

## 약물방출시스템 적용을 위한 락타이드/히아루론산 고분자 막의 제조

김민수·권지영·정성일<sup>†</sup>

한남대학교 나노생명화학공학과  
(2005년 9월 30일 접수, 2005년 12월 21일 채택)

### Synthesis of Lactide/Hyaluronic Acid Polymer Membrane for the Application of Drug Delivery System

Min Su Kim, Ji Young Kwon, and Seong Ihl Cheong<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Nano-Bio Technology, Hannam University, Daejeon, 306-791, Korea  
(Received September 30, 2005, Accepted December 21, 2005)

**요약:** 생체 적합성이 우수한 히아루론산과 생분해성이 우수한 폴리 락타이드의 이량체를 결합하여 약물 방출 시스템에 적용할 수 있는 생체 재료를 제조하고자 하였다. 냉동 건조법을 이용하여 히아루론산과 락타이드를 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)로 가교시켰다. 생성된 막을 핵자기 공명 분광법으로 분석하여 락타이드 반응도와 EDC 반응도를 결정하였다. 히아루론산에 대한 락타이드 몰비, 가교제 농도가 증가할수록 혹은 가교 온도가 감소할수록, 락타이드 반응도가 증가하였으며 팽윤도는 감소하였다. 서로 다른 락타이드 반응도를 가진 막으로 약물 방출 실험을 수행한 결과 락타이드 반응도가 증가하면 약물 방출 속도가 감소하는 경향을 보였다. 또 친수성이 다른 여러 가지 약물로 약물 방출 실험을 수행한 결과 친수성이 우수한 약물일수록 서서히 방출되었다.

**Abstract:** The hyaluronic acid (HA) with excellent biocompatibility can be combined with lactide, the ester dimer of polylactide, with good biodegradability to produce biocompatible materials applicable to drug delivery system. By freeze drying method, HA and lactide were crosslinked with crosslinking agent, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide. Degree of lactide and EDC reaction was determined by the analysis of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The degree of lactide and EDC reaction increased and swelling ratio decreased as the mole ratio of lactide to HA or crosslinking agent concentration increased or reaction temperature decreased. The drug release experiment result from membranes having different degree of lactide reaction showed that drug release rate reduced in proportion to the degree of lactide reaction. The drug release experiment result from drugs having different hydrophobicity showed that the more hydrophobic drug was released more slowly.

**Keywords:** hyaluronic acid, lactide, crosslinking, swelling, drug release

#### 1. 서론

과학의 발달로 인간의 수명이 연장되고 고품질의 삶에 대한 욕구가 커지면서 보형 및 성형 재료의 수요가 급증하여 생체 의학 분야에서 천연 및 인공 물질을 생체 재료로 사용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 목적에 적합한 물질로 고분자를 가교시켜 만든 3차원 망상구조의 하이드로젤을 들 수 있다. 하이드로

젤은 높은 흡습성과 안정성, 무독성을 가지고 있고 혈액, 체액 및 생체와 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 보인다. 1960년 폴리하이드록시 에틸메타아크릴레이트를 이용한 제품이 처음 선보인 이래[1] 상처 치료용 드레싱, 콘택트렌즈, 약물 전달계, 성형 보형물 등의 생체 재료로 널리 사용되고 있다[2-4]. 하이드로젤이 약물 전달계 또는 성형 보형물의 용도로 사용되기 위해서는 단백질이나 효소 등과 화학 반응을 일으키지 않고 인체 변화 조건에 순응하여야 한다.

<sup>†</sup>주저자(e-mail : suho@hannam.ac.kr)

