

Characterization of the biodegradable behavior for biphasic calcium phosphates using X-ray diffraction and lattice parameter

Dong-Hyun Kim, Chang-Weon Song, Tae-Wan Kim, Heoyng-Ho Jin, Hong-Chae Park and Seog-Young Yoon[†]

School of Materials Science Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Received June 14, 2011)

(Revised June 25, 2011)

(Accepted July 15, 2011)

Abstract Nanoscale-biodegradable behaviors of synthesized biphasic calcium phosphates (BCP) powders were characterized using X-ray diffraction (XRD), lattice parameter, and field emission microscopy (FE-SEM). The calcined BCP powders in vitro tested in Hank's balanced salt solution (pH = 7.4, 36.5°C) for 3 weeks. The calculated unit cell parameters for BCP have shown lattice distortion and expansion as irregular changes in the a and c-axis after in vitro.

Key words Biphasic calcium phosphate, X-ray diffraction, In vitro test, Lattice parameter

X-선 회절 및 격자 매개변수를 이용한 biphasic calcium phosphate 분말의 생분해성 특성평가

김동현, 송창원, 김태완, 진형호, 박홍채, 윤석영[†]

부산대학교 재료공학부, 부산, 609-735

(2011년 6월 14일 접수)

(2011년 6월 25일 심사완료)

(2011년 7월 15일 게재확정)

요약 합성된 biphasic calcium phosphate(BCP) 분말의 나노크기 생분해성 거동은 X-선 회절 분석방법, 격자 매개변수 및 전계방출형 주사전자현미경을 통해 특성평가 하였다. BCP 분말은 공침반응 및 하소과정을 통해 합성하였고, 합성된 분말은 헹크 용액(pH = 7.4, 36.5°C)을 이용하여 3주 동안 in vitro 시험 하였다. 분해 시험(in vitro) 후, BCP 단위포의 매개변수는 a 및 c축의 불규칙한 변화와 비슷한 격자 왜곡 및 팽창 거동을 보였다.

1. 서론

Calcium phosphate계 세라믹스 재료는 생체와의 우수한 친화력 및 골전도성으로 인하여 생체 의료용 재료로서 각광을 받고 있으며, 특히 무기 결정 화합물인 합성 hydroxyapatite($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 이하 HAp 표기)와 β -tricalcium phosphate($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 이하 β -TCP 표기)에 대한 연구는 신체 경조직(hard tissue) 대체 및 골수복재(bone regeneration materials)에 관련하여 응용되고 있다 [1-6].

일반적으로 calcium phosphate계 세라믹스를 생체 내에 식립(implant) 할 경우, HAp는 비분해성을, β -TCP는

분해성을 가지는 것으로 알려져 있는 가운데 이러한 상반된 분해거동을 동시에 가지는 biphasic calcium phosphate (이하 BCP 표기)의 생체 분해성과 활성의 조절은 BCP의 구성 조직인 HAp/ β -TCP의 상(phase) 비율 값에 의해 좌우 될 수 있으며, 이러한 상 조절 능력에 따른 의료용 재료로서의 적용연구가 진행 중이다[7].

생체 내 적용 연구에 있어 BCP 복합 조직의 분해특성은 의사체액(simulated body fluid)에서 특성 평가하는 경우가 많은데, 이런 경우 분말의 분해 후 나타나는 의사체액 내 Ca^{2+} 및 PO_4^{3-} 이온의 농도를 측정하여 BCP 분말의 분해거동을 예측하고 있다[8, 9]. 그러나 실질적으로 생체 내 적용 후 BCP 자체의 특성평가가 아닌 용액내의 화학적 분해거동에만 초점이 맞추어 있는 실정이며, in-vitro 및 in-vivo 시험에 적용된 BCP 분말의 결정학적 측면에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 합성된 BCP 분말을 in vitro

[†]Corresponding author

Tel: +82-51-510-2487

Fax: +82-51-512-0528

E-mail: syy3@pusan.ac.kr

테스트 한 후, 적용된 분말의 분해시간에 따른 HAp/ β -TCP 상 비율을 측정하였고, 결정학적 격자 매개변수 (crystallographic lattice parameter)를 측정하여 나노스케일에서의 BCP 분말의 분해거동을 연구하고자 한다.

