

가교된 히아루론산 막의 분해 특성

조 구 현 · 정 성 일[†]

한남대학교 나노생명화학공학과
(2009년 12월 3일 접수, 2009년 12월 22일 수정, 2009년 12월 22일 채택)

Degradation Characteristics of Cross-linked Hyaluronic Acid Membrane

Gu Hyun Cho and Seong Ihl Cheong[†]

Department of Chemical Engineering and Nano-Bio Technology, Hannam University, 461-6 Jeonmin-dong,
Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

(Received December 3, 2009, Revised December 22, 2009, Accepted December 22, 2009)

요 약: 조직 공학용 지지체로 사용할 목적으로 제조된 가교된 lactide/hyaluronic acid (LA/HA) 막의 분해 특성을 살펴보았다. 가교제 1,3-butadiene diepoxide (BD), 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC)를 사용하여 얻어진 고분자 막을 37°C로 조절된 항온조에서 증류수에 침전시켜 분해시켰다. 가교반응시 LA/HA 몰비가 작을수록, 가교제의 농도가 작을수록 생성된 고분자 막의 분해속도가 증가하였다. 분해될 때 막의 구조 변화를 살펴보기 위해 분해 전, 3일, 6일, 9일 후의 시료를 채취하여 핵자기 공명 분광법으로 분자 구조를 살펴보았다. EDC로 가교시킨 막의 경우 시간이 지남에 따라 HA-EDC 결합구조는 서서히 분해되는데 HA-LA 결합구조는 급격히 분해되어 6일 후에는 완전히 소멸되었다. BD로 가교시킨 막의 경우 가교된 결합 구조 모두 서서히 분해되었으며 3일, 6일이 지나면서 HA-BD 결합 구조는 원래의 89, 83%가 유지되었으나 HA-LA 결합 구조는 원래의 83, 65%로 유지되었다. 분해된 막을 전자 현미경으로 측정된 결과 분해 전후 표면에서 기공의 밀도는 크게 차이 나지 않았으며, 표면과 측면의 구조도 크게 차이가 나지 않아 조직공학용 재료로서 사용할 때 아무런 문제가 없는 것으로 관찰되었다.

Abstract: The degradation characteristics of cross-linked lactide/hyaluronic acid (LA/HA) membranes were investigated for purpose of applying to tissue engineering. The lactide/hyaluronic acid cross-linked with 1,3-butadiene diepoxide (BD) and 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) was degraded in deionized water in water bath at 37°C. As the LA/HA mole ratio or crosslinking agent concentration decreased, the degradation rate of the crosslinked membranes increased. In order to investigate the structure change of the membrane in the degradation process, the control sample and 3, 6, 9 days-degraded samples were analysed by the nuclear magnetic resonance spectroscopy. In case of the membranes crosslinked with EDC, the HA-EDC bonding structure was degraded slowly whereas the HA-LA bonding structure was degraded quickly and disappeared completely after 6 days. In case of the membranes crosslinked with BD, all the cross-linked bonding structure degraded slowly. The HA-BD bonding structure maintained its original state about 89, 83% in case of 3, 6 days-degraded samples respectively whereas the HA-LA bonding structure maintained its original state about 83, 65%. The scanning electron microscopy of the degraded membranes showed that the pore density in the surface, and the structure in the surface and cross section, of the before and after-degradation membranes did not change greatly, so the membranes was shown to be applied to materials for tissue engineering.

