

생체용 타이타늄 합금의 산화거동 및 세포독성에 관한 연구

광주보건대학 치기공과, 전남대학교 공과대학 신소재공학부*

조 흥 규, 이 도 재*, 이 광 민*, 이 경 구*

【Abstract】

A Study on Oxidation Behavior and Cytotoxicity Test of Ti-10Ta-10Nb Alloy

Hong-Kyu Cho, Doh-Jae Lee*, Kwang-Min Lee*, Kyung-Ku Lee*

Dept. of Dental Laboratory Technology, Kwangju Health College

*Dept. of Metallurgical Engineering, Chonnam National University**

A new Ti-10Ta-10Nb alloy has designed and examined some possibility of forming more passive oxide film by oxidation treatment which is closely related to corrosion resistance and biocompatibility. Ti-6Al-4V and Ti-10Ta-10Nb alloys were prepared by consumable vacuum arc melting and homogenized at 1050°C for 24hours. Alloy specimens were oxidized at the temperature range of 400 to 750°C for 30minutes, and the oxide films on Ti alloys were analysed by optical microscope, SEM, XPS and TGA. Cytotoxicity test was performed in MTT assay treated L929 fibroblast cell culture by indirect method.

It is found out that the oxide film on Ti-10Ta-10Nb alloy is denser and thinner compared to Ti-6Al-4V alloy. The weight gain during the oxidation was increased rapidly at the temperature above 650°C for Ti-6Al-4V alloy and above 700°C for Ti-10Ta-10Nb alloy respectively. It was analysed that the passive film of the Ti alloys consisted of TiO₂ through X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis. It is found out by cytotoxicity test that moderate oxidation treatment lowers cell toxicity, and Ti-10Ta-10Nb alloy showed better result compared to Ti-6Al-4V alloy.

• Key words : Ti-10Ta-10Nb alloy, oxidation, cytotoxicity test

교신 ■ 성명 : 조 흥 규 ■ 전 화 : 062-958-7694 ■ E-mail : hkcho@kjhc.ac.kr
저자 ■ 주 소 : 광주광역시 광산구 신창동 688-3 광주보건대학 치기공과

I. 서론

타이타늄 합금은 비중이 낮고, 어느 생체재료보다 탄성률이 뼈 조직의 것과 유사하며, 표면에 안정한 산화피막인 TiO_2 를 형성하여 체액 중에서 금속이온의 용출이 없으며, 골조직과의 우수한 결합 특성 등 생체적합성이 월등하고, 응력부식 균열이 없다는 장점 때문에 인공관절이나 치과용 임플란트 등의 생체재료로 널리 사용되고 있다(Black & Hastings, 1998; Andreas & Recum, 1999). 생체재료로 사용되는 분야는 정형외과의 경우 고관절, 슬관절, 척추관절 등 인공관절을 비롯해 골절부의 plate, 압박고 나사 등으로 사용되고 있으며, 치과 분야에서도 매식재, 보철물 그리고 교정용 선재 등으로 개발되어 사용되고 있다(Kawahara et al, 1980; Kasemo, 1983; Hobo et al, 1989).

생체용 재료로 초기에 주로 사용된 금속재료는 스테인리스강과 Co-Cr-Mo 합금이었으나 Ni의 독성과 부식 등의 문제가 있었다(정중현 등, 1998). 현재 생체용 재료로 널리 사용되고 있는 타이타늄계 합금으로는 CP Ti, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb 합금 등이 있으며, 이 합금 중 Ti-6Al-4V 합금은 순수 타이타늄에 비해 피로강도가 높으면서도 타이타늄과 유사한 골유착 특성(bioadhesion), 높은 비강도 및 우수한 내식성 때문에 가장 널리 사용되어 왔으나(Petrunko & Anokhin, 1995; Bordji et al, 1996), 최근 합금의 성분원소인 Al과 V의 생체 안정성에 대한 문제가 심각하게 제기되고 있다(Steinemann, 1980; Farrar et al, 1990; Landsberg et al, 1992; Winship, 1992;