히아루론산(HA)은 조직 내의 간질에 광범위하게 분포되어 있는 천연 무코다당류로서 세포간 분자의 3차원 가교 역할을 하고, 점도가 높아 연골사이에서 연골을 보호하며, 인체 내에서 혈액, 체액 및 생체 조직과 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 갖는다[5]. 또 그 독특한 화학적 특성으로 인해 필요에 따라 다양한 분자량을 갖도록 할 수 있으며, 생체 내에서 효소적으로 재구성 가능하고, 관능기의 조절 및 가교화, 하이드로젤 형태로의 재구성이 용이하다. 이러한 히아루론산의 우수한 물리 화학적 성질을 이용하기 위해 히아루론산을 개조하여 면역성 조직공학과 약물전달체, 인체 보형물 등에 적용되는 생체 재료물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[6-10]. 히아루론산은 친수성 기인 카르복실기를 다량 함유하고 있어 수분과 접촉시 기계적 강도가 약화되고 신속히 분해 되나[11,12] 적절한 방법을 도입하여 카르복실기를 개조함으로써 기계적 강도를 높이고 인체 내에서 분해 속도를 지연시킬 수 있다. 이 목적으로 가장 적합한 물질로 polylactide (PLA)를 들 수 있다. PLA는 1962년 수술용 봉합사로 사용된 이래 가장 널리 사용되는 합성 생체 고분자 재료 중 하나로서 기계적 강도가 우수하고 생체 내에서 신진대사를 통해 서서히 분해되어 배출되는 생체 분해성이 우수한 고분자이다[13]. PLA는 카르복실기와 에스테르 결합을 유도할 수 있는 하이드록시기가 다량 존재하며, 반복단위에 존재하는 이성질체의 구조를 조절함으로써 분해속도를 조절할 수 있다[14,15]. 또 PLA의 올리고머도 D/L형 이성질체의 비율 및 분자량에 따라 기계적 물성과 분해속도가 달라진다[16]. 이와 같은 PLA의 분해속도 조절 능력을 생체 재료에 도입하기 위하여 PLA 혹은 그 모노머인 젯산을 히아루론산에 가교시켜 생체 내에서 분해 능력을 조절 할 수 있는 새로운 고분자를 제조하였다. 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)를 사용하여 히아루론산과 젯산과의 가교반응이 진행됨을 확인하였으나 친수성이 너무 크고 분해 속도가 빨라 생체 재료나 세포 배양용으로 사용하는데 문제점이 있었다[17]. 이러한 단점을 개선하기 위해 소수성이 더 큰 젯산의 무수 환형 이량체인 락타이드를 사용하여 가교시키면 소수성을 크게 하고 생체 분해 속도를 지연시킬 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 가교제를 사용하여 PLA의 무수 환형

이량체인 락타이드를 히아루론산에 가교시켜 약물 방출 시스템에 적용할 수 있는 새로운 고분자를 제조하려고 한다. 히아루론산과의 혼합 몰비, 가교 온도, 가교제 농도 등을 변화시키면서 반응성에 미치는 영향을 살펴본다. 제조된 새로운 물질의 고분자가 가교됨을 확인하기 위하여 핵자기공명 분광분석기(NMR)로 분석하며, 적외선 흡수분광기를 사용하여 약물 방출 농도를 측정한다. 제조된 고분자가 약물 방출 시스템의 물성을 살펴보기 위해 팽윤도, 인장 강도, 약물 방출성 등을 측정한다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

히아루론산은 평균분자량  $2 \times 10^6$  Da인 Fulllong-chem사의 의약품 제품을 사용하였다. 락타이드, 에탄올, indomethacin, dexamethasone, prednisone, flufenamic acid와 가교제로 쓰인 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)는 씨그마 알드리치사의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 막의 제조

1 wt% 히아루론산 수용액에 히아루론산 기준으로 락타이드를 5~13 몰비로 첨가하여 상온에서 4시간 교반한다. 히아루론산과 락타이드의 혼합 용액을 캐스팅 판에 부어 Gardner 칼을 이용하여 균일한 두께로 캐스팅한 후  $-80^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동결시킨다. 이것을 꺼내  $-80^\circ\text{C}$ , 1 Pa하의 동결건조기에서 24시간 동결 건조한다. 제조된 막은 에탄올에 가교제를 5~20 wt%비로 섞은 혼합액에 15~28 $^\circ\text{C}$ 에서 24시간 담가 가교시킨다. 가교 후 막은 초음파 세척기로 5분간 3회 세척하여 가교제를 완전히 제거한 후 건조기에서 건조시킨다.

