

PLGA 분자량에 따른 이중층 독소루비신 미립구의 방출거동

박정수 · 양재찬 · 육순홍* · 신형식** · 이종문 · 김문석*** · 이해방*** · 강길선†

전북대학교 BK-21 고분자 BIN융합연구팀, *한남대학교 고분자공학과,

전북대학교 화학공학과, *한국화학연구원 나노생체재료연구팀

(2007년 1월 19일 접수, 2007년 4월 6일 채택)

Effect of Molecular Weight of PLGA on Release Behavior of Doxorubicin for Double-Layered PLGA Microspheres

Jung Soo Park, Jae Chan Yang, Soon Hong Yuk*, Hyung Shik Shin**, John M. Rhee, Moon Suk Kim***, Hai Bang Lee***, and Gilson Khang†

BK21 Polymer BIN Fusion Res. Team, Chonbuk National University,

664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

*Department of Polymer Science and Engineering, Hannam University,

133, Ojeongdong, Daedeog, Daejeon 306-791, Korea

**Department of Chemical Engineering, Chonbuk National University,

664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

***Nanobiomaterials Lab, Korea Research Institute of Chemical Technology,

P. O. BOX 107, Yuseong, Daejeon 305-506, Korea

(Received January 19, 2007; accepted April 6, 2007)

초록 : 항암제인 독소루비신의 지속적인 방출을 위하여 PLGA와 독소루비신의 미립구를 수중유형(O/W) 용매증발 방법을 이용하여 약물의 농도와 고분자의 분자량의 변화에 따른 방출거동의 차이를 확인하였다. 이중층 미립구내의 독소루비신의 방출을 분석하기 위하여 형광 분광 광도계를 이용하여 5주 동안 독소루비신의 방출을 보았으며 주사 전자현미경을 이용하여 이중층미립구의 단면과 표면을 확인하였다. 제조된 이중층 미립구는 외부층이 전체적으로 매끄러운 표면과 구형을 나타내고 있었고 이중층 미립구의 단면을 잘라 계면층을 중심으로 하여 내부형태와 외부형태를 구분 지을 수 있었다. 또한 제조된 이중층 PLGA 독소루비신 미립구는 방출 결과를 통하여 저분자량의 고분자를 이용할수록 방출이 빠르다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 미립구를 제조하는데 있어서 고분자의 분자량을 조절함으로써 방출거동을 조절할 수 있다는 것을 확인하였다.

Abstract : We developed the doxorubicin-loaded PLGA double-layered microspheres using relatively simple oil-in-water (O/W) solvent evaporation method for sustained release of doxorubicin and investigated the release behavior according to PLGA molecular weight and initial drug loading. The double-layered microsphere was characterized on the surface, the cross-section morphology, the behavior of doxorubicin release for 5 weeks by SEM and fluorescence spectrophotometer. Double-layered microspheres showed smooth surfaces and clear difference between core and outer-shell. As the PLGA molecular weight increased, the release rate of doxorubicin-loaded, double-layered microspheres decreased. These results showed that the release behaviors can be controlled by the variation of molecular weight of PLGA.

Keywords : dextran, double-layered microsphere, doxorubicin, PLGA.

서 론

암 환자를 치료하는데 광범위하게 이용되는 항암제는 인체에서 필요한 기간 동안 적당량의 농도를 유지할 수 있도록 서서히 방출되

어야 한다.¹ 또한 효과적인 치료를 위하여 정상조직이 아닌 암조직이나 암세포만을 공격하는 방법을 이용하여 부작용을 최소화할 수 있어야 한다.² 현재 연구되고 있는 여러 분야 중 국부지향성을 위한 방법으로 생분해성 고분자를 이용한 미립구를 이용하는 방법이 있다.³ 주로 이용되는 생분해성 고분자로는 폴리에스테르 계열의 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA)가 있으며 생분해성과 생체 적합성의 특징으로 인하여 약물 전달체로서 다양한 분야에 이용되

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

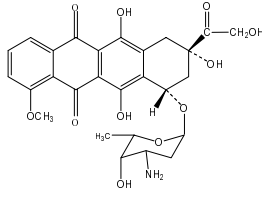


Figure 1. The chemical structure of doxorubicin.