Keywords: hyaluronic acid, lactide, crosslinking, degradation, tissue engineering

1. 서 론

양질의 삶에 대한 욕구와 고령화 시대의 도래로 조직

및 장기의 손상을 효과적으로 치료할 수 있는 방법에 대한 필요성이 절실히 요구되었다. 이러한 요구에 부응하여 천연 및 인공 물질로 생체에 적합한 재료를 만들려는 노력이 활발히 전개되고 있다. 히아루론산(hyalu-

[†]주저자(e-mail : suho@hnu.kr)

ronic acid, HA)은 조직 내에 존재하는 천연고분자로서 생체 적합성이 뛰어나 이를 물리 화학적으로 개조하여 조직공학용 재료로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[1-9]. 조직 공학용 재료로 사용되기 위해서는 생분해성과 인체에 대한 비독성, 다공성이 풍부한 3차원적인 구조, 낮은 면역 반응성, 안정된 구조를 유지하기 충분한 기계적 강도 등의 물성이 요구된다[10]. 이러한 특성 중에서 다양한 분해성과 기계적 화학적 특성을 가진 생분해성 고분자가 지지체의 재료로서 주목을 받고 있다. 지지체로 사용되기 위해서는 세포나 조직이 고정될 수 있어야 할 뿐 아니라 충분히 성장할 수 있도록 영양분이 제공될 수 있어야 하며, 조직이 완전히 형성되었을 때 분해되어 소멸되어야 한다. 따라서 생체적합성과 생분해성이 동시에 제공되어야 하며 세포와 조직의 종류에 따라 지지체의 물성을 조절할 수 있어야 한다. 이러한 지지체는 다양한 형태로 개발되어 왔는데, 대표적인 형태로는 높은 표면적을 제공할 수 있는 다공성 구조를 갖는 3차원적 지지체, 인체 조직에서 세포가 성장하는 세포외지질의 3차원적인 나노구조와 유사한 나노섬유 구조의 지지체, 다량의 수분을 포함한 망상구조의 하이드로젤 등을 들 수 있다[10].

본 실험실에서는 히아루론산을 가교시켜 생체적합성이 우수할 뿐 아니라 생체 내에서 분해속도를 조절할 수 있는 생체 적합성 고분자를 합성하는 연구를 계속하여 왔다[11-17]. 특히 조직 공학용 지지체로서 사용할 목적으로 가교제 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide (EDC) 혹은 1,3-butadiene diepoxide (BD) 등을 사용하여 락타이드와 히아루론산을 가교시켜 다공성 구조를 갖는 막을 제조하였다. 제조된 막의 물성을 조절하기 위하여 여러 가지 반응 조건을 변화시키면서 막의 물성과 독성을 측정하였다. 독성을 보기 위해서는 적용하고자 하는 조직을 구성하는 세포를 사용하여 독성을 살펴보는 것이 바람직하나 일차적으로 동물세포의 성장에서 나타나는 유사한 구조의 섬유아세포를 사용하여 독성을 최소로 하는 반응 조건을 탐색하였다[15]. 이렇게 제조된 막은 세포가 부착하여 성장할 수 있는 충분한 기계적 강도를 가지며 적당한 팽윤성을 가지고 있어 세포의 성장에 필요한 영양분을 계속 공급할 수 있었다. 한편 본 실험실에서는 제조된 막의 가교 구조에 따라 막의 물성이 차이가 있을 뿐 아니라 분해 특성이 크게 다른 것을 관찰하였다. 이에 대한 보다 정량적이고 구체적인 막의 반응 조건에 따른 가교 구조의 차이, 분

해 특성의 차이 등을 관찰함으로써 막의 분해특성을 조절할 수 있는 방법을 규명하여 적용 목적에 적절한 지지체를 손쉽게 제공할 수 있을 것으로 판단되었다.

본 연구에서는 냉동건조법으로 제조된 다공성 지지체의 분해 특성을 규명하려고 하였다. 가교 조건을 변화시키면서 생성된 막을 증류수에 침전시켜 37°C로 조절된 항온조에서 생분해성을 측정하였다. 막의 분해 구조를 확인하기 위하여 핵자기 공명분광분석기(NMR)로 분석하였으며 이를 이용하여 분해구조를 추정하였다. 또 막의 3차원적인 구조를 살펴보기 위해 전자현미경(SEM)을 이용하여 지지체의 표면과 측면의 구조를 살펴보았다.