2. 실험방법

본 연구에서 Biphasic Calcium Phosphate(BCP)를 제조하기 위해 시약급의 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (KATAYAMA Chemical, Japan)과 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (JUNSEI Chemical, Japan)을 공침 및 하소처리과정을 통해 합성하였다. BCP 분말의 합성조건은 선행실험 결과에 근거하여 목표한 HAp와 β -TCP의 60:40 비율이 되기 위해 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 Ca/P 몰 비 1.602에 맞추어 정량하였다. 250 ml의 탈이온 증류수(Distilled water)에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 및 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 첨가한 후 NH_3 (JUNSEI Chemical, Japan)를 천천히 적가하여 pH 11로 조절하여 공침시켰다.

이렇게 제조된 현탁액을 2시간 동안 교반을 한 후 상온에서 24시간 동안 시효처리(Aging)하였다. 반응생성물의 여과 및 미 반응물을 제거하기 위해 1 μm 의 미세필터를 이용하여 증류수로 최소한 5회 이상 반복적으로 수세하였다. 여분의 수분을 제거하기 위하여 80°C로 고정된 건조기를 이용하여 24시간 동안 충분히 건조시켰다. 이렇게 얻은 분말을 충분히 분쇄 및 400 mash 체가름 후, 전기로를 이용하여 900°C에서 2시간 동안 하소처리 하여 BCP 분말을 제조하였다. BCP 분말의 생체활성 평가를 위하여 헹크 용액(pH = 7.4, 36.5°C)에 3주간 침적 시켰다.

제조된 BCP분말 및 in vitro 시험을 거친 시편은 XRD(D/max-IIA, Rigaku)를 사용하여 X-선 회절패턴 값을 측정하였고, 생성물의 상 분석 및 격자 매개변수는 X'Pert High Score(PANalytical B.V.) 프로그램을 분석하였고, ICDD(The International Centre for Diffraction Data) 데이터베이스(HAp; 00-009-0432, β -TCP; 00-009-0169)를 통해 계산하였다. 또한 FE-SEM(S-4800, Hitachi)을 통해 분해시간에 따른 입자형상 및 분해 진행과정을 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. In vitro 시험에 따른 biphasic calcium phosphate의 분해 거동

출발 물질의 Ca/P몰 비율을 1.602로 고정하여 합성한

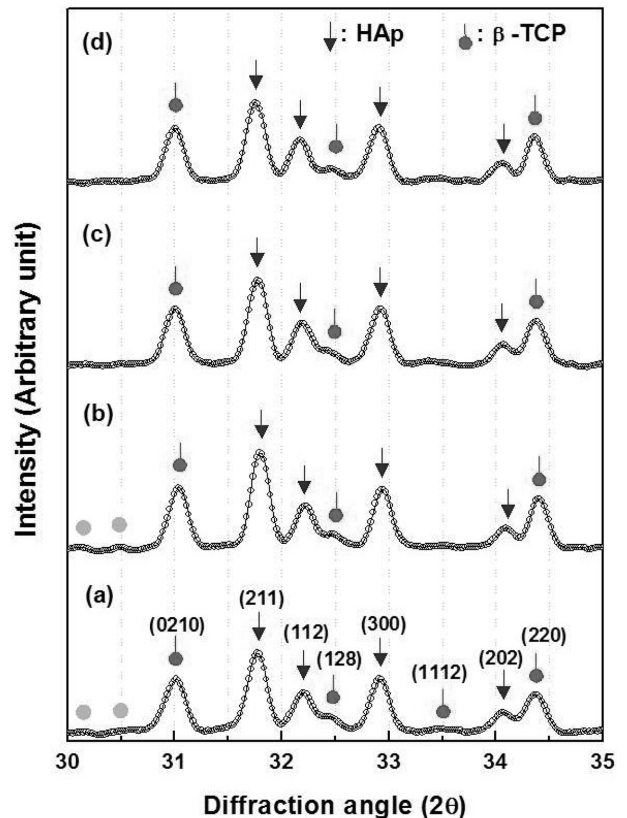


Fig. 1. XRD patterns of BCP powders obtained after in vitro test; (a) 0, (b) 1, (c) 2, and (d) 3 week.

