

## 젖산이 결합된 히아루론산 막의 특성

권지영·정성일<sup>†</sup>

한남대학교 나노생명화학공학과  
(2005년 1월 28일 접수, 2005년 2월 18일 채택)

### Characterization of Hyaluronic Acid Membrane Containing Lactic Acid

Ji Young Kwon and Seong Ihl Cheong<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Nano-Bio Technology, Hannam University, 133 Ojeong-dong, Daeduk-gu, Daejeon  
306-791, Korea

(Received January 28, 2005, Accepted February 18, 2005)

**요약:** 생체 적합성이 우수한 히아루론산과 생분해성이 우수한 폴리 락타이드의 모노머를 결합하여 인체내에서 분해속도를 조절할 수 있는 생체적합성이 우수한 생체 재료를 제조하고자 하였다. 냉동 건조법을 이용하여 히아루론산과 폴리 락타이드의 모노머인 젖산 또는 이량체인 락타이드를 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide로 가교시켰다. 생성된 막을 적외선 흡수 분광법으로 분석한 결과 에스테르 결합이 생성됨을 확인하였고, 핵자기 공명 분광법으로 분석하여 이 에스테르 결합이 젖산의 반응 참여에 의한 것임을 확인하였다. 젖산과 히아루론산의 몰비를 1부터 10까지 증가시키면서 가교시킨 결과 젖산의 전화율(6~32%)과 가교도(4~19%)는 증가하였으나, 반응에 참여한 젖산이 가교되는 선택도는 몰비에 관계없이 62% 정도로 일정하였다. 몰비가 커서 젖산이 많이 첨가되면 취성은 강해졌으나 생분해 속도는 빨라졌으며, 팽윤도는 500에서 2000% 범위의 값을 보였다.

**Abstract:** The hyaluronic acid (HA) with excellent biocompatibility can be combined with the monomer polylactide with good biodegradability to produce biocompatible materials which can control the period of degradation in a human body. By freeze drying method, HA and the lactic acid, monomer of polylactide, or lactide, the ester dimer of polylactide, were crosslinked with crosslinking agent, 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide. The analysis of infrared spectroscopy showed that the ester linkage was formed and the analysis of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy showed that the ester linkage was due to the reaction of lactic acid and HA. The conversion (6~32%) and degree of crosslinking (4~19%) increased but the selectivity was almost constant at 62% as the mole ratio of LA to HA increased from 1 to 10 in the crosslinking reaction. The brittleness became more pronounced and the rate of degradation became faster with more addition of lactic acid resulting from the higher ratio of LA to HA, and the swelling ratio was in the range of 500 to 2000%.

**Keywords:** hyaluronic acid, lactic acid, crosslinking, swelling, degradation

### 1. 서론

최근 교통 사고에 의한 외상 및 화상 환자의 급증, 고령화와 양질의 삶에 대한 욕구로 성형 및 보형 재료의 수요 급증 등으로 생체 의학 분야에서 천연 및 인공 물질을 생체 재료로 사용하려는 연구가 활발히 진

행되고 있다. 히아루론산(Hyaluronic acid, HA)은 조직 내의 간질에 광범위하게 분포되어 있는 천연 무코다당류로서 세포간 분자의 3차원 가교 역할을 하며, 점도가 높아 연골사이에서 연골을 보호하는 윤활제 역할을 한다. HA는 천연 생체 고분자이므로 인체 내에서 혈액, 체액 및 생체 조직과 접촉하였을 때 우수한 생체 적합성을 갖는다. 그러나 생체와 유사한 환경 하에서

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

효소작용 혹은 가수분해 반응에 의해서 신속히 분해되는 특징을 가지고 있어[1,2] 그 응용이 제한되어져 왔다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 HA를 화학적으로 변형하면 그것의 물리 화학적인 성질이 개선될 수 있다. 즉 천연적인 생체 적합성, 생체분해성 등의 우수한 성질은 원래대로 유지하면서 체내에서의 체류시간을 목적에 맞게 조절할 수 있다. 요즘 HA의 생체 적합적 성질을 이용하기 위해 HA를 개조하여 면역성 조직공학과 약물전달계, 인체 보형물에 적용되는 생체 재료물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다 [3-7].