2. 실험

2.1. 실험재료

히아루론산 고분자는 평균분자량 2×10^6 Da인 Full-longchem Corp.사(Changzhou, China)의 의약품 제품을 사용하였다. EDC, 락타이드는 Sigma Aldrich (Korea)에서, BD는 Wako Chemical (Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 막의 제조

1 wt% 히아루론산을 녹인 후 히아루론산 반복단위 기준으로 락타이드를 8~20몰비로 첨가하여 상온에서 4시간 교반하였다. 히아루론산과 락타이드의 혼합용액에 캐스팅 판에 부어 Gardner 칼을 이용하여 균일한 두께로 캐스팅한 후 -80°C에서 2시간 동결시켰다. 이것을 꺼내 -80°C에서 24시간 동결 건조시켰다. 건조된 막은 에탄올에 대한 가교제의 비율을 5~15 wt%로 섞은 혼합액에 담가 가교제가 막 속으로 충분히 잠긴 상태로 48시간 자석 젓개로 교반시키면서 가교시켰다. 가교 후 막은 증류수로 세척하여 잔류 가교제와 미반응 락타이드를 완전히 제거한 후 건조기에서 건조시켰다.

2.3. 물성연구

2.3.1. 기기분석

제조된 막의 가교됨을 확인하기 위해 NMR을 사용하여 관능기를 확인하였고 이를 기초로 락타이드 반응도와 가교제 BD의 반응도를 결정하였다. NMR은 D₂SO₄를 용매로 하여 Bruker AMX 500 MHz (Karlsruhe, Germany)로 측정하였다. 시료를 백금코팅하여 전자현미경 S-3000N (Hitach High-Technologies, Japan)으로

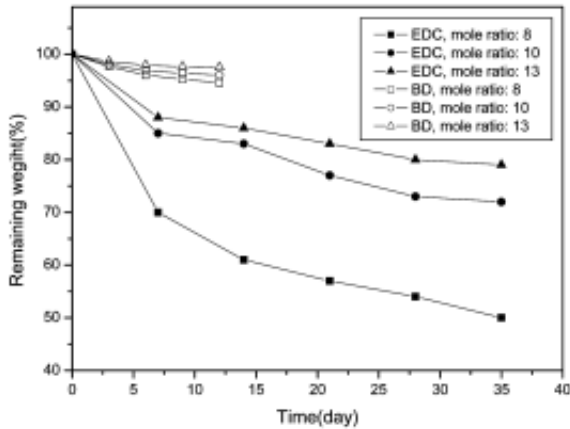


Fig. 1. Degradation profiles of HA membranes crosslinked at different mole ratio of lactide to HA.

막의 표면 및 측면의 형상학적 구조를 관찰하였다.

2.3.2. 막의 생분해성

제조된 막을 다른 효소 없이 증류수에 침전시킨 후 37°C에서 분해가 얼마나 이루어지는지 살펴보았다. 시료는 일정한 크기로 잘라 50 ml 병에 넣어 37°C로 조절된 항온조에서 가수분해 시키면서 정해진 시간에 채취한 시료를 25°C 건조기에서 48시간 건조한 후 시료의 무게를 재어 분해정도를 측정하였다. 동일한 조건에서 3회 반복하여 평균값을 취하였다.

3. 결과 및 고찰

본 실험의 목적이 분해 성능을 조절할 수 있는 조직 공학용 매트릭스의 개발에 있으므로 막의 분해 특성을 이해하는 것이 중요하다. 막의 분해는 락타이드와 히아루론산의 가교에 의해 생성된 에스테르기 혹은 가교제와 히아루론산의 결합이 분해되면서 진행된다[17]. 본 실험실에서 분해 특성을 살펴본 결과 결합된 구조의 차이에 따라 분해속도가 다르다는 사실을 관찰하였다. 이는 분해 속도를 조절하는 데 중요한 단서를 제공할 수 있다고 판단되어 이에 대하여 보다 자세히 관찰, 분석하려고 하였다.

