

Bioactivity behavior of biphasic calcium phosphate powders prepared by co-precipitation method

Tae-Wan Kim, Dong-Hyun Kim, Hyeong-Ho Jin, Heon-Soo Lee*, Hong-Chae Park and Seog-Young Yoon†

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

*Division of Electrical and Electronic Engineering, Daegu Technical University, Daegu 704-721, Korea

(Received February 27, 2012)

(Revised March 18, 2012)

(Accepted March 23, 2012)

Abstract The co-precipitation technique has been applied to synthesize biphasic calcium phosphate (BCP). $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as the starting materials was used. X-ray diffraction (XRD) and Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy were used to characterize the structure of as-synthesized and calcined BCP powders. After immersion in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), for 1 week a precipitation started to be formed with individual small granules on the specimen surface. An MTT assay indicated that BCP powders have no cytotoxic effects on MG-63 cells, and that they have good biocompatibility.

Key words Biphasic calcium phosphate, Bioactivity, Co-precipitation, Hanks' balanced salt solution

공침법으로 합성된 biphasic calcium phosphate 분말의 생체활성 거동

김태완, 김동현, 진형호, 이현수*, 박흥채, 윤석영†

부산대학교 재료공학부, 부산, 609-735

*대구공업대학교 전기전자계열, 대구, 704-721

(2012년 2월 27일 접수)

(2012년 3월 18일 심사완료)

(2012년 3월 23일 게재확정)

요약 BCP(biphasic calcium phosphate) 분말을 제조하기 위하여 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 출발 물질로 공침법(co-precipitation process)을 이용하여 합성하였다. 합성된 분말의 열처리 전 후의 HAp(Hydroxyapatite)/ β -TCP(β -Tricalcium phosphate) 결정상 비율 및 분광학적 특성을 XRD 및 FT-IR를 이용하여 분석하였다. BCP 분말의 생체활성 거동을 평가하기 위하여 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적시켜 시간에 따라 형상, 이온농도의 변화 및 결정상을 분석한 결과 낮은 결정화도의 HAp가 생성됨을 확인하였다. BCP분말의 세포독성 평가에서도 대조군에 비하여 세포성장률이 우수함을 관찰하였다.

1. 서론

인산칼슘 계열의 생체재료는 생체적합성(biocompatibility), 생체활성(bioactivity), 골전도(osteoconduction) 등의 특성으로 인하여 치과 및 정형외과 영역의 재건 의학 분야에서 뼈 이식 재료로써 주목받고 있다[1-3]. 그 중 특히, Hydroxyapatite(HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)와 β -Tricalcium phosphate(β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)가 광범위하게 이용되고 있

다. 그러나 각각의 물질은 생물학적 특성이 좋음에도 불구하고 생체 적용에 한계가 존재한다. HAp는 생체 내 이식 후 비분해성으로 인하여 신생골 형성능력이 저하되고[4], β -TCP는 생체 내 체액에 노출되면 분해성으로 인하여 Ca^{2+} 과 PO_4^{3-} 이온이 빠르게 방출되어 골세포 증식을 위한 골격을 제공할 수 없어, 임상 적용에 한계를 나타낸다고 보고되어 있다[5]. 따라서 HAp의 비분해성과 β -TCP의 분해성을 적절히 혼합하여 골전도성은 유지하면서 재료의 흡수성을 조절한 이상인산칼슘(Biphasic Calcium Phosphate; BCP)이 골이식 재료로서 제안되었다[6, 7].

BCP는 HAp/ β -TCP의 비율을 조절함으로써 생체활성

†Corresponding author

Tel: +82-51-510-2487

Fax: +82-51-512-0528

E-mail: syy3@pusan.ac.kr

과 생분해성을 조절할 수 있으나, 생체 내에서 최적의 골 전도성을 나타내기 위한 HAp/ β -TCP의 비율은 명확히 제시되어 있지 않다. 최근에 발표된 연구에서 약 60:40의 HAp/ β -TCP의 비율이 적절한 것으로 제안되었다[8-10].