HA 자체로 경화된 고분자 하이드로겔은 복강경 수술 후 조직과의 유착을 감소시키는데 유효한 것으로 밝혀졌다[8]. HA와 알코올과의 에스테르화에 의해 개조된 고분자는 새로운 물리화학적 성질을 가져 조직공학과 약물전달계에 유용하게 사용될 수 있다[4,9-11]. HA를 슬폰화하여 제조된 필름을 폴리에틸렌(PE)에 플라즈마로 막처리한 결과 표면에 세포 부착, 오염, 박테리아 성장이 억제되어 혈액 친화적이고 혈전생성을 억제하는 효과가 있다[12]. HA를 포름알데하이드하에서 단백질을 처리하여 제조된 점탄성이 우수한 제품은 관절염 치료에 연골조직을 보호하고 그 손상이 진행되는 것을 예방하는 성질이 있다[13]. HA와 여러 종류의 카르복실산 고분자와의 블렌딩에 의해 얻어진 막은 혈액에서의 안정성이 우수하여 수술 후 조직과의 유착을 감소시키는 보호막으로 사용될 수 있다고 발표되었다[14].

Poly lactide (PLA)는 1962년 수술용 봉합사로 사용된 이래 가장 널리 사용되는 합성 생체 고분자 재료 중 하나이다. PLA는 생체 분해성이 우수하여 손상된 조직이나 기관의 치유에 사용된 후 생체 내에서 신진대사를 통해 소멸된다. 따라서 상처 치유 후 별도의 수술이 필요치 않고 상처가 치유됨에 따라 서서히 분해되어 새로 생성된 조직이 충분한 기능을 갖게 하는데 도움을 준다[15]. PLA의 모노머인 젖산은 손대칭 중심의 존재로 인해 D/L형 광학 이성질체가 존재하며 그 중합체인 PLA도 원자 배열에 따라 여러 가지 이성질체가 존재하는데 이를 조절함으로써 분해속도를 조절할 수 있음이 발표되었다[16,17]. 또 PLA의 올리고머도 D/L이성질체의 비율 및 분자량에 따라 분해속도가 차이가 난다고 발표되었다[18]. 이처럼 PLA의 화학적 분자구조를 조절함으로써 수주일로부터 수년에 이르기까지 분해속도를 조절하여 목적에 맞는 생체 분해성

고분자를 제조하여 사용하고 있다. 이와 같은 PLA의 분해속도 조절 능력을 생체 재료에 도입하기 위하여 PLA 모노머인 젖산 혹은 이량체인 락타이드를 HA에 가교시키면 생체 내에서 분해 능력을 조절할 수 있는 새로운 고분자를 제조할 수 있을 것이다.

우리는 냉동 건조법을 이용하여 가교제 EDC로 HA와 젖산 혹은 락타이드를 가교시켜 새로운 HA유도체를 개발하려고 하였다. 제조된 새로운 물질의 고분자가 가교됨을 확인하기 위하여 적외선 흡수 분광 분석기(IR), 핵자기 공명 분광 분석기(NMR) 등으로 분석하였고, 이 물질이 생체 재료로서의 사용 가능성을 살펴보기 위해 생분해성, 팽윤, 인장 강도 등을 측정하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

히아루론산은 평균분자량  $2 \times 10^6$  Da (Fulllongchem Corp.)을 사용하였다. 젖산, 락타이드, 에탄올과 가교제로 쓰인 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)는 씨그마 알드리치에서 구입하여 사용하였다.

