

Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-dimethylamino ethyl methacrylate)가 고정화된 알지네이트 비드 제조 및 방출 특성

강미경 · 김진철[†]

강원대학교 생명공학부 생물소재공학전공

(2009년 10월 6일 접수, 2009년 11월 2일 수정, 2009년 11월 5일 채택)

Preparation and Release Property of Alginate Beads Immobilizing Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-dimethylamino ethyl methacrylate)

Mi Kyoung Kang and Jin-Chul Kim[†]

School of Biotechnology & Bioengineering and Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, 192-1, Hyoja 2 dong, Chunchon, Gangwon-do 200-701, Korea

(Received October 6, 2009; Revised November 2, 2009; Accepted November 5, 2009)

초록: Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-dimethylamino ethyl methacrylate) (P(NIPAM-*co*-DMAEMA))가 고정화된 알지네이트 비드를 제조하였다. 알지네이트와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)의 정전기적 인력을 이용하여 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)로 코팅된 알지네이트 비드와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 함유한 알지네이트 비드를 제조하였다. P(NIPAM-*co*-DMAEMA)은 자유 라디칼 반응으로 제조하였고 핵자기 공명분광기를 통해 확인하였다. 비드의 온도 민감성 방출 거동을 관찰하였으며, 모델시약으로 blue dextran과 fluorescein isothiocyanate-dextran을 사용하였다. P(NIPAM-*co*-DMAEMA)가 고정화된 알지네이트 비드로부터의 방출 정도는 온도 의존성이 낮았고, 방출모델시약의 분자량이 작을수록 더 높았다.

Abstract: Alginate beads were prepared using poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-dimethylamino ethyl methacrylate) (P(NIPAM-*co*-DMAEMA)). First, P(NIPAM-*co*-DMAEMA) was immobilized on the surface of alginate beads by taking advantage of electrostatic interaction between alginate and P(NIPAM-*co*-DMAEMA). Second, P(NIPAM-*co*-DMAEMA) was contained in the matrix of alginate beads. P(NIPAM-*co*-DMAEMA) were prepared by a free radical polymerization at 74 °C for 12 h. The weight ratio of NIPAM to DMAEMA monomer was 95/5. The copolymer was identified by ¹H-NMR. Releases from the alginate beads were observed at 30, 37, and 45 °C using blue dextran or FITC-dextran (fluorescein isothiocyanate-dextran) as a model drug. The effect of temperature on the degree of release from the beads was insignificant. FITC-dextran was released more than blue dextran possibly due to its smaller molecular weight.

Keywords: alginate beads, *N*-isopropylacrylamide, dimethylamino ethyl methacrylate, release property.

서 론

알지네이트(alginate)는 갈조류와 해조류의 세포벽의 주요 구성성분으로 존재하는 다당류(polysaccharide)이다.^{1,2} 우수한 생체적합성과 생분해성 및 다양한 물성을 가지고 있어 의약품, 화장품, 식품 등의 첨가제로 광범위하게 이용되고 있다. 알지네이트는 β-D-만누론산(mannuronic acid)과 α-L-글루론산(guluronic acid)으로 구성되어 있다.^{3,4} 알지네이트 용액에 칼슘 이온(Ca²⁺)과 같은 다가 이온(multivalent ion)을 넣어 주면 알지네이트에 존재하는 카르복실기와 정전기적 인력(electrostatic interaction)이 발생하여 겔(gel)을 형성

한다.^{5,6} 약물의 부작용을 최소화하고 안정성과 흡수율을 향상시켜 약물발현을 최적화하고 치료효과를 극대화하고자 하는 목적으로 약물전달체에 관한 연구가 집중되고 있는데, 알지네이트 비드는 자극 민감성 약물 전달체의 유효한 수단이 될 있다. 예를 들면, poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)을 알지네이트에 중합시켜서, PNIPAM이 고정화된 알지네이트 비드를 제조하여 온도민감성을 보였다.⁷ PNIPAM은 하한 임계 용액 온도(LCST, lower critical solution temperature) 거동을 나타내는 대표적인 고분자이다. 하한 임계 용액 온도 이하에서는 높은 용해도와 팽윤성을 나타내다가 하한 임계 용액 온도 이상에서는 낮은 용해도와 상분리가 나타나는 특징을 가지고 있다.⁸⁻¹³ PNIPAM이 중합된 알지네이트 비드에서 PNIPAM은 비드 기공의 밸브 역할을 하게 된다. 따라서, 하한 임계 용액 온도 이하에서는