BCP 분말을 헹크 용액에서 3주간 in vitro 실험한 결과를 Fig. 1 및 2에 나타내었다. Fig. 1은 in vitro 분해 실험 후 얻어진 분말의 XRD 회절패턴 결과이다. In vitro 분해시험 후 얻어진 분말의 결정상은 각각 β -TCP와 HAp 피크가 혼재한 이상(biphasic)이 관찰 되었으며, 각각의 주 피크인 HAp (211)와 β -TCP (0210) 피크는 분해 시간에 따라 뚜렷하게 양분화 되었다. 게다가 HAp 주 피크는 분해 시험 1주 후에는 오히려 성장하다가 2주 후에는 다시 감소함을 관찰 하였다. 또한 합성된 분말의 미반응물로 사료되는 피크(index; grey circle)는 분해 시간에 따라 관찰이 되지 않았다.

Fig. 2는 합성된 BCP 및 in vitro 분해 시험 후 얻어진 분말 표면의 SEM 결과이다. 헹크 용액에 의한 분해 실험 후 회수된 분말형상은 합성된 BCP 분말 보다 상대적으로 분해된 형상을 보였고, 열처리에 의해 생성된 기공수도 분해시간에 따라 작아짐을 관찰하였다. 이러한 경향은 Fig. 1의 결과와 비교하여 볼 때, 공침법에 의해 합성된 분말(저 결정성 HAp 생성 확인)은 열처리(900°C)에 의해 BCP 상으로 합성되나 공침분말의 비화학양론비에 의해 Ca 결손 apatite 및 분해성 calcium phosphate 조직이 미약하게 생성되어 헹크 용액 내에서의 유지시간에 따라 표면에서부터 분해되어 생성된 결과라 사료된다.

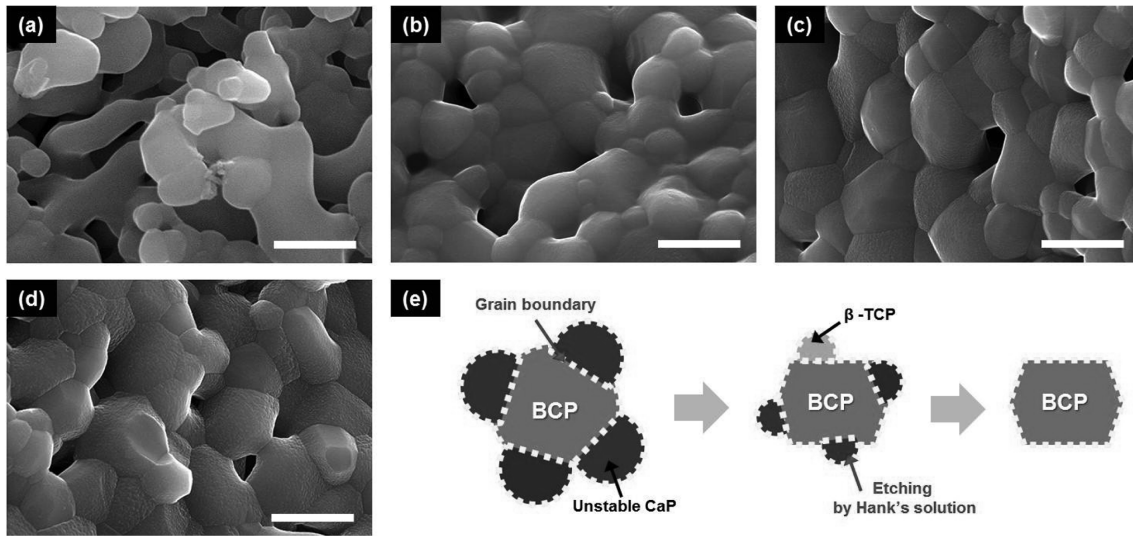


Fig. 2. SEM images of BCP powders obtained after in vitro test; (a) 0, (b) 1, (c) 2, and (d) 3 week (Scale bar is 1 μ m). Fig. 2(e) shows schematics for biodegradable behaviors of BCP in micro-scale.