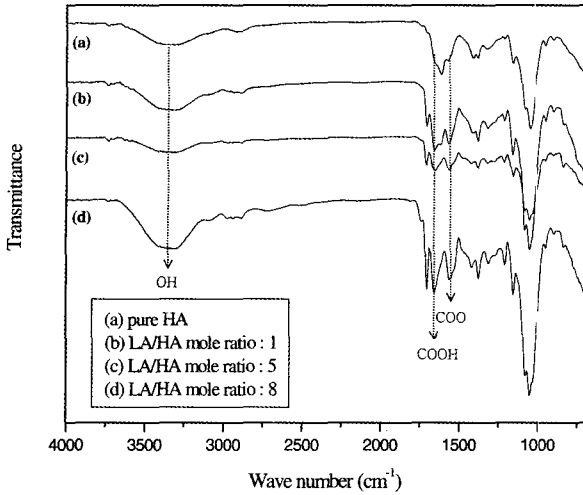
### 2.2. 막의 제조

1 wt% 히아루론산 수용액에 히아루론산 기준으로 젖산을 1~10의 몰비로 첨가하여 상온에서 4시간 교반한다. 히아루론산과 젖산의 혼합 용액을 캐스팅판에 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 동결건조한다. 제조된 막은 에탄올에 가교제를 5~15 wt%비로 섞은 혼합액에 상온에서 24시간 담궈 가교시킨다. 가교 후 막은 초음파 세척기로 5분간 3회 세척하여 가교제를 완전히 제거한다.

### 2.3. 물성연구

#### 2.3.1. 기기분석

제조된 히아루론산과 젖산의 혼합 용액의 구조 변화를 보기 위해 IR과 NMR을 사용하여 기본적인 관능기를 확인하였다. IR은 Bio-Rad Digilab Division FTS-165에 장착된 ATR (Attenuated Total Reflectance) mode로 측정하였다. NMR은  $\text{D}_2\text{SO}_4$ 를 용매로 하여 Bruker AMX 500 MHz로 측정하였다. Universal Testing Ma-



**Fig. 1.** IR spectra of crosslinked polymer with various mole ratios of LA to HA; (a) pure HA (b) 1 (c) 5 (d) 8.

chine (UTM)을 사용하여 76.2 mm×3.15×0.5 mm 크기로 제조된 막의 인장강도를 측정하였다.

2.3.2. 팽윤도

막을 일정한 크기로 잘라 물속에 침적시킨 후 막이 평형에 완전히 이를 수 있도록 24시간 정도 상온에 놔둔다. 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.

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

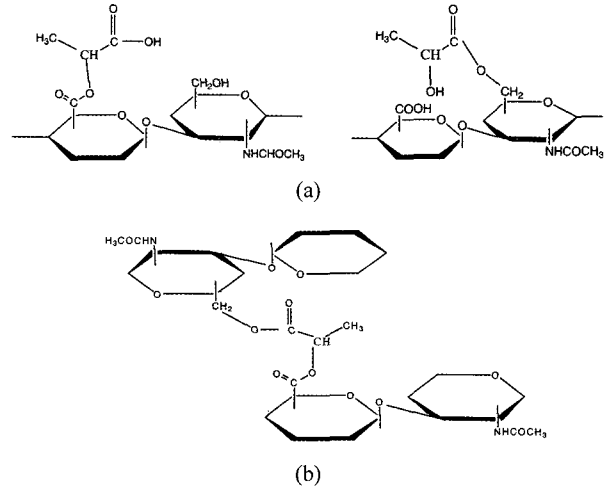
( $W_s$  = 젖은 시료의 무게,  $W_d$  = 건조된 시료의 무게)

2.3.3. 막의 가수분해

가교제 용액 10 wt% 농도에서 제조된 두께 0.25 mm의 막을 다른 효소 없이 phosphate buffer saline 용액에 침전시킨 후 37°C, pH 7.4에서 분해가 얼마나 이루어지는지 살펴보았다. 시료는 일정한 크기로 잘라 50 mL 병에 넣어 37°C에서 가수분해 시키면서 정해진 시간에 35°C 오븐에서 하루이상 건조한 후 시료의 무게를 재어 분해정도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

