Synthesis and bioactivity evaluation of metal ion-substitution biphasic calcium phosphate for bone defect reconstruction

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

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

*Echo Composite Materials Center, Korea Institute of Ceramic Engineering and Technology, Seoul 153-801, Korea

(Received October 8, 2012)

(Revised November 14, 2012)

(Accepted November 23, 2012)

Abstract The co-precipitation technique has been applied to synthesize Biphasic Calcium Phosphate (BCP), Mg-BCP and Si-BCP. X-ray diffraction (XRD) and Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy were used to characterize the structure of synthesized BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders. The results have shown that BCP and substitution of magnesium and silicon in the calcium deficient apatites revealed the formation of biphasic mixtures of Hydroxyapatite (HAp)/ β -Tricalcium phosphate (β -TCP) ratios after heating at 1000°C. Ionic substituted BCP is able to develop a new apatite phase on the surface in contact with physiological fluids faster than BCP does. An MTT assay indicated that BCP, Mg-BCP, and Si-BCP powders had no cytotoxic effects on MG-63 cells, and that they have good biocompatibility.

Key words Biphasic calcium phosphate, Ionic-substituted, Magnesium, Silicon, Co-precipitation

골결손부 재건을 위한 금속 이온 치환 이상인산칼슘 합성 및 생체 활성 평가

김태완, 김동현, 진형호, 이승호*, 박흥채, 윤석영[†]

부산대학교 재료공학부, 부산, 609-735

*한국세라믹기술원 에코복합소재센터, 서울, 153-801

(2012년 10월 8일 접수)

(2012년 11월 14일 심사완료)

(2012년 11월 23일 게재확정)

요약 BCP, Mg-BCP, Si-BCP 분말을 공침법(co-precipitation process)을 이용하여 합성하였다. 제조된 분말을 X-선 회절 분석(XRD), 적외선분광분석(FTIR)을 이용하여 특성을 분석하였다. Ca/P 몰 비율이 1.602인 칼슘 결손 아파타이트 공침 물을 제조하여 1000°C 열처리 과정을 통하여 HAp와 β -TCP 상이 혼재된 BCP, Mg-BCP, Si-BCP를 합성할 수 있었다. 제조된 분말의 생체활성 거동을 평가하기 위하여 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적시켜 시간에 따라 형상의 변화 및 결정상을 분석한 결과, BCP 분말에 비하여 금속 이온이 치환된 BCP 분말에서 빠른 생체활성을 관찰할 수 있었다. MTT assay를 통한 세포 성장을 평가에서도 모든 분말에서 시간 경과에 따라 독성을 나타내지 않았으며, 세포의 활성이 증가하였다.

1. 서론

칼슘 인산염 기반의 재료들은 그들의 우수한 생체적합성(biocompatibility), 생체활성(bioactivity) 및 골전도(osteoconduction) 특성으로 인하여 치과 및 정형외과 영역에 있어 골 재건을 위한 뼈 이식 대체재로서 많은 주목을

받아 오고 있다[1-4]. 특히, 가장 널리 사용되는 인산칼슘계 세라믹은 수산화아파타이트[HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]와 β -삼인산칼슘[β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]이다. 이들 물질은 각각의 생물학적 특성이 우수함에도 불구하고, 임상 시 생체 활성이 저하되는 단점이 존재한다. 기존의 *in vitro*, *in vivo* 관련 연구에서 HAp는 체내 이식 후에 낮은 분해능으로 인하여 최적의 골조직을 생성하기에는 한계를 나타내는 것으로 알려져 있다[5, 6]. 이에 반해, β -TCP는 생체 내 체액에 노출되면 분해성으로 인하여 Ca^{2+} 과 PO_4^{3-} 이 빠르게 방출되어 골세포 증식을 위한 골격을 제공할

[†]Corresponding author

Tel: +82-51-510-2487

Fax: +82-51-512-0528

E-mail: syy3@pusan.ac.kr

수 없어, 임상 적용에 한계를 나타낸다고 보고되어 있다 [7, 8]. 따라서 HAp의 비분해성과 β -TCP의 분해성을 적절히 혼합하여 골전도성 유지 및 재료의 흡수성을 조절한 이상인삼칼슘(Biphasic Calcium Phosphate; BCP)이 골이식 재료로서 제안되었다[9]. BCP는 HAp/ β -TCP의 비율을 조절함으로써 생체활성과 생분해성을 조절할 수 있으나, 생체 내에서 최적의 골전도성을 나타내기 위한 HAp/ β -TCP의 비율은 아직 명확히 제시되어 있지는 않은 실정이다.