3.2. In vitro 시험에 따른 biphasic calcium phosphate의 상 거동 관찰

헝크 용액에서 3주간 in vitro 시험한 BCP 분말시편의 XRD 회절패턴 중 β -TCP와 HAp상의 주 피크를 이용하여, 분해시간에 따른 상변화 거동을 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 이 때 β -TCP와 HAp상 주 피크의 적분강도 값을 구하기 위해 각각의 피크를 분리시켜 분석하였다(Fig. 3a 참조). Fig. 3(b~d) 결과에 있어, β -

TCP상의 피크 강도 값은 유지되었으나 HAp상의 피크 강도 값은 시간에 따라 증가하다가 다시 감소하였다. 그러나 FWHM(full width at half maximum)값은 시간에 따라 HAp상은 증가하다가 유지 되었으며, β -TCP상의 FWHM 값은 감소하였다. 이를 기초로 상대적인 피크 강도 값(HAp 피크강도 값을 100 %로 기준함)을 구한 결과, β -TCP상의 피크 강도 값은 분해시간에 따라 감소함을 알 수 있었다. 또한 Fig. 3a 그래프를 이용하여 적분강도 값을 구하여 상대적인 상 비율을 구한 결과, 분해

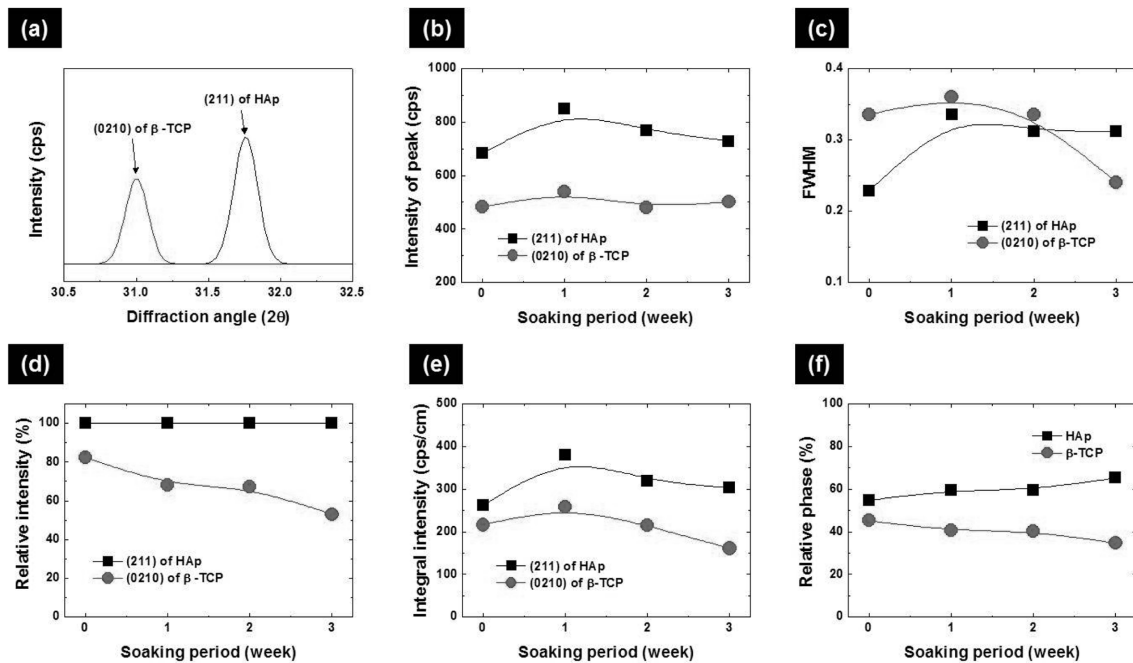


Fig. 3. Phase analysis of BCP powders obtained after in vitro test; (a) main peak of BCP fitted by gaussian function, (b) XRD peak intensity, (c) FWHM, (d) relative intensity, (e) Integral intensity, and (f) relative phase ratio of HAp and β -TCP.