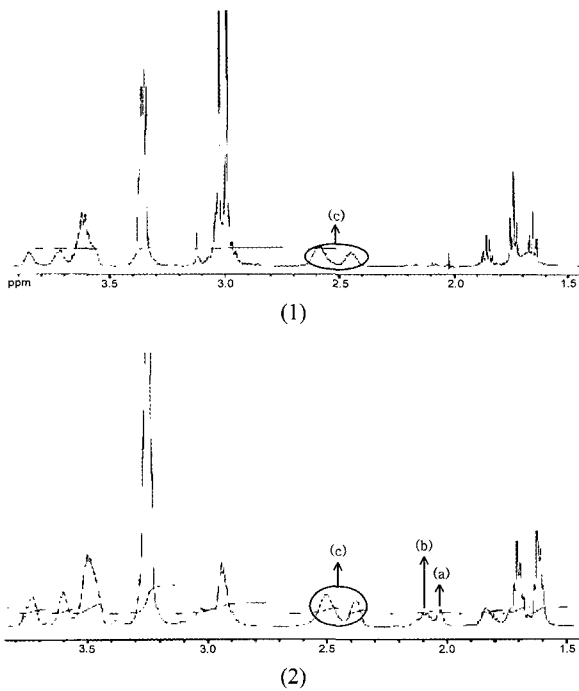
히아루론산과 젖산에 존재하는 하이드록시기와 카



**Fig. 2.** Structure of ester group (a) connected to lactic acid end group (b) crosslinked to HA group.

르복실기가 가교 반응하여 얻어진 고분자는 물에 녹지 않는 성질을 가지므로 이를 관찰함으로써 가교반응의 유무를 일차적으로 관찰하였다. 피상 반응기에서 히아루론산과 젖산 혼합수용액에 EDC, diepoxide, ephichlorohydrin 등의 가교제를 넣고 반응시켰으나 가교반응은 일어나지 않았다. 이는 반응액의 점도가 매우 높아 교반이 충분히 이루어지지 못하여 반응기끼리의 접촉이 충분치 못한 상태에서 가교제가 그 역할을 다하지 못한 것으로 판단되었다. 반응기끼리의 접촉을 충분히 할 수 있도록 하기 위하여 히아루론산과 젖산 수용액을 먼저 혼합하여 냉동 건조시킨 후 제조된 막을 가교제(EDC) 용액에 장시간 침전시켜 가교제가 막 속으로 충분히 침투시킨 상태로 가교 반응을 진행시켰다.

생성된 고분자 막은 물에 녹지 않음을 확인하였고 관능기의 구조를 확인하기 위하여 IR로 분석하였다. 젖산과 히아루론산의 몰비가 1, 5, 8인 경우 가교 반응 후 얻어진 고분자 물질의 IR 그래프를 Fig. 1에 보았다. 1650, 3360, 1560  $cm^{-1}$  위치에 각각 카르복실기, 하이드록시기, 에스테르기 peak가 나타난다. 반응 전에는 에스테르기가 없었으나 반응 후 에스테르기가 형성됨을 확인할 수 있었으며 젖산의 농도가 클수록 에스테르기의 peak가 커짐을 보여 젖산의 농도가 클수록 가교반응이 더 잘 일어남을 알 수 있었다. 또 에스테르화 반응에 의해서 형성된 에스테르기는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 단순히 젖산이 말단기에 존재하는 형태와 가교된 형태의 2가지 형태로 존재할 수 있다. 젖산이 반응하여 가교된 형태로 존재하는 경우 원하는



**Fig. 3.** <sup>1</sup>H-NMR spectra with various types of methyl group (a) connected to ester end group (b) connected to crosslinked ester group (c) connected to amide group of HA crosslinked with HA only (1); and crosslinked with LA and HA (2).

기계적 강도를 갖는 성질을 나타낼 수 있지만, 말단기로 존재하는 경우 이웃한 히아루론산과 가교가 되지 않아 원하는 기계적 물성을 나타낼 수 없다. 두 경우 젯산에 연결된 메틸기의 구조가 다른 점에 주목하여 순수한 HA만으로 가교시킨 고분자와 HA와 LA를 함께 섞어 가교시킨 고분자를 NMR로 측정하여 그 분자 구조를 Fig. 3에서 살펴보았다. 2.03, 2.1, 2.5 ppm에서 각각 말단기로 존재하는 에스테르기에 연결되어 있는