고 있다.⁴⁻¹⁰ 이러한 고분자는 분자량과 공중합시 분율 조절의 요인으로 인해 약물의 방출을 조절할 수 있다는 장점이 있고 미국 식품의약국(FDA)에서 허가를 받은 물질이기도 하다.¹¹⁻¹⁸

광범위하게 사용되는 항암제인 독소루비신(doxorubicin, Figure 1)은¹⁹ 1960년대에 분리해 내었고^{20,21} 친수성분자이며 DNA 내 삽입되어 DNA 및 RNA 합성을 억제하고 DNA 단일 및 이중 나선을 파괴하는 작용을 통해 육종, 다수의 골수종, 악성 임파종, 급성 임파성 백혈병, 고환암, 난소암, 유방암, 위암, 방광암, 식도암을 치료하기 위해 이용되고 있다.²² 또한 높은 치료효과를 가지고 있음에도 불구하고 낮은 안정성으로 인한 문제점이 존재하며²³ 암세포에만 작용하지 않고 정상세포에도 작용하기 때문에 심한 부작용과²⁴⁻²⁶ 누적 투여량에 따른 문제점, 심장독성이 존재하여 치료제로서의 제한점이 존재한다.²⁷

약물을 전달하기 위한 방법으로써 단일층 미립구는 높은 초기 방출, 일정량 방출된 이후에 발생하는 지연시간과 낮은 약물 지속기간을 갖는 단점이 있다.²⁸ 이러한 문제 해결을 위한 방법으로 이중층 미립구를 제조하여 내부에 텍스트란과 약물을 포접하고 외부에는 생분해성 PLGA를 이용하여 약물의 포접률을 증가시키고 초기 방출을 억제시키면서 지속방출을 할 수 있는 방법이 개발되었다.²⁹ 하지만 단일층 미립구보다 크기를 조절하기 어렵고 포접시킬 수 있는 약물이 제한된다는 단점이 존재한다.³⁰ 이러한 문제를 해결하기 위하여 본 연구에서는 미립구의 크기를 조절하면서 포접률을 증가시키고 약물의 지속 방출을 위한 방법으로써 이중층 미립구를 이용하여 실험을 설계하였다. 이중층 미립구는 내부에 약물이 존재하고 외부에는 생분해성 PLGA가 존재하도록 제조하기 위하여 텍스트란을 사용하였다. 텍스트란은 이중층 미립구 제조과정에서 내부 구성 물질로서 이용되며 생분해성 고분자이고 봉입된 약물의 방출을 조절해주는 조절자 역할을 할 것으로 예상된다.³¹

이중층 미립구는 전보에서 보고된 것과 같이 W/O/W 이중에멀션 방법과 O/W 용매증발 방법이 존재하며 외부에는 PLGA와 내부에 텍스트란을 이용하여 이중층 미립구를 제조하였으며 주사전자현미경과 투과전자현미경, 공초점현미경을 이용하여 미립구가 이중층을 이루고 있다는 것이 보고되었으며³² O/W 용매증발 방법은 W/O/W와 O/O/W의 방법과는 달리 비교적 제조가 간편하다는 장점이 있고 지속방출을 위한 가능성을 제시하였다. 따라서 본 연구에서는 O/W 용매증발 방법을 이용하여 약물의 초기 투여량, 고분자의 분자량에 따른 미립구의 크기분포, 미립구 표면과 단면도, 약물 방출거동에 대해서 연구하였다.

실 험

시약 및 재료. PLGA는 ResomerTM RG 503H(Mw; 90000

Table 1. The Preparation Condition and Characteristics of Doxorubicin Double-Layered Microspheres

Batch no.	Initial drug loading(w/w%)	PLGA Mw	Encapsulation efficiency (%)	Size(mean±SD mm) n=30
1.	0.75	33 K	14	87.5±18.0
2.	0.75	90 K	4	118.3±20.1
3.	1.5	33 K	18	72.4±17.4
4.	1.5	90 K	5	113.5±24.0

g/mole, lactide/glicolide mole ratio, 50/50, Boehringer Ingelheim, Germany), RG 756(Mw; 33000 g/mole, lactide/glicolide mole ratio, 75/25, Boehringer Ingelheim) 제품을 사용하였다. 텍스트란은 평균분자량 35000~45000 g/mol로 Sigma Chem.(St. Louis, Mo, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 미립구를 제조하는데 에멀션을 형성하도록 사용하는 계면활성화제는 폴리(비닐 알코올)(PVA)로서 분자량이 1500 g/mol로 Showa Chem. Co. Ltd.(Tokyo, Japan) 제품을 구입하여 사용하였다. 미립구의 단면을 보기 위해 이용된 젤라틴은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 이용하였으며 그 외의 시약은 HPLC 등급을 사용하였다.