Yumoto et al, 1992; Ahmed et al, 1995; Okazaki et al, 1995). Ti-Ta-Nb합금의 경우 세포 독성과 생체 적합성 시험에서 Ti-6Al-4V 합금보다 세포독성에 대한 안정성이 높고, 세포 증식에도 영향이 없는 것으로 보고되었으며(Yoon et al, 2003), 여기에 첨가된 Ta, Nb의 경우 세포독성이 거의 없고, 내 산화성 또한 Ti보다 우수한 것으로 알려져 있다(Okazaki et al, 1998). 최근 생체용 재료로서 많이 사용되는 합금으로서는 세포 독성이 지적되지 않고 β 형 원소가 첨가된 Ti-Nb-Ta-Zr, Ti-Nb-Ta-Sn계 합금이 많이 연구 개발되고 있고, 또한 Nb와 Ta은 고 용점금속과는 달리 전연성이 좋기 때문에 냉간가공이 용이한 특성이 있고, 내식성은 표면에 치밀한 산화막을 피복시킬 경우 대단히 안정적이다.

이에 본 연구에서는 Ti에 세포독성이 보고되지 않은 Nb, Ta을 합금원소로 첨가하여 새로운 타이타늄 합금을 제조하고, 이 합금을 여러 가지 조건으로 공기 중에서 산화하여 산화 거동을 관찰하고, 산화조건이 이 합금의 이온용출 특성과 세포독성 등에 미치는 효과를 조사하여 현재 널리 사용되고 있는 생체용 재료와 비교 검토하였다.

II. 연구방법

실험에 사용된 Ti-6Al-4V, Ti-10Ta-10Nb 합금은 99%이상의 순도를 지닌 각각의 원소를 무게비로 장입하여 소모식 진공 아크용해로(Consumable Vacuum Arc Furnace)에서 VAR(Vacuum Arc Remelting)법으로 제조하

였으며, 균질화처리 및 열간 가공을 거쳐 제조한 시편에 대하여 각각 미세조직, 내식성 및 세포독성에 관한 실험을 수행하였다.

1. 합금제조

시료용 합금을 제조하기 위한 Ti은 판상형태의 ASTM grade 2 CP Ti을 사용하였다. V, Al, Nb은 칩 형태의 시료를 사용하였으며, 고용점 금속인 Ta의 경우 용해를 용이하게 하기 위해 분말형태의 시료를 얇은 박판 형태의 칩으로 성형하여 사용하였다. 이상의 합금원소들은 용해하기 전에 시료 표면의 산화피막과 불순물을 제거하기 위해 5%HF+95%H₂O용액에서 5분간 산세(pickling)한 후 알코올 용액에서 초음파 세척하였다. 시료의 용해는 먼저 장입재료를 비소모성 용해방법으로 용해하여 작은 막대 형태로 만들고, 이들을 접합하여 소모성 전극을 제조한 후 소모성 아크 용해 방법으로 제조하였다. 비소모성 아크로에서는 균일한 합금을 얻기 위하여 -400mmHg의 Ar 분위기하에서 4회 이상 재용해를 실시하였다. 미세조직 관찰을 위한 시험편은 고속정밀 절단기를 이용하여 절단한 후 2000grit의 SiC 연마지까지 단계적으로 습식 연마하고, 최종적으로 1 μ m의 알루미나 분말로 마무리 연마한 후 초음파 세척하였다. 준비된 시편은 Keller's Reagent인 2mlHF+3mlHCl+5mlHNO₃+190mlH₂O의 혼합용액으로 에칭한 후 광학현미경(Japan, Olympus Co., PMG-3)을 이용하여 미세조직을 관찰하였다.

2. TGA실험

온도에 따른 합금의 산화거동을 알아보기 위

해 TGA(Thermogravimetric Analysis, TA Instruments Co., TGA 2950) 열중량분석기를 이용하여 산화에 따른 중량변화를 측정하였다. 시편의 크기는 1×0.5×11mm 이었으며, 공기 중에서 5°C/min.의 승온속도로 800°C까지 가열하였다. 공기의 유속은 1/min.로 일정하게 하였다.