### 2.3. 물성연구

#### 2.3.1. 기기분석

제조된 막의 가교됨을 확인하기 위해 NMR을 사용하여 관능기를 확인하였고 이를 기초로 가교도와 가교제 EDC의 반응 참여율을 결정하였다. NMR은  $\text{D}_2\text{SO}_4$ 를 용매로 하여 Bruker AMX 500 MHz로 측정하였다. Universal Testing Machine (UTM)을 사용하여 76.2 mm  $\times$  3.15 mm  $\times$  1.0 mm 크기로 제조된 막의 인장강도를

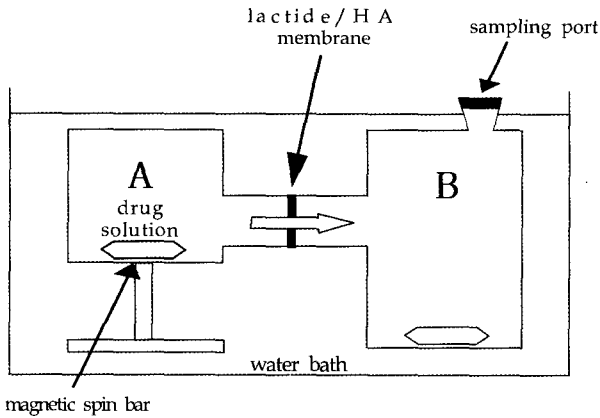


Fig. 1. Experimental setup for drug release.

측정하였다.

2.3.2. 팽윤도

막을 일정한 크기로 잘라 물속에 침적시킨 후 막이 평형에 완전히 이를 수 있도록 24시간정도 상온에 보관한다. 이 막을 꺼내 표면의 물을 제거한 후 무게를 측정한다 다음 건조기에 넣어 수분을 완전히 제거한 후 건조된 막의 무게를 측정한다. 시료에 대한 팽윤도는 다음 식에 의해 결정된다.

$$\text{팽윤도}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100(\%)$$

( $W_s$  = 젖은 시료의 무게,  $W_d$  = 건조된 시료의 무게)

2.3.3. 막의 가수분해

제조된 막을 다른 효소 없이 증류수에 침전시킨 후 37°C에서 분해가 얼마나 이루어지는지 살펴보았다. 시료는 일정한 크기로 잘라 50 mL 병에 넣어 37°C에서 가수분해 시키면서 정해진 시간에 꺼내어 세척한 후 37°C 건조기에서 24시간 건조한 후 시료의 무게를 재어 분해정도를 측정하였다. 동일한 조건에서 3회 반복하여 그 평균값을 취하였다.

2.3.4. 투과도 측정

약물 투과 실험은 Fig. 1과 같이 diffusion cell을 이용하여 측정하였다. 방 A에는 약물 용액을 35 mL, 방 B에는 pH 7 완충용액을 250 mL 채운다. 두 방 사이에 가교된 하이드로겔 막을 집계를 이용하여 고정하고 증발을 막기 위해서 밀봉한다. 이때 사용된 막의 유효면

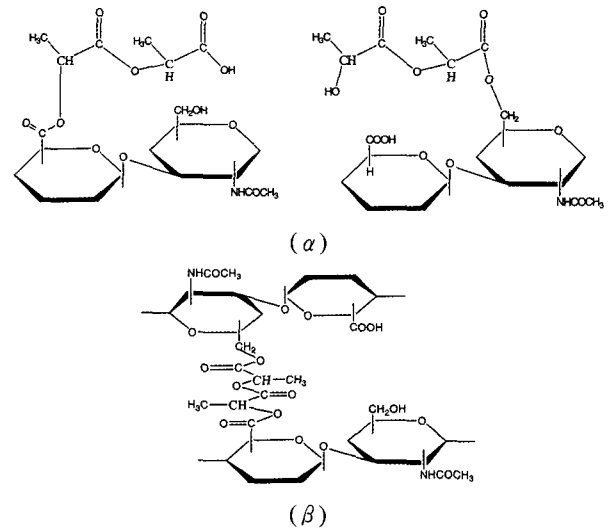


Fig. 2. Structure of ester group ( $\alpha$ ) connected to lactide end group, ( $\beta$ ) crosslinked to HA.

