

모델 Microspheres의 합성 및 Bovine Albumin의 흡착

박영준 · 윤정열 · 박함용 · 김종현 · 김우식

= Abstract =

Synthesis of Model Microspheres and Adsorption Study of Bovine Albumin

Young-Jun Park, Jeong-Yeol Yoon,
Ham-Yong Park, Jung-Hyun Kim, Woo-Sik Kim

Microspheres are expected to be applied to biomedical areas such as solid-phase immunoassays, drug delivery systems, immunomagnetic cell separation. To synthesize microspheres for biomedical application, "two stage shot growth method" was developed.

The uniformity ratio of synthesized microspheres was always smaller than 1.05. And the surface charge density (or the number of ionizable functional groups) of the microspheres synthesized by "two stage shot growth method" was 6~13 times higher than that of the microspheres synthesized by conventional seeded batch copolymerization.

As a previous step for biomedical application, adsorption experiments of bovine albumin on microspheres were carried out under various conditions. The maximum adsorbed amount was obtained in the neighborhood of pH 4.5. Isoelectric point of bovine albumin is pH 5.0, so experimental result shows that it shifted to acid area. The adsorption isotherm was obtained, the plateau region was always reached at 2.0g/L (bulk concentration of bovine albumin). The effect of the kind and the amount of surface functional group was also examined.

서 론

오늘날 고분자 공학의 발전과 함께 생물 공학의 기술 또한 빠른 진전을 보이고 있으며, 고분자 공학과 생물 공학의 접합 연구가 관심의 대상이 되고, 이들 연구 결과를 이용한 생의학 분야에서의

기능성 microspheres의 응용이 큰 주목을 받기 시작했다. 과거 생의학 분야에서 microspheres의 응용은 blood flow나 perfusion rates 측정 등에 한정되었지만, 최근에는 생명을 위협하거나 심각한 질환을 일으키는 많은 질병들에 대한 진단과 치료 등을 포함하는 것으로, 그 응용 범위가 넓어질 전망이다 [1,2]. 특히 이 분야의 발전에는 biotechnology의 발전을 이용한 세포융합기술로, 동물이나 생물 반응기에서 균일한 항체 분자를 생산할 수 있게 된 것이 큰 계기가 되었으며, 이 기술은 앞으로 척추동물의 면역 방어의 작용체인 항체가 질병이나, 돌연

(접수 : 1992년 12월 8일)

연세대학교 공과대학 화학공학과

* 본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구비에 의하여 이루어진 것입니다

변이 세포의 진단과 약물운반 그리고 생분리 등에서 유용한 상품이 될 것을 예고하고 있다. 다양한 응용들 중에 어떤 것들은 빠른 진전을 보이는 것도 있고, 또 어떤 것들은 초기 개발 단계에 있는 바, 생의학적 분야에서의 microspheres의 주요 응용예로는 다음을 들 수 있다[3].

(a) Solid-phase immunoassays

-항체로 코팅된 microspheres에 항원이 포함된 sample이 혼합되면 표면의 항체와 항원-항체 반응을 통해 라텍스가 응집하여 큰 덩어리를 형성하며, 이를 검출하여 정량화한다.

(b) Drug delivery system

-약물로 코팅된 microspheres는 magnetic 등의 성질을 이용하여 특정 병소부위를 선택적으로 표적화하여 국부적으로 약의 농도를 집중시켜 치료 효과를 높일 수 있다.

(c) Immunomagnetic cell separation

-한번의 조작으로 기존의 방법들보다 많은 양의 sample을 처리할 수 있고, 효과 또한 높기 때문에 유용하게 사용될 전망이다.

기능성 공단량체를 공중합해서, 입자 표면상의 기능성기 종류 및 농도를 조절하려는 연구가 진행되었다[4,5,6,7]. 또한 유화 공중합 방법을 이용하여 입자에 기능성 단량체를 결합시키려는 시도가 있었다[8]. 그러나 최종 중합체에서의 기능성기의 양은 초기 중합 성분에 투여한 양보다 언제나 작다는 것이 밝혀졌다[9].

따라서 기존의 중합 방법으로는 기능성 단량체를 주단량체 대비 1 wt% 이상으로 하여 무유화제 공중합할 경우, 입자의 크기가 균일하지 않게 되고, 많은 양의 수용성 고분자가 형성되어 생물공학에 응용시 많은 문제점이 발생되어 "two stage shot growth method"가 개발되었다[10].

이 방법은 1단계로 미량의 기능성 단량체를 사용하여 입자의 크기를 조절할 뿐만아니라 입자의 안정성을 향상시키며, 2단계로 주단량체와 기능성 단량체의 혼합물을 투입하여 표면 전하 밀도를 결정한다. 이 공정의 장점은 기능성 단량체를 고농도로 공중합시키면서도 입자의 크기를 균일하게 할 수 있고 입자의 크기 및 표면전하밀도를 독립적으로 조절할 수 있는 점 등이다.

한편 microspheres의 생의학적 응용분야는 주로 항원, 항체등 단백질과의 결합을 기본단계로 한다.

따라서 microspheres를 의용공학적으로 응용하기 위해서는 이러한 단백질들의 흡착거동을 고찰하는 일이 중요하다. 따라서 단백질 흡착에 대한 연구가 많이 이루어져 왔으나 실험적 연구가 주종을 이루고 있으며, 여러 실험적 결과에 모두 적용될 수 있는 통일된 이론이 없는 실정이다[11,12,13,14,15]. 이 이론의 수립을 위해서는 단백질 흡착에 영향을 미치는 여러 인자들을 고찰하는 것이 필요하다.