시간에 따라 HAp상은 증가하였고, β -TCP상은 감소하였다(Fig. 3e 및 f). 이러한 연구결과를 바탕으로 상반된 분해거동을 동시에 가지는 BCP는 생체 내 구조적 안정성(HAp)과 생분해 거동을 가진다고 판단되어 진다.

3.3. Biphasic calcium phosphate의 나노크기 분해 거동

Fig. 4와 5는 헹크 용액에서 3주간 in vitro 시험한 BCP 분말시편의 분해시간에 따른 HAp 및 β -TCP unit cell의 lattice parameter 결과 값이다. Unit cell의 lattice parameter 결과 값은 ICDD(The International Centre for Diffraction Data) reference(HAp; 00-009-0432, β -TCP; 00-009-0169)와 측정된 XRD 회절패턴 값(면 지수)을 이용하여 각각의 상에 대한 d-spacing 값의 변이 차를 구하여 계산하였다.

Fig. 4에서 나타낸 HAp의 hexagonal 구조 unit cell에 있어 a 축 길이는 분해 시간에 따라 증가 하다가 다시 감소하였고, c 축 길이는 감소하다가 점진적으로 증가 하였다. 분해실험 전 HAp 상의 a/c 축비는 이상적인 hexagonal 구조(a/c ratio = 1.368)와 비슷한 구조를 가졌으나, 분해시간에 따라 a 축 길이가 증가하다가 이론적인 a/c 축비에 가까워짐을 알 수 있었다. 또한 HAp

unit cell의 부피는 이론 값 보다 작은 부피를 가졌지만 분해시간에 따라 이론값에 가까워짐을 알 수 있었다.

이와 달리 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 β -TCP unit cell의 lattice parameter 결과는 분해 실험 전 시편의 rhombohedral 구조에 있어, a 및 c 축의 길이는 이론값에 비해 감소된 상태였다. 분해시간에 따라 a 및 c 축의 길이는 이론값에 가까워지고 있으나 a/c 축비는 전반적으로 이론값에 비해 상대적으로 벗어나 있음을 알 수 있었다. 그러나 β -TCP unit cell의 부피는 분해시간에 따라 증가하다가 이론값에 가까워짐을 알 수 있었다.

3.4. Biphasic calcium phosphate의 나노크기 생분해 메커니즘

상기 열거된 Fig. 1~5의 결과에 의해 BCP 분말의 분해거동은 Fig. 6과 같이 설명 할 수 있다. 첫째, HAp 및 β -TCP의 unit cell parameter 중, 축각(axial angle)은 기본적으로 같으나($a = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) 축 길이 및 결정방향이 서로 다르기 때문에 lattice mismatch가 생길 가능성이 크다. 둘째, 다결정상의 입자에 있어 하나의 입자는 HAp 및 β -TCP 단결정상이 존재하고, 결정방향이 서로 다르기 때문에 입내에서 응력은 발생 하지 않는다