이중층 미립구의 제조. 독소루비신을 포함하는 이중층 미립구는 Table 1에 제시한 PLGA 분자량, 초기약물 투여량에 따라 O/W 용매증발 방법을 이용하여 제조하였다. 먼저 수용액 층은 0.75, 1.5 w/w% 농도의 독소루비신과 0.2 w/v% 텍스트란, 0.2 w/v% PVA와 함께 용해시키고 유기용액 층은 2.0 w/v% PLGA를 5 mL의 MC에 용해시켜 제조한다. 이렇게 제조한 유기용액 층을 수용액 층 50 mL에 주사기를 이용하여 떨어트리면서 교반시킨다. 이때 교반속도는 500 rpm이며 교반시킨 상태에서 5시간 동안 유기용액을 증발시키고 이중층 미립구를 안정화시킨다. 본 실험에서 이용한 물리적 교반기로는 RZR 2102(Heidolph Instrument GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany)을 사용하였다. 이렇게 제조된 미립구는 원심분리기를 이용하여 2000 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 미립구를 가라앉히고 상등액을 제거하여 새로운 증류수를 첨가하는 방법을 5번 실시하여 제조된 미립구를 세척한다. 이렇게 얻어진 미립구는 동결건조 방법을 이용하여 건조하였으며 사용전까지 습기를 제거하여 4 °C에서 보관하였다.

이중층 미립구의 모폴로지 관찰. SEM(Model : S-2250N, Hitachi Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 제조된 이중층 미립구의 외부 형태와 내부의 형태를 확인하였다. SEM 사진 촬영을 위하여 시료를 금속판 위에 고정시킨 후, 아르곤 가스를 충전하여 백금 코팅을 실시하였다. 코팅이 완료된 시료는 전자현미경을 이용하여 15 kv에서 관찰하였다. 또한 미립구의 단면도를 위해서 5% 글리세린을 포함하는 30% 젤라틴 용액 속에 일정량의 미립구를 넣고 3일 동안 진공건조하여 수술용 칼로 잘라서 미립구의 단면을 관찰하였다.^{33,34}

이중층 미립구 안에 존재하는 약물 함량 결정. 미립구 내에 포접시킨 독소루비신의 포접률을 분석하기 위하여 먼저 40 mg의 미립구를 3 mL의 메틸렌 클로라이드에 넣어 PLGA를 녹이고 pH 7.4인 인산염 완충식염수용액(PBS)을 10 mL를 첨가한 후, 24시간 동안 100 rpm으로 교반하여 미립구 내에 존재하는 독소루비신을 추출

하였다.³⁵ 수용액 층에서 1 mL을 취하여 흡수과장은 480 nm, 방출과장은 525 nm에서 형광 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 이렇게 구한 값을 다음의 포접률을 얻기 위한 공식을 이용하여 구하였다.

$$E \cdot E = \frac{\text{Amount of drug in double-layered microsphere}}{\text{Total amount of polymer fed to the system}} \times 100\%$$

Encapsulation efficiency ($E \cdot E$)는 약물의 포접 효율을 나타낸다.

생체의 방출분석. 제조한 이중층 미립구는 완충용액에서 분산이 늦는 현상이 존재한다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 0.02 w/v% Tween 80를 이용하여 이중층 미립구를 완충용액에 분산시키고 미립구와 완충용액간의 친화력을 증가시켜^{36,37} 빠른 시간 안에 가라앉게 하여 생체 외에서 독소루비신 방출을 관찰하였다. 일정 농도의 계면활성제를 포함하는 5 mL의 PBS 용액에서 미립구(40 mg 미립구/5 mL PBS)를 넣어 현탁하고 인큐베이터 안에서 37 °C와 70 rpm을 유지시키면서 일정 기간별로 시료를 취하여 형광 분광광도계를 이용하여 정량하였다.