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jinkim@kangwon.ac.kr

PNIPAM이 팽윤되어 기공을 막게 되어 방출이 억제된다. 또 다른 예로는 알지네이트 비드 내부에 PNIPAM을 함유하고 있고, 알지네이트의 카르복실기와 키토산의 아민기의 정전기적 인력을 이용하여 비드를 키토산으로 코팅하여 pH와 온도 민감성 거동을 보였다.¹⁴ 비드 이외에 PNIPAM의 열적 특성을 이용하여, PNIPAM을 온도 민감성 방출의 조절자로 이용한 리포솜,¹⁵⁻¹⁹ 큐빅상²⁰ 그리고 하이드로겔²¹ 대한 연구가 많이 수행되고 있다.

본 연구에서는 자유 라디칼 반응으로 poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-dimethylamino ethyl methacrylate) (P(NIPAM-*co*-DMAEMA))을 합성하여 온도 민감성 고분자를 얻었다. P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 이용하여 온도에 따른 방출거동을 보기 위해, P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 매트릭스에 함유한 알지네이트 비드와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 매트릭스에 코팅한 알지네이트 비드를 제조하였다. Blue dextran과 FITC-dextran을 모델시약으로 알지네이트 비드의 온도 민감성 방출거동을 수행하였다.

실 험

시약 및 재료. 알지네이트(sodium alginate), blue dextran(MW 300000), fluorescein isothiocyanate-dextran(FITC-dextran, MW 40000), 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate(DMAEMA)는 미국의 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 염화칼슘(calcium chloride)은 한국 대정화금(주)에서 구입하였다. *N*-isopropylacrylamide(NIPAM)는 일본 Tokyo Kasei Kogyo사에서 구입하였고, α,α' -azobis(isobutyronitrile) (AIBN)은 일본 Junsei Chemical사의 시약을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 시약들은 시약급(reagent grade) 이상의 것을 사용하였다.

P(NIPAM-*co*-DMAEMA)의 합성 및 특성. P(NIPAM-*co*-DMAEMA)는 자유 라디칼 반응을 이용하여 합성하였다.²² 3구 둥근 바닥 플라스크에 NIPAM(9.5 mmol), DMAEMA(0.5 mmol) 그리고 개시제인 AIBN(0.05 mmol)을 넣고 1,4-dioxane에 녹였다. 30분 교반한 후, 산소에 의한 반응 라디칼의 소모와 역 오염을 방지하기 위해 1시간 동안 질소가스를 주입하여 내부의 산소를 제거하였다. 74 °C에서 12시간 반응시킨 후(온도오차: ± 1 °C), 반응을 종료하고 얻어진 반응물을 디에틸에테르(diethyl ether)에 침전시켜 고분자를 분리하였고, 반응에 참가하지 않은 단량체를 제거하였다. 합성된 고분자를 40 °C 진공오븐에서 일주일 동안 건조하였다. 얻어진 고분자의 구조분석을 위해 P(NIPAM-*co*-DMAEMA) 100 mg을 1 mL의 CDCl₃에 녹여서 핵자기 공명분광기(NMR, Bruker Avance 600, 600 MHz)를 사용하였다.

P(NIPAM-*co*-DMAEMA)로 코팅된 알지네이트 비드 제조. 알지네이트(0.6%, w/v)와 모델시약을 증류수 50 mL(pH 5.0)에 완전히 용해시켰다. 모델시약으로 blue dextran 또는 FITC-dextran을 각각 0.2% (w/v), 0.02% (w/v)씩 녹여 사용하였다. 이 용액을 일회용 주사기를 사용하여 염화칼슘(1.1% w/v) 400 mL(pH 5.0)에 적하한 후 바로 비드를 분리하였다. 그리고 염화칼슘(1.1%, w/v)과 P(NIPAM-*co*-DMAEMA) (2.0%, w/v)가 녹아 있는 400 mL (pH 5.0)에 비드를 옮겨 자석 교반자(magnetic bar)로 30분 교반한 후, 비드를 분리하였다. 제조된 비드를 증류수로 두 번 세척한 후 건

조하지 않고 바로 방출 실험에 사용하였다.