적은 7.0 cm<sup>2</sup>이다. 실험시 농도구배를 최소화하기 위하여 교반시켜 주었으며 온도를 37°C로 일정하게 유지시켜 주기 위해 항온조에서 실행하였다. 투과도는 방 B에서 일정한 시간마다 시료를 채취하여 파장 270 nm에서 분광광도계(UV spectrophotometer) (SMART PLUS SP-1900PC)를 사용하여 농도를 측정하고 이를 이용하여 결정하였다. 투과계수는 다음 식에 의해 구했다[18].

$$P = \frac{-d}{A(1/V_A + 1/V_B)t}$$

$$\ln\left[\left(1 + \frac{V_A}{V_B}\right) \frac{C_t}{C_0} - \frac{V_A}{V_B}\right]$$

여기서 P: 투과계수(cm<sup>2</sup>/s),  $V_A$ ,  $V_B$ : 방 A, 방 B의 부피(cm<sup>3</sup>),  $C_0$ : 초기용액의 약물 농도(mg/L),  $C_t$ : 시간 t에서 방 B에서의 약물 농도(mg/L), d: 막의 두께(cm), A: 막의 유효면적(cm<sup>2</sup>)이다.

3. 결과 및 고찰

히아루론산과 락타이드에 존재하는 하이드록시기와 카르복실기가 반응하여 얻어진 가교된 고분자는 물에 녹지 않는 성질을 가지므로 이를 관찰함으로써 가교반응의 유무를 일차적으로 관찰하였다. 가교 반응에 의해서 형성된 에스테르기는 락타이드가 말단기로 존재하는 형태( $\alpha$ )와 완전히 가교된 형태( $\beta$ )로 존재할 수



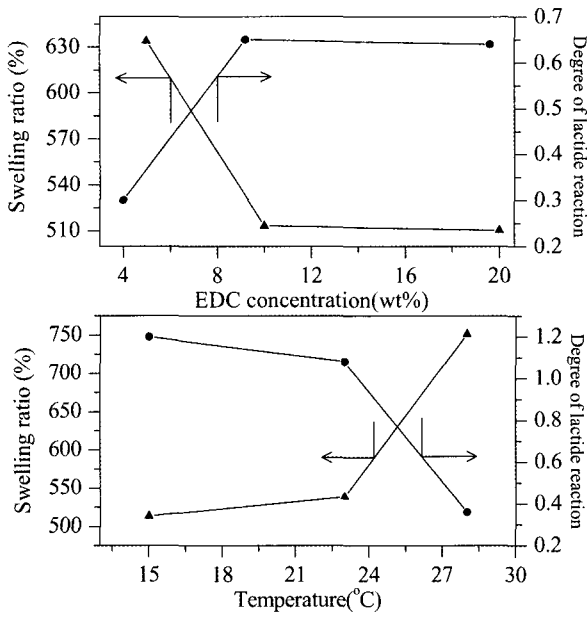


Fig. 5. The effect of EDC concentration and crosslinking temperature on degree of lactide reaction and swelling ratio.

커져 히아루론산과의 반응에 의해 가교도가 증가한다. 일반적으로 가교도가 증가하면 3차원적인 망상구조가 많아져 물을 함유할 수 있는 체적이 줄어들어 팽윤도는 감소하는 경향을 보인다[20-22]. 물비가 증가할수록 EDC와의 반응에 의한 수산기의 감소, 젖산기 첨가에 의한 가교도 증가로 팽윤도는 감소하는 경향을 보였다.

Fig. 4에서 사용한 시료를 사용하여 Instron에 의한 인장강도를 측정된 결과를 Table 1에 보였다. 물비가 증가함에 따라 인장강도와 탄성률은 증가하였으나 인장률은 감소하였다. 예상한 바와 같이 물비가 증가하여 젖산기가 많이 첨가될수록 취성이 강하게 나타났다. 여기서 얻어진 인장강도 값이 가교된 히아루론산 고분자 혹은 고분자 하이드로젤과 유사한 크기의 값을 가지나[23,24] 일반적인 필름형태의 고분자 막보다 작은 값을 보이고 있는 것은 동결건조에 의해 제조된 막

