

글리세롤 흡착으로 인산완충식염수에서 콜로이드 안정성이 향상된 수산화인회석 합성

안자운* · 최혜빈* · 이근영** · 권기영*,**,†

*경상국립대학교 화학과, **HAP Materials
(2023년 11월 7일 접수, 2023년 11월 13일 수정, 2023년 11월 14일 채택)

Adsorption of Glycerol on Hydroxyapatite Enhanced Colloidal Stability in Phosphate Buffered Saline Solution

Jaun An*, Hyebin Choi*, Keunyoung Lee** and Ki-Young Kwon*,**,†

*Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

**HAP Materials, Jinju 52828, Republic of Korea

(Received November 7, 2023; Revised November 13, 2023; Accepted November 14, 2023)

초 록

수산화인회석은 생체 적합성이 뛰어나 다양한 분야에 활용이 가능하다. 그 중 약물/유전자 전달과 같은 실용적인 생물학적 응용을 수행하기 위해 인산완충식염수(PBS) 용액 속 수산화인회석의 콜로이드 안정성은 특히 중요하다. 본 연구에서는 글리세롤 용액 하에 수산화인회석을 200 °C로 열처리하여 글리세롤이 흡착된 수산화인회석(Gly-HAP)을 합성하였다. 이를 상온에서 합성한 수산화인회석(RT-HAP) 및 증류수에서 200 °C로 열처리된 수산화인회석(H₂O-HAP)과 물성 및 콜로이드 안정성을 비교하였다. 증류수와 글리세롤 용액 모두에서 열처리된 수산화인회석의 결정성을 향상시켰다. 하지만 글리세롤에 대한 수산화인회석의 낮은 용해도와 수산화인회석 표면에 글리세롤 분자들의 흡착으로 인해 열처리 과정에서 Gly-HAP의 결정 성장이 제한되었다. 반면에 H₂O-HAP는 초기 결정 크기에 비해 약 4배 성장하였다. RT-HAP 및 H₂O-HAP과 비교하면, Gly-HAP는 PBS 용액에서 콜로이드 안정성이 향상되었으며, 이는 글리세롤이 수산화인회석 표면에 흡착되어 HAP 결정들의 응집을 억제한 것에 기인한다.

Abstract

The biocompatibility of hydroxyapatite (HAP) has led to its application in various fields. To accomplish practical biological applications, such as drug/gene delivery, the colloidal stability of HAP in phosphate-buffered saline (PBS) is particularly important. In this study, we prepared a glycerol incorporated-HAP (Gly-HAP) by heating HAP in a glycerol environment at 200 °C. To compare morphology and colloidal stability, HAP prepared at room temperature (RT-HAP) was thermally treated in water at 200 °C (H₂O-HAP). The heat treatment of HAP in both water and glycerol solutions results in an increase in the crystallinity of HAPs. Due to the low solubility of HAP in glycerol and the adsorption of glycerol on the HAP surface, crystal growth is limited. However, the heat-treated HAP under water increased in size by approximately four times compared to the initial crystallites. Compared to RT-HAP and H₂O-HAP, Gly-HAP shows improved colloidal stability in PBS, which originates from the adsorption of glycerol on the HAP surface that inhibits the agglomeration of individual HAP precipitates.

Keywords: Hydroxyapatite, Glycerol, Surface modification

1. 서 론

수산화인회석(HAP, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)은 인간의 뼈와 치아와 같은 포유류의 경조직에서 발견되는 주요 무기 성분으로 알려져 있다[1]. 따라서, 수산화인회석은 바이오미네랄 연구에서 대표적인 화합물로

집중 연구되어 왔다. 높은 생체적합성과 낮은 독성/면역 반응으로 인해 수산화인회석은 경조직 공학용 재료, 약물/유전자 전달용 기질, 정형외과 임플란트용 코팅 등 다양한 영역에 응용된다[2-5]. 생물학적 응용 외에도, 칼슘 이온을 다양한 전이 금속 이온으로 교환하면 불균일 촉매의 지지체 및 유해 중금속 제거를 위한 흡착 물질로도 활용이 가능하다[6,7]. 우리는 이전에 원자탐침 현미경(AFM)을 이용한 미시적 관찰로 개별 분자 단계의 용해 속도와 표면 구조에 대해 연구한 바 있다[8,9]. 또한 수산화인회석 표면에 루테튬, 코발트, 은 양이온을 도입하여 알코올 산화, 아민 산화 및 수소 생성 반응을 위한 촉매로도 활용했다[10-12].