P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 함유한 알지네이트 비드 제조. 알지네이트(0.6%, w/v)와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA) (2.4%, w/v) 그리고 모델시약을 증류수 50 mL(pH 5.0)에 완전히 용해시켰다. 모델시약으로 blue dextran 또는 FITC-dextran을 각각 0.2% (w/v), 0.02% (w/v)씩 녹여 모델시약의 분자량에 따른 방출량의 차이를 측정하고자 하였다. 이 용액을 일회용 주사기를 사용하여 1.1% (w/v) 염화칼슘 400 mL(pH 5.0)에 적하하였다. 자석 교반자로 30분 교반한 후 비드를 분리했다. 제조된 비드를 증류수로 두 번 세척한 후 건조하지 않고 바로 방출 실험에 사용하였다.

알지네이트 비드에서의 모델 시약 봉입량 측정. 알지네이트 비드를 적 하했던 용액(1.1% 염화칼슘 400 mL)을 자외선/가시광선 분광광도계(Jenway 6505, UK)를 이용하여 630 nm의 파장에서 흡광도를 측정 또는 형광 분광 광도계(HITACHI F-2500, Japan)를 이용하여 여기 파장(excitation wavelength)을 495 nm로 설정하여 520 nm (emission wavelength)에서 형광성을 측정한 후 검량선과 비교하여 비드 제조 시 빠져나간 양을 계산하였다.

$$\text{봉입효율(\%)} = \frac{[\text{초기 공급된 모델 시약의 양} - \text{비드 제조시 빠져나간 양}]}{\text{초기 공급된 모델 시약의 양}} \times 100$$

방출 특성 실험. 9.0 g의 건조하지 않은 비드를 각각 30, 37, 45 °C 인 90 mL의 2-(*N*-morpholino)-ethane sulfonic acid(MES) 완충 용액(pH 5.0)에 분산시킨 후, 자석 교반자를 이용하여 일정한 속도로 교반하면서 실험을 수행하였다. 일정 시간(30분, 1, 2, 4, 6시간)에서 1 mL의 완충용액을 취한 후 다시 같은 양만큼의 완충용액을 다시 넣어 보충하였다. Blue dextran의 방출량은 자외선/가시광선 분광광도계(Jenway 6505, UK)를 이용하여 630 nm의 파장에서 흡광도를 측정한 후 검량선으로부터 계산하였다. FITC-dextran의 방출량은 형광 분광 광도계(HITACHI F-2500, Japan)를 이용하여 여기 파장(excitation wavelength)을 495 nm로 설정하여 520 nm (emission wavelength)에서 형광성을 측정 후 검량선과 비교하여 결정하였다.

결과 및 토론

고분자 합성 및 구조 분석. NIPAM과 DMAEMA를 개시제 AIBN을 사용하여 74 °C에서 dioxane 용매 내에서 자유 라디칼 반응을 이용하여 공중합체시켰다. 합성된 공중합체는 NMR 스펙트럼을 분석하여 확인하였다.

Figure 1의 P(NIPAM-*co*-DMAEMA) 주요 피크를 관찰하면, NIPAM에 기인한 -CH-(CH₃)₂와 -NH-CH-가 각각 3.9, 1.1 ppm에서 나타나며, CH₂-CH-와 CH₂-CH- 피크가 각각 1.6, 2.1 ppm에서 나타난다. DMAEMA에 기인한 -N-(CH₃) 피크는 2.3 ppm에서 나타나며, -CH₂-CH₂-N-와 -CH₂-CH₂-N-의 피크는 각각 4.3, 3.5 ppm에서 나타난다. Zhang 등이²³ 보고한 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)의 핵자기 공명분광기 피크와 유사한 것을 알 수 있다.