또한, 인산칼슘계 세라믹은 금속 이온이 쉽게 치환될 수 있는 구조를 가지고 있으며, 인체 이식 후 인산칼슘계 세라믹 내에 치환된 이온 성분이 골 조직과의 작용에 의해 골 형성을 촉진한다고 보고되고 있다[10, 11]. 이러한 이온이 첨가된 인산칼슘에서 이온의 종류 및 치환 농도는 wt%에서 ppm 단위까지 다양하다[12, 13]. 이러한 이온의 종류나 치환되는 양에 따른 골 조직 내에서의 역할에 대한 연구는 아직 충분하지 못한 실정이며, 이온 성분들이 골 조직 내에서 생체 내 화학적 거동에 영향을 미치는 것으로 받아들여지고 있다[14]. 이러한 이온들 중 Si 이온은 뼈 성장에 있어 생물학적으로 필수적인 요소이며, Si 이온이 첨가된 인산칼슘계 생체재료는 생체 활성을 향상시키는 것으로 알려져 있다[15]. Mg 이온은 인체 내에서 조골세포(osteoblast)의 증식을 자극하여 뼈 형성 초기 단계에 중요한 역할을 제공하는 것으로 알려져 있다[16, 17].

본 연구에서는 현재 치과용 골이식재로 사용되고 있는 프랑스 Biomatlante社의 MBCP를 벤치마킹하여 생체활성 소재인 HAp와 분해성 소재인 β -TCP가 60:40의 비율로 혼합된 이상인삼칼슘(Biphasic Calcium Phosphate; BCP)분말을 공침법을 이용하여 합성하였다. 또한, 이상인삼칼슘 구조 내에 Mg 이온과 Si 이온을 각각 치환하여 이온 치환에 따른 BCP의 물리적, 화학적 특성을 평가하고, 제조된 BCP 분말의 생체재료로서의 적용가능성을 평가하였다.

2. 실험방법

BCP 분말을 합성하기 위하여 Ca 공급원으로 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Katayama chemical)를 사용하고, P 공급원으로 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Junsei chemical)를 사용하였다. pH 조절을 위하여 약염기성 물질인 NH_3 (Junsei chemical)를 사용하였다. BCP 조직 내에 Mg 및 Si 이온을 치환하기 위하여 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Junsei chemical)와 $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS)(Sigma-Aldrich)를 출발물질로 사용하였다.

BCP 분말을 제조하기 위하여 Ca/P 몰 비율을 1.602로 고정하여 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 각각 용

해시켜 수용액을 제조하였다. Mg-BCP 분말을 제조하기 위하여 (Ca + Mg)/P를 1.602로 고정하여 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 1.0 wt% 첨가하여 수용액을 제조한 후 제조된 용액에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 각각 첨가하였다. Si-BCP 분말을 제조하기 위하여 Ca/(P + Si)의 몰 비율을 1.602로 고정하여 TEOS를 3 wt% 첨가하여 가수분해 시키고, 가수분해 된 수용액에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 각각 첨가하였다. 각각의 제조된 수용액에 NH_3 를 첨가하여 pH를 11로 조절하였다. 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 2시간동안 열처리 하였다. 열처리 후 분말을 400 mesh 체가름하였다.

제조된 BCP, Mg-BCP, Si-BCP 분말의 열처리 전 후의 결정상 변화를 관찰하기 위해 X선 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, 측정범위는 25°~45°(2 θ)이었다. 열처리에 따른 탈수 축합 거동을 분석하기 위하여 주파수 400-4000 cm^{-1} 범위에서 FT-IR(Nicolet Magna IR 560, USA) 측정하였다.