두 종류의 가교제를 사용하여 고분자 막을 제조하여 각각의 막에 대하여 분해 속도를 관찰하였고 서로 비교하였다. Fig. 1은 가교제 EDC와 BD를 사용하여 LA/HA 몰비가 8~13일 때 가교시켜 얻은 고분자 막을 37°C의 증류수에 침전시켜 분해속도를 관찰한 그래프

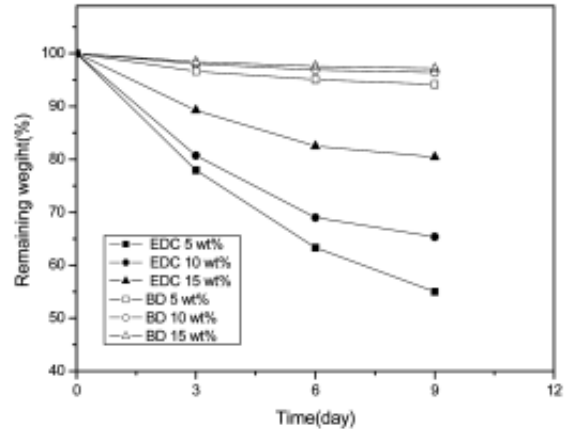


Fig. 2. Degradation profiles of HA membranes crosslinked at different crosslinking agent concentration.

이다. 가교제의 종류에 상관없이 몰비가 작을수록 분해속도가 증가하였다. NMR 분석 자료에 의하면 몰비가 작을수록 가교도가 떨어지는데[13,16,17] 이로 인하여 3차원적인 구조가 덜 발달하여 분해가 빨리 진행되는 것으로 보인다. 또 동일한 몰비일 때 가교제로 BD를 사용할 경우 EDC를 사용할 때보다 분해속도가 느린 경향을 나타내었다. 히아루론산과 BD와의 반응의 경우 2분자의 히아루론산이 한 분자의 BD 양쪽으로 연결되어 가교된 구조의 에텔기가 생성되고 에텔기의 양쪽으로 히아루론산 한 분자씩 연결되어 3차원적인 분자구조가 발달되게 된다. 이에 비하여 히아루론산과 EDC의 결합의 경우 히아루론산과 EDC가 히아루론산의 가지에 있는 하이드록시기에 결합하여 거대한 히아루론산의 말단에 조그만 분자의 가교제가 연결된 분자구조로 3차원적인 분자구조의 발달에 크게 기여하지 못한다. 이러한 분자구조의 차이로 가교제 BD를 사용할 경우 EDC를 사용할 경우보다 3차원적인 분자구조가 더 발달하여 분해속도가 느린 것으로 보인다.

Fig. 2는 가교제 EDC와 BD를 사용하여 가교제의 농도를 5~15 wt%로 변화시키면서 가교시켜 얻은 고분자 막을 37°C의 증류수에 침전시켜 분해속도를 관찰한 그래프이다. 가교제의 농도가 클수록 가교가 많이 진행되어 3차원적인 구조가 발달하면[13,16,17] 분해속도가 느려질 것으로 예측할 수 있다. 예상한 바와 같이 가교제의 종류에 관계없이 가교제의 농도가 클수록 분해속도가 느렸다. 동일한 가교제 농도일 때 가교제 BD를 사용할 경우 EDC를 사용할 때 보다 분해속도가 매우 느린 경향을 나타내었다. Figs. 1과 2에서 보는 바와 같이 같