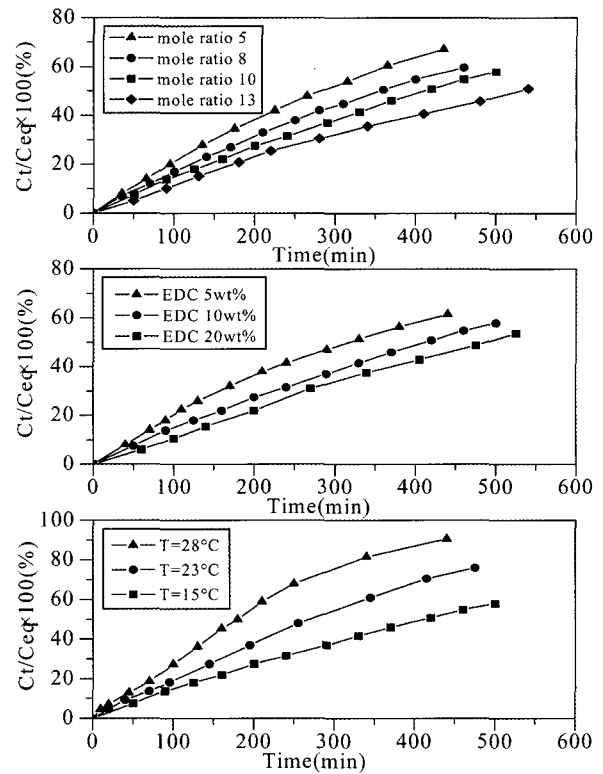


Fig. 6. Release profiles of indomethacin from HA membranes crosslinked at different mole ratio of lactide to HA, different EDC concentration, and different crosslinking temperature.

이 내부에 형성된 기공에 의해 필름의 강도가 약해진 것으로 사료된다.

고분자의 물성이 가교 조건에 따라 차이가 나는 것을 관찰하기 위해 가교제 농도를 5~20 wt%, 가교 온도를 15~28°C로 변화시키면서 락타이드 반응도와 팽윤도를 측정된 결과를 Fig. 5에 보였다. 가교제 농도가 증가할수록 혹은 가교 온도가 감소할수록, 락타이드 반응도가 증가하였으며 이로 인해 가교도가 증가하여 팽윤도는 감소하는 경향을 보였다.

약물 방출 현상은 고분자 재료의 성질, 약물의 성질,

Table 1. Tensile Properties of HA Polymers with Mole Ratio of Lactide to HA (Temperature: 15°C, EDC Concentration: 10 wt%)

Mole ratio (lactide/HA)	Tensile strength (kg/mm <sup>2</sup> )	Young's modulus (kg/mm <sup>2</sup> )	Elongation (%)
5	0.14	2.67	9.21
8	0.20	3.07	9.19
10	0.22	4.03	7.99
13	0.43	7.97	7.73

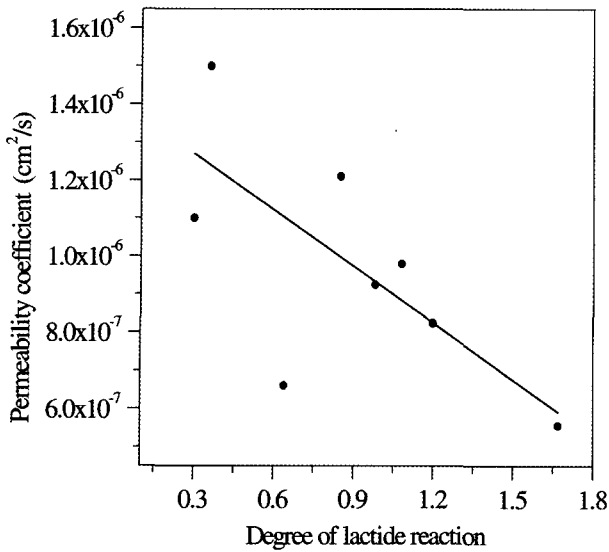


Fig. 7. Correlation between permeability and degree of lactide reaction.