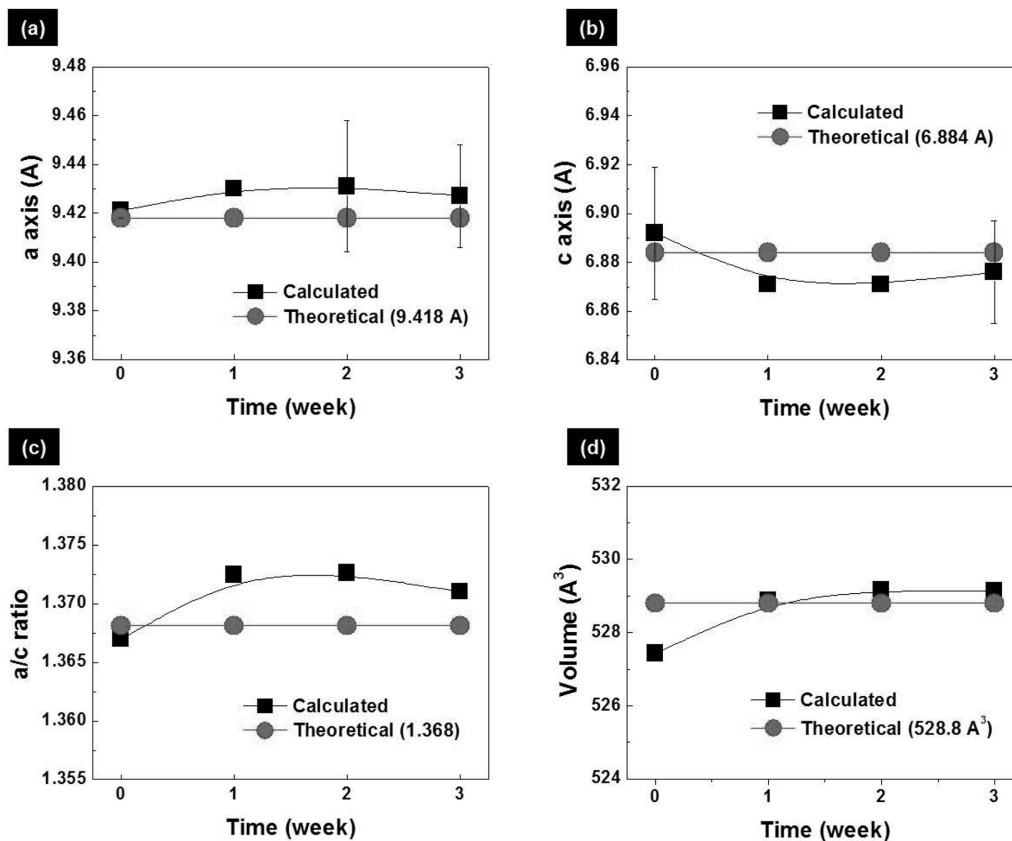


Fig. 4. Lattice parameter of hexagonal HAp unit cell calculated from BCP powders obtained after in vitro test; (a) a-axis, (b) c-axis, (c) a/c ratio, and (d) volume (Notice: $a = b$ -axis, $a = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$).