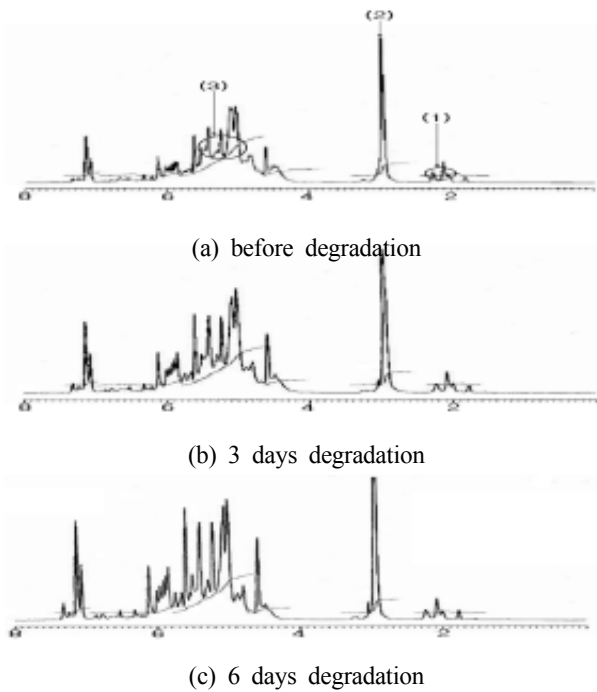


Fig. 3. ¹H-NMR spectra of control (a) and 3(b), 6(c) days-degraded, BD crosslinked membranes with methyl group (1) connected to ester group, (2) connected to amide group of HA, (3) and methylene group connected to BD.

은 LA/HA 고분자 막일지라도 BD로 가교된 막이 EDC로 가교된 막에 비해 분해속도가 매우 느린 것으로 관찰되었으며, 제조된 막을 조직공학용 지지체에 사용할 경우 적용 목적에 맞게 분해속도가 조절된 막을 제조하여 적용할 수 있을 것이다.

가교제 BD와 EDC로 가교된 막의 분해 특성을 구체적으로 살펴보기 위해 각각의 가교제로 만든 고분자막을 시간에 따라 분해시키면서 정해진 시간에서 채취한 샘플을 NMR로 측정하여 분자구조의 변화 과정을 살펴보았다. Fig. 3에서는 BD로 가교된 고분자막이 분해 전, 3일, 6일, 9일 분해 후에 측정된 NMR 분석자료를 보였

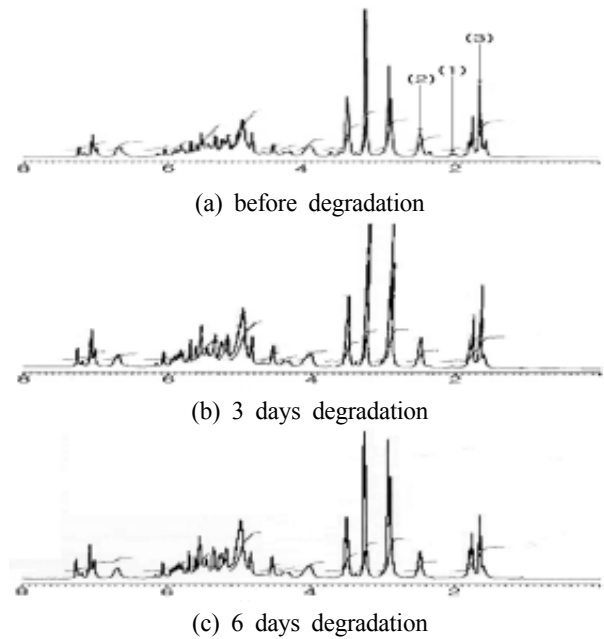


Fig. 4. ¹H-NMR spectra of control (a) and 3(b), 6(c) days-degraded, EDC crosslinked membranes with methyl group (1) connected to ester group, (2) connected to amide group of HA, (3) and methylene group connected to EDC.