약물과 고분자간의 인력, 주변 환경(pH, 온도, 용제) 등에 의해 영향을 받는다[25,26]. 락타이드에 대한 히아루론산의 몰비(5~13), 가교제 농도(5~20 wt%), 가교 온도(15~28°C) 등의 가교 조건을 변화시키면서 제조된 막을 통하여 약물이 방출되는 현상을 관찰하여 Fig. 6에 보였다. 약물로는 관절염 치료제로 사용되는 indomethacin을 사용하였다. 25°C로 조절된 항온조에서 시간에 따라 막을 투과한 약물의 농도를 측정하고 평형 농도에 대한 농도비로 약물 투과도를 계산하였다. 약물은 초기에 급격히 약물이 방출되나 시간에 지남에 따라 그 속도가 서서히 줄어드는 모습으로 일반적인 히아루론산 유도체와 동일한 모습을 보였다 [26,27]. 또 몰비의 증가, 가교제 농도의 증가, 가교 온도의 감소에 따라 약물이 늦게 방출되었다. Fig. 4, 5에서 보는 바와 같이 몰비의 증가, 가교제 농도의 증가, 가교 온도의 감소 등에 의해 락타이드 반응도가 증가하면 가교가 잘 되어 막의 3차원 구조가 발달하게 된다. 약물은 이와 같이 조밀하게 제조된 막을 통하여 빠져 나가기 힘들게 되어 약물 방출 속도가 느려지는 것으로 보인다.

여러 운전 조건에서 얻어진 막을 통하여 약물 방출 속도를 측정한 결과 락타이드 반응도가 증가하면 약물 방출 속도가 감소하는 경향을 보여 막의 락타이드 반응도와 약물 투과도와 밀접한 관계가 있는 것으로 보였다. 약물 방출 속도를 나타낸 Fig. 6을 이용하여 투

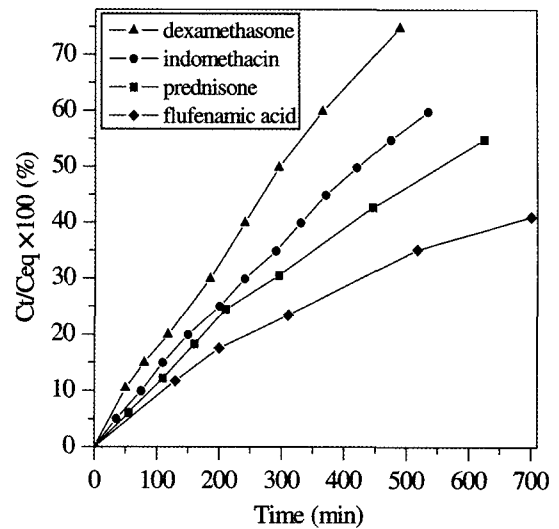


Fig. 8. Release profiles of indomethacin, dexamethasone, prednisone, and flufenamic acid from HA membrane crosslinked at 10 of mole ratio, 10 wt% of EDC concentration, and 15°C of crosslinking temperature.

과계수를 구하여 락타이드 반응도에 따른 투과계수의 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 락타이드 반응도가 증가할수록 투과계수는 감소하여 동일한 재료의 막이라도 가교도에 따라 투과도가 달라졌다. 약물 방출 속도는 약물의 용도와 목적에 맞도록 운전변수(몰비, 가교 온도, 가교제 농도 등)를 조절하여 고분자의 가교도를 적절하게 설계함으로써 조절 가능함을 알 수 있었다.

한편 약물 방출 현상은 약물과 막의 친화도, 약물의 친수성, 약물 분자의 크기 등 약물의 성질에 따라 다르다. 제조된 막에서 약물의 특성에 따른 변화를 관찰하기 위해 가교제 농도 10 wt%, 가교 온도 15°C, 몰비 10에서 제조된 막을 통하여 여러 가지 약물이 방출되는 농도를 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. 약물은 indomethacin, dexamethasone, prednisone, flufenamic acid 등을 사용하였다. 예상한 바와 같이 서로 다른 약물에서 약물 방출 속도가 달라졌다. 약물이 가교된 막을 통과할 때 친수성의 차이에 따라 투과속도가 다를 것으로 예상하여 친수성의 척도를 나타내는 octanol-water 분배계수값(Log P)[27]과 투과 계수와의 상관관계를 Fig. 9에 나타내었다. 친수성이 우수하여 분배계수가 큰 약물일수록 막을 통하여 투과되는 시간이 길어져 투과계수가 작아지는 경향을 보였다. 동일한 막이라도 약물의 종류에 따라 약물 방출 속도가 달라지므로 주어진 약물에 적합한 막을 사용하는 것이 중요