단백질 흡착에 영향을 미칠 수 있는 인자들(고분자 라텍스 입자 즉 microspheres에 단백질이 흡착되는 경우)은 pH, 전해질의 종류, 이온강도, 단백질의 종류, 농도, 라텍스의 고형량, 온도, 라텍스 입자의 종류, 입자 표면의 기능성 기의 종류, 입자 표면의 표면전하밀도(기능성 기의 양), 입자의 크기분포 등을 들 수 있다. Microspheres 입자와 단백질간의 흡착의 구동력으로 볼 수 있는 상호작용력은 크게 물리적인 것과 화학적인 것으로 나눌 수 있는데, 이 중 화학적인 것은 라텍스 입자 표면의 기능성 기와 부분적으로 전하를 띠는 단백질 입자(단백질 분자 전체에 대한 전하는 영)간의 상호작용에 의한 것으로 알려져있다.

이 물리, 화학적인 상호작용력들은 다음의 네 가지로 나뉘어 질 수 있다.

-이온결합 : $-COO-$ 와 N^+H_3- 의 결합, 결합 에너지 -5 kcal/mol

-수소결합 : $-NH-$ 와 $O=C-$ 의 결합 에너지 -3 kcal/mol

-전하이동 : $\pi-\pi$ 궤도함수의 상호작용

-소수성 표면에서의 흡착

그러나 여태까지의 연구들은 단백질의 종류 및 사용된 microspheres의 종류에 따른 영향을 살펴보는 것에 집중되어 있었으며, 단백질-microspheres 간의 상호작용력에 따른 고찰을 찾아보기 힘들고, 단지 소량의 기능성 기만을 가지는 microspheres를 사용한 경우만이 보고되고 있으나 실험범위가 좁아 정확한 규명이 이루어지지 못하는 실정이다. 본 실험에서는 "two stage shot growth method"를 이용하여 다량의 기능성 기를 가지도록 제조된 microspheres를 사용함으로써 상호작용력에 대한 광범위한 규명을 행할 수 있었다. 본 실험에서는 여러 단백질 중 모델 단백질로서 bovine albumin을 선정하여 여러가지 실험 변수별로 흡착실험을 행하였다.

2. 기능성 Microspheres의 제조

2. 1 Seeded batch method에 의한 기능성 microspheres의 제조

주단량체로 styrene(St)를 이용하여 전통적인 emulsion polymerization의 방법으로 polystyrene seed를 만든다. 이 seed에 주단량체 St와 기능성 단량체로 2-hydroxyethyl acrylate (HEA), methacrylic acid (MA)를 투입한 후 1시간 동안 swelling을 시킨다. Swelling 후 tumbling reactor에서 중합온도인 50°C에 이르게 한 후, 개시제로 potassium persulfate (KPS)와 sodium bicarbonate (SB)의 redox 개시제를 투입하여 중합을 시작한다.

2. 2 "Two stage shot growth method"에 의한 기능성 microspheres의 제조

주단량체로 styrene(St), 기능성 단량체로 2-hydroxyethyl acrylate (HEA), methacrylic acid (MA)를 사용하였다.

1단계로 반응기에 알맞은 양의 단량체와 탈이온 증류수를 채우고, 반응 온도에 도달하면 개시제와 미량의 기능성 단량체를 투입하여 반응을 진행시키고 2단계로 알맞은 전화율에 이르면 주단량체와 기능성 단량체의 혼합물을 개시제와 같이 투입한다. 이때 반응물은 질소기류하에서 교반된다. 이와 같이하여 기능성 단량체의 공중합비율이 1 wt% 이상 되게하여 기능성 microspheres를 제조하였다.

3. 기능성 Microspheres의 세척 및 분석

3. 1 기능성 microspheres의 세척

제조된 microspheres는 미반응 단량체, 개시제, 각종 전해질, 수용성 polymer 및 기타 불순물을 포함하고 있어 세척이 필요하다. 이중 수용성 polymer는 친수성 단량체들에 의해 만들어진 homopolymer로서 기존의 이온교환법으로는 완전히 제거할 수가 없다. 그러므로 수용성 polymer들을 완전히 제거할 수 있는 serum replacement method[16]를 같이 사용하여 세척하는 것이 효과적이다.

이온교환법에서 사용된 이온교환수지는 Amberlite MB-604A (Rohm & Haas)였다. Serum replacement method에 의한 세척장치도는 Fig. 1에

나타내었다.

3. 2 기능성 microspheres의 분석

-반응물 전화율

반응물의 전화율은 증량법으로 측정하였다.