결과 및 토론

이중층 미립구의 특성조사. 본 연구에서 사용한 독소루비신의 구조식은 Figure 1에 나타내었다. PLGA의 분자량, 초기약물 투여양에 따라 제조한 미립구의 크기, 독소루비신의 포접률의 차이는 Table 1에 나타내었다. 약물의 포접률은 제조 조건에 따라 4~18%의 범위로 나타났으며 초기 약물 투여양과는 무관하게 낮은 분자량의 고분자를 이용할수록 높은 포접률의 경향성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 낮은 분자량의 고분자를 이용하게 되면 미립구를 제조하는 과정에서 미립구를 안정화시키기 위하여 일정시간 동안 교반시켜 주게 되는데 낮은 분자량을 갖는 고분자에 의해 발생된 에멀션의 경우, 점도가 낮아 초기 연속상에 유기용액을 떨어뜨린 후 연속상과의 물질의 이동이 더 많아지게 된다. 이때 에멀션과 연속상에 존재하는 약물과의 상호작용이 증가하여 약물의 포접률이 증가하는 것으로 판단된다. 또한 분자량이 낮은 고분자가 점도가 감소하여 고분자 사슬간의 상호작용이 감소하기 때문에 안정화되는 과정에서 약물을 포접하기가 용이하다고 사료된다. 이중층 미립구의 크기에 있어서도 분자량이 높은 고분자를 이용할 경우 분자간력 상호작용 인력이 증가하기 때문에 크기가 커지는 것을 확인할 수 있었다.

분자량에 따른 미립구의 형태와 단면. Figure 2는 고분자의 분자량에 따라 독소루비신을 함유한 미립구의 표면과 크기를 나타낸 것이다. SEM 사진에서 볼 수 있듯이 미립구의 표면은 전체적으로 구형을 갖으며 매끄러운 표면을 갖고 있었다. 고분자의 분자량 따라서 미립구의 크기와 분포가 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 동일한 농도에서 높은 분자량의 고분자를 이용한 독소루비신 이중층 미립구의 크기가 더 커짐을 확인할 수 있었다. 이것은 점도에 의해서 나타난 결과로 낮은 분자량의 고분자보다 높은 분자량의 고분자가 점도가 더 커서 낮은 분자량의 고분자로 미립구를 제조할 때 더 빠른 시간에 유기용매가 제거되어 점도가 낮은 고분자로 제조한

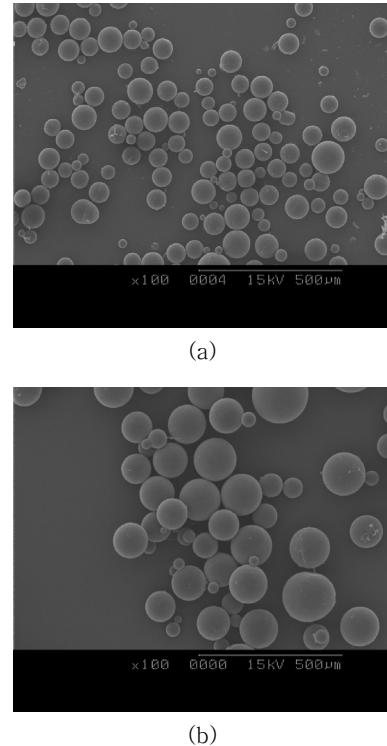


Figure 2. The surface morphology of double-layered microspheres. (a) 33K PLGA and (b) 90K PLGA (x100).

미립구의 크기가 더 작아지는 것으로 판단된다.

Figure 3은 독소루비신 이중층 미립구의 단면 관찰결과를 나타낸 것이다. 결과에서 볼 수 있듯이 PVA를 이용한 계면활성화제 층을 기준으로 내부와 외부가 뚜렷한 경계를 이루어 나뉘어져 있으며 내부에는 텍스트란과 독소루비신이 외부에는 PLGA 고분자가 위치하여 이중층 미립구를 이루고 있음을 확인할 수 있었다. Figure 3에 (b)를 통하여 유기용액상과 수용액과의 친화력을 갖게 하기 위한 계면이 뚜렷이 존재하는 것을 SEM 사진을 통하여 확인할 수 있었다. 본 연구에서 제조한 이중층 미립구의 크기는 평균 100 μm 였으며 크기를 작게 하기 위해 고분자의 농도를 낮추거나 더 낮은 분자량의 고분자를 이용하였을 때 이중층 미립구를 제조할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