3. 산화 실험

온도 변화에 따른 산화막의 조성과 특성을 알아보기 위해 관상로를 이용하여 400°C, 650°C 및 750°C에서 30분간 등온산화를 실시하였다. 관상노 내에 유입되는 공기 중의 수분은 산화양상에 영향을 미칠 수 있으므로 제올라이트(zeolite)가 충전된 건조탑에 공기를 통과시켜 수분을 제거하였다. 관상노 내 공기 유입량은 약 10/min.의 조건으로 일정하게 하였다. 산화표면의 형상은 주사전자현미경(Phillips, XL30SFEG, FE-SEM)을 이용해 관찰하였다.

4. ESCA 분석

생체용으로 사용되는 재료의 표면특성은 생체 적합성과 깊은 관련이 있으므로 표면의 화학조성, 산화물 형태 및 결합특성을 이해하는 것이 중요하다. 따라서 타이타늄 합금의 표면특성을 전자분광화학분석기(ESCA ; VG Sci. ESCA Lab 200R)을 이용하여 분석하였다.

5. 용출시험

생체용 금속재료는 인체 내에 이식되는 경우 금속이온의 체내 용출로 인해 주위 세포조직에 영향을 미치거나, 장기간 사용에 의해 해리 되는 현상이 발생할 수 있다. 따라서 본 연구에서는

0.9% NaCl, 1% Lactic Acid, 5% HCl 용액에서 시험편을 각각 35일간 침지시킨 후 ICP분석장비(Jobin Yvon, JY 38 plus)를 이용하여 수용액 중에 용출된 금속이온을 정량분석하여 합금의 용출특성을 평가하였다. 이때 산화막이 용출특성에 미치는 영향을 조사하기 위해 650°C에서 30분 산화처리하여 비교하였다. 시험편은 20ml 용량의 바이알(vial)병에 넣고 부식용액을 10ml 채운 후 마개를 닫아 외부로부터의 산소 유입을 차단시켰으며, 시험이 끝난 시험편은 꺼내어 광학현미경(Olympus Co., PMG-3)으로 표면을 관찰하였다.

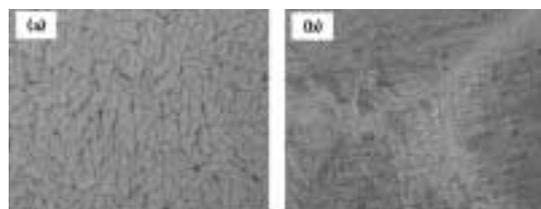
6. 세포독성시험(cytotoxicity test)

본 연구에서는 L929 섬유아세포(fibroblast)의 세포독성을 관찰하였다. 세포는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)을 포함하는 Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)에 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였고 세포가 80% 정도 증식되면 세포수를 측정하였다. 조직배양용 폴리스틸렌접시(96-well plate)의 각 well에 2×10⁴ cell을 분주하고 각 추출 희석액을 100μl 씩 첨가하였다. 이렇게 추출액에 노출한 세포를 37°C, 5% CO₂ 환경에서 48시간동안 배양하였다. 대조군으로는 신선한 배양액에 노출된 L929세포를 이용하였다. 48시간동안 배양된 세포에 Methylthiazoletetrazolium (MTT:Sigma, USA)용액을 처리하고 4시간 동안 동일한 환경에서 배양하였다. 이 과정에서 빛을 차단하여 MTT 처리효과를 증대하고 배양 후 세포배양 상층액을 제거하여 DMSO와 Glycine buffer를 차례로 첨가한 후 570nm의 파장에서

흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 비교 분석하였다.