제조된 분말의 생체활성 거동을 비교 평가하기 위해 제조한 분말을 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS; Sigma-Aldrich)에서 1주, 2주, 3주간 36.5°C의 인큐베이터에서 침적 테스트하였으며, 일정한 이온 농도를 유지하기 위하여 HBSS를 2일마다 교환해주었다. HBSS 침적 후의 시간에 따른 표면 형상의 변화 및 표면의 결정성 변화를 XRD 및 SEM을 통하여 관찰하였다. 합성한 분말의 세포와의 친화력을 비교 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)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.

Fig. 1. XRD patterns of the as-synthesized BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders.

3. 결과 및 고찰

BCP 및 이온이 치환된 BCP 공침 분말의 X-선 회절 패턴 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이온 치환 유무에 관계없이 모든 샘플의 공침 분말은 저결정성 HAp 회절 패턴을 나타내었다. 상대적으로 이온이 치환된 BCP 분말의 경우 BCP 분말에 비해 이온의 치환에 따른 영향으로 결정성이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 이전의 연구 결과들에서 습식법을 이용한 아파타이트 합성 시 전형적으로 나타나는 저결정 패턴이며[18], 공침법에 의한 HAp 분말 합성의 경우에 Ca/P 몰비율이 1.67 보다 적어도 공침분말은 HAp 회절 패턴을 나타낸다는 앞선 연구결과와 일치한다[19]. 일반적으로 칼슘 결손 아파타이트[d-HAp, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$]의 경우 Ca/P 몰 비율이 1.5에서 1.67의 다양한 조성의 HAp와 β -TCP의 혼합상을 형성시킬 수 있으며(Eq. 1) 열처리 과정을 통하여 700°C 부근부터 이상(biphasic) 조적이 나타난다[20, 21].

Si-BCP 공침 분말의 경우 Mg-BCP 분말과 BCP 분말에 비하여 전체적으로 저결정성 HAp의 주피크가 저각으로 이동하였는데, 이는 Si 이온의 경우 양이온인 Ca 이온과의 치환 거동이 아닌 음이온인 PO_4 이온과의 치환거동 때문인 것으로 사료되어진다.

공침분말을 1000°C 열처리한 후 생성된 BCP, Mg-BCP, Si-BCP 분말의 X-선 회절 패턴을 Fig. 2에 나타내었다. 각각의 분말에서 β -TCP의 (0210)면(JCPDS #09-0169)과 HAp의 (211)면(JCPDS #74-0566)이 나타남을

Fig. 2. XRD patterns of the calcined BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders.

관찰할 수 있었다. 측정된 X-선 회절패턴 결과를 BCP 분말의 적분강도 값을 (Eq. 2)에 대입하여 부피 분율(RIR: Relative Intensity Ratio)을 계산한 결과 본 연구에서 얻고자 하는 HAp/ β -TCP = 60 : 40의 BCP 분말을 얻을 수 있었다.

$$\text{RIR} = \frac{I_{\beta\text{-TCP}}}{I_{\text{HAp}} + I_{\beta\text{-TCP}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Mg 이온이 치환된 BCP 분말의 경우 β -TCP의 (0210)면의 회절패턴이 Mg 이온의 치환으로 인하여 이동하는 현상을 관찰할 수 있다. 이는 Mg 이온의 치환이 β -TCP에서 우선적으로 이루어지고, Ca의 이온반경이 $\sim 0.99 \text{ \AA}$ 이며, Mg의 이온반경이 $\sim 0.65 \text{ \AA}$ 으로 이들 이온의 이온반경의 차이에 의하여 β -TCP의 주피크의 2θ가 이동하는 것으로 사료되어진다[22, 23]. 측정된 X-선 회절패턴 결과를 토대로 적분강도 값을 (Eq. 2)에 대입하여 부피 분율을 계산한 결과 Mg가 치환된 경우 이론적인 HAp/ β -TCP = 60 : 40의 비율에서 벗어나 Mg 이온의 치환으로 인하여 β -TCP의 양이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 HAp에 Mg 이온이 치환된 메커니즘을 통하여 설명이 가능할 것으로 판단되어진다[24].