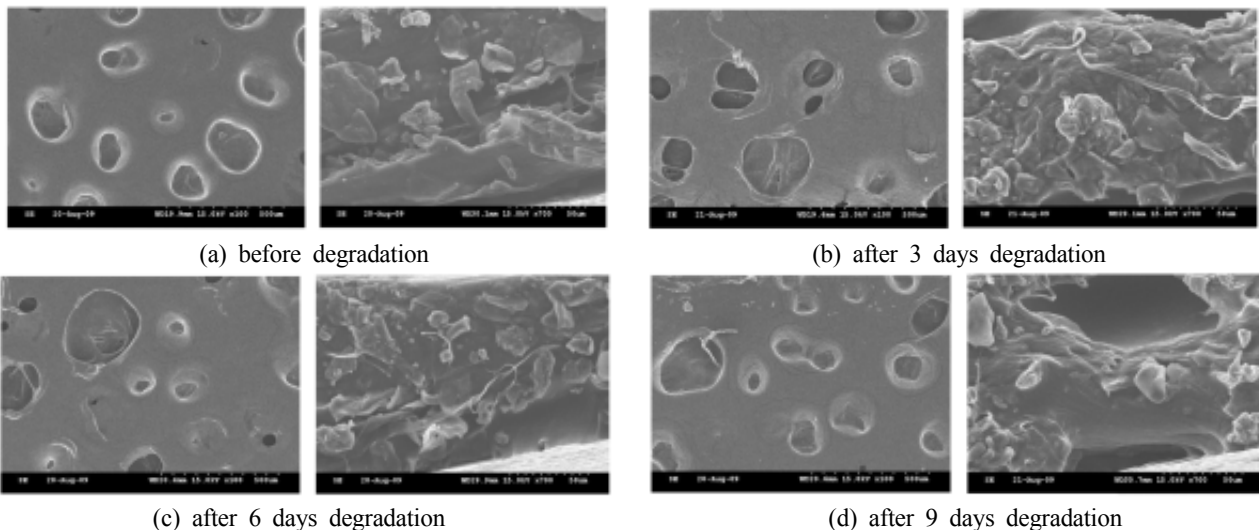
다. 가교된 고분자 막의 구조를 살펴보면 BD와 HA의 결합, LA와 HA의 결합에 의해 3차원적인 구조가 생성된다. 이미 발표한 논문에서와 같이[13,16,17] 1.9~2.1, 2.8, 4.5~5.5 ppm에서의 피크를 각각 LA, HA, BD로 보고, 2.8 ppm 피크의 면적에 대한 1.9~2.1 ppm의 피크의 면적, 2.8 ppm 피크에 대한 4.5~5.5 ppm 피크의 면적에 대한 비를 각각 LA 반응도, BD 반응도로 간주하였다. NMR 분석 자료로부터 얻어진 면적을 이용하여 이의 반응도를 계산하여 Table 1에 보였다. 가교로 생성된 BD, LA 피크가 서서히 줄어들었으며 BD 반응도, LA 반응도 역시 시간이 지남에 따라 서서히 감소하는 모습을 보였다. 3일, 6일이 지나면서 BD 반응도가 3.24에서 2.88, 2.78로 줄어들어 HA와 BD로 결합된 구

Table 1. Methyl and Methylene Group Concentration Measured by ¹H-NMR in the Membranes Crosslinked with BD and Reactivities Calculated from the Data

Time (days)	1.9~2.1 ppm (a)	2.8 ppm (b)	4.5~5.5 ppm (c)	Degree of lactide reaction (a/c)	Degree of BD reaction (b/c)
control	8.07	35.88	116.18	0.23	3.24
3	5.04	26.86	77.35	0.19	2.88
6	4.71	31.80	88.31	0.15	2.78
9	6.15	42.03	113.65	0.15	2.70

Table 2. Methyl and Methylene Group Concentration Measured by $^1\text{H-NMR}$ in the Membranes Crosslinked with EDC and Reactivities Calculated from the Data

Time (days)	1.6~1.8 ppm (a)	2.1 ppm (b)	2.5 ppm (c)	Degree of lactide reaction (a/c)	Degree of EDC reaction (b/c)
control	3.0	0.2354	1.4055	0.17	2.13
3	3.0	0.1182	1.3357	0.09	2.25
6	3.0	0	1.2843	0	2.34
9	3.0	0	1.164	0	2.58

**Fig. 5.** SEM images of surface and cross section of control (a) and 3(b), 6(c), 9(d) days-degraded membranes; left side: surface; right side: cross section.