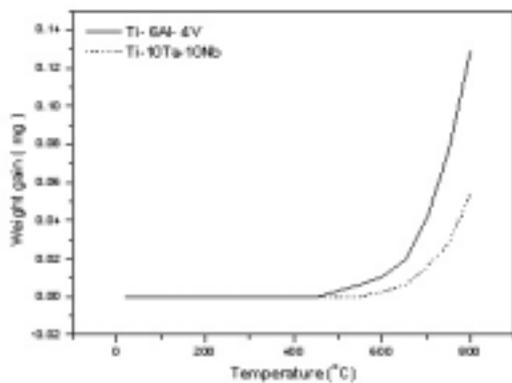
III. 연구결과 및 고찰

〈그림 1〉은 진공 아크 용해법에 의해 제조된 Ti-6Al-4V 합금과 Ti-10Ta-10Nb 합금을 1050°C의 진공분위기중에서 24시간 동안 유지하여 균질화 열처리 한 미세조직 사진이다. 그림 1-(a)의 Ti-6Al-4V 합금의 경우는 등축상 형태의 α상과 그 사이에 β상이 존재하고 있으며, Ti-10Ta-10Nb 합금의 경우(b)에는 β상 안정화 원소인 Ta과 Nb의 영향으로 β상의 기지에 백색의 침상형태인 α상이 미세하게 존재함을 알 수 있다. Ti-6Al-4V 합금은 α+β형 합금이며, 이는 V이 β상 안정화 원소로 작용하기 때문인 것으로 알려져 있다(강현구와 조현기, 1992). 이 합금의 경우 β상 영역으로부터 냉각 속도에 따라 침상과 등축상의 조직이 나타나고, 급냉할 경우에는 침상조직이 나타나며, 압연 후 서냉의 경우에는 등축상의 조직이 나타난다(김연욱과 정종평, 1998).



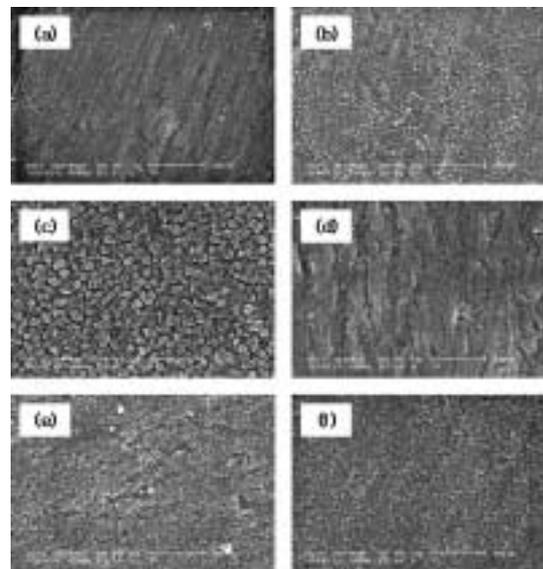
〈Fig. 1〉 Optical microstructures of Ti-6Al-4V(a) and Ti-10Ta-10Nb alloy (b). All specimens were homogenization treatment at 1050°C.

〈그림 2〉는 Ti-6Al-4V 합금 및 Ti-10Ta-10Nb 합금을 5°C/min.의 승온 속도로 공기 중에서 가열하여 TGA 실험을 행한 결과이다. 그림에서 상온으로부터 약 650°C까지는 질량의 변화가 거의 나타나지 않아 두 합금 모두 650°C 이하에서는 산화에 대한 저항성을 지니고 있음을 알 수 있으며, Ti-6Al-4V합금의 경우 650°C 이상에서는 시료의 질량이 급격히 증가하여 급속한 산화가 진행됨을 알 수 있다. 한편 800°C에 이르러서는 Ti-10Ta-10Nb 합금의 중량증가는 0.05g인데 반해 Ti-6Al-4V 합금의 경우는 0.13g으로 두 배 이상의 산화중량증가가 있음을 알 수가 있다. 이와 같은 결과를 통하여 전반적으로 Ti-6Al-4V 합금에 비해 Ti-10Ta-10Nb 합금의 내산화성이 우수함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 Ti-10Ta-10Nb 합금의 경우 내산화성 원소인 Nb가 산화속도를 늦추는 역할을 한 것으로 생각되며, 이는 Peiying(2000)과 Yoshihara(1995)등이 Ti-5Nb의 합금에서 Nb가 첨가됨으로써 산화 중량증가를 감소시킬 수 있다고 제시한 결과와 일치한다.