(Eq. 3)에 의하면, Mg 이온이 HAp에 치환되면 Mg 이온의 영향으로 HAp가 아닌 β -TCP에서 먼저 치환이 일어나게 된다. Mg^{2+} 의 이온반경이 Ca^{2+} 의 이온반경에 비하여 작기 때문에 이온화 에너지에 의한 결합력이 증가한다. 이로 인해 이온결합인 Mg^{2+} 양이온과 PO_4^{3-} 음이온의 결합력이 증가하여 OH^- 결합을 상대적으로 배제

하여 마그네슘의 첨가량이 증가할수록 β -TCP의 비율이 증가하는 것으로 판단되어진다.

Si 이온이 치환된 BCP 분말의 경우 Si 이온의 치환에 의해 HAp의 (211)면과 β -TCP의 (0210)면의 회절강도가 감소하는 경향을 나타내는데, 이는 Si 치환으로 인하여 상대적으로 인산염 결손이 나타나서 생기는 현상으로 사료되어진다. 또한, β -TCP의 (0210)면의 회절패턴이 Si가 치환됨으로써 이동하는 현상을 관찰할 수 있다. 이는 Si-O간의 원자간 거리가 1.66 Å이며, P-O간의 원자간 거리가 1.57 Å으로 결합 원자간 거리의 차이로 인하여 나타나는 현상으로 사료되어진다. 인산염의 대체로 Si 이온이 치환된 다른 연구결과에 의하면 Si 이온 치환에 따라 원자간 거리 차이로 인하여 단위격자의 부피가 증가하여 회절패턴이 이동하는 현상이 나타나고, 아파타이트 구조의 안정성을 감소시켜 생체활성을 높일 수 있다고 한다[23]. 또한, 측정된 X-선 회절패턴 결과를 토대로 적분강도 값을 (Eq. 2)에 대입하여 부피 분율을 계산한 결과 Si 이온이 치환된 경우 이론적인 HAp/ β -TCP = 60 : 40의 비율과 정확히 일치하는 결과를 얻지 못하였다. 이러한 경향은 HAp에 인산염을 대신하여 규산염이 치환된 메커니즘을 통하여 설명이 가능할 것으로 판단되어진다[15].

(Eq. 4)에 의하며, 규산염의 치환은 Ca^{2+} 와 O^{2-} 의 양을 증가시켜 이온의 불균형을 일으켜, 이론적인 결과 값과 실험에 의해 측정된 결과 값에 차이를 보인다. 이러한 결과는 BCP에 Si 이온이 치환된 다른 연구결과와 일치한다[25, 26].

BCP, Mg-BCP, Si-BCP 공침분말의 FTIR 결과를 Fig.

Fig. 3. FTIR spectra of as-synthesized BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders.

Fig. 4. FTIR spectra of calcined BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders.

3에 나타내었다. 모든 공침 분말에서 574, 603 그리고 1020~1120 cm^{-1} 의 진동모드에서 PO_4 그룹과 603, 3570 cm^{-1} 의 진동모드에서 OH^- 그룹의 HAp 상을 관찰할 수 있었다[27]. 이는 앞에서 언급한 X-선 회절분석에서 얻어진 저결정성 HAp를 나타내는 것을 뒷받침 하는 결과라고 판단되어진다. 또한, 3300~3600 cm^{-1} 의 진동모드는 수분흡착에 의한 것이며, 1660과 1385 cm^{-1} 의 진동모드는 공침분말에 잔류하는 탄산염과 질산염의 존재로 사료되어진다.

Fig. 4의 열처리 후 FTIR의 스펙트럼은 모든 BCP 분말에서 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 X-선 회절 패턴 결과를 뒷받침 해주는 결과로 판단되어진다. Mg 이온이 치환된 경우 OH^- 그룹의 진동모드가 감소하고, PO_4^{3-} 의 진동모드의 강도가 약해지는 경향을 나타내었다. 이러한 경향은 습식공정을 이용한 인산칼슘 합성 시 Mg 이온의 치환에 따라 HPO_4^{2-} 의 증가로 나타나는 현상으로 판단되어진다. Si 이온이 치환된 BCP 분말 역시 OH^- 그룹의 진동모드가 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 인산칼슘 구조에 Si가 치환되면 PO_4^{3-} 가 SiO_4^{4-} 로 전환되어 나타나는 결과로 다음의 메커니즘을 통하여 OH^- 그룹의 감소를 설명할 수 있을 것으로 사료되어진다.