메틸기(a), 가교된 상태로 존재하는 에스테르기에 연결된 메틸기(b), 히아루론산의 아마이드기에 있는 메틸기(c)의 peak가 나타난다. 순수한 HA만으로 가교시킨 고분자는 히아루론산의 아마이드기에 있는 메틸기가 존재하나(2.5 ppm) 에스테르 결합에 연결된 메틸기(2.03, 2.1 ppm)는 존재하지 않는다. 그러나 HA와 LA를 함께 가교시킨 경우 히아루론산에 있는 메틸기는 그대로 존재하나(2.5 ppm) 젯산의 카르복실기와 하이드록시기에 의해 에스테르 반응이 진행되어 2.03, 2.1 ppm 위치에 새로운 메틸기가 생성되었음을 보여주고 있다. 이는 히아루론산의 자체 반응에 의하여 가교 반응이 진행된 것이 아니라 젯산이 반응에 참여하여 에스테르결합이 이루어졌음을 보여주는 것이다. 히아루론산의 반복 단위에 1개의 메틸기와 1개의 카르복실산이 존재한다. 히아루론산에 존재하는 메틸기는 반응에 참여하지 않으므로 반응 전후에 그 농도가 일정하게 유지되나 히아루론산에 존재하는 카르복실기는 젯산과의 하이드록시기와 에스테르 반응을 하게 되며 따라서 젯산에 존재하는 메틸기가 가교된 고분자에 추가된다. 이러한 사실을 기초로 하여 2.5 ppm 위치에서의 peak 면적에 대한 2.03과 2.1 ppm 위치에서의 peak 면적의 합을 반응 전후율로, 2.03과 2.1 ppm에서의 peak 면적의 합에 대한 2.1 ppm에서의 면적 비율 반응한 젯산 중에서 선택적으로 가교 반응에 참여한 선택도로 간주하였다. 젯산의 농도가 가교반응에 미치는 영향을 살펴보기 위해 젯산의 농도를 증가시키면서 가교 반응을 진행하였고 NMR 그래프 상에서 메틸기에 해당하는 면적을 Table 1에 나타내었고 위의 방법으로 계산된 반응성 결과를 Table 1과 Fig. 4에 보였다. 젯산의 농도가 증가할수록 히아루론산과의 전화율

**Table 1.** Methyl Group Concentration of Crosslinked Polymers Measured by <sup>1</sup>H-NMR and Reactivities

| LA/HA mole ratio | 2.5 ppm (a) | 2.1 ppm (b) | 2.03 ppm (c) | total (d = b + c) | Degree of crosslinking | Conversion | Selectivity |
|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------------|------------------------|------------|-------------|
|                  |             |             |              |                   | (b/a)                  | (d/a)      | (b/d)       |
| 1                | 3.8509      | 0.1426      | 0.0886       | 0.2312            | 0.037                  | 0.06       | 0.617       |
| 5                | 4.0714      | 0.3685      | 0.236        | 0.6045            | 0.091                  | 0.148      | 0.610       |
| 8                | 6.101       | 0.877       | 0.5          | 1.377             | 0.144                  | 0.226      | 0.637       |
| 10               | 3.5349      | 0.6817      | 0.4339       | 1.1156            | 0.193                  | 0.316      | 0.611       |

- (a) HA methyl group.
- (b) Lactic acid methyl group crosslinked to HA.
- (c) Lactic acid methyl group only connected to HA.
- (d) Total methyl group (in lactic acid) reacted to HA.

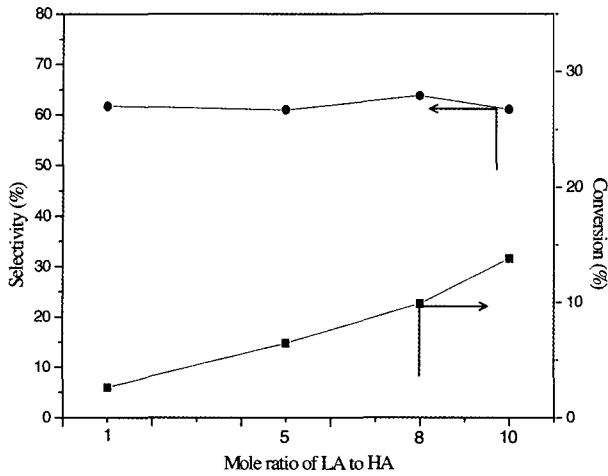


Fig. 4. Conversion and selectivity with mole ratios of LA to HA.

