Polymers*, 283-290(1990).
6. Ahmed, T. A. and Aljaeid, B. M., "Preparation, Characterization, and Potential Application of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Chitosan Metal Nanoparticles in Pharmaceutical Drug Delivery," *Drug Des Devel Ther*, **10**, 483-507(2016).
7. Prabakaran, M., "Review Paper: Chitosan Derivatives as Promising Materials for Controlled Drug Delivery," *J. Biomater Appl.*, **23**, 5-36(2008).
8. Li, G. Y., Jiang, Y. R., Huang, K. L., Ding, P. D. and Chen, J., "Preparation and Properties of Magnetic Fe₃O₄-Chitosan Nanoparticles," *Journal of Alloys and Compounds*, **466**, 451-456(2008).
9. Arum, Y., Oh, Y. O., Kang, H. W., Ahn, S. H. and Oh, J. H., "Chitosan-Coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles as Carrier of Cisplatin for Drug Delivery," *Fisheries and Aquatic Sciences*, **18**, 89-98(2015).
10. Luangtana-anan, M., Nunthanid, J. and Limmatvapirat, S., "Potential of Different Salt Forming Agents on the Formation of Chitosan Nanoparticles as Carriers for Protein Drug Delivery Systems," *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **49**, 37-44(2019).
11. Meguid, M. M., Matthews, D. E., Meredith, C. N., Young, V. R., "Valine Kinetics at Graded Valine Intakes in Young Men," *The American Journal of Clinical Nutrition*, **43**, 781-786(1986).
12. Galhoum, A. A., Mahfouz, M. G., Atia, A. A., Abdel-Rehem, S. T., Gomaa, N. A., Vincent, T. and Guibal, E., "Amino Acid Functionalized Chitosan Magnetic Nanobased Particles for Uranyl Sorption," *Ind. Eng. Chem. Res*, **54**, 12374-12385(2015).
13. Kalant, H., "Colorimetric Ninhydrin Reaction for Measurement of α -Amino Nitrogen," *Anal. Chem*, 265-266(1956).

14. Moore, S., "Amino Acid Analysis: Aqueous Dimethyl Sulfoxide as Solvent for the Ninhydrin Reaction," *Journal of Biological Chemistry*, **243**, 6281-6283(1968).
15. Sun, S. W., Lin, Y. C., Weng, Y. M. and Chen, M. J., "Efficiency Improvements on Ninhydrin Method for Amino Acid Quantification," *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 112-117 (2006).
16. Nasti, A., Zaki, N. M., Leonardis, P. D., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M. G. and Tirelli, N., "Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation," *Pharmaceutical Research*, **26**, 1918-1930(2009).
17. Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M. and Rivera-Rodríguez, G. R., "Parameters Influencing the Size of Chitosan-TPP Nano- and Microparticles," *Scientific Reports*, **8**, 4695 (2018).
18. Ko, J. A., Park, H. J., Hwang, S. J., Park, J. B. and Lee, J. S., "Preparation and Characterization of Chitosan Microparticles Intended for Controlled Drug Delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, **249**, 165-174(2002).
19. Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B. and Cesàro, A., "Chitosan Nanoparticles: Preparation, Size Evolution and Stability," *Pharmaceutical Nanotechnology*, **455**, 219-228(2013).
20. Lim, J. W. and Kang, I. J., "Fabrication of Chitosan-Gold Nanoshells for γ -Aminobutyric Acid Detection as a Surface-enhanced Raman Scattering Substrate," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **36**, 672-677(2015).
21. Lim, J. W. and Kang, I. J., "Fabrication of Chitosan-gold Nanocomposites Combined with Optical Fiber as SERS Substrates to Detect Dopamine Molecules," *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **35**, 25-29(2014).