〈Fig. 2〉 TGA curves of Ti alloys as a function of oxidation temperature.

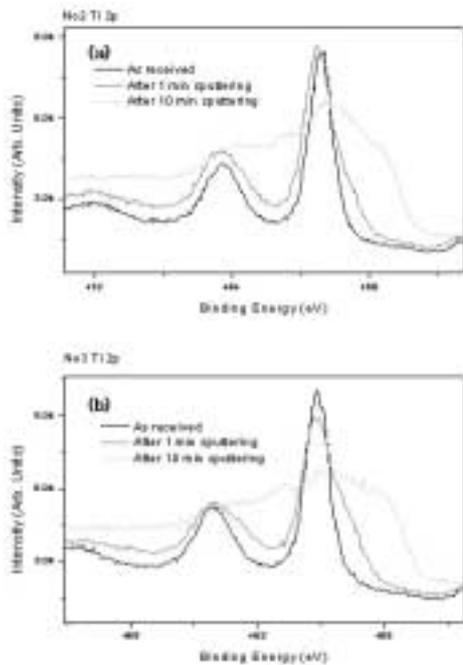
〈그림 3〉은 400°C~750°C의 공기 중에서 30분간 산화시킨 시편 표면의 SEM 사진으로 Ti-6Al-4V합금의 경우 온도가 상승하면서 표면에 생성되는 산화물의 결정립이 성장함을 알 수 있고, 650°C~750°C에서는 급격한 결정립 성장이 나타남을 볼 수 있다. 결정립의 성장은 기지와의 결정차이로 인한 접착강도를 저하시키며, 이러한 결과는 표면 산화층의 보호성도 상실시키는 것으로 알려져 있다. Ti-10Ta-10Nb합금의 경우에도 온도상승에 따른 결정립 성장의 양상이 나타나지만 Ti-6Al-4V합금에 비해 상대적으로 안정하며 650°C~750°C구간에서도 큰 차이를 나타내지 않았다. 사진에서 Ti-6Al-4V합금의 경우 급격한 결정립의 성장은 그림 2의 TGA결과에서 650°C이상에서 급격한 산화가 발생된 것과 일치하며, Ti-10Ta-10Nb합금의 경우에는



〈Fig. 3〉 SEM micrographs of Ti-6Al-4V(a, b, c) and Ti-10Ta-10Nb(d, e, f) alloys oxidized at 400°C(a, d), 550°C(b, e) and 650°C(c, f) for 30 min.

Ta, Nb의 산화저항성에 따라 TGA 결과에서와 같이 표면 산화가 심하게 진행되지 않았음을 알 수 있다.

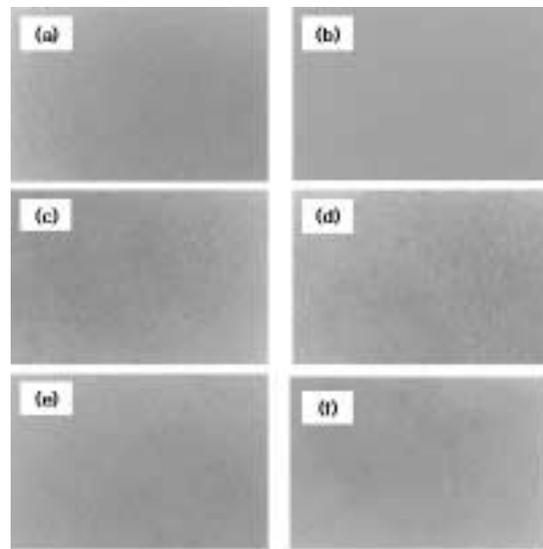
일반적으로 spectra의 형태와 위치의 차이는 원소의 전자결합에너지 차이에 의해 나타나는 것으로 동일한 원소일지라도 화학적 상태에 따라 spectra가 다르게 나타난다. <그림 4>에 나타난 peak은 금속상태일 때의 결합에너지(binding energy(eV))와 차이를 보이고 있는데, 이는 시료 표면에 형성된 Ti가 공기 중의 산소와 결합하여 산화물이 되면서 원자궤도 결합 에너지가 변하였기 때문이다. 일반적으로 Ti이 금속상태일 때의 결합에너지는 454eV며 산화물 상태일 경우에는 TiO가 455eV, TiO₂는 458.9eV로 나타나는데, <그림 4>에 나타난 바와 같이 표