조는 원래의 89, 83%가 유지되었으나 LA반응도는 0.23에서 0.19, 0.15로 줄어들어 HA와 LA로 결합된 구조는 원래의 83, 65%로 유지되었으며 이로부터 HA와 LA로 결합된 구조가 HA와 BD로 결합된 구조에 비하여 빨리 분해됨을 알 수 있었다.

Fig. 4에서는 EDC로 가교된 고분자 막이 분해할 때 분해 전, 3일, 6일 분해 후에 측정한 NMR 분석자료를 보였다. 1.6~1.8, 2.1, 2.5 ppm에서의 피크를 각각 EDC, LA, HA로 보고, 위에서와 동일한 방법으로 2.5 ppm 피크에 대한 1.6~1.8 ppm 피크의 면적비, 2.5 ppm 피크에 대한 2.1 ppm 피크의 면적비를 각각 EDC 반응도, LA 반응도로 간주하였고 이 면적으로부터 계산된 반응도를 Table 2에 보였다. 시간이 지남에 따라 1.6~1.8, 2.1 ppm에서의 피크가 줄어들고 있어 가교 반응에 의해 생성된 구조들이 분해됨을 보여주고 있다. HA와 EDC와의 결합에 의한 피크는 서서히 줄어들는데 비해 HA와 LA와의 결합에 의한 피크는 급격히 감소하였

고 6일 후에는 완전히 소멸되었다. 이로써 HA와 EDC와의 결합 구조보다 HA와 LA와의 결합 구조가 훨씬 빨리 분해됨을 알 수 있었다. Table 2에 의하면 EDC 반응도는 오히려 증가하는 모습을 보이는데 여기서 EDC 반응도가 증가하는 것처럼 보이는 이유는 시간이 지남에 따라 히아루론산도 서서히 분해되는데 비해서 EDC와 HA가 결합하여 생성된 구조는 거의 분해되지 않아 나타나는 현상으로 보인다.

제조된 막이 조직공학용 지지체로 사용되기 위해서는 지지체가 분해되면서 3차원 적인 구조를 유지하고 있어야 지지체의 공간을 통하여 세포가 성장하는 데 필요한 영양분이 원활히 공급되어 막에서 세포나 조직이 성장할 수 있다. 분해된 막의 구조가 3차원적인 구조를 유지하는 지를 살펴보기 위하여 분해정도가 더 빨리 진행되는 EDC로 제조된 막의 분해 전, 3일, 6일, 9일 분해 후에 채취한 막의 표면과 측면을 전자현미경으로 측정한 사진을 Fig. 5에 보였다. 분해 전후의 표면에서 기공의

밀도는 크게 차이하지 않았으며, 표면과 측면의 구조에서도 크게 차이가 나지 않았다. 시간이 지남에 따라 막이 분해되기는 하더라도 구조자체가 함몰되어 주저앉는 구조의 붕괴현상은 나타나지 않았다. 시간이 지나면 비록 막이 분해되어 소멸되는 부분이 있어도 이웃한 분자들이 빈 공간을 채워 3차원적인 구조는 그대로 유지되는 것으로 보인다. 이로써 가교된 고분자 막이 분해되어도 3차원 적인 구조에서의 큰 차이가 없어 조직공학용 재료로써 사용할 때 아무런 문제가 없는 것으로 관찰되었다.