BCP 분말의 합성 방법 중 하나인 HAp와 TCP 분말의 단순 기계적 혼합인 고상반응법은 BCP 분말의 제조를 위한 간단한 공정이나 높은 하소온도로 인하여 비교적 큰 응집입자의 생성 및 생산비용 절감에 있어 문제점이 대두된다[11]. 이러한 문제점을 해결하기 위해 칼슘 결손 HAp의 하소(calcination) 처리법[12], 공침된 인산칼슘계 전구체의 하소[13] 및 인산칼슘계 수화물 혼합용액의 마이크로파 가열법[14] 등이 연구되고 있다.

본 연구에서는 공침법을 이용하여 BCP 분말을 합성하고, 합성된 분말의 결정학적 특성 및 화학적 결합 거동을 측정하기 위하여 XRD 및 FT-IR을 통하여 X-선 회절 분석 및 적외선 분광분석을 실시하였다. 또한 생체활성 거동을 평가하기 위하여 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적시켜 시간에 따른 BCP 분말의 형상, 결정성 및 HBSS 용액의 이온농도 변화를 분석하였다. BCP 분말의 세포 독성 평가를 위하여 MTT assay를 시행하였다.

2. 실험방법

본 연구에서 biphasic calcium phosphate(BCP) 분말을 제조하기 위하여 출발물질로 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Junsei chemical, Japan), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Junsei chemical, Japan)를 사용하였고, 제조공정으로 공침법(co-precipitation process)을 이용하였다. HAp/ β -TCP의 부피 비율이 60:40인 BCP 분말을 합성하기 위하여 출발물질의 Ca/P 몰 비율을 1.602로 고정하여 공침물을 제조하였다. 공침물은 출발물질인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 증류수에 용해하여 각각을 수용액 상태로 제조하였다. 제조된 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 수용액에 NH_3 (Junsei chemical, Japan)를 첨가하여 수용액의 pH를 11로 조절하였다. pH 11로 조절된 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 수용액을 교반시키면서 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 를 천천히 첨가하였다. 제조된 수용액을 2시간 동안 교반한 후 상온에서 24시간 동안 시효처리(Aging)하였다. 반응생성물의 여과 및 미 반응물을 제거하기 위해 증류수로 수회 반복적으로 수세하고, 여분의 수분을 제거하기 위하여 80°C로 고정된 건조기에서 24시간 건조하였다. 건조된 분말을 분쇄하여, 1000°C에서 2시간 동안 열처리 하였다. 열처리 후 분말을 400 mesh 체가름 하였다.

제조된 BCP 분말의 열처리 전 후의 결정상 변화를 관찰하기 위해 X-선 회절분석장치(XRD, D/max-IIA, Rigaku, Japan)를 이용하여 분석하였다. 측정조건은 $\text{CuK}\alpha$,

30 kV, 25 mA, scanning speed 1°/min, 0.5 Slit계, 측정 범위는 25°~45°(2 θ)이었다. 열처리에 따른 탈수 축합 거동을 분석하기 위하여 400~4000 cm^{-1} 범위에서 FT-IR (Nicolet Magna IR 560, USA) 측정하였다. 열처리 전 후의 분말의 형상 변화를 관찰하기 위하여 Osmium 코팅 후 SEM(HITACHI S-4800, Japan)을 이용하여 분석하였다.

BCP 분말의 생체활성 거동을 평가하기 위해 제조한 분말을 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS; Sigma-Aldrich, Japan)에서 1주, 2주, 3주간 36.5°C의 인큐베이터에서 침적 테스트하였으며, 일정한 이온 농도를 유지하기 위하여 HBSS를 2일마다 교환해주었다. HBSS 침적 후의 표면의 형상 변화 및 표면의 결정상 변화를 XRD 및 SEM을 통하여 관찰하였다. HBSS 침적 기간에 따른 HBSS 용액의 Ca, P 이온 농도의 변화를 ICP-AES(ICPS-7500, Shimadzu, Japan)를 통해 측정하였다.