Table 2. Tensile Properties of Crosslinked Polymers

| LA/HA mole ratio | Tensile strength (kgf/mm <sup>2</sup> ) | Elongation (%) | Young's modulus (kgf/mm <sup>2</sup> ) |
|------------------|---|----------------|--|
| 0                | 0.4                                     | 20.24          | 345                                    |
| 1                | 0.84                                    | 22.31          | 598                                    |
| 5                | 0.59                                    | 12.03          | 737                                    |
| 8                | 1.11                                    | 14.50          | 747                                    |

과 가교도는 점차로 증가함을 알 수 있었고 이는 앞서 IR 분석 결과와 일치하였다. 또 반응에 참여한 메틸기에서 가교된 메틸기의 비를 보여주는 선택도는 농도에 크게 영향을 받지 않았다.

한편 젖산의 농도가 어느 정도 이상으로 증가할 경우 주어진 온도범위(-80°C)에서 냉동 건조가 어려워 그 이상으로 농도를 증가시킬 수 없었다. 위의 실험에서 사용한 젖산은 D/L형이 혼합된 meso형 젖산을 사용하였다. 젖산의 이성질체에 의한 효과를 살피기 위해 D-젖산을 사용하였으나 이 경우 가교반응이 거의 진행되지 않았으며, L-젖산의 경우 가격이 너무 비싸 실험을 생략하였다.

합성된 고분자 필름의 Instron에 의한 인장 실험 결과를 Table 2에 나타내었다. 젖산을 첨가한 양이 증가함에 따라 인장 강도와 탄성률은 증가하였으나 인장율은 감소하였다. 취성이 강한 특성을 가진 PLA의 단량체인 젖산의 농도를 크게 하여 생성된 고분자일수록 젖산이 많이 첨가되어 취성이 강하게 나타난다. 여기서 얻어진 인장 강도 값은 가교된 히아루론산 고분자

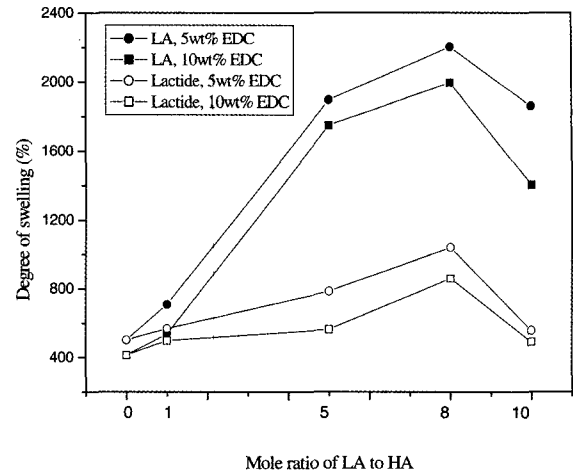


Fig. 5. Degree of swelling with mole ratios of LA to HA.

혹은 고분자 하이드로젤과 유사한 크기의 값을 가지나 [19,20] 일반적인 필름형태의 고분자 막보다 작은 값을 보이고 있는 것은 동결건조에 의해 제조된 막이 내부에 형성된 기공에 의해 필름의 강도가 약해진 것으로 사료된다.