-입자의 크기 및 분포

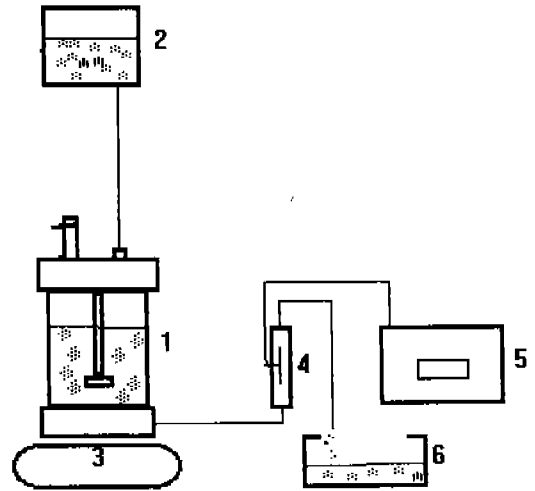


그림 1 세척장치도 (serum replacement 법)

Fig. 1 Schematic diagram of cleaning apparatus (serum replacement method)

1. Serum replacement cell (Micro Filtration Systems)
2. Reservoir (ultra-pure water & dilute HCl solution)
3. Magnet stirrer
4. Conductivity cell
5. Conductance meter
6. Outlet reservoir

입자의 크기 및 분포는 particle size analyzer (CHDF-110, Matec Applied Sciences)로 측정하였다. 그 결과는 Table 1에 정리하였으며 monodispersity가 모두 1.05 이하로 입자크기가 균일함을 알 수 있다.

Fig. 2에 "two stage shot growth method"로 제조된 microspheres의 SEM 사진 및 seeded batch method로 제조된 microspheres의 TEM 사진을 실었다.

-기능성 기의 정성적 확인
 제조된 microspheres를 IR 분석하여 (Shimadzu IR-440, 일본), 그 결과를 Fig. 3, 4에 각각 나타내었는바, 기능성기의 도입이 확인되었다.
 -기능성 기의 정량적 확인
 P(St/MA)를 conductometric titration으로 표현

전하밀도를 측정하였으며 여기에서 도입된 기능성 기의 양을 결정할 수 있었다. Table 2에 결과를 나타내었으며, 여기에서 seeded batch method에 의해 제조된 microspheres 보다 "two stage shot growth method"로 제조된 microspheres가 6~13배 높은 표면전하밀도(또는 이온화할 수 있는 기능성 기의

표 1 평균입자직경 uniformity ratio(D_w/D_n)

Table 1 Average particle diameters and uniformity ratio(D_w/D_n)

Sample	MA monomer % (2nd stage)	Number Average Particle Diameter (nm)	Uniformity Ratio (-)
HEA SB-1	20.0	201.2	1.027
HEA SB-2	40.0	204.1	1.025
HEA SB-3	80.0	203.0	1.021
HEA SB-1	1.1	194.5	1.020
MA/ SB-2	2.2	203.4	1.020
MA/ SB-3	5.6	201.0	1.019
MA/ SB-4	11.1	202.7	1.018
MA/ SB-5	20.0	197.4	1.039
MA/ SB-6	40.0	204.2	1.039
MA/ SB-7	60.0	208.0	1.049
MA/ SB-8	100.0	207.2	1.041
MA SG-1	20.0	443.3	1.003
MA SG-2	40.0	421.3	1.002
MA SG-3	60.0	726.9	1.001

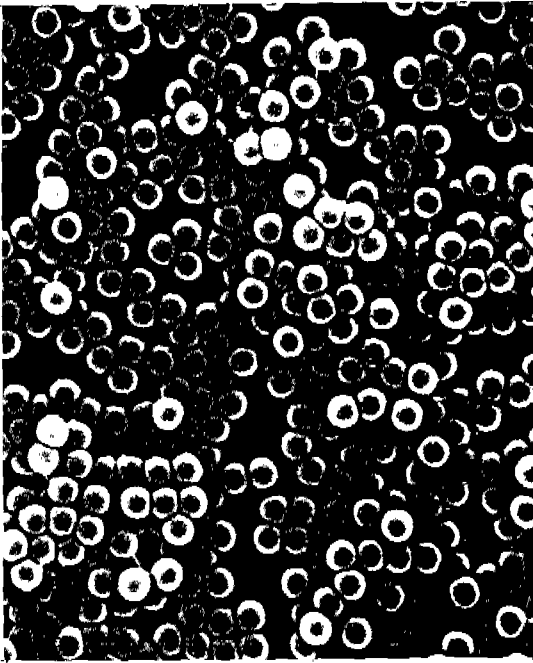
HEA = P(St/HEA), MA = P(St/MA) SB = seeded batch method SG = two stage shot growth method

표 2 이온화되는 기능성 기의 수 및 표면전하밀도

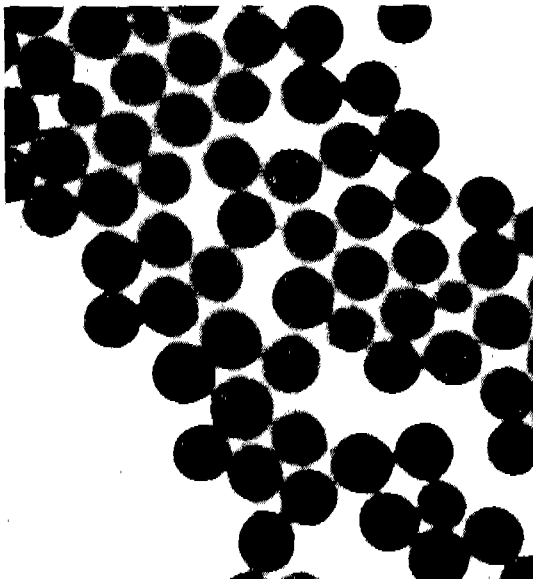
Table 2 Number of ionizable functional groups and surface charge densities