Si 이온이 치환됨으로써 OH^- 그룹의 감소되는 현상은 Eq. 5에서와 같이 PO_4^{3-} 와 OH^- 의 결합에 의해 V_{OH} 가 증가하고, SiO_4^{4-} 가 생성되기 때문이다. 생성되는 SiO_4^{4-} 이온은 SiO_4 사면체 구조에서 기인하며, 이러한 SiO_4^{4-} 가

Fig. 5. SEM micrographs of calcined BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders after immersion in HBSS for 1, 2 and 3 weeks.

세라믹재료에 도입되면 표면의 전하를 감소시키게 되어 생물학적인 반응에 영향을 주는 것으로 사료되어진다 [25].

제조된 BCP, Mg-BCP, Si-BCP 분말의 생체 적용 가능성을 평가하기 위하여 의사체액의 일종인 Hanks' Balanced Salt Solution(HBSS)에 침적 시킨 후 시간에 따른 표면의 형상 변화를 관찰한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 침적 1주 후 BCP 분말과 비교하여 Mg-BCP, Si-BCP 분말의 표면에서는 활성이 일어나 휘스커 타입의 입자가 생성됨을 관찰할 수 있었다. BCP 분말의 경우 침적 2주 후부터 표면에 활성이 나타나 휘스커 타입의 입자가 생성되며, 3주 후 표면 전체로 확산이 일어나는 경향을 나타내었다. Mg-BCP 분말의 경우 침적 3주 후 표면에 새로 생성된 휘스커 타입의 입자가 커지는 경향을 나타내며, Si-BCP 분말은 침적 3주 후 표면에 생성된 입자가 판상의 형태에 가까워지는 경향을 나타내었다. Fig. 6의 침적 3주 후 분말의 X선 회절 패턴의 결과를 관찰하면, BCP 분말에 비하여 Mg-BCP 분말의 경우 상대적으로 β -TCP와 HAp의 피크가 감소하는 경향을 나타내는데 이는 Mg 이온 자체의 우수한 생체활성과 Mg 이온이 인산칼슘 내에서 Ca 이온과의 치환 거동에 의해 생체활성을 증가시킨 것이며 β -TCP의 분해에 의한 결과는 아닌 것으로 사료된다. Si-BCP 분말의 경

Fig. 6. XRD patterns of BCP, Mg-BCP and Si-BCP powders after immersion in HBSS for 3 weeks.

우 침적 3주 후 두 분말과 달리 β -TCP 피크는 사라지고 HAp 피크만 남아있는 현상을 관찰할 수 있다. 이는 Si 이온이 인산칼슘 조직에 치환될 경우 앞서 설명한 바와 같이 구조적 안정성을 감소시켜 β -TCP의 빠른 분해를 일으킨 것으로 사료되어진다[28, 29]. BCP 분말의 경우 이온이 치환된 BCP 분말에 비하여 의사체액 내에서의 활성화 속도는 늦으나 생체활성을 나타내는데 이는

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

앞선 연구결과의 의사체액 내에서의 이온 농도 변화에 따르면, 침적 시간이 길어짐에 따라 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 의 이온 농도가 감소하여 분말의 표면에서 Ca^{2+} 와 PO_4^{3-} 이온이 용출되어 인산칼슘염의 핵생성을 촉진시키는 것으로 판단되어진다[30-32].

Fig. 7은 제조된 BCP 분말의 MTT assay 결과이다. DMEM 배지에 BCP, Mg-BCP, Si-BCP 분말을 첨가하여 MG-63 세포의 성장률을 비교하여 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) 검출기(Wallac 1420, USA)를 통해 570 nm에서 흡광도를 측정한 결과를 나타내었다. 1주 후 BCP 분말에 비하여 이온이 첨가된 BCP분말의 세포의 성장률이 높으며, 또한 Mg-BCP 분말의 의 경우 Si-BCP 분말의 세포 성장률과 비교하여 높은 것으로 나타나며, 세포 실험 3주 후 두 샘플의 차이는 상대적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 HBSS 침적 후 BCP 표면의 생체활성 결과에서와 같이, BCP에 비하여 이온이 치환된 BCP 분말이 침적 후 저결정성 휘스커 타입의 HAp 생성이 빠르게 일어나 생체활성이 우수해지는 것과 같은 결과로 사료되어진다. BCP 분말 또한 앞선 연구결과의 대조군에 비하여 세포활성이 우수함을 나타내었다[32].