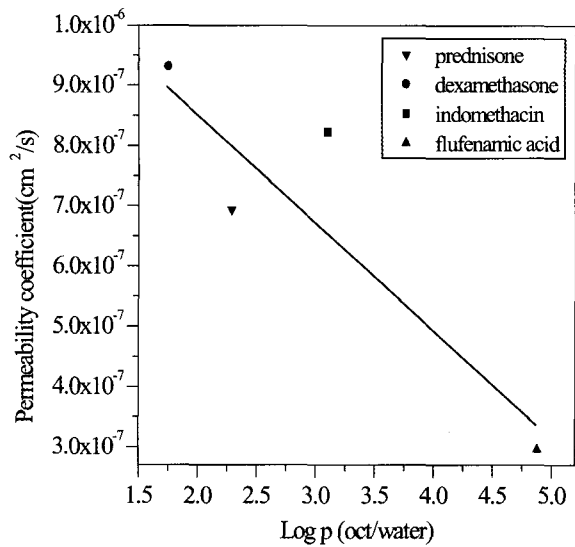


Fig. 9. Correlation between permeability and drug hydrophobicity.

하리라 사료된다.

#### 4. 결론

냉동 건조법을 이용하여 히아루론산과 락타이드 수용액을 가교제 EDC로 가교시켜 불용성 박막을 제조하였다. 생성된 고분자 박막을 NMR로 분석하여 락타이드와 EDC가 히아루론산과 결합한 구조를 확인하였고 이를 이용하여 반응도를 결정하였다. 히아루론산에 대한 락타이드의 몰비를 증가시키면서 가교시킨 결과 락타이드 반응도와 EDC 반응도는 증가하였다. 몰비가 증가하여 젯산기가 많이 첨가될수록 팽윤도는 감소하였고 기계적 강도는 증가하였다. 락타이드에 대한 히아루론산의 몰비와 가교제 농도가 증가할수록, 혹은 가교 온도가 감소할수록 팽윤도가 감소하여 가교 반응이 잘 일어남을 알 수 있었다. Indomethacin을 사용하여 가교도가 다른 여러 가지 막으로 약물 방출 현상을 관찰한 결과 가교가 많이 된 막일수록 투과도가 감소하였다. 또 동일한 막이라도 약물의 종류에 따라 약물 방출 속도가 달라졌으며 친수성이 우수한 약물일수록 막을 투과하기 어려워 투과계수가 작아지는 경향을 보였다.

#### 감사

본 연구는 2005년 산업자원부의 지역전략산업 석박

사 연구인력 양성사업의 연구결과로 수행되었음.

#### 참고 문헌

- O. Wichterle and D. Lim, *Nature*, "Hydrophilic Gels for Biological Use", **185**, 117-118 (1960).
- N. A. Peppas, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Boca Raton, Vol. I, II, III, CRC Press Inc., Florida (1986).
- G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, J. H. Chang, and K. J. Kim, "Recent Development Trend of Stimuli Sensitive Hydrogels", *Polym. Sci. and Tech.*, **14(4)**, 431-437 (2003).
- F. Lim and A. M. Sun, *Science*, "Microencapsulation of islets as bioartificial endocrine pancreas", **210**, 908-910 (1980).
- Y. D. Park, N. Tirelli, and J. A. Hubbell, "Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks", *Biomaterials*, **24**, 893-900 (2003).
- G. D. Prestwich, D. M. Marecek, and J. F. Marecek, "Controlled chemical modification of hyaluronin acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives", *J. Control. Rel.*, **53**, 93-103 (1998).
- Y. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery", *J. Control. Rel.*, **69**, 169-184 (2000).
- S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, "Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide cross-linking", *Biomaterials*, **22**, 1205-1212 (2002).
- S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Suh, "Biological characterization of EDC-crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration", *Biomaterials*, **24**, 1631-1641 (2003).
- H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Jung, "Synthesis of Hyaluronic acid scaffold for tissue engineering and evaluation of its drug release behaviors", *Polymer(Korea)*, **25(4)**, 476-485 (2001).