알지네이트 비드 중에서의 모델 시약의 봉입효율. 알지네이트 비드

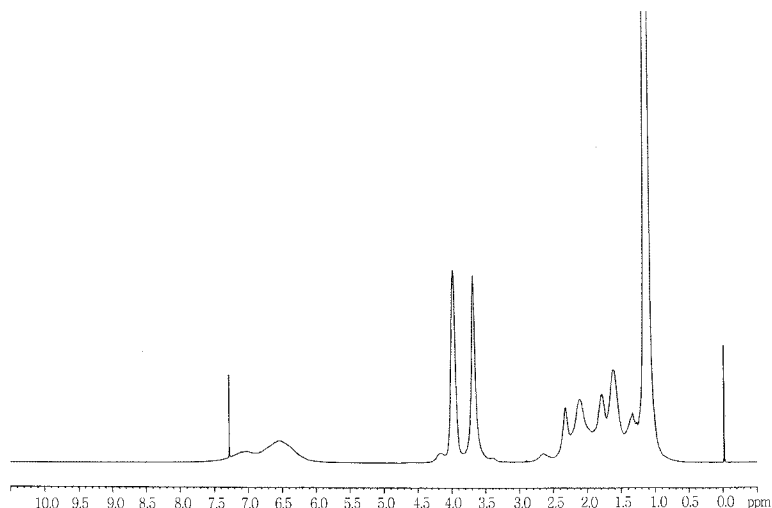


Figure 1. ¹H-NMR spectrum of synthesized P(NIPAM-*co*-DMAEMA).

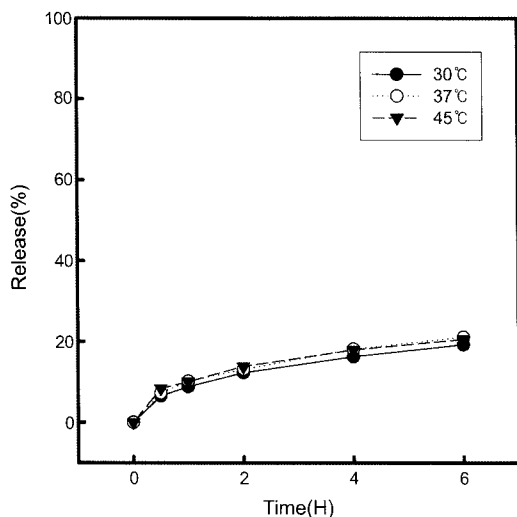


Figure 2. Release of blue-dextran from alginate beads coated with P(NIPAM-*co*-DMAEMA).

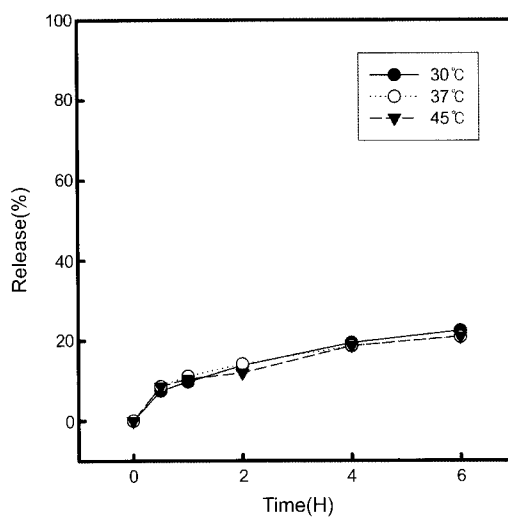


Figure 3. Release of blue-dextran from alginate beads containing P(NIPAM-*co*-DMAEMA).

가 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 함유하고 있을 때와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)로 코팅했을 때, blue dextran 봉입효율은 약 20% 정도로 나타났다. P(NIPAM-*co*-DMAEMA)이 없는 알지네이트 비드의 blue dextran 봉입효율은 약 18% 정도로 나타났다. 모델 시약이 FITC-dextran일 때, P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 함유한 비드와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)로 코팅된 비드와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)이 없는 알지네이트 비드 봉입효율은 약 15% 정도로 나타났다. Blue dextran을 모델 시약으로 하여 알지네이트 비드를 제조하였을 때 FITC-dextran을 사용하였을 때보다 봉입효율이 3~5% 높게 나타났다. 이는 blue dextran의 분자량이 FITC-dextran보다 커서 제조시 비드 외부로 빠져나가지 않기 때문이다.