BCP 분말의 세포 독성을 평가하기 위하여 Human osteosarcoma cell line인 MG-63을 이용하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 cell을 penicillin(100 units/ml), streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) solution과 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하여 5% CO_2 , 37°C 배양기에서 배양시켜 사용하였다. 우선 24 well에 MG-63 1×10^4 개를 분주하고, 24시간 뒤에 새 배지로 교체 후 시료를 1 mg/ml로 처리하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(5 mg/ml)을 각 well에 처리하여 4시간 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) reader(Wallac 1420, USA)를 통해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

BCP(HAp : β -TCP = 60 : 40) 분말을 합성하기 위하여 Ca/P 몰 비율을 1.602로 조절하여 공침분말을 제조하였다. 제조된 공침분말과 1000°C 열처리 후 생성된 BCP 분말의 X-선 회절 패턴을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1(a)에서와 같이 공침분말에서 낮은 결정화도의 HAp 회절패턴을 관찰할 수 있었다. 본 연구에서는 공침분말의 Ca/P 몰비율이 1.602로 공침법에 의해 합성된 HAp 분말 합성의 경우에는 이론적인 Ca/P 몰비율이 1.67보다 적어도 공침분말은 HAp 회절 패턴을 나타낸다는 앞선 연구결과와 일치한다[15]. 공침분말을 1000°C 열처리 한 후 생성된 분말의 X-선 회절패턴은 Fig. 1(b)에서 같이, 2 θ 에서 X-선 회절된 피크와 d-spacing 값을 보면 모든

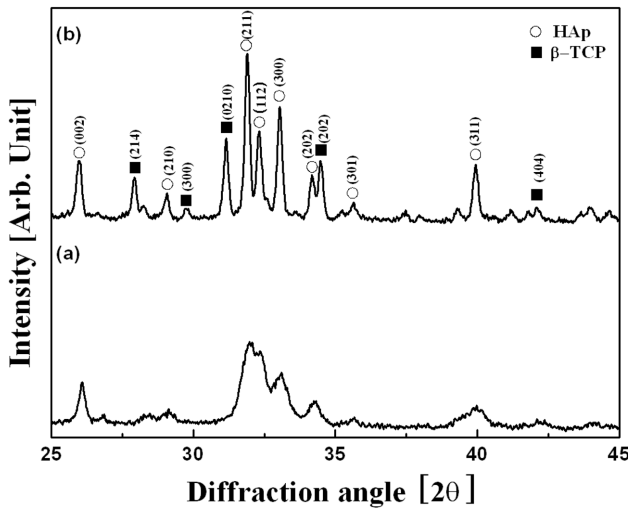


Fig. 1. XRD patterns of BCP powders; (a) as-synthesized, (b) as-calcined.

샘플에서 JCPDS #74-0566의 HAp의 (211)면과 JCPDS #09-0169의 β -TCP의 (0210)면이 나타남을 관찰할 수 있었다. 측정된 X-선 회절패턴 결과를 토대로 적분강도 값을 식 (1)에 대입하여 부피 분율을 계산한 결과 본 연구에서 얻고자 하는 HAp/ β -TCP = 60 : 40의 BCP 분말을 얻을 수 있었다.

$$V_{\beta\text{-TCP}} = \frac{I_{\beta\text{-TCP}}}{I_{\beta\text{-TCP}} + I_{\text{HAp}}} \quad (1)$$

Fig. 2는 열처리 전 후 BCP 분말의 구조적 특성을 알아보기 위하여 측정된 FT-IR 결과이다. Fig. 2(a) 열처리 전 FT-IR의 스펙트럼 분석에서 HAp 결정상에서 나타나는 574, 603 그리고 1020~1120 cm^{-1} 의 진동모드에서 PO_4 그룹과 603, 3570 cm^{-1} 의 진동모드에서 OH^- 그룹의 밴드를 관찰할 수 있었다[16]. 이는 앞선 XRD 결과와 같이 공침분말이 낮은 결정화도의 HAp 상을 나타낸다는 것을 보여준다. 또한, 3300~3600 cm^{-1} 의 진동모드