11. Y. Tokita and A. Pkamoto, "Degradation of hyaluronic acid-Kinetic study and thermodynamics", *Eur. Polym. J.*, **32(8)**, 1011-1014 (1996).
12. S. P. Zhong, D. Campoccia, P. J. Doherty, R. L. Williams, L. Benedetti, and D. F. Williams, "Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase", *Biomaterials*, **15**, 359-368 (1994).
13. J. S. Lee, D. J. Choo, S. H. Kim, and Y. H. Kim, "Synthesis and degradation property of star-shaped polylactide", *Polymer(Korea)*, **22(6)**, 880-889 (1998).
14. C. Grandfils, P. Flandroy, and R. Jerome, "Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) micro-particles intended as chemoembolization materials", *J. Control. Rel.*, **38**, 109-122 (1996).
15. H. Fukuzaki, M. Yoshida, M. Asano, and M. Kumakura, "Synthesis of copoly (D,L-lactic acid) with relatively low molecular weight and *in vitro* degradation", *Eur. Polym. J.*, **25(10)**, 1019-1026 (1989).
16. S. Li, M. Tenon, H. Garreau, C. Braud, and M. Vert, "Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, D,L- and meso-lactides", *Polym. Deg. Stab.*, **67**, 85-90 (2000).
17. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, *Membrane J. (Korea)*, "Characterization of Hyaluronic Acid Membrane Containing Lactic Acid", **15(1)**, 8-14 (2005).
18. J. H. Kim, J. Y. Kim, Y. M. Lee, and K. Y. Kim, "Controlled-release drug delivery through crosslinked poly(vinyl alcohol)/chitosan blend membrane", *Polymer (Korea)*, **15(6)**, 695-701 (1991).
19. J. W. Kuo, D. Swann, and G. D. Prestwich, "Chemical modification of hyaluronic acid by carbodiimides", *Bioconjugate Chem.*, **2**, 232-241 (1991).
20. K. R. Park, D. Kim, and Y. C. Nho, "Preparation and its application for wound dressing of gelatin hydrogel and PVP/Gelatin hydrogel by radiation crosslinking", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **12(7)**, 718-723 (2001).
21. L. F. Miranda, A. B. Lugao, L. D. B. Machado, and L. V. Ramanathan, "Crosslinking and degradation of PVP hydrogels as a function of dose and PVP concentration", *Radia. Phys. Chem.*, **55**, 709-712 (1999).
22. E. K. Choi, H. I. Kim, K. R. Park, and Y. C. No, "Preparation and characterization of PVA/PVP/PEG/Chitosan hydrogels by freezing/thawing and radiation crosslinking", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14(4)**, 505-510 (2003).
23. E. K. Choi, H. I. Kim, K. R. Park, and Y. C. No, "Preparation and characterization of PVA/PVP/PEG/Chitosan hydrogels by freezing/thawing and radiation crosslinking", *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14(4)**, 505-510 (2003).
24. E. Milella, E. Brescia, C. Massaro, P. A. Ramires, M. R. Miglietta, V. Fiori, and P. Aversa, "Physico-chemical properties and degradability of non-woven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds", *Biomaterials*, **23**, 1053-1063 (2002).
25. Y. L. Luo, K. R. Kirker, and G. D. Prestwich, "Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery", *J. Control. Rel.*, **69**, 169-184 (2000).
26. E. Payan, J. Y. Jouzeau, F. Lapicque, K. Bordji, and P. Netter, "In vitro drug release from HYC 141, a corticosteroid ester of high molecular weight hyaluronan", *J. Control. Rel.*, **34**, 145-153 (1995).
27. T. Coviello, M. Dentini, G. Rambone, P. Desideri, and F. Alhaique, "A novel co-crosslinked polysaccharide: studies for a controlled delivery matrix", *J. Control. Rel.*, **55**, 57-66 (1998).