알지네이트 비드로부터 Blue Dextran의 방출 거동. Figure 2는 30, 37, 45 °C에서 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)로 코팅된 알지네이트 비드의 blue dextran 방출 거동을 나타낸 것이다. 30 °C에서 알지네이트 비드는 1시간 동안 약 9% 방출을 보였고, 그 이후로 서서히 방출하여 6시간 동안 19%의 방출을 보였다. 37 °C에서 알지네이트

트 비드는 1시간 동안 10%의 blue dextran을 방출하였으며, 그 이후에는 방출량이 약간 증가하여 21%의 blue dextran을 방출하였다. 45 °C에서 알지네이트 비드의 blue dextran 방출량을 보면, 처음 1시간 동안은 10%로 나타났으며, 6시간 동안 약 20%로 나타났다. 6시간 경과 후 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)로 코팅된 알지네이트 비드의 blue dextran의 양은 30 °C에서 19%, 37 °C에서 21%, 그리고 45 °C에서는 20%로 나타났다. 반면에, P(NIPAM-*co*-DMAEMA)가 없는 알지네이트 비드의 방출량을 보면 30 °C와 37 °C, 그리고 45 °C에서 모두 25~28%로 나타났다(Figure 4).

본래 이 연구는 온도 민감성을 가지고 있는 PNIPAM을 이용하여 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)을 비드에 고정화하여 온도 민감성을 나타내는 알지네이트 비드를 만드는 것이었다.

NIPAM은 친수성 부분인 -CONH- 그룹과 소수성 부분인 -CH(CH₃)₂를 가지고 있다. 하한 임계 용액 온도 이하에서는 친수성 부분이 강한 수소 결합에 의해 물에 잘 녹지만, 하한 임계 용액 온도보다 높은 온도에서는 열에 의해 수소결합이 깨져서, 소수성 부분의 소

수성 인력이 커지게 되어 상분리가 일어나고 NIPAM이 수축하게 된다.²⁴ NIPAM에 DMAEMA를 합성하면, 소수성 부분이 줄어들고 친수성 부분이 늘어나면서 수소결합이 강해져서 하한 임계 용액 온도가 32 °C보다 높아졌을 것이라고 예상된다.

P(NIPAM-co-DMAEMA) 영향으로 30 °C에서는 P(NIPAM-co-DMAEMA)이 팽윤되어 있고 45 °C에서는 P(NIPAM-co-DMAEMA)이 수축할 것이라 예상하였다. 즉, 비드에서의 P(NIPAM-co-DMAEMA)의 성격이 나타나서 45 °C에서 blue dextran 방출량이 적어질 것이라 생각하였다.

P(NIPAM-co-DMAEMA)로 코팅된 알지네이트 비드 방출 결과를 보면, P(NIPAM-co-DMAEMA) 코팅한 알지네이트 비드의 blue dextran 방출량이 P(NIPAM-co-DMAEMA)이 없는 알지네이트 비드보다 낮게 나오므로써 알지네이트 비드가 P(NIPAM-co-DMAEMA)로 코팅되었다는 것을 간접적으로 알 수 있다. 이미 보고된 논문에 의하면,²⁵ 3차 아민을 갖고 있어 양전하를 띠는 DMAEMA가 중합된 dextran 미세구(microsphere)와 카르복실기를 가지고 있어 음전하를 띠는 methacrylic acid(MAA)가 중합된 미세구가 정전기적 인력으로 수화젤이 제조될 수 있는 것을 알 수 있었다. 또 다른 논문은 P(NIPAM-co-DMAEMA)와 카르복실기를 가지고 있는 지방산(fatty acid)을 염다리(salt bridge)로 나노입자(nanoparticle)를 제조하였다.²⁶ 따라서, 정전기적 인력으로 (NIPAM-co-DMAEMA)이 알지네이트 비드 표면에 흡착할 수 있다.