<Fig. 4> The Ti2p Narrow scan results of Ti-6Al-4V alloy(a), and Ti-10Ta-10Nb alloy (b).

면에 형성된 Ti은 결합에너지가 458.7eV로 TiO₂의 산화물 상태임을 알 수 있으며, Ti-6Al-4V 합금에서는 Al₂O₃가, Ti-10Ta-10Nb 합금에서는 Nb₂O₅가 함께 나타났다.

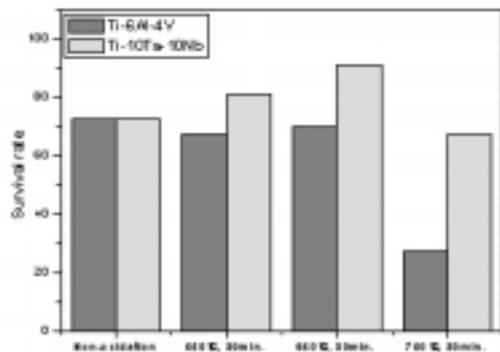
<그림 5>는 Ti-6Al-4V 합금과 Ti-10Ta-10Nb 합금이 생체에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포배양액에 시편 추출액을 노출하여 48 시간 배양한 후 위상차 현미경 (Inverted microscope)을 이용하여 세포의 형태학적 변화를 관찰한 것이다. 그림에서 (a, b)는 control의 경우로 세포자체만을 배양한 것이며, (c, d)와 (e, f)는 각각 650°C와 750°C에서 30분 동안 산화시킨 시편에 배양한 것이다. 그림에서 시편 추출액을 처리하지 않은 대조군의 경우는 활성화되지 않은 구형의 세포양상을 나타내었으며, 두 합금이 모두 유사한 세포형태를 나타내었으나



<Fig. 5> Morphological changes of cells of (a, c, e) Ti-6Al-4V, (b, d, f) Ti-10Ta-10Nb alloy with oxidation condition. (a, b) controlled (c, d) 650°C, 30min. oxidized (e, f) 750°C, 30min. oxidized.

650°C에서 30분 동안 산화시킨 시편들이 가장 활성화된 마름모 및 다각형의 양상을 보였다.

〈그림 6〉은 시편 추출액에 대해 MTT를 처리하여 세포의 Mitochondria Innermembrane에 존재하는 Succinate dehydrogenase의 활성도를 측정하여 세포의 생존율을 비교한 것으로 산화시키지 않은 시편의 경우 두 합금 모두 73%의 생존율을 보였으나 산화 처리를 한 시편에서는 Ti-10Ta-10Nb합금의 경우 그 생존율이 650°C의 산화온도까지는 증가되었으며, 반면에 Ti-6Al-4V 합금의 경우는 산화막을 형성시키면 오히려 그 생존율이 낮아지는 양상을 보여주고 있다. 이상의 연구 결과로부터 Ti-10Ta-10Nb합금에 산화막을 형성시키면 Ti-6Al-4V 합금보다 세포안정성이 높음을 확인 할 수 있었으며, 그 결과 생체 내에 식립되었을 때 골 유착 형성에 유리할 것으로 판단된다.



〈Fig. 6〉 Cytotoxicity of oxidized specimens by MTT assay.