4. 결 론

본 연구에서는 생체활성 소재인 HAp와 분해성 소재인 β -TCP가 이상(biphasic)으로 존재하는 BCP 분말과 BCP 조직 내에 생체 활성을 향상 시키는 Mg 이온과, Si 이온을 각각 치환하여 Si-BCP, Mg-BCP 분말을 공침법을 이용하여 합성하였다. 합성된 분말의 X선 회절 분석 및 적외선 분광분석을 실시하고, HBSS에 침적시켜 시간에 따른 BCP분말의 표면 활성 및 결정상 변화를

비교 분석한 결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

출발물질의 Ca/P 몰 비율을 1.602로 조절하여 HAp/ β -TCP의 비율이 60 : 40으로 혼재된 BCP 분말을 합성하였으며, HBSS에 침적 3주 후 저결정성의 HAp가 생성됨을 확인하였다. Mg 이온이 치환된 BCP 분말의 결정상 분석에서 HAp의 (211)면과 β -TCP의 (0210)면이 나타남을 관찰할 수 있었다. Mg 이온의 치환 시 Mg와 Ca의 이온 반경의 차이로 인한 β -TCP의 (0210)면의 회절패턴이 이동하는 현상을 관찰 할 수 있다. 또한, 인산칼슘에 Mg 이온을 치환할 경우 Mg 이온 자체의 우수한 생체활성으로 인하여 HBSS 침적 1주 후부터 저결정성의 HAp가 생성됨을 관찰하였다. Si 이온이 치환된 BCP 분말의 결정상 분석에서 HAp의 (211)면과 β -TCP의 (0210)면이 나타남을 관찰할 수 있었다. Si 이온 치환에 따라 원자간 거리 차이로 인하여 회절패턴이 이동하는 현상이 나타났으며, 결정상 분석과 분광 분석에서 Si 치환으로 인하여 SiO_4 사면체 구조에서 기인하여 생성되는 SiO_4^{4-} 이온의 존재로 BCP 구조적 안정성이 감소됨을 확인하였다. 이로 인해 HBSS 침적 1주 후부터 저결정성 HAp가 생성됨을 관찰하였다. 또한, 세포 시험 결과에서도 Mg 이온이 치환된 BCP 분말은 Mg 이온 자체의 우수한 생체활성의 결과로, Si 이온이 치환된 BCP 분말은 Si 이온의 치환에 따른 구조적 안정성 감소로 인하여 BCP 분말에 비하여 세포 성장률이 우수하였으며, BCP 분말을 포함하여 금속이온이 치환된 BCP 분말은 생체재료로서 적용이 가능하리라고 판단되어진다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 연구임(20120002219).

참 고 문 헌

- [1] K. de Groot, "Clinical applications of calcium phosphate biomaterials; A review", *Ceram. Int.* 19 (1993) 363.
- [2] M. Jarcho, "Biological aspects of calcium phosphates: properties and applications", *Dent. Clin. North. Am.* 30 (1986) 25.
- [3] R.W. Bucholz, A. Carlton and R.E. Holmes, "Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes", *Orthop. Clin. North. Am.* 18 (1987) 323.
- [4] L.L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.* 81 (1998) 1705.
- [5] C.P.A.T. Klein, A.A. Driessen, K. de Groot and A. van den Hooff, "Biodegradation behavior of various cal-