코팅은 되었지만 0.6% 알지네이트에 흡착할 수 있는 P(NIPAM-co-DMAEMA)이 적어서 P(NIPAM-co-DMAEMA)의 성질이 제한되었을 것으로 예상된다. 또, 비드 내부에 알지네이트와 칼슘이온의 결합이 강해서 P(NIPAM-co-DMAEMA)의 성질이 제한되었을 것으로 생각된다. 흡착된 P(NIPAM-co-DMAEMA)가 알지네이트의 비드 표면의 많은 기공을 막아서 blue dextran의 방출 저해 역할을 하였다. P(NIPAM-co-DMAEMA)를 코팅함으로써 blue dextran의 방출량을 제어할 수 있다.

Figure 3은 P(NIPAM-co-DMAEMA)을 함유한 알지네이트 비드의 blue dextran 방출거동을 30, 37, 45 °C에서 보았다. 30과

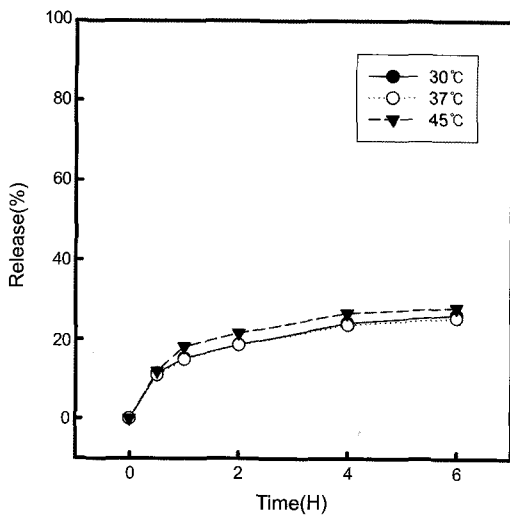


Figure 4. Release of blue-dextran from alginate beads containing no P(NIPAM-co-DMAEMA).

37 °C, 그리고 45 °C에서 모두 1시간 동안 15% 방출을 보였고 6시간 후에는 약 20~22%로 나타났다. 비드를 제조할 때 pH 5.0에서 먼저 알지네이트와 P(NIPAM-co-DMAEMA)을 용해시켜 제조하여 알지네이트의 카르복실기와 P(NIPAM-co-DMAEMA)가 결합하도록 하였다. 비드 제조 과정에서 (NIPAM-co-DMAEMA)이 알지네이트 내부에 고정되었을 것이라 예상된다. 내부에 고정화된 P(NIPAM-co-DMAEMA)과 알지네이트가 결합하여 방출이 저해되어 P(NIPAM-co-DMAEMA)이 없는 알지네이트 방출량(Figure 4)보다 낮게 나온다는 것을 예상할 수 있다. P(NIPAM-co-DMAEMA)이 내부에 고정되어 있어도 비드 전체에 작용하지 못해 온도가 높아져도 방출량에는 거의 차이가 없었지만 약물 전달체(drug carrier)가 갖추어야 할 서방성(slow release)을 나타내었다.

알지네이트 비드로부터 FITC-Dextran의 방출 거동. P(NIPAM-co-DMAEMA)로 코팅된 알지네이트 비드에서 6시간 동안의 FITC-dextran의 방출량은 30, 37, 45 °C에서 각각 78%, 82%, 82%로 나타났다(Figure 5). P(NIPAM-co-DMAEMA)을 함유한 알지네이트 비드의 FITC-dextran의 방출량은 30, 37, 45 °C에서 각각 79%, 80%, 85%로 나타났다(Figure 6). P(NIPAM-co-DMAEMA)가 존재하지 않는 알지네이트 비드의 방출 결과는 30, 37, 45 °C에서 각각 70%, 69%, 77%로 나타났다(Figure 7). FITC-dextran를 모델 시약으로 사용한 알지네이트 비드의 방출 실험한 결과, 온도가 증가함에 따라 방출량이 조금 증가하였으며 시간이 지날수록 방출량이 증가하는 서방성을 보였다. P(NIPAM-co-DMAEMA)이 비드 안에 함유되어 있거나 비드 밖에 코팅되었을 때 방출량이 P(NIPAM-co-DMAEMA)이 존재하지 않을 때보다 높게 나온 것은 온도에 따른 단순확산 효과에²⁷ 의한 것으로 보인다. 모델시약으로 FITC-dextran을 사용했을 때 방출량이 blue dextran 방출량보다 4배 정도 크게 나왔다. 분자량 차이로 인해 나타난 것으로, 분자량이 감소할수록 확산계수가 증가하기 때문에,²⁸ 상대적으로 작은 비드 기공을 통해 FITC-dextran이 더 잘 방출된 것으로 예상된다.