Sample	MA monomer % (2nd stage)	Number of ionizable functional groups (m^{-2})	Surface Charge Density ($\mu C/cm^2$)
MA SB-1	1.1	$.7314 \times 10^{18}$	11.75
MA SB-3	5.6	$.7345 \times 10^{18}$	11.77
MA SB-4	11.1	$.7522 \times 10^{18}$	12.05
MA SB-5	20.0	$.9992 \times 10^{18}$	16.01
MA SB-6	40.0	1.103×10^{18}	17.67
MA SB-7	60.0	1.224×10^{18}	19.61
MA SB-8	100.0	1.583×10^{18}	25.36
MA SB-1	20.0	6.717×10^{18}	107.62
MA SB-2	40.0	9.969×10^{18}	159.72
MA SB-3	60.0	11.22×10^{18}	179.77

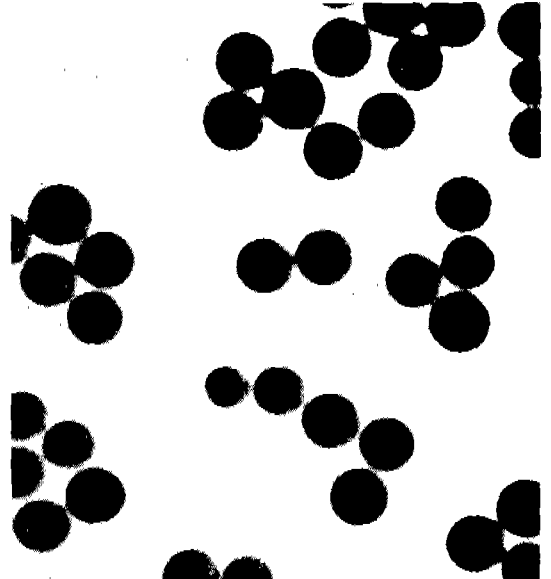
MA = P(St/MA) SB = seeded batch method



(A)



(B)



(C)

그림 2 Microspheres의 SEM/TEM 사진

Fig. 2 SEM/TEM photographs of microspheres

(A) P(St/MA) SG-2 (SEM, magnification $\times 10,000$)

(B) P(St/HEA) SB-3 (TEM, magnification $\times 50,000$)

(C) P(St/MA) SB-7 (TEM, magnification $\times 50,000$)

수)를 가짐을 알 수 있다. Fig. 5에는 2단계에서 투입된 MA 단량체의 양과 표면전하밀도와의 관계를 보였는데, 역시 seeded batch method 보다 “two stage shot growth method”가 더 높은 표면전하밀도를 보이고 있다.

이상의 결과와 같이 주단량체대비 1 wt% 이상의 기능성 단량체를 사용하여 공중합하였음에도 기존의 방법을 사용한 경우에 비해 모두 입자의 크기가 균일하면서도 기존의 방법보다 약 6~13배 가량 많은 기능성 단량체를 포함한 모델 microspheres를 합성할 수 있었다.

4. 기능성 Microspheres에의 Bovine Albumin 흡착

4. 1 흡착실험 방법

사용된 microspheres는 seeded batch method로 제조된 P(St/HEA), P(St/MA)와 “two stage shot growth method”로 제조된 P(St/MA)이다.

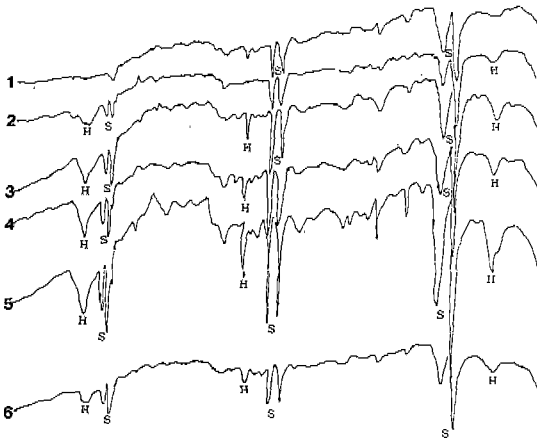


그림 3 P(St/HEA)의 IR 스펙트럼 S와 H는 각각 polystyrene과 poly(2-hydroxyethyl acrylate)를 나타냄.

Fig. 3 IR spectra of P(St/HEA). S and H represents polystyrene and poly(2-hydroxyethyl acrylate), respectively

- (1) seed PS (2) P(St/HEA) SB-1
 (3) P(St/HEA) SB-2 (4) P(St/HEA) SB-3
 (5) P(St/HEA) SB-4 (6) P(St/HEA) SB-5

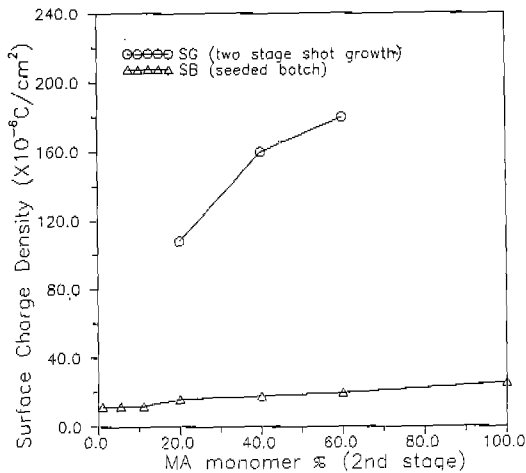


그림 5 투입된 단량체의 양에 따른 P(St/MA)의 표면전하밀도

- (○) two stage shot growth 법
 (△) seeded batch 법

Fig. 5 Amount of surface charge density of P(St/MA) as a function of introduced monomer