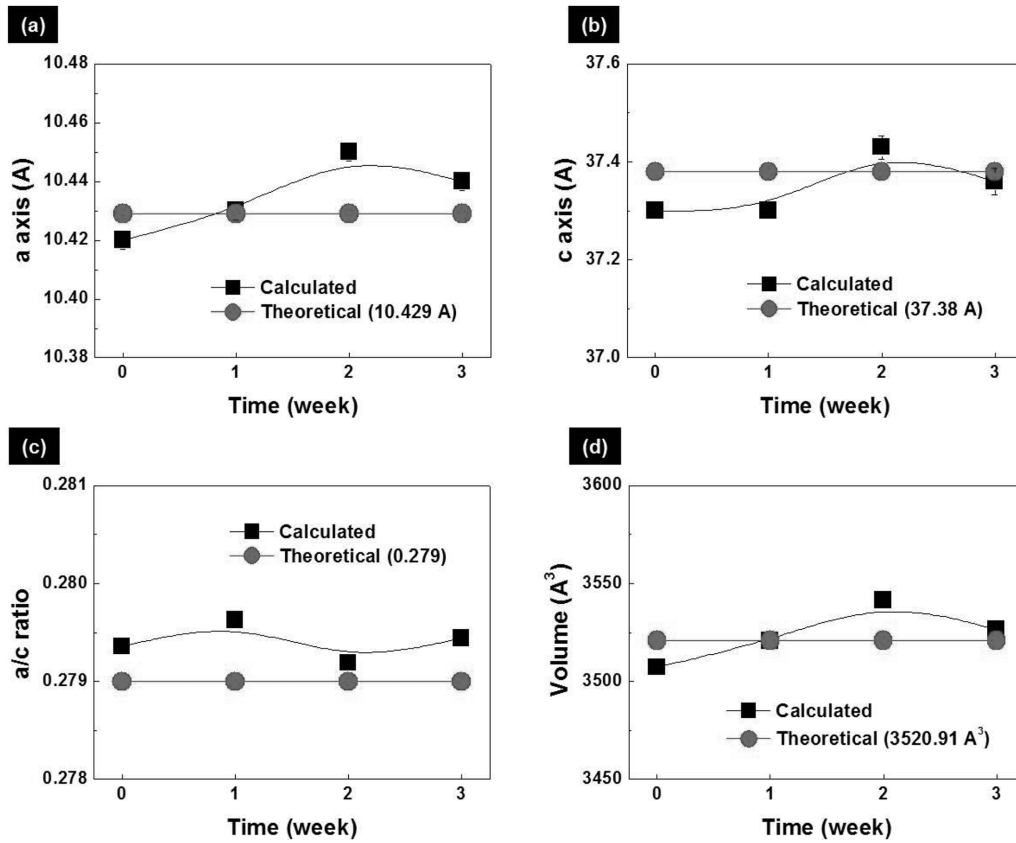


Fig. 5. Lattice parameter of rhombohedral β -TCP unit cell calculated from BCP powders obtained after in vitro test; (a) a-axis, (b) c-axis, (c) a/c ratio, and (d) volume (Notice: $a = b$ -axis, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$).

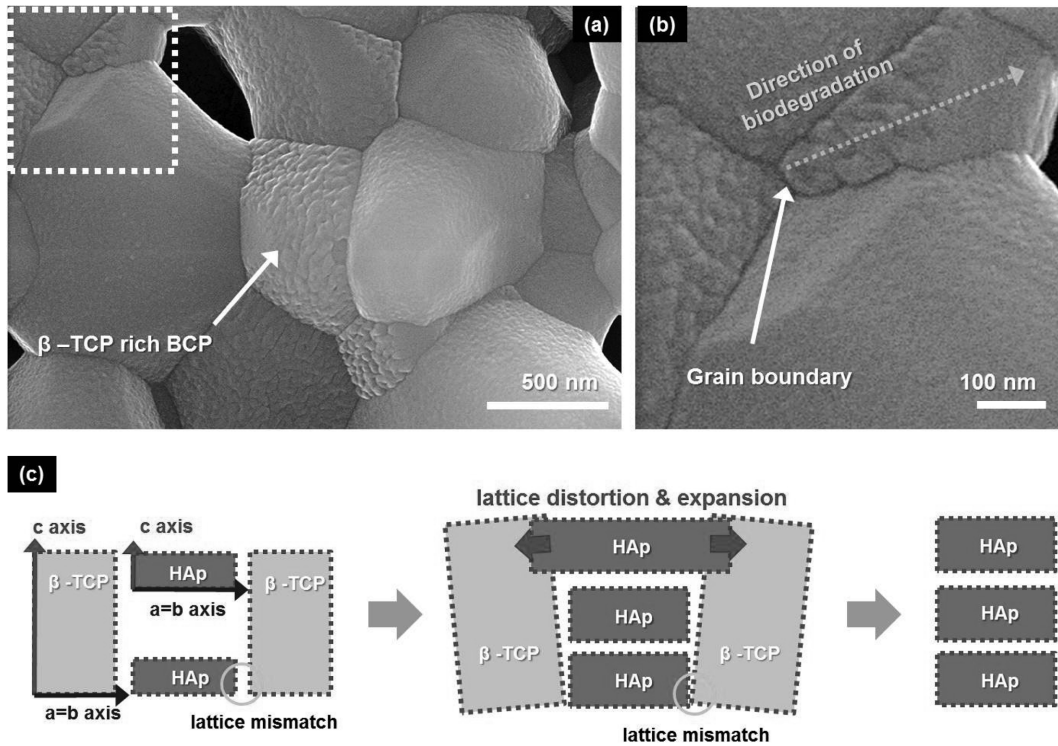


Fig. 6. Biodegradable behaviors of BCP in nano-scale; (a and b) FE-SEM results of BCP after in vitro for 3 week (Fig. 6(b) shows an inset image is magnified from the dotted line of Fig. 6(a)), (c) schematics for biodegradable behaviors of HAp and β -TCP unit cell (Notice: $a = b$ -axis, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$).