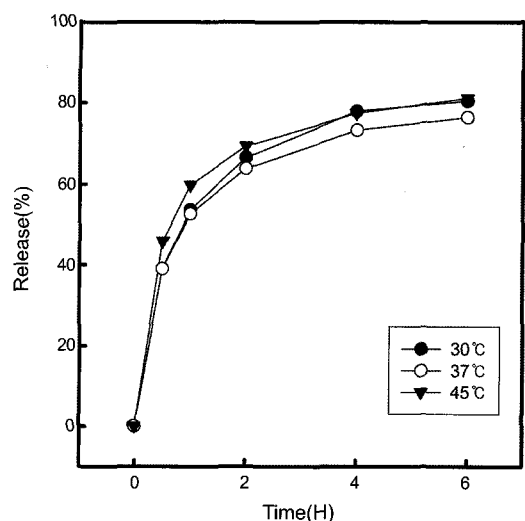


Figure 5. Release of FITC-dextran from alginate beads coated with P(NIPAM-co-DMAEMA).

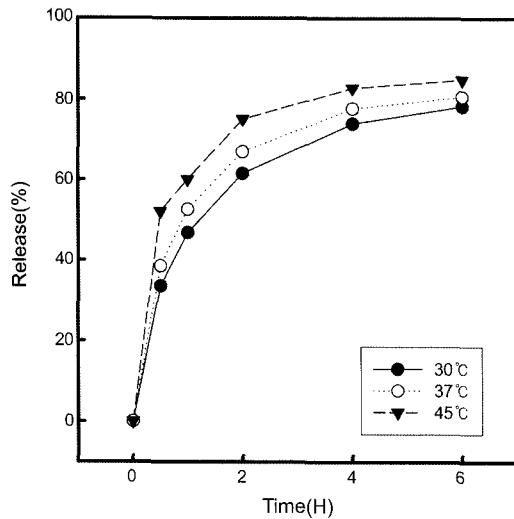


Figure 6. Release of FITC-dextran from alginate beads containing P(NIPAM-*co*-DMAEMA).

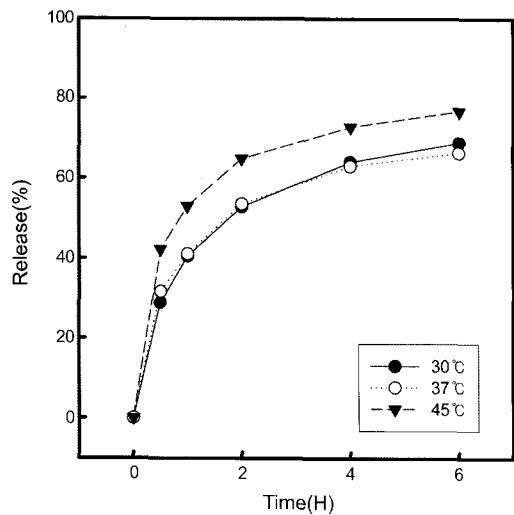


Figure 7. Release of FITC-dextran from alginate beads containing no P(NIPAM-*co*-DMAEMA).

결 론

본 연구는 NIPAM과 DMAEMA를 자유라디칼 반응을 이용하여 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)를 성공적으로 합성하였다. P(NIPAM-*co*-DMAEMA)를 매트릭스에 함유하고 있는 알지네이트 비드와 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)으로 코팅된 알지네이트 비드를 제조하여 알지네이트 비드의 온도 민감성 방출특성에 관하여 연구하였다. 비록 P(NIPAM-*co*-DMAEMA)에 의한 온도 의존적 방출특성은 나타나지 않았지만, 모델시약의 분지량이 작을수록 더 많은 방출량이 관찰되었고, 아울러 약물 전달체가 갖추어야 할 서방성을 나타내었다.