- cium phosphate materials in bone tissue", *J. Biomed. Mater. Res. A* 17 (1983) 769.
- [6] S.V. Dorozhkin and M. Epple, "Biological and medical significance of calcium phosphates", *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 3130.
- [7] S. Yamada, D. Heyman, J.K. Bouler and G. Daculsi, "Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios", *Biomaterials* 18 (1997) 1037.
- [8] 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.
- [9] M. Jarcho, "Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetic", *Clin. Orthop. Relat. Res.* 157 (1981) 259.
- [10] S.G. Dahl, P. Allain, P.J. Marie, Y. Mauras, G. Boivin, P. Ammann, Y. Tsouderos, P.D. Delmas and C. Christiansen, "Incorporation and distribution of strontium in bone", *Bone* 28 (2001) 446.
- [11] R.S. Lee, M.V. Kayser and S.Y. Ali, "Calcium phosphate microcrystal deposition in the human intervertebral disc", *J. Anat.* 208 (2006) 13.
- [12] N.C. Blumenthal, F. Betts and A.S. Posner, "Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions III. Radiometric studies of the kinetics of precipitation and aging of calcium phosphates", *Calcif. Tissue. Int.* 18 (1975) 81.
- [13] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. Noris Suarez and L. Moro, "Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone", *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 45.
- [14] R.Z. Le Geros, "Calcium phosphates in oral biology and medicine", *Monogr. Oral. Sci.* 15 (1991) 1.
- [15] I.R. Gibson, S.M. Best and W. Bonfield, "Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite", *J. Biomed. Mater. Res. A* 44 (1999) 422.
- [16] K.J. Lilley, U. Gbureck, J.C. Knowles, D.F. Farrar and J.E. Barralet, "Cement from magnesium substituted hydroxyapatite", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 455.
- [17] W.L. Suchanek, K. Byrappa, P. Shuk, R.E. Riman, V.F. Janas and K.S. TenHuisen, "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface", *Biomaterials* 25 (2004) 4647.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] O. Gauthier, J.M. Bouler, E. Aguado, P. Pilet and G. Daculsi, "Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth", *Biomaterials* 19 (1998) 133.
- [21] R.Z. Le Geros, "Calcium phosphates in oral biology and medicine, in: H.M. Myers (Ed.)", *Monographs in Oral Science* Karger Basel 31 (1991).
- [22] M. Palard, E. Champion and S. Foucaud, "Synthesis of silicated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ ", *J. Solid State Chem.* 181 (2008) 1950.
- [23] Th. Leventouri, C.E. Bunaciu and V. Perdikatsis, "Neutron powder diffraction studies of silicon-substituted hydroxyapatite", *Biomaterials* 24 (2003) 4205.
- [24] A. Mortier, J. Lemaitre and P.G. Rouxhet, "Temperature-programmed characterization of synthetic calcium-deficient phosphate apatites", *Thermochimica Acta* 143 (1989) 265.
- [25] S. Gomes, G. Renaudin, A. Mesbah, E. Jallot, C. Bonhomme, F. Babonneau and J.-M. Nedelec, "Thorough analysis of silicon substitution in biphasic calcium phosphate bioceramics: A multi-technique study", *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3264.
- [26] T.W. Kim, D.H. Kim, H.H. Jin, H.S. Lee, H.C. Park and S.Y. Yoon, "Bioactivity behavior of Si and Mg ion-substituted biphasic calcium phosphate powders", *J. Kor. Cry. Grow. Cry. Tech.* 22 (2012) 92.
- [27] 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.
- [28] L.H. Long, L.D. Chen, S.Q. Bai, J. Chang and K.L. Lin, "Preparation of dense β - CaSiO_3 ceramic with high mechanical strength and HAp formation ability in simulated body fluid", *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 1701.
- [29] C.W. Song, T.W. Kim, D.H. Kim, H.H. Jin, K.H. Hwang, J.K. Lee, H.C. Park and S.Y. Yoon, "In situ synthesis of silicon-substituted biphasic calcium phosphate and their performance in vitro", *J. Phys. Chem. Solid.* 73 (2012) 39.
- [30] K.S. TenHuisen and P.W. Brown, "Effects of magnesium on the formation of calcium-deficient hydroxyapatite from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ ", *J. Biomed. Mater. Res.* 36 (1997) 306.
- [31] X. Lu and Y. Leng, "Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid", *Biomaterials* 26 (2005) 1097.
- [32] T.W. Kim, D.H. Kim, H.H. Jin, H.S. Lee, H.C. Park and S.Y. Yoon, "Bioactivity behavior of biphasic calcium phosphate powders prepared by co-precipitation method", *J. Kor. Cry. Grow. Cry. Tech.* 22 (2012) 99.