Fig. 5에서 젖산 혹은 락타이드의 몰비에 따라 팽윤도를 보였다. 젖산 혹은 락타이드 몰비가 증가함에 따라 팽윤도가 증가하다 8 근처에서 최대값을 가진 후 감소하였다. 일반적으로 가교도가 증가하면 3차원적인 망상구조가 많아져 물을 함유할 수 있는 체적이 줄어들어 팽윤도는 감소하는 경향을 보인다고 알려져 있다 [20-22]. 앞서 Table 1에 의하면 가교도는 몰비가 증가함에 따라 증가하여 팽윤도가 감소하리라 예상하였으나 오히려 전반적으로 증가하는 경향을 보였다. 몰비가 증가하면 젖산이 더 많이 부가되어 이 때 생성된 고분자는 Fig. 3(a)와 같은 분자 구조를 더 많이 갖게 되어 분자 내에 수산기의 농도가 증가하게 된다. 친수성이 우수한 수산기 농도의 증가는 생성된 고분자의 흡수율을 증가를 초래한다. 또 몰비가 증가할수록 HA의 농도는 감소하고 따라서 HA의 자체 경화되는 비율은 줄어들게 된다. 몰비가 1~8인 범위에서는 LA와의 가교도는 증가하나 자체 경화 비율 감소 및 수산기의 농도 증가 효과에 의해 팽윤도가 증가하고, 몰비가 8보다 클 경우 LA의 가교도 증가에 의한 체적 감소 효과가 크게 작용하여 팽윤도가 감소하는 것으로 해석된다. 또 젖산보다 락타이드의 경우 팽윤도가 감소함을 보였다. 락타이드는 젖산의 이량체로서 수산기의 농도가 동일한 농도의 젖산에 비해 2배 적으므로 수산기의

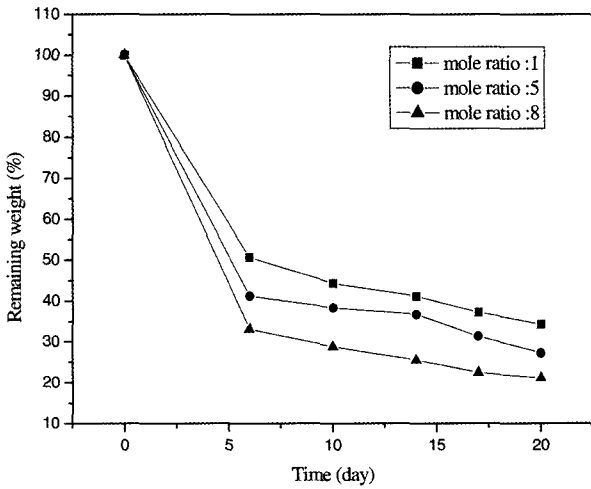


Fig. 6. Degree of degradation with mole ratios of LA to HA.

농도 감소로 인해 팽윤도가 감소하는 것으로 보인다. 한편 젯산 혹은 락타이드의 몰비에 관계없이 가교제 EDC의 농도가 클수록 가교가 더 잘 되어 팽윤도가 감소하는 경향을 보였다.

생성된 고분자의 생체 내에서 분해 능력을 살펴보기 위해 생체와 유사한 조건하에서 생분해성을 살펴보았다. 폴리락티드의 분자쇄 절단은 에스테르기의 가수분해에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다[23]. 가수분해 반응은 고분자의 분자량, pH, 완충용액의 농도 등에 의해 영향을 받으므로 동일한 조건에서 실험하는 것이 중요하다. Fig. 6에서 동일한 분자량의 HA로부터 가교된 고분자를 phosphate buffer saline 용액에 침전시킨 후 37°C, pH 7.4에서 시간에 따른 분해거동을 살펴보았다. 시간이 지남에 따라 모든 종류의 고분자가 분해하였으며 HA의 몰 비가 커 HA가 많이 첨가된 고분자일수록 분해정도가 커짐을 보였다. 즉 HA의 몰비를 조절함으로써 인체 내에서 분해 속도를 마음대로 조절할 수 있는 가능성을 보였다.