생체의 방출거동. 제조된 미립구를 이용하여 5주 동안 생체의 실험으로 약물의 방출거동을 알아보았다. Figures 4 및 5는 초기 약물 투여량에 따른 방출거동을 나타낸 그래프를 제시하였다. 결과에서 약물 농도에 따르는 전체적인 방출거동은 유사했으나 0.75% 독소루비신 용액을 사용하여 제조한 미립구의 방출거동과는 달리 1.5% 독소루비신 용액을 사용하여 제조한 미립구의 방출거동에서는 PLGA로 제조한 미립구에서 존재하는 지연시간이 더 감소되었음을 확인하였다. PLGA 분자량의 변화에 따라 약물의 방출은 큰 차이를 보였는데 분자량이 33 K일 경우에는 초기 방출이 약 20% 미만 이후에 지속적으로 방출하여 최대 90%의 방출량을 보였다. 반면에 분자량이 90 K인 PLGA 미립구의 경우에는 초기방출이 10% 이후에 거의 방출이 없음을 확인하였다. 이는 본 연구에서 이용한 PLGA 분해결과로부터 33 K PLGA보다 90 K PLGA가 분해속도가 느리

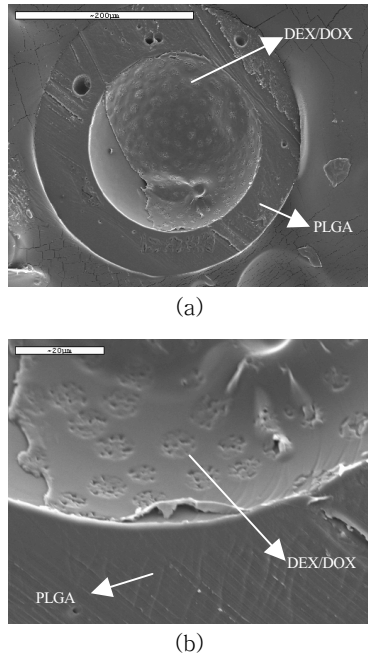


Figure 3. The cross-sectional image of double-layered microspheres batch no. 1. (a) x300 and (b) x1500.

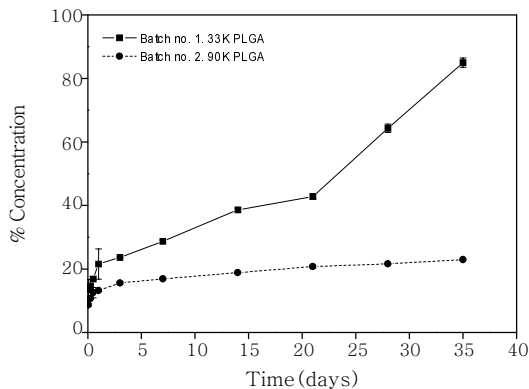


Figure 4. Release profile of doxorubicin in the double-layered microspheres according to the effect of the PLGA polymer molecular weight (Batch no. 1 and 2, $n=3$, 0.75 w/w% doxorubicin loading, 2 w/v% PLGA, and 5 mL DCM).

기 때문에 사료된다.

Figure 6에서 볼 수 있듯이 낮은 분자량의 고분자를 이용하여 제조한 미립구일수록 분해속도가 더 빨라 쉽게 미립구의 형태가 일그러지고 표면에 다공성이 증가하는 모습을 SEM 결과를 통해 확인할 수 있었다. 이는 PLGA의 분자량이 클수록 제조한 미립구의 크기가 더 컸으며 이에 따라 작은 분자량의 PLGA로 제조한 미립구의 표면적이 넓어 분해가 빨라지며 더 많은 다공성을 갖는 결과를 나타내는 것으로 사료된다. 또한 Table 1에서 PLGA의 분자량이 낮을수록 미립구의 크기가 작아지고 방출이 더 빠른 경향을 확인할 수 있었는데 이것 역시 낮은 분자량의 PLGA로 제조한 독소루비신 이중층 미립구의 크기가 더 작기 때문에 이중층 미립구 각각의 표면적이 증가하여 방출이 더 빨라진 것으로 사료된다. 고분자의 분자량이 클수록 제조

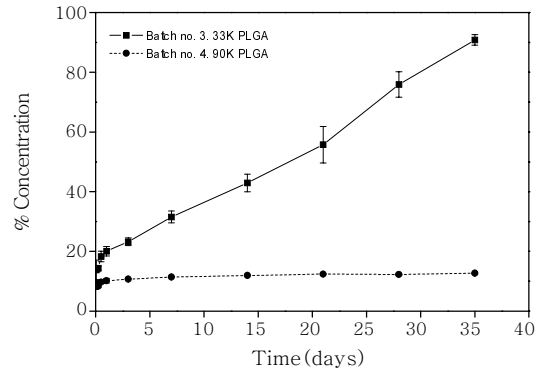


Figure 5. Release profile of doxorubicin in the double-layered microspheres according to the effect of the PLGA polymer molecular weight (Batch no. 3 and 4, $n=3$, 1.5 w/w% doxorubicin loading, 2 w/v% PLGA, and 5 mL DCM).