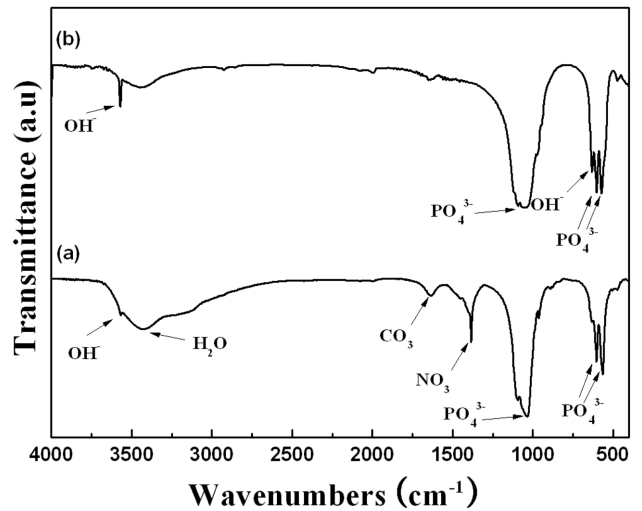


Fig. 2. FT-IR spectra of BCP powders; (a) as-synthesized, (b) as-calcined.

는 수분흡착에 의한 것이며, 1660과 1385 cm^{-1} 의 진동모드는 공침분말에 잔류하는 탄산염과 질산염의 존재로 사료되어진다. Fig. 2(b)의 열처리 후 FT-IR의 스펙트럼은 전체적으로 PO_4^{3-} 와 OH^- 그룹에 해당하는 632와 3570 cm^{-1} 의 진동모드를 관찰할 수 있었다. 이는 열처리 후 BCP 분말이 HAp와 β -TCP의 혼재된 상이 나타나는 XRD 결과를 뒷받침 해주는 결과로 판단되어진다.

열처리 전 후의 합성 분말의 형상을 SEM을 통해 관찰한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3(a)의 공침분말의 경우 입자의 크기가 작으며 그 형상이 휘스커 타입에 가까운 반면, Fig. 3(b)의 열처리 후 분말은 입자의 크기가 크며, 열처리에 의해 입자간의 응집 경향을 나타내었다.

생성된 BCP 분말의 생체활성 거동을 평가하기 위해 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적 후 시간에 따른 표면의 형상 변화를 관찰한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a)의 침적 1주 후 미세하게나마 표면이 분해되는 형상을 관찰할 수 있었으며, Fig. 4(b)의 침적

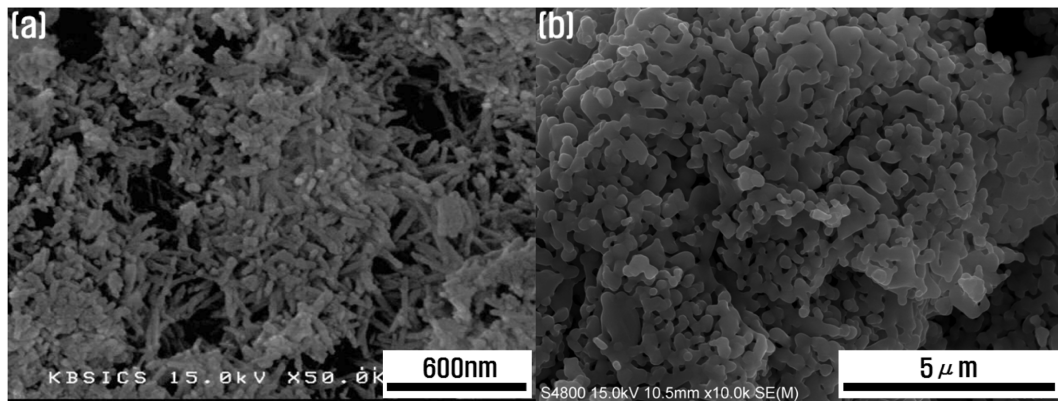


Fig. 3. SEM micrographs of BCP powders; (a) as-synthesized, (b) as-calcined.