- (○) two stage shot growth method
 (△) seeded batch method

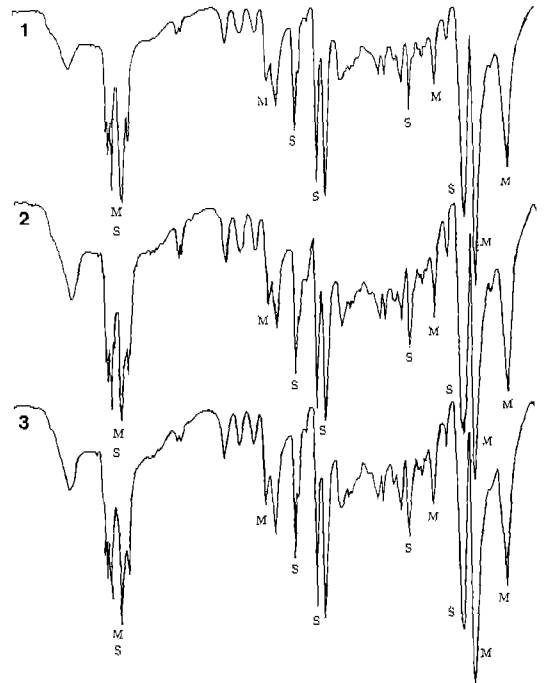


그림 4 P(St/MA)의 IR 스펙트럼 S와 M은 각각 polystyrene과 poly(methacrylic acid)를 나타냄

Fig. 4 IR spectra of P(St/MA). S and M represents polystyrene and poly(methacrylic acid), respectively

- (1) P(St/MA) SB-8 (2) P(St/MA) SB-5
 (3) P(St/MA) SB-6

세척된 microspheres는 건조중량법으로 고형량을 측정한다. 탈이온 증류수에 정해진 pH의 acetic buffer와 원하는 양의 bovine albumin (Sigma, 98-99%, 미국)을 용해시킨 후, 적정량의 microspheres와 섞었다. 이온강도는 0.01로 조정하고, 25°C 항온조에서 3시간 동안 반응시킨 후, 25°C, 500rpm에서 30분 원심분리 시켰다.

상청액을 cellulose nitrate membrane (0.1~0.2μm)으로 감압여과한 후 투과액을 280nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 사용한 UV는 Shimadzu UV-160A (일본)이다. Bovine albumin의 cellulose nitrate membrane에의 투과율을 따로 실험을 통해 결정하여 실험치를 보정하였다.

흡착된 bovine albumin의 양은 단백질에 대한 물

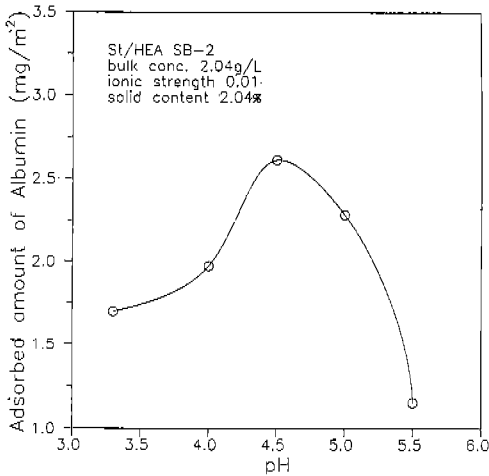


그림 6 pH에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화
P(St/HEA) SB-2

Fig. 6 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of pH.