#### 4. 결론

냉동 건조법을 이용하여 히아루론산과 젯산 혹은 락타이드 수용액을 가교제 EDC로 가교시켜 불용성 박막을 제조하였다. 생성된 고분자 박막을 IR로 분석한 결과 에스테르 결합이 생성됨을 확인하였고, NMR로 분석하여 이 에스테르 결합이 젯산의 반응 참여에 의한 것임을 확인하였다. 히아루론산과 젯산의 몰비를

증가시키면서 가교시킨 결과 젯산의 전화율(6~32%)과 가교도(4~19%)는 증가하였으나 반응에 참여한 젯산이 가교되는 선택도는 몰비에 관계없이 일정한 값(62%)을 나타내었다. 또 몰비가 증가할수록 젯산이 많이 첨가되어 취성이 강해짐을 보였으며, 팽윤도는 증가하다 감소하였다. 생분해 조절능력을 살펴본 결과 몰비가 커 젯산이 많이 첨가된 고분자일수록 빨리 분해되어 몰비를 조절함으로써 인체 내에서 분해 속도를 조절할 수 있는 가능성을 보였다.

#### 감사

본 연구는 2004년 산업자원부의 지역전략산업 석박사 연구인력 양성사업의 연구결과로 수행되었음.

#### 참고 문헌

1. Y. Tokita and A. Pkamoto, "Degradation of hyaluronic acid-Kinetic study and thermodynamics", *Eur. Polym. J.*, **32**(8), 1011~1014 (1996).
2. S. P. Zhong, D. Campoccia, P. J. Doherty, R. L. Willians, L. Benedetti, and D. F. Williams, "Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase", *Biomaterials*, **15**, 359~368 (1994)
3. G. D. Prestwitch, D. M. Marecak, and J. F. Marecek, "Controlled chemical modification of hyaluronin acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives", *J. Control. Rel.*, **53**, 93~103 (1998).
4. 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).
5. 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-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking", *Biomaterials*, **22**, 1205~1212 (2002).
6. 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).

7. 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).
8. P. A. Delco, M. Stefanetti, D. Pressato, S. Piana, M. Dona, and A. Pavesio, "A novel hyaluronan-based gel in laparoscopic adhesion prevention: preclinical evaluation in an animal model", *Fertil. Steril.*, **69**, 318~323 (1998).
9. J. A. Hunt, H. N. Joshi, V. J. Stella, and E. M. Topp, "Diffusion and drug release in polymer films prepared from ester derivatives of hyaluronic acid", *J. Control. Rel.*, **12**, 159~169 (1990).
10. L. Benedetti, R. Cortivo, T. Berti, A. Berti, F. Pea, M. Marzzo, M. Moras, and G. Abatangel, "Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats", *Biomaterials*, **14**, 1154~1160 (1993).
11. J. Aigner, J. Tegeler, P. Hutzler, D. Campoccia, A. Pavesio, C. Hammer, E. Kastenbauer, and A. Naumann, "Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester", *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 172~181 (1998).
12. G. P. Chen, Y. Ito, Y. Imanishi, A. Magnani, S. Lamponi, and R. Barbucci, "Photoimmobilization of sulfated hyaluronic acid for antithrombogenicity", *Bioconjugate Chem.*, **8**, 730~734 (1997).
13. N. E. Larsen, E. A. Leshchiner, E. G. Parent, and E. A. Balazs, *Cosmetic and Pharmaceutical Applications of Polymer*; C. G. Gebelein, Ed., pp. 147~157, Plenum Press, New York (1991).
14. J. W. Burns, L. Burgess, K. Skinner, M. J. Colt, R. Rose, and M. P. Diamond, "A hyaluronate based gel for the prevention of postsurgical adhesions: evaluation in two animal species", *Fertil. Steril.*, **66**, 814~821 (1996).
15. 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).
16. C. Grandfils, P. Flandroy, and R. Jerome, "Control of the biodegradation rate of poly(DL-lactide) microparticles intended as chemoembolization materials", *J. Control. Rel.*, **38**, 109~122 (1996).
17. 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).
18. S. Li, M. Tenon, H. Garreau, Christian Braud, and Michel Vert, "Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, D,L- and meso-lactides", *Polym. Degradation and Stability*, **67**, 85~90 (2000).
19. E. Milella, E. Brescia, C. Massaro, P. A. Ramires, M. R. Miglietta, V. Fiori, and P. Aversa, "Physicochemical properties and degradability of nonwoven hyaluronan benzylic esters as tissue engineering scaffolds", *Biomaterials*, **23**, 1053~1063 (2002).
20. 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).