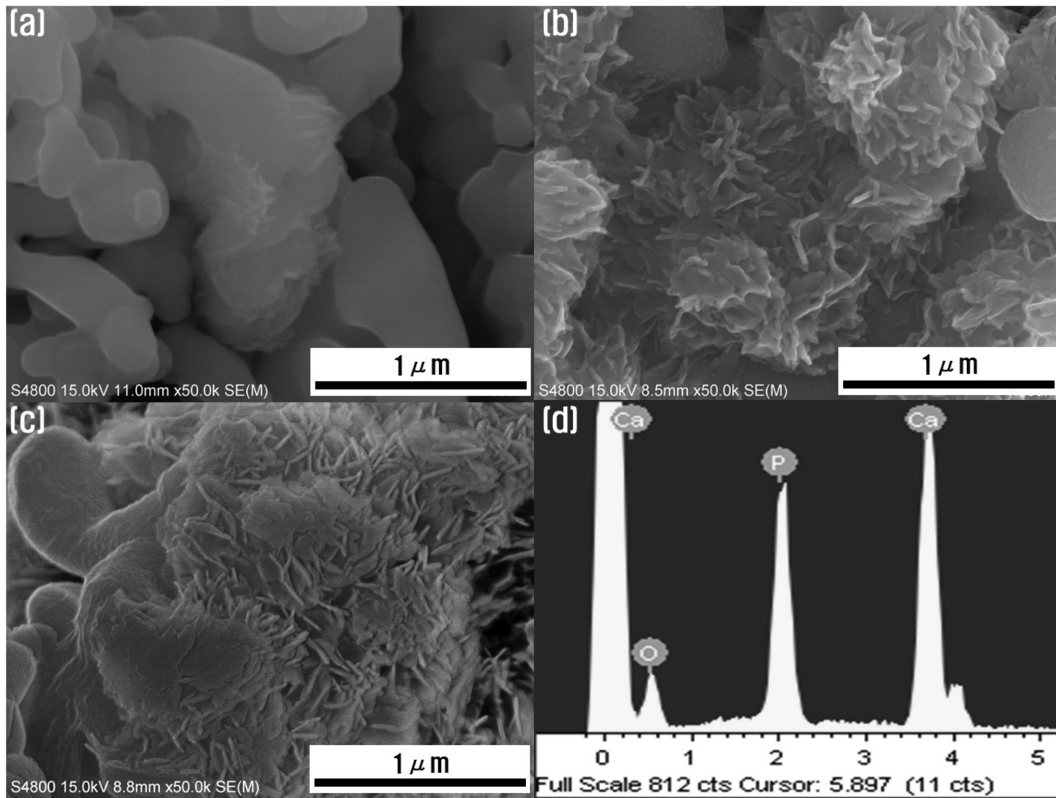


Fig. 4. SEM morphologies of BCP powders after immersion in HBSS for (a) 1, (b) 2, and (c) 3 weeks, (d) EDS of (c).

2주 후 BCP 표면에 새로 생성되는 입자의 형상을 관찰할 수 있었다. 침적 3주 후 BCP 표면(Fig. 4(c))에 낮은 결정화도의 HAp로 보이는 휘스커 타입의 입자가 형성됨을 관찰하였고, EDS 결과 Ca와 P 원소가 검출되었다. HBSS 침적 후 생성되는 입자의 존재를 확인하기 위하여 침적 후 HBSS 용액의 농도를 ICP-AES 측정된 결과(Fig. 5), 초기의 농도를 기준으로 하여 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 의 이온농도가 시간에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 HBSS 용액 내의 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 이온이 BCP 분말

의 표면에 낮은 결정화도의 HAp를 생성시킨 결과로 사료되어 진다. 이를 통해 Fig. 4의 SEM 관찰에서 나타난 표면의 입자 생성은 낮은 결정화도의 HAp의 형상이라고 뒷받침 할 수 있다. Fig. 6의 HBSS 침적 후 분말의 X선 회절 패턴을 관찰한 결과, 침적 시간에 따라 HAp의 FWHM을 계산한 결과 (a) 0.141, (b) 0.153, (c) 0.165 degree로 나타나 결정성이 감소하는 경향을 나타내었다. β -TCP의 결정성 감소는 β -TCP의 분해에 의한

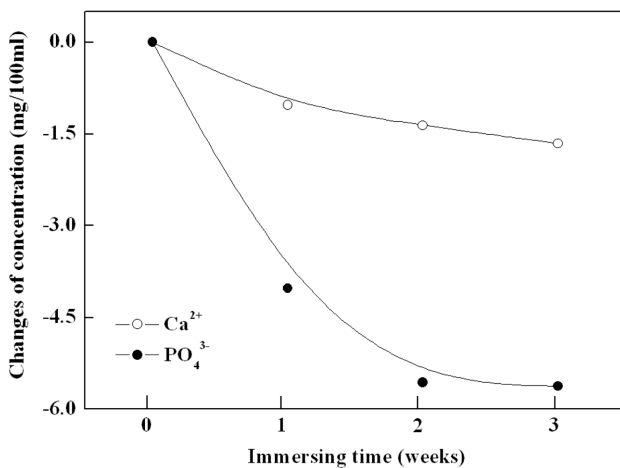


Fig. 5. Changes of Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions concentrations in HBSS immersed with BCP powder with 3 weeks.