P(St/HEA) SB-2

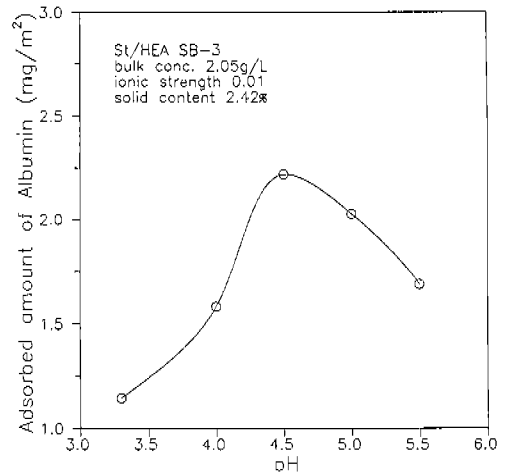


그림 7 pH에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화
P(St/HEA) SB-3

Fig. 7 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of pH

P(St/HEA) SB-3

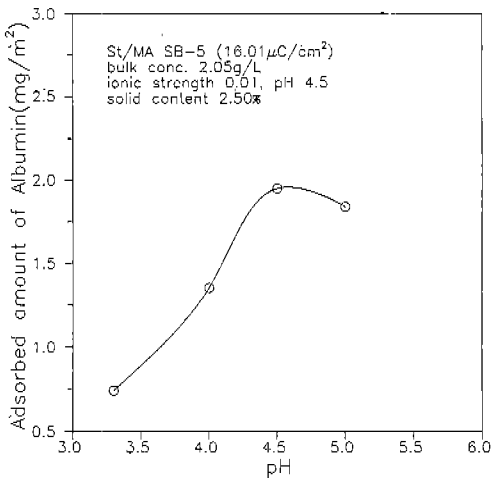


그림 8 pH에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화
P(St/MA) SB-5

Fig. 8 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of pH

P(St/MA) SB-5

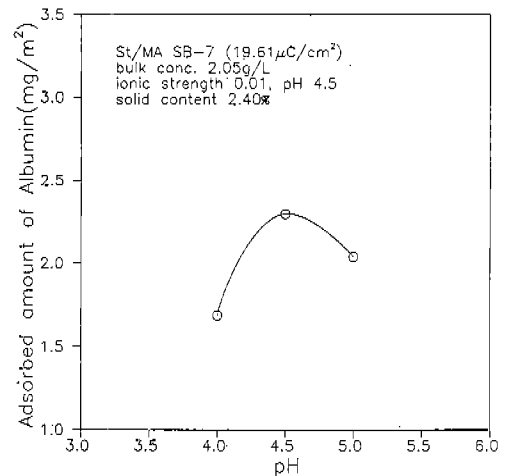


그림 9 pH에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화
P(St/MA) SB-7

Fig. 9 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of pH

P(St/MA) SB-7

질수지에서 고형량, 입자크기 투입된 단백질 농도를 이용하여 계산하였다.

4. 2 흡착실험 결과

pH의 영향

P(St/HEA) 및 P(St/MA) 샘플들에 대해 bovine albumin의 농도는 고정시키고 pH를 변화시키면서

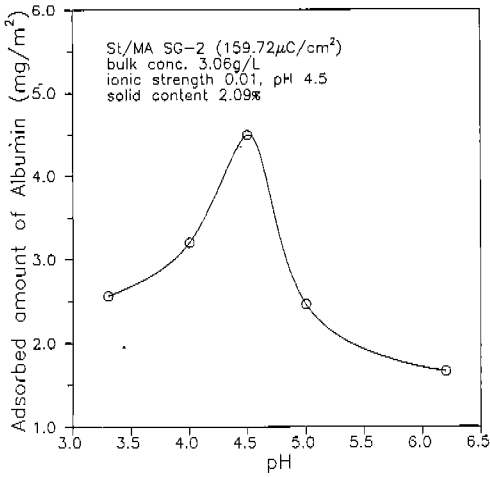


그림 10 pH에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화
P(St/MA) SG-2

Fig. 10 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of pH
P(St/MA) SG-2

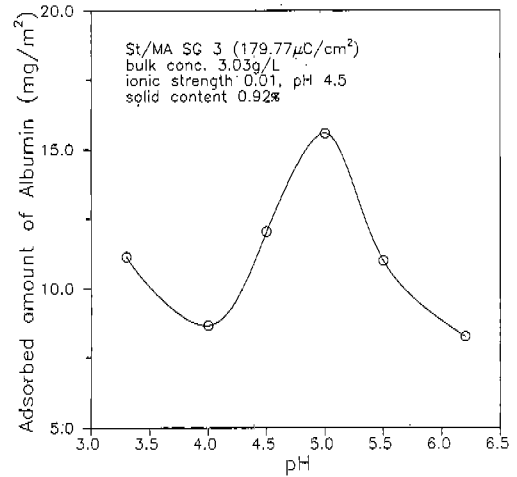


그림 11 pH에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화
P(St/MA) SG-3

Fig. 11 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of pH
P(St/MA) SG-3

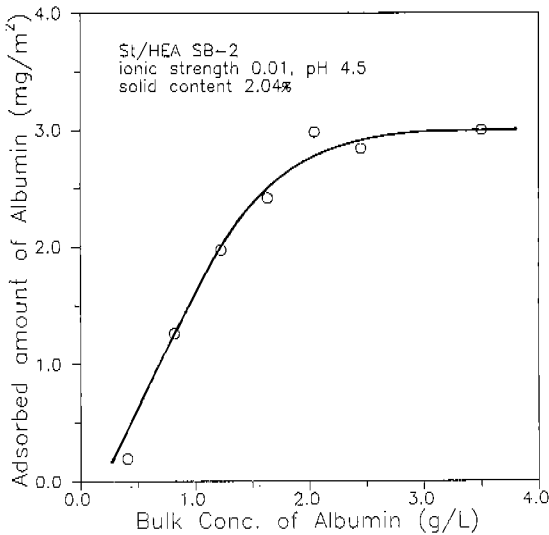


그림 12 Bovine albumin의 흡착등온선
P(St/HEA) SB-2

Fig. 12 Adsorption isotherm of bovine albumin
P(St/HEA) SB-2

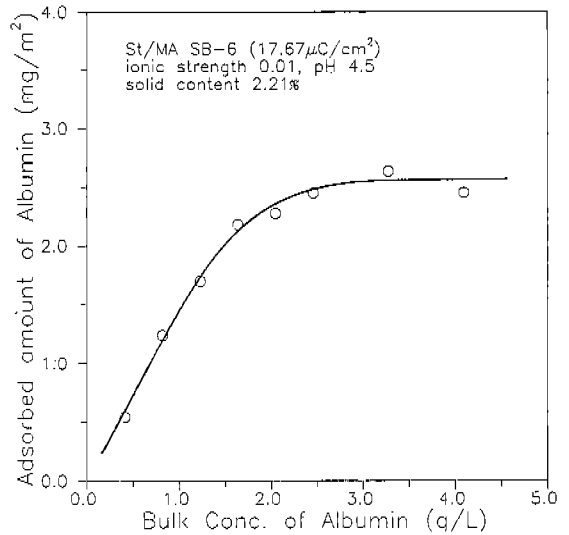


그림 13 Bovine albumin의 흡착등온선
P(St/MA) SB-6

Fig. 13 Adsorption isotherm of bovine albumin
P(St/MA) SB-6

실험하였으며, 그 결과를 Fig. 6~11 나타내었다. 그림에 나타난 바와 같이, 모두 pH=4.5부근에서 최대 흡착을 나타내었다. 일반적으로 단백질은 등전