† Corresponding Author: Gyeongsang National University
Department of Chemistry, Jinju 52828, Republic of Korea
Tel: +82-55-772-1493 e-mail: kykwon@gnu.ac.kr

수용액에서 콜로이드 안정성을 갖는 나노 사이즈의 수산화인회석의 합성은 생물학적 응용에 있어 특히 중요하다. 카복실레이트와 칼슘 양이온의 상호작용으로 인해 다양한 아미노산과 구연산염에 의해 수산화인회석의 폭이 줄어들 수 있다고 보고되었다[13,14]. 본 연구는 글리세롤 분자가 열처리 과정에서 수산화인회석의 크기와 형태 변화, 그리고 콜로이드 안정성에 미치는 영향에 대해 보고한다. 글리세롤 분자는 앵커 부분의 3개의 수산기(hydroxyl group, -OH)를 가진다. 또한, 글리세롤은 생체적합성이 우수하고 독성이 낮은 천연물질로 알려져 있다[15]. 우리는 글리세롤 조건 하에 합성된 수산화인회석(~50 nm)이 글리세롤이 없는 조건(~100 nm)에서보다 더 작은 크기로 합성되는 것을 발견했다. 더 나아가, 수산화인회석에 글리세롤 분자의 흡착은 1X 인산완충식염수(PBS) 용액에서 콜로이드 안정성을 향상시켰다.

2. 실험

수산화인회석은 수용액 하에서 침전법으로 상온에서 합성되었다. 교반 하에 0.6 M Na₂HPO₄ 80 mL를 1 M Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 80 mL 용액에 천천히 적가하였다. 상기 제조된 용액에 10 M NaOH 32 mL를 첨가하고 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후, 원심분리기를 이용하여 혼합물을 3차 증류수로 네 번 세척하였다. 24시간의 동결건조 후 흰색 분말의 시료를 얻었다. 마지막으로, 흰색 분말을 막사발을 사용하여 균일하게 갈아주었다. 이렇게 상온에서 합성된 수산화인회석을 RT-HAP로 명명하였다.

RT-HAP를 증류수 및 글리세롤 용매 하에 각각 열처리하였다. 두 개의 50 mL 테플론 라이닝된 오토클레이브 반응기에 증류수와 글리세롤 용액을 각각 20 mL씩 담고, RT-HAP 1 g을 각각 넣어준다. 고르게 분산된 혼합물을 얻기 위해 10분 동안 초음파 처리하였다. 반응기 속 혼합물을 200 °C 온도에서 20시간 열처리하였다. 이후의 원심분리 및 동결건조 단계는 앞서 RT-HAP의 합성방법과 동일하게 진행하였다. 증류수와 글리세롤에서 열처리된 샘플은 각각 H₂O-HAP 및 Gly-HAP로 명명하였다.

3. 결과 및 고찰

Figure 1은 합성한 3개의 샘플들의 XRD (X-ray powder diffraction) 패턴이다. 모든 샘플의 XRD 패턴은 유사하게 나타났으며, 표준 데이터베이스 JCPDS No. 00-009-0432와 비교하여 순수한 수산화인회석과 XRD 패턴이 일치함을 확인했다. 제2인산칼슘(모네타이트) 또는 α형 제3인산칼슘과 같은 다른 인산칼슘에 해당하는 피크는 발견되지 않았다. RT-HAP와 비교하였을 때에 200 °C에서 열처리된 H₂O-HAP와 Gly-HAP은 피크의 분해능이 향상된 것을 관찰되었다 (H₂O-HAP 및 Gly-HAP 샘플은 RT-HAP와 다르게 (211) 및 (300)의 결정면이 식별 가능하다). 따라서 RT-HAP는 열처리 과정에서 결정성이 향상되었을 것으로 생각된다.