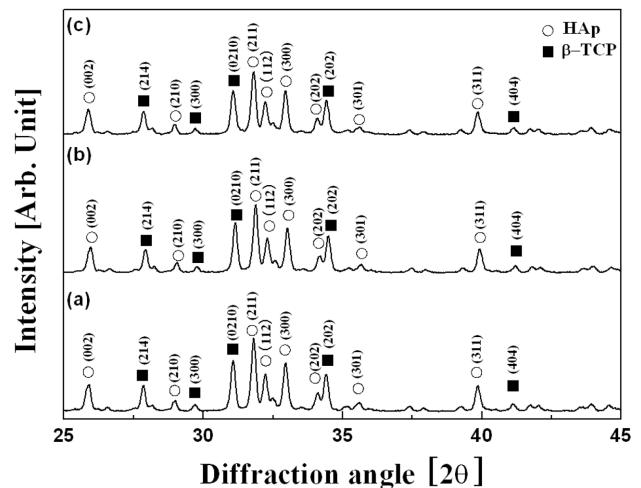


Fig. 6. XRD patterns of BCP powders after immersion in HBSS for (a) 1, (b) 2, and (c) 3 weeks.

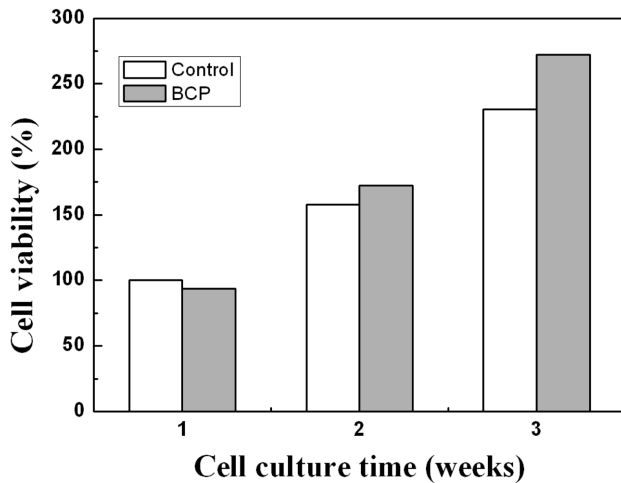


Fig. 7. Effect of BCP powders on cell viability in human osteosarcoma MG-63 cells.

결과로, HAp의 결정성 감소는 BCP 분말 표면에 형성되는 낮은 결정화도의 HAp의 결과로 사료되어진다. 또한 ICP 결과에서 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 이온의 농도가 증가하지 않고 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 β -TCP의 빠른 분해에 의해서 이온의 농도가 증가하여 생성되는 낮은 결정화도의 HAp가 시간에 따라 증가한 것으로 판단할 수 있는 반응의 속도론적인 결론은 도출할 수 없으나 BCP 분말이 유사체액 내에서의 생체활성 거동이 증가하는 사실은 확인할 수 있었다. 이는 Fig. 6의 X-선 회절 패턴의 결과에서도 침적 후 β -TCP의 회절 패턴을 확인할 수 있는 바, 위 사실을 뒷받침해주는 근거로 사료되어진다.

Fig. 7은 BCP 분말의 MTT assay 결과이다. DMEM 배지에 BCP 분말을 첨가하지 않은 샘플을 대조군으로 설정하여 BCP 분말을 첨가한 샘플과의 MG-63 세포의 성장률을 비교하여 나타내었다. 대조군의 1주 후 세포 성장률을 100% 기준으로 하여 나타낸 그래프에서 초기 1주 후 세포 성장률이 BCP 분말의 경우 감소하는 경향을 보이나 이는 생물학적으로 세포의 괴사가 일어나는 수준은 아닌 것으로 판단되어지며, 시간이 증가할수록 대조군에 비해 세포의 성장률이 증가하는 경향을 나타내어 생물학적으로 BCP 분말의 적용에 문제가 없음을 나타내 주는 결과로 사료되어진다.