4. 결 론

가교제 EDC와 BD로 가교시켜 얻은 막을 증류수에 침전시켜 37°C로 조절된 항온조에서 분해시켰다. 고분자 막을 가교시킬 때 가교제의 종류에 관계없이 LA/HA 몰비가 작을수록, 가교제의 농도가 작을수록 고분자 막의 분해속도가 증가하였다. 분해시 시간에 따라 채취한 막을 NMR로 분석하여 락타이드와 BD 반응도를 추정하여 가교된 막의 분해 상태를 분석하였다. BD로 가교시킨 막의 경우 서서히 분해되었으며 3일, 6일이 지나면서 HA와 BD의 결합 구조는 원래의 89, 83%가 유지되었으나 HA와 LA의 결합 구조는 원래의 83, 65%로 유지되었다. EDC로 가교시킨 막의 경우 HA와 EDC와의 결합구조는 서서히 분해되는데 HA와 LA와의 결합구조는 급격히 감소하여 6일 후에는 완전히 소멸되었다. 막의 형상적인 구조변화를 보기 위해 전자 현미경으로 측정된 결과 분해 전후의 표면에서 기공의 밀도는 크게 차이하지 않았으며, 표면과 측면의 구조에서도 크게 차이가 나지 않아 조직공학용 지지체로 사용될 수 있을 것으로 기대되었다.

감 사

이 논문은 2009년 한남대학교 교비 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

1. 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 (1997).
2. 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 (1998).
3. G. D. Prestwich, 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 (1998).
4. T. Coviello, M. Dentimi, G. Rambone, M. Carafa, and F. Alhaique, "A novel co-crosslinked polysaccharide: studies for a controlled delivery matrix," *J. Controlled Rel.*, **55**, 57 (1998).
5. 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*, **25(4)**, 476 (2001).
6. 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-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide cross-linking," *Biomaterials*, **22**, 1205 (2002).
7. 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 (2003).
8. N. J. Turner, C. M. Kielty, M. G. Walker, and A. E. Canfield, "A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts," *Biomaterials*, **25**, 5955 (2004).
9. A. Maleki, A. Kjøniksen, and B. Nystrom, "Characterization of the chemical degradation of hyaluronic acid during gelation in the presence of different cross-linker agents," *Carbohydr. Res.*, **342**, 2776 (2007).
10. S. H. Kim, S. H. Kim, Y. M. Shin, and H. S. Shin, *Polymer science and technology*, **18(5)**, 450 (2008).

11. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, "Characterization of hyaluronic acid membrane containing lactic acid," *Membrane Journal*, **5(1)**, 8 (2005).
12. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, "Synthesis and characterization of hyaluronic acid bead crosslinked by 1,3-butadiene diepoxide," *Polymer*, **29(5)**, 445 (2005).
13. J. Y. Kwon and S. I. Cheong, "Characterization of hyaluronic acid membrane crosslinked with lactide," *Polymer*, **29(6)**, 599 (2005).
14. M. S. Kim, J. Y. Kwon, and S. I. Cheong, "Synthesis of lactide/hyaluronic acid polymer membrane for the application of drug delivery system," *Membrane Journal*, **15(4)**, 281 (2005).
15. W. J. Kim, J. Y. Kwon, S. I. Cheong, and I. S. Kim, "Cytotoxicity of hyaluronic acid membrane crosslinked with lactide," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21(4)**, 255 (2006).
16. G. S. Han, J. E. Bae, I. S. Kim, and S. I. Cheong, "Synthesis of lactide/hyaluronic acid polymer membrane for the application of drug delivery system," *Membrane Journal*, **18(2)**, 124 (2008).
17. G. S. Han, J. E. Bae, I. S. Kim, and S. I. Cheong, "Application of hyaluronic acid membrane crosslinked with 1,3-butadiene diepoxide," *Polymer*, **32(4)**, 390 (2008).