감사의 글: 이 논문은 강원대학교에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. V. Pillay and R. Fassihi, *J. Control. Rel.*, **55**, 243 (1999).
2. S. R. Kim, S. H. Yuk, and M. S. Jhon, *Eur. Polym. J.*, **33**, 1009 (1997).
3. H. Ertesvag and S. Valla, *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 85 (1998).
4. P. D. Vos, B. D. Haan, and R. V. Schilfgaarde, *Biomaterials*, **18**, 273 (1997).
5. J. H. Choi, H. Y. Lee, and J.-C. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.*, **110**, 117 (2008).
6. E. Roux, C. Passirani, S. Scheffold, J. P. Benoit, and J. C. Leroux, *J. Control. Rel.*, **94**, 447 (2004).
7. M. H. Kim, J.-C. Kim, H. Y. Lee, J. D. Kim, and J. H. Yang, *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, **46**, 57 (2005).
8. H. D. Han, M. S. Choi, T. W. Hwang, C. K. Song, H. S. Seong, T. W. Kim, H. S. Choi, and B. C. Shin, *J. Pharm. Sci.*, **95**, 1909 (2006).
9. C.-J. Cheng, L.-Y. Chu, J. Zhang, M.-Y. Zhou, and R. Xie, *Desalination*, **234**, 184 (2008).
10. K. Yamashita, T. Nishimura, and M. Nango, *Polym. Adv. Technol.*, **14**, 189 (2003).
11. D. Duracher, A. ElaßEssari, and C. Pichot, *Colloid Polym. Sci.*, **277**, 905 (1999).
12. J. Zhang, L.-Y. Chu, Y.-K. Li, and Y. M. Lee, *Polymer*, **48**, 1718 (2007).
13. W. Yin, M. Chen, T. Lu, M. Akashi, and X. Huang, *Eur. Polym. J.*, **42**, 2523 (2006).
14. J. Shi, N. M. Alves, and J. F. Mano, *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **84**, 595 (2008).
15. K. Kono, R. Nakai, K. Morimoto, and T. Takagishi, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1416**, 239 (1999).
16. H. Hayashi, K. Kono, and T. Takagishi, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1280**, 127 (1996).
17. J. C. Kim, S. K. Bae, and J. D. Kim, *Biochem.*, **121**, 15 (1997).
18. K. Kono, A. Henmi, H. Yamashita, H. Hayashi, and T. Takagishi, *J. Control. Rel.*, **59**, 63 (1999).
19. J. H. Choi, H. Y. Lee, J. C. Kim, and Y. C. Kim, *J. Ind. Eng. Chem.*, **13**, 380 (2007).
20. J. Hua, Y. Liu, J. Hu, Q. Wang, Z. Gong, and X. Guo, *J. Appl. Polym. Sci.*, **74**, 2457 (1999).
21. J. H. Choi, H. Y. Lee, and J. C. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.*, **108**, 3707 (2008).
22. J. Zhang, R. Xie, S.-B. Zhang, C.-J. Cheng, X.-J. Ju, and L.-Y. Chu, *Polymer*, **50**, 2516 (2009).
23. H. Feil, Y. H. Bae, J. Feijen, and S. W. Kim, *Macromolecules*, **26**, 2496 (1993).
24. S. R. van Tomme, M. J. van Steenberg, S. C. de Smedt, C. F. van Nostrum, and W. E. Hennink, *Biomaterials*, **276**, 2129 (2005).
25. X. Yang, H. Y. Lee, and J.-C. Kim, *J. Macromol. Sci. Part A-Pure Appl. Chem.*, **46**, 959 (2009).
26. D. Karlsson, G. Zacchi, and A. Axelsson, *Biotechnol. Prog.*, **18**, 1423 (2002).
27. M. T. Ende and N. A. Peppas, *J. Control. Rel.*, **48**, 47 (1997).