이상의 결과로 BCP 조직이 유사체액 내에서의 생체활성을 가지는 것으로 판단할 수 있으며, 세포독성 평가에서도 대조군과 비교하여 생물학적 특성이 우수한 것으로 판단할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 HAp/ β -TCP의 비율이 60:40인 분말

을 공침법을 이용하여 합성하였다. 합성된 분말의 열처리 전 후의 X-선 회절 패턴과 FT-IR의 분광학적 특성을 관찰한 결과 Ca/P 비율이 1.602로 조절하여 HAp와 β -TCP상이 혼재된 BCP 조직을 확인하였다, 생체활성 거동을 평가하고자 HBSS에 침적 후 표면의 형상 변화를 관찰한 결과, 침적 3주 후 낮은 결정화도의 HAp의 존재를 확인하였다. 침적 시간에 따른 이온 농도의 변화에 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 이온의 농도의 감소와 침적 후 시간에 따른 BCP 분말의 X-선 회절 패턴에서도 HAp 및 β -TCP의 결정성이 감소하는 경향은 이를 뒷받침 하는 결과로 판단되어진다. 또한 세포독성 평가에서도 대조군에 비하여 세포의 성장률이 증가함으로써 BCP 분말이 생체 내에서 적용될 경우 생체활성을 증가시킬 수 있을 것으로 판단되어진다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유 과제 학술 연구비(2년)에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- [1] M. Jarcho, "Biological aspects of calcium phosphates: Properties and applications", *Dent. Clin. North. Am.* 30 (1986) 25.
- [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] L.L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 1705.
- [4] C.P.A.T. Klein, A.A. Driessen, K. de Groot and A. van den Hooff, "Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue", *J. Biomed. Mater. Res. A* 17 (1983) 769.
- [5] D. Buser, B. Hoffmann, J.P. Bernard, et al., "Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs", *Clin. Oral. Implants. Res.* 9 (1998) 137.
- [6] J.M. Bouler, R.Z. LeGeros and G. Daculsi, "Biphasic calcium phosphates: Influence of three synthesis parameters on the HA/ β -TCP ratio", *J. Biomed. Mater. Res. A* 51 (2000) 680.
- [7] M. Jarcho, "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetic", *Clin. Orthop. Relat. Res.* 157 (1981) 259.
- [8] R.Z. LeGeros, S. Lin, R. Rohanzadeh, D. Mijares and J.P. LeGeros, "Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 201.
- [9] H.S. Lee, T.W. Kim, D.H. Kim, H.C. Park and S.Y. Yoon, "Suitability evaluation of magnesium substituted biphasic calcium phosphates prepared by coprecipita-

- tion method”, *J. Kor. Cry. Grow. Cry. Tech.* 20 (2010) 237.
- [10] C.W. Song, T.W. Kim, D.H. Kim, H.C. Park and S.Y. Yoon, “Synthesis and characterization of silicon ion substituted biphasic calcium phosphate”, *J. Kor. Cry. Grow. Cry. Tech.* 20 (2010) 243.
- [11] N. Kivrak and A.C. Tas, “Synthesis of calcium hydroxyapatite-tri calcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior”, *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 2245.
- [12] S.V. Dorozhkin and M. Epple, “Biological and medical significance of calcium phosphates”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 3130.
- [13] J. Pena and M. Vallet-Regi, “Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique”, *J. Euro. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1687.
- [14] M. Vallet-Regi, “Ceramics for medical applications”, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* (2001) 97.
- [15] S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J. Lee, S.C. Chung and Y.H. Kim, “Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors”, *Biomaterials* 24 (2003) 1389.
- [16] S. Kannan, I.A.F. Lemos, J.H.G. Rocha and J.M.F. Ferreira, “Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios”, *J. Solid. State. Chem.* 178 (2005) 3190.