합성된 수산화인회석의 형태는 TEM (transmission electron microscopy)으로 분석하였다(Figure 2). Figure 2a-c의 TEM 이미지로부터 RT-HAP와 H₂O-HAP는 결정들이 대부분 큰 덩어리로 응집되어 있었으며, Gly-HAP는 상대적으로 고르게 분산되어 있음을 확인했다. Figure 2d-f의 확대된 TEM 이미지로부터 모든 샘플이 수산화인회석 단결정의 전형적인 모양인 길쭉한 육각 기둥 형태를 가지는 것을 확인했다[16]. 특히, H₂O-HAP가 육각 기둥 모습이 가장 뚜렷하게 보이는 것을 확인했다(Figure 2e). 또한, RT-HAP와 Gly-HAP의 결정 크기

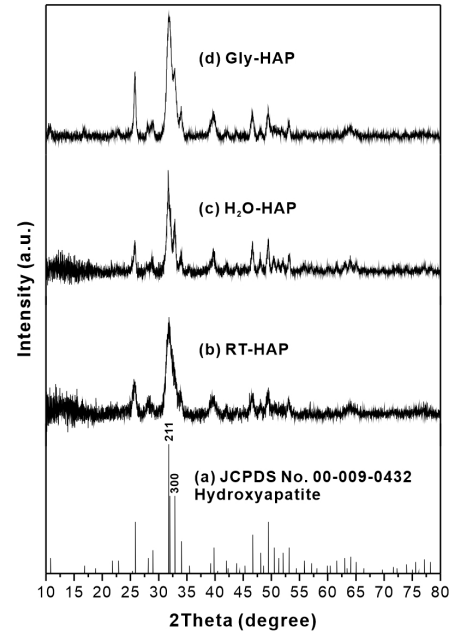


Figure 1. The X-ray diffraction patterns of a: JCPDS No. 00-009-0432 hydroxyapatite, b: RT-HAP, c: H₂O-HAP, and d: Gly-HAP.

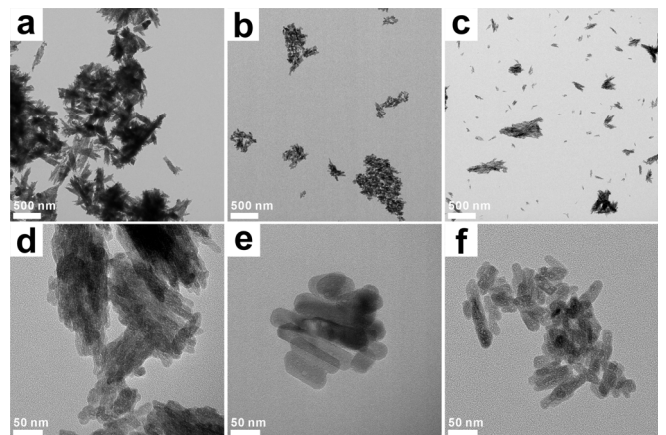


Figure 2. The TEM images of (a, d): RT-HAP, (b, e): H₂O-HAP, and (c, f): Gly-HAP.

는 비슷한 반면, H₂O-HAP (Figure 2e)는 단결정이 확연히 큰 것을 볼 수 있다.

TEM 이미지로부터 각 샘플들의 단결정 크기를 측정하여 비교했다 (Figure 3). 앞서 TEM 이미지로부터 예상한 바와 같이 H₂O-HAP (85.5 및 28.3 nm)의 길이와 너비는 RT-HAP (21.5 및 8.6 nm)에 비해 약 4배 증가하였고, 세 샘플 중 단결정의 크기가 가장 컸다. 반면, Gly-HAP (33.4 및 12.1 nm)의 결정의 크기 증가폭은 H₂O-HAP에 비해 훨씬 작았다. H₂O-HAP의 경우, 증류수에 대한 수산화인회석의 용해도가 열처리 과정에서 상승한 온도로 인해 높아져 수산화인회석이 증류수 속으로 용해될 수 있으며, 이후 침전 과정을 거쳐 결정 성장이 가능하다고 판단된다. 반면, Gly-HAP 결정의 성장은 두 가지 주요 요인에 의해 제한되었다. 첫째, 글리세롤이 용매인 경우 수산화인회석의 낮은 용해도는 칼슘 및 인산 음이온의 농도를 감소시켰으며, 이는 결정의 추가 성장을 제한한다. 둘째, 수산화인회석 표면에 글리세롤 분