IV. 결 론

현재 생체용 재료로 널리 사용되고 있는 Ti-

6Al-4V합금과 본 연구에서 VAR 법으로 제조한 Ti-10Ta-10Nb합금에 대하여 미세조직, 산화특성, 세포독성을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TGA 분석 결과, Ti-6Al-4V합금은 650°C 이상에서 Ti-10Ta-10Nb합금은 700°C 이상에서 각각 지수적인 산화가 진행되었다.
2. XPS 분석결과, Ti 합금이 공기 중에서 산화에 따른 생성물은 TiO_2 와 Al_2O_3 임을 알 수 있었다.
3. Ti-10Ta-10Nb합금 표면에 산화막을 형성시킨 시편은 Ti-6Al-4V합금 표면에 산화막을 형성시킨 시편보다 낮은 세포독성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- 강형구, 조현기. J of the Korean Inst. of Met. & Mater., Vol. 30, No. 11, 1992.
- 김연옥, 정종평. 인공치근용 CP-Ti 과 Ti 합금의 기계적 성질 및 내식성. J Korean FoundryMmen's Society, Vol. 18, No. 5, 76, 1998.
- 정종현, 백승남, 노 학, 고영무. J Korean Res. Soc. Dent. Mater. Vol. 25, No. 1, 75, 1998.
- Ahmed T, Long M, Silvestri J, Ruiz C and Rack HJ. A new modulus, biocompatible titanium alloy. Titanium 95 science and technology, 2, 1760, 1995.

- Andreas F and von Recum. Handbook of Biomaterials Evaluation. Taylor & Francis, 1, 1991.
- Black J and Hastings G. Handbook of Biomaterial Properties. Chapman & Hall, 135, 1998.
- Bordji K and Jouzeau JY. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. Biomaterials, Vol. 17, No. 9, 929, 1996.
- Farrar G, et al. Defective Gallium-transferrin binding in Alzheimer disease and Down syndrome, possible mechanism for accumulation of aluminum in brain. Lancet, Vol. 335, 747, 1990.
- Hobo S, Ichida E and Garcia LT. Osseointegration and occlusal rehabilitation. Quintessence Int., Tokyo, 1989.
- Kasemo B. Biocompatibility of Titanium implants ; surface science aspects. J. Prosth. Dent., Vol. 49, No. 6, 832, 1983.
- Kawahara H, et al. Single crystal alumina for dental implants and bone screws. J. Biomed. Mater., 14, 597, 1980.
- Landsberg JP, McDonald B and Watt F. Absence of Aluminum in neurotic plaque cores in Alzheimer's disease. Nature (London), Vol. 360, 65, 1992.
- Okazaki Y, Kyo K, Ito Y, Tateishi T. Effect of Mo and Pd on corrosion resistance of V-free titanium alloys for medical implantation. J. Japan Inst. Metals Vol. 59, No. 10, 1061, 1995.
- Okazaki Y, Kyo K, Ito Y, Tateishi T. Biomaterials 19, 1621, 1998.
- Peiyng L, et al. Surface and Coatings Tech. 128-129, 89, 2000.
- Petrunko AN, Anokhin VM. Titanium in medicine, food industry and ecology. Titanium 95 science and technology, 2, 1816, 1995.
- Steinemann SG. Corrosion of Surgical Implants in-vivo and on-vitro Tests. Evaluation of Biomaterials, John Wiley & Sons Ltd., 1, 1980.
- Winship KA. Toxicity of Aluminum, A historical Review Part 1, Adverse Drug React. Toxicol. Rev., Vol. 11, No. 2, 123, 1992.
- Yoshihara M, Miura K. Intermetallic 3, 357, 1995.
- Yoon T R et al. KOSOMBE, New Trends in Medical Imaging, 89, 2003.
- Yumoto S, et al. Aluminum neurotoxicity in the rat brain. Internation Journal of PIXE, World scientific Publishing Company, Vol.2, 4, 493, 1992.