고 본다. 따라서 Fig. 1~5의 결과에서 유추 한다면 BCP의 분해거동은 입계에서 시작되며, HAp와 β -TCP의 계면(혹은 입계)에 결정학적으로 불안정한 상(예; bio glass 또는 Ca-결손 apatite)이 존재하여 in vitro 분해시험 진행시 탱크 용액의 pH 불균형으로 인한 Ca 이온 방출 및 그에 따른 unit cell의 lattice distortion 및 expansion에 의해 시간에 따라 분해가 가속화 될 가능성이 높다고 사료되어진다(Fig. 6(b) 참조). 셋째, Fig. 6(a)에 나타낸 결과에서 실질적으로 합성된 BCP의 입자들은 Ca/P물비는 비화학양론비가 성립되기 때문에 β -TCP상이 상대적으로 많은 BCP 조직(β -TCP rich BCP)에서의 먼저 분해 될 수 있다고 판단되어진다.

4. 결 론

본 연구에서는 합성한 BCP 분말을 in vitro 분해시간에 따라 HAp/ β -TCP상 거동, 비율 및 결정학적 격자 매개변수를 측정하였다. 상 비율 측정 결과, BCP 분말은 분해 시간에 따라 HAp상은 증가하였고, β -TCP 상은 감소하였다. 격자 매개변수를 측정에 있어, hexagonal HAp 격자구조는 분해시간에 따라 a 축 길이가 증가하다가 이론적인 a/c 축비에 가까워짐을 알 수 있었다. 이와 달리 rhombohedral β -TCP 격자구조는 분해시간에 따라 unit cell 형태가 불규칙적으로 바뀌고 있음을 알 수 있었다. 나노스케일에서의 BCP 분해거동은 hexagonal HAp 격자구조와 rhombohedral β -TCP 격자간의 lattice mismatch 거점으로 분해 요인이 되며, 탱크 용액에 의한 분말 표면에서의 Ca 이온의 방출에 의해 각각의 hexagonal 및 rhombohedral 구조가 lattice distortion 및 expansion 거동이 반복되기 때문에 분해가 이루어진다고 사료된다. 또한 이러한 분해의 시작은 grain boundary에서 진행됨을 형상 관찰을 통해 유추 할 수 있었다. 이러한 연구결과를 바탕으로 상반된 분해거동을 동시에 가지는 BCP는 생체 내 구조적 안정성(HAp)과 생분해 거동을 통한 생체 활성화도(β -TCP)를 가진다고 판단되어 진다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(20100280000). 또한 본 연구는 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신 인력양성사업으로 수행된 연구결과임.

참 고 문 헌

- [1] K.-B. Park, J.-W. Park, H.-U. Ahn, D.-J. Yang, S.-K. Choi, I.-S. Jang, S.-I. Yeo and J.-Y. Suh, "Comparative study on the physicochemical properties and cytocompatibility of microporous biphasic calcium phosphate ceramics as a bone graft substitute", *Journal of Periodontal & Implant Science* 36 (2006) 797.
- [2] R.W. Bucholz, A. Carlton and R.E. Holmes, "Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes", *Orthop. Clin. North Am.* 18 (1987) 323.
- [3] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants", *J. Mater. Res.* 13 (1998) 94.
- [4] Y. Ota, T. Iwashita, T. Kasuga, Y. Abe and A. Seki, "Bone formation following implantation of fibrous compounds (β -Ca(PO₃)₂, CaCO₃(aragonite)) into bone marrow", *J. Mater. Sci.* 12 (2002) 895.
- [5] J.H. Kim, Y.M. Park, T.Y. Yang, S.Y. Yoon and H.C. Park, "Microstructural development in synthetic hydroxyapatite", *J. Kor. Ceram. Soc.* 41 (2004) 289.
- [6] D.J. Baek, T.Y. Yang, Y.B. Lee, S.Y. Yoon and H.C. Park, "Fabrication of hydroxyapatite whiskers by hydrolysis of α -TCP", *J. Kor. Ceram. Soc.* 40 (2003) 608.
- [7] S.H. Kwon, Y.K. Jun, S.H. Hong and H.E. Kim, "Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders", *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1039.
- [8] R. Xin, Y. Leng, J. Chen and Q. Zhang, "A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics in vitro and in vivo", *Biomaterials* 26 (2005) 6477.
- [9] S.-H. Kwon, Y.-K. Jun, S.-H. Hong and H.-E. Kim, "Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powders", *J. Euro. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1039.