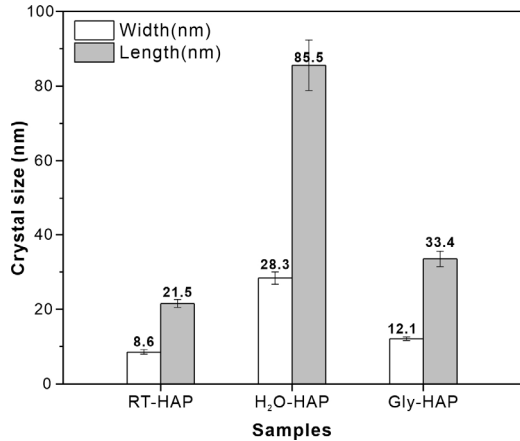


Figure 3. The average crystal sizes of RT-HAP, H₂O-HAP, and Gly-HAP.

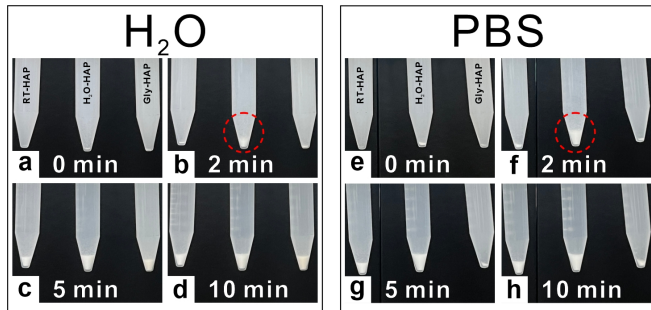


Figure 4. Time-dependent colloidal stability of RT-HAP, H₂O-HAP, and Gly-HAP in the solvent of water (left hand sided) and PBS (right hand sided). The pictures were taken after (a, e): 0 min, (b, f): 2 min, (c, g): 5 min, and (d, h): 10 min after sonication.

자가 흡착되면서 결정의 성장이 방해된다.

Figure 4는 증류수 및 1X PBS 용액 하에 각 샘플의 콜로이드 안정성을 시험한 결과이다. H₂O-HAP는 증류수와 PBS 용액 모두에서 2분 이내에 빠르게 침전되는 것을 확인했다(Figure 4b, f의 빨간색 원). 이는 H₂O-HAP의 결정 크기가 가장 크기 때문일 것이라 생각한다. RT-HAP와 Gly-HAP의 콜로이드 안정성은 증류수에서는 비슷했으며, 5분 후 침전되었다(Figure 4c, d). 반면, PBS 용액에서 Gly-HAP의 콜로이드 안정성은 RT-HAP보다 뛰어났으며, 5분 이상 분산된 상태를 유지하여 세 샘플 중 콜로이드 안정성이 가장 좋았다(Figure 4g, h). 특이한 점은, TEM 분석으로부터 확인한 결과, Gly-HAP가 RT-HAP보다 결정 크기가 더 크에도 불구하고 콜로이드 안정성이 우수하다는 것이다. 따라서 Gly-HAP의 향상된 콜로이드 안정성이 글리세롤 분자가 수산화인회석 표면에 흡착되어 수산화인회석의 응집을 방지한 결과에 기인한 것으로 예상된다.

4. 결 론

결론적으로, 증류수와 글리세롤 용액 모두에서 수산화인회석의 열처리는 결정성을 향상시켰다. TEM 분석으로 열처리 후 H₂O-HAP의 결정 크기는 RT-HAP에 비해 약 4배 정도 증가했음을 확인했다. 그러나 동일한 열처리 과정으로 합성된 Gly-HAP의 결정 크기는 H₂O-HAP보다 현저히 작았으며, 이는 RT-HAP와 비슷했다. 글리세롤

에 대한 수산화인회석의 낮은 용해도는 결정 성장에 필요한 물질 전달을 감소시키며, 수산화인회석 표면에 글리세롤 흡착도 결정의 성장 제한 요소로 작용된다. 중요하게도, 수산화인회석에 글리세롤이 흡착되면 증류수와 PBS 용액에서 콜로이드 안정성이 향상되었다. 이는 흡착된 글리세롤 분자에 의한 수산화인회석의 응집이 방해되었기 때문이라고 예상된다.