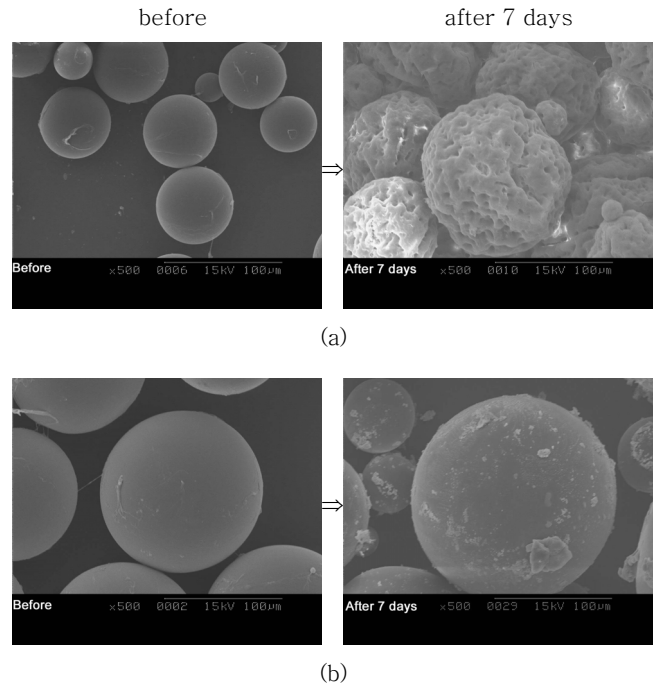


Figure 6. The surface degradation image of double-layered microspheres after 7 days. (a) 33 K PLGA and (b) 90 K PLGA.

된 미립구의 방출속도가 느린 것을 확인할 수 있었는데 이는 전보에서 보고된 것과 같이 높은 분자량의 고분자를 이용한 미립구일수록 PLGA의 소수성이 더 증가하기 때문에 수용액이 미립구로의 젖음속도가 늦어져서 방출속도가 늦어지게 되는 결과를 나타낼 수 있다.³⁸ 따라서 분자량이 다른 PLGA를 이용하여 약물의 방출거동을 효과적으로 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다.

24시간 이내에 약 20% 정도의 초기 방출이 일어나는 것을 볼 수 있는데 이러한 현상은 초기 약물 투여량, 고분자 분자량에 무관하게 나타났으며 이러한 결과는 미립구 표면의 PLGA 매트릭스와 약물을 포함하는 PVA가 연결된 구조를 형성하고 있기 때문에 나타나게 된다고 보고되었다.³⁹

결 론

본 연구에서는 고분자의 분자량과 약물의 초기 투여량을 달리하여 외부에는 생분해성 고분자인 PLGA를 이용하고 내부에는 독소루비신을 포접하는 이중층 미립구를 제조할 수 있었다. 33 K와 90 K PLGA에 따라 방출거동이 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었고 주사전자현미경 관찰을 통하여 내부에 텍스트란/독소루비신과 외부에 PLGA로 구성되어 있음을 확인하였으며 5주간 생체의 방출 실험결과 텍스트란 존재 아래 포접 약물의 서방화가 가능함을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 항암제를 운반하기 위한 약물전달체로써 이중층 미립구를 사용한 응용이 가능함을 확인하였다.