점에서 microspheres에 최대 흡착이 이루어지는 것으로 알려져 있는데[11,12], 본 실험 결과는 등전 점에서 산 쪽으로 약간 이동한 점에서 최대 흡착

- 박영준 외 : 모델 Microspheres의 합성 및 Bovine Albumin의 흡착 -

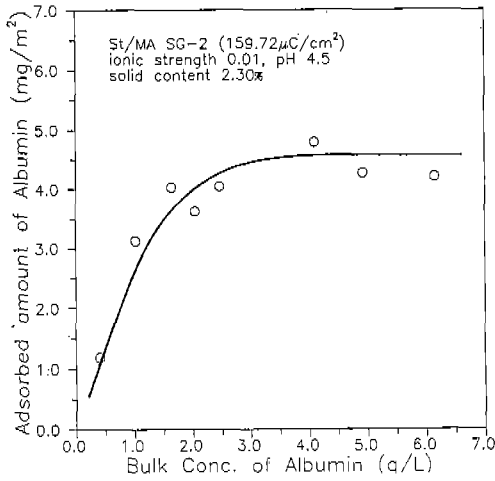


그림 14 Bovine albumin의 흡착등온선

P(St/MA) SG-2

Fig. 14 Adsorption isotherm of bovine albumin
P(St/HEA)SG-2

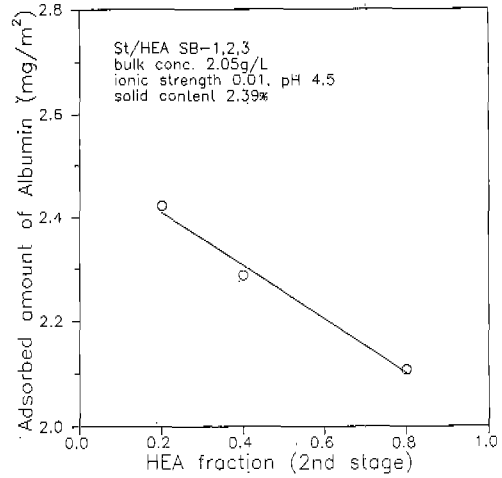


그림 15 2단계에서 투입된 HEA의 양에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화

P(St/HEA) SB-1,2,3

Fig. 15 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of HEA fraction of 2nd stage

P(St/HEA) SB-1,2,3

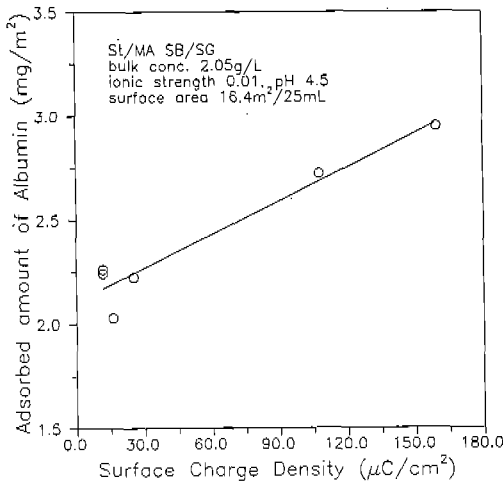


그림 16 표면전하밀도에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화

P(St/MA) SB-1,3,4,5,8 SG-1,2

Fig. 16 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of surface charge density

P(St/MA) SB-1,3,4,5,8 SG-1,2

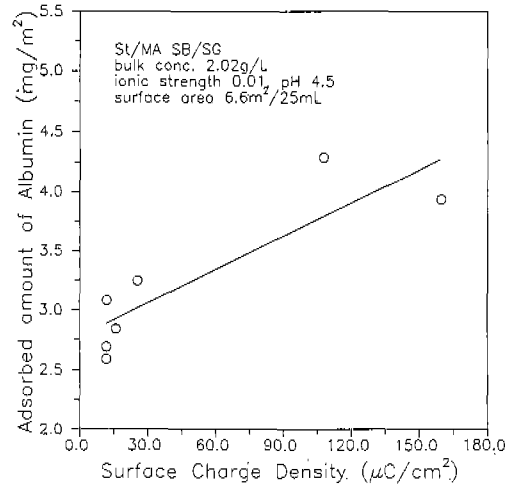


그림 17 표면전하밀도에 따른 bovine albumin의 흡착량 변화

P(St/MA) AB-1,3,4,5,8 SG-1,2

Fig. 17 Adsorbed amount of bovine albumin as a function of surface charge density

P(St/MA) SB-1,4,5,8 SG-1,2

이 일어나고 있다. 이는 이온강도 증가에 따라 최대 흡착점이 산 쪽으로 이동한 결과이다[11,12].

흡착등온선

P(St/HEA)와 P(St/MA) 모두 흡착등온선은 2.

0g/L에서 평형에 도달하였으며, 이 결과를 Fig. 12 ~14에 보였다.