감 사

본 연구는 2022년 교육부의 재원으로 지역대학우수과학자지원사업(NRF-2022R111A3071407)과 2020년도 교육부의 재원으로 한국기초과학지원연구원 국가연구시설 장비진흥센터와(2019R1A6C1010042), 2022년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임(S3316896).

References

1. M. I. Kay, R. A. Young, and A. S. Posner, Crystal structure of hydroxyapatite, *Nature*, **204**, 1050-1052 (1964).
2. W. Suchanek and M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J. Mater. Res.*, **13**, 94-117 (1998).
3. T. M. Chu, D. G. Orton, S. J. Hollister, S. E. Feinberg, and J. W. Halloran, Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures, *Biomaterials*, **23**, 1283-1293 (2002).
4. D.-M. Liu, Control of pore geometry on influencing the mechanical property of porous hydroxyapatite bioceramic, *J. Mater. Sci.*, **15**, 419-421 (1996).
5. T. M. Chu, J. W. Halloran, S. J. Hollister, and S. E. Feinberg, Hydroxyapatite implants with designed internal architecture, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**, 471-478 (2001).
6. K. Mori, T. Hara, T. Mizugaki, K. Ebitani, and K. Kaneda, Hydroxyapatite-supported palladium nanoclusters: A highly active heterogeneous catalyst for selective oxidation of alcohols by use of molecular oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10657-10666 (2004).
7. A. Corami, S. Mignardi, and V. Ferrini, Cadmium removal from single- and multi-metal (Cd + Pb + Zn + Cu) solutions by sorption on hydroxyapatite, *J. Colloid Interface Sci.*, **317**, 402-408 (2008).
8. K.-Y. Kwon, E. Wang, A. Chung, N. Chang, and S.-W. Lee, Effect of salinity on hydroxyapatite dissolution studied by atomic force microscopy, *J. Phys. Chem. C*, **113**, 3369-3372 (2009).
9. K. Y. Kwon, E. Wang, N. Chang, and S. W. Lee, Characterization of the dominant molecular step orientations on hydroxyapatite (100) surfaces, *Langmuir*, **25**, 7205-7208 (2009).
10. J. W. Jaworski, S. Cho, Y. Kim, J. H. Jung, H. S. Jeon, B. K. Min, and K.-Y. Kwon, Hydroxyapatite supported cobalt catalysts for hydrogen generation, *J. Colloid Interface Sci.*, **394**, 401-408 (2013).
11. D. Kim, Y. Kim, K. Jung, M. Y. Choi, M. Park, B. Y. Lee, T. H. Kim, and K.-Y. Kwon, Ruthenium-incorporated hydroxyapatites for the oxidation of alcohols and amines using molecular oxygen as an oxidant, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **36**, 1-2 (2015).
12. E. Pyo, Y. Kim, J. B. Park, and K.-Y. Kwon, A silver-doped hydroxyapatite for an active sunscreen material, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **37**, 1395-1396 (2016).

13. X. Jin, J. Zhuang, Z. Zhang, H. Guo, and J. Tan, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods in the presence of sodium citrate and its aqueous colloidal stability evaluation in neutral pH, *J. Colloid Interface Sci.*, **443**, 125-130 (2015).
14. R. Gonzalez-McQuire, J.-Y. Chane-Ching, E. Vignaud, A. Lebugle, and S. Mann, Synthesis and characterization of amino acid-functionalized hydroxyapatite nanorods, *J. Mater. Chem.*, **14**, 2277-2281 (2004).
15. H. Zhang and M. W. Grinstaff, Recent advances in glycerol polymers: Chemistry and biomedical applications, *Biomaterials*, **35**, 1906-1924 (2014).
16. A. C. Taş, Molten salt synthesis of calcium hydroxyapatite whisk-

ers, *J. Am. Ceram. Soc.*, **84**, 295-300 (2001).

Authors

Jaun An; M.Sc., Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea; alxkdil@gnu.ac.kr
 Hyebin Choi; M.Sc., Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea; gpqls3214@gnu.ac.kr
 Keunyoung Lee; M.Sc., Researcher, HAP Materials, Jinju 52828, Republic of Korea; kyounglee96@gmail.com
 Ki-Young Kwon; Ph.D., Professor, Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea, HAP Materials, Jinju 52828, Republic of Korea; kykwon@gnu.ac.kr