감사의 글 : 본 연구는 과학기술부(2004-01352, F104AA010005-06A0101-00510) 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. T. M. Allen, W. W. Cheng, J. I. Hare, and K. M. Laginha, *Anticancer Agents Med Chem.*, **6**, 513 (2006).
2. A. Muvaffak, I. Gurhan, U. Gunduz, and N. Hasirci, *J. Drug. Target.*, **13**, 151 (2005).
3. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulharni, and W. E. Rudzinski, *J. Control. Release*, **70**, 1 (2001).
4. G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
5. W. Y. Jang, S. H. Kim, I. W. Lee, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 100 (2005).
6. W. I. Son, D. I. Yun, G. Khang, B. S. Kim, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**, 92 (2000).
7. H. S. Choi, S. W. Kim, D. I. Yun, G. Khang, J. M. Rhee, Y. S. Kim, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 334 (2001).
8. G. Khang, J. C. Cho, J. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 49 (1999).
9. K. S. Seo, K. D. Hong, H. Hyun, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 109 (2005).
10. S. K. Kim, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, G. Khang, I. W. Lee, C. W. Han, H. K. Lee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 130 (2005).
11. H. S. Choi, G. Khang, H. Shin, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Int. J. Pharm.*, **234**, 195 (2002).
12. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **13**, 197 (2002).
13. H. S. Seong, D. S. Moon, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **26**, 128 (2002).
14. D. S. Moon, G. Khang, H. S. Seong, J. M. Rhee, J. S. Lee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**, 107 (2000).
15. T. K. An, H. J. Kang, J. S. Lee, H. S. Seong, J. K. Jeong, G. Khang, Y. Hong, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **26**, 670 (2002).
16. K. J. Cho, D. K. Song, S. H. Oh, Y. J. Koh, S. H. Lee, M. C. Lee, and J. H. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 115 (2005).
17. T. K. An, J. S. Lee, P. K. Shin, S. H. Cho, G. Kahng, and H. B. Lee, *Macromol. Symp.*, **15**, 339 (2002).
18. T. K. An, H. J. Kang, D. S. Moon, J. S. Lee, H. S. Seong, J. K. Jeong, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **26**, 691 (2002).
19. *United States Pharmacopoeia XXI*, Rockville, MD, USA, p. 357 (1994).
20. F. Arcamone, G. Cassineli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, and C. Spalla, *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 1101 (1969).
21. M. G. Trevisan and R. J. Poppi, *Anal. Chim. Acta.*, **69**, 493 (2003).
22. *United States Pharmacopoeia XXI*, Rockville, MD, USA, p. 357 (1994).
23. D. Missirlis, R. Kawamura, N. Tirelli, and J. A. Hubbell, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **29**, 120 (2006).
24. L. A. Cedron, M. L. Sayalero, and J. M. Lanao, *J. Chromatogr. B*, **721**, 271 (1999).
25. L. J. Steinherz, P. G. Steinherz, C. T. C. Tan, G. Heller, and L. Murphy, *J. Am. Med. Assoc.*, **266**, 1672 (1991).
26. R. D. Olson and P. S. Mushlin, *FASEB J.*, **4**, 3076 (1990).
27. R. Stridhar, C. Dwivedi, J. Anderson, P. B. Baker, H. M. Sharma, P. Desai, and F. N. Engineer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 1653 (1992).
28. R. Arshady, *J. Bioact. Compatible Polym.*, **5**, 315 (1990).
29. K. D. Hong, Y. S. Ahn, J. T. Go, M. S. Kim, S. H. Yuk, H. S. Shin, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 260 (2005).
30. J. T. Ko, H. J. Jung, J. H. Mo, J. S. Cho, S. H. Yuk, H. S. Shin, M. S. Kim, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Key Engineering Materials*, **342**, 513 (2007).
31. R. Y. Cheung, Y. Ying, A. M. Rauth, N. Marcon, and X. Y. Wu, *Biomaterials*, **26**, 5375 (2005).
32. J. T. Ko, J. H. Lee, C. R. Lee, H. S. Shin, S. H. Yuk, M. S. Kim, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 543 (2005).
33. M. Iwata and J. W. Meginity, *Pharmacol. Res.*, **10**, 1219 (1990).
34. J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**, 728 (2000).
35. Y. P. Li, Y. Y. Pei, X. Y. Zhang, Z. H. Gu, Z. H. Zhou, W. F. Yuan, J. J. Zhou, J. H. Zhu, and X. J. Gao, *J. Control. Release*, **71**, 203 (2001).
36. Y. Miyazaki, Y. Onuki, S. Yakou, and K. Takayama, *Int. J. Pharm.*, **324**, 144 (2006).
37. A. J. Defail, H. D. Edington, S. Matthews, W. C. Lee, and K. G. Marra, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **15**, 954 (2006).
38. J. S. Lee, J. H. Shin, J. K. Jeong, J. M. Rhee, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **27**, 9 (2003).
39. M. N. V. R. Kumar, U. Bakowsky, and C. M. Lehr, *Biomaterials*, **25**, 1771 (2004).