표면 기능성기의 양에 따른 흡착량 변화

P(St/HEA) 및 P(St/MA) 샘플에 대하여 표면 기능성기의 양에 따른 흡착량의 변화를 고찰하였다.

P(St/HEA)의 경우를 Fig. 15에 보였는데, 도입된 기능성기의 양이 늘어날수록 흡착량이 감소함을 알 수 있다. 단백질은 일반적으로 소수성 표면에 흡착이 잘되는 것으로 보고되어 있는 바[11], 친수성 HEA가 단백질의 흡착을 방해한 결과로 볼 수 있다. 이로부터 HEA 단량체의 히드록시기는 단백질의 흡착에 기여하는 바가 없음을 알 수 있다. 따라서 P(St/HEA) 샘플의 경우 흡착의 주요 구동력으로 작용하는 것은 소수성 표면에서의 흡착, 즉 물리적인 것으로 볼 수 있다.

한편, P(St/MA) 샘플의 경우를 Fig. 16~17에 보였는데, 표면전하밀도(또는 이온화할 수 있는 기능성기의 양)가 늘어날수록 흡착량이 증가하고 있다. MA 단량체도 HEA와 마찬가지로 친수성이므로 흡착을 방해하게 되는데, 그럼에도 불구하고 흡착량이 늘어나는 것은 MA 단량체의 카르복시기와 단백질의 강한 이온결합력(-COO-와 N⁺H₃-의 결합)이 친수성 MA 단량체와 단백질의 척력보다 점점 강해지기 때문으로 볼 수 있다. 이로부터 P(St/MA) 샘플의 경우, 화학적 상호작용이 지배적인 흡착의 구동력으로 작용함을 알 수 있다.

이상의 실험결과로부터 "two stage shot growth method"를 이용하여 기능성기의 양을 원하는 범위로 조절하여 단백질과 강한 상호작용력을 갖는 microspheres를 합성함으로써, 흡착되는 단백질 또는 항원/항체의 양을 조절할 수 있으며, 또한 흡착량의 조절을 통해 적용하고자 하는 응용분야에 적합한 제 2차의 기능성을 갖는 microspheres의 제조도 가능할 것으로 사료된다.

5. 결 론

유화제를 사용하지 않는 "two stage shot growth method"에 의해 입자의 표면에 여러 가지 기능성기를 갖는 기능성 microspheres를 제조하여, bovine albumin의 흡착에 관하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 유화제를 사용하지 않는 "two stage shot

growth method"로 제조한 microspheres는 uniformity ratio가 모두 1.05이하로 매우 균일하였으며, 기존의 seeded batch method에 의해 제조된 것에 비하여 6~13배 높은 표면전하밀도를 나타내었다.

2. 모델 단백질 bovine albumin의 흡착 실험 결과, 모두 pH 4.5부근에서 최고 흡착량을 나타내었으며, 흡착 등온선은 모두 bovine albumin의 농도가 2.0g/L일때 평형에 도달하였다.

3. 표면 기능성기의 양에 따른 흡착 실험 결과 P(St/HEA)의 경우 HEA 단량체의 히드록시기는 단백질과 상호작용이 없어 물리적인 구동력이 지배적이었으며, P(St/MA)에서는 MA 단량체의 카르복시기와 단백질과의 강한 상호작용을 보여, 화학적인 구동력이 흡착에 지배적이었다.

6. 참 고 문 헌

- 1) B. I. Hoffbrand and R. P. Forsyth: *Cardiovascular Research*, 3:426 (1969)
- 2) R. H. Phibbs et al.: *Nature*, 216:1339 (1967)
- 3) A. Rembaum and Z. A. Tokes (Eds.) "Microspheres: Medical and Biological Applications", CRC Press, Boca Raton (1988)
- 4) M. S. Juang and I. M. Krieger: *J. Poly. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 14:2089 (1976)
- 5) B. N. Greene, D. P. Sheetz and T. D. Fisher: *J. Colloid Interface Sci.*, 32:97(1970)
- 6) R.L. Schild, M. S. El-Aasser, G. W. Phehilen and J. W. Vanderhoff: in "Emulsion, Latices, and Dispersion", P. Becher (Ed.), Dekker, New York, 99(1978)
- 7) D. F. Witmann: M.S. Research Report, Lehigh Univ., Bethlehem (1978)
- 8) L. J. Liu and I. M. Krieger: *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 19:3013 (1981)
- 9) R. S. Turner, R. A. Weiss, and D. L. Robert: *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 23:535 (1983)
- 10) J. H. Kim, M. Chainey, M. S. El-Aasser and J. W. Vanderhoff: *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 27: 187 (1989)
- 11) T. Suzawa and T. Murakami: *J. Colloid Interface Sci.*, 78:266 (1980)
- 12) E. S. Daniels: M. S. Thesis, Lehigh Univ., Beth-

- lehem (1983)
- 13) R. L. J. Zsom : *Research Report, Akzo Co. Research Dept, Netherlands*
- 14) A. Kondo and K. Higashitani : *J. Colloid Interface Sci.*, 150:344 (1992)
- 15) S. Margel, M. Tenanbaum and I. Fisher. : *J. Colloid Interface Sci.*, 150 : 22(1992)
- 16) M. S. El-Aasser : in "Advances in Emulsion Polymerization and Latex Technology", Vol. 2, Emulsion Polymers Institute, Lehigh Univ., Bethlehem (1984)