

공침법을 이용한 은-수산화아파타이트 항균소재의 제조

장광규 · 신현용[†]

서울산업대학교 화학공학과
139-743 서울시 노원구 공릉2동 172
(2006년 12월 22일 접수, 2007년 5월 22일 채택)

Synthesis of Ag-Hydroxyapatite Antibiotic Material by Coprecipitation Method

Kwang-Kyu Jang and Hun Yong Shin[†]

Department of Chemical Engineering, Seoul National University of Technology, 172, Kongneung-2-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received 22 December 2006; accepted 22 May 2007)

요 약

공침법을 이용하여 질산은(AgNO_3)을 수산화아파타이트(hydroxyapatite)에 흡착시켜 복합항균제를 제조하였다. 질산은의 농도, 온도, 압력, 숙성시간에 따른 흡착된 은이온양의 변화를 관찰하였고, 은-수산화아파타이트 흡착의 최적조건을 얻었다. 제조된 은-수산화아파타이트를 ICP-MS, SEM-EDAX, DSC, XRD를 이용하여 물리적·화학적 특성을 고찰하였다. 또한 제조된 은-수산화아파타이트는 진탕플라스크실험법(shake flask method, KS M-146-2003)을 이용하여 양성균인 황색포도상구균(staphylococcus aureus, ATCC 6538)과 음성균인 대장균(escherichia coli, ATCC 25922)의 항균성을 확인하였다.

Antibiotic composite was synthesized by coprecipitation of silver nitrate into hydroxyapatite. Adsorbed amount of silver ion was examined by the variation of concentration of silver nitrate, temperature, pressure and curing time. Optimum condition for silver-hydroxyapatite adsorption could be achieved. Physical and chemical characteristic properties of synthesized silver-hydroxyapatite were tested by ICP-MS, SEM-EDAX, DSC and XRD. Antibiotic properties for gram positive staphylococcus aureus (ATCC 6538) and gram negative escherichia coli (ATCC 25922) were tested by shake flask method.

Key words: Hydroxyapatite, Silver Ion, Adsorption, Coprecipitation, Antibacterial Effect

1. 서 론

세계무역기구(world trade organization)보고에 의하면, 전 세계 사망자의 약 30%가 미생물 군에 감염되어 사망한다고 한다. 최근에는 각종 유해 미생물의 내성균인 칸피로박타 및 황색포도상구균에 의한 식중독 등의 문제가 발생하고 있다. 이렇듯 우리의 일상생활 환경에 다양한 미생물이 존재하고 있으며, 인체의 위생과 건강에 커다란 해를 끼치기도 한다.

국민의 생활수준의 향상에 따른 청결과 안정성에 대한 의식이 고조됨에 따라 세균오염에 대한 불안감과 예방책으로 항균성제품이 개발되고 있다[1]. 항균이란 항생물질 등이 세균의 성장을 저지하는 것을 의미하며, 각종제품에 첨가되어 세균이나 곰팡이 등을 사멸시키는 기능을 가진 것을 항균제라고 한다. 항균제의 종류는 유기, 무기, 유·무기, 광촉매, 천연계 항균제가 있고 종래에는 유기항균제를 많이 사용되어 왔으나, 항균성은 우수하지만 인체에 미치는 독성에

대한 규제로 사용이 제한되었다[2]. 최근에는 지속성과 내열성과 안정성을 고려하여 알루미나, 실리케이트 등의 다공성 무기담체를 이용하여 Ag^+ , Zn^{2+} 등의 금속이온을 담지한 무기항균제가 사용되고 있다. 항균성을 가진 금속들 중 은, 아연, 구리들은 작은 입자를 가지며, 결합력이 강한 금속이온에 속하고 은이온은 Ca^+ , Na^+ 와 같은 전자가를 가지며 골격구조가 산소와의 결합에너지가 크므로 안정한 결합을 형성하기 때문에 다른 물질과는 달리 수계에 유입시 용출속도가 낮아 안정성이 증가한다[3-4]. 기존에 연구되어온 은 또는 은이온의 강력한 항균성은 이미 오래전부터 알려져 왔다[5]. 그러나, 널리 쓰이는 항균제로서 은에 대한 항균작용의 메커니즘은 완전히 밝혀지지 않았으며, 이미 오래전부터 은 또는 은이온의 항균성 메커니즘을 설명하는 이론들이 제안되었고, 항균성을 갖는 것으로 확인되었다[6-9]. 지난 5,000년 전부터 은(silver)의 우수한 항균 효과가 알려져 왔으며, 항균성 도입에 이용할 수 있는 적합한 소재이며, 항균성 도입 연구에 사용되는 소재 중에 대표적인 예이다[10].

수산화아파타이트에 은을 담지 시키는 방법에는 침전법, 공침법, 이온교환법 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 침전법과 공침법을 이

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: hyshin@snut.ac.kr

용하여 은 함량을 조사하고, 표면에 미치는 영향은 SEM-EDAX, DSC, 그리고 XRD를 통하여 분석하고, 최적조건을 설정하여 은-수산화아파타이트를 제조하였다. 제조된 은-수산화아파타이트에 은 함량에 따른 항균성은 양성균인 황색포도상구균(*staphylococcus aureus*, ATCC 6538)과 음성균인 대장균(*escherichia coli*, ATCC 25922)을 대상으로 진탕 플라스크 시험법(shake flask method, KS M-146-2003)을 이용하여 고찰하였다[11]. 인간의 생활 속에서 자주 발생하는 미생물 감염을 방지하기 위해서 연구가 진행되었고 항균성을 확인하고 문제점을 도출하고 이를 해결하기 위한 방안을 마련하고자 본 연구를 수행하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

본 연구에서 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$, 95%, Samchun Chemical Co.)과 인산(H_3PO_4 , 85%, MATSUNOEN Chemical Co.)을 사용하여 다공성 소재인 수산화아파타이트를 제조하였고, 제조된 수산화아파타이트에 은을 흡착시키기 위해 질산은(AgNO_3 , 99.9%, KOJIMA Chemical Co.)을 사용하였다. 질산기를 제거하기 위하여 과산화수소(H_2O_2 , 30%, Junsei Chemical Co.)를 세척제로 사용하였다. 항균성 실험에 사용된 균주는 그람 양성균으로 *staphylococcus aureus* (ATCC 6538)과 음성균으로 *escherichia coli* (ATCC 25922)를 사용하였으며, 일반세균수의 확인을 위해 배지는 nutrient agar(Difco™)를 사용하였다.

2-2. 다공성소재의 제조 및 은코팅

2-2-1. 공침법(coprecipitation method)

용액 1은 수산화칼슘 37 g(0.925 mol)을 증류수 450 mL에 용해시켜 수산화칼슘수용액을 제조하고 질산은수용액(0.1~1.0 wt%)을 첨가한다. 용액 2는 인산 31 g(0.316 mol)을 증류수 450 mL에 넣고 용해시켜서 인산수용액을 제조한다. 용액 1을 용액 2에 혼합한 후 30 분간 교반하여 상온에서 숙성시간을 달리하여 숙성시킨 후 여과하여 전기로에서 소결시킨다. 5% 과산화수소수를 이용하여 여과물질을 세척하고 다시 물로 세척하여 은-수산화아파타이트를 제조하여 항균성을 가진 항균제로 활용하였다. 공침법장치의 개략도를 Fig. 1, 공정도는 Fig. 2에 나타내었다.

2-2-2. 침전법(precipitation method)

용액 1은 수산화칼슘 37 g을 증류수 450 mL에 용해시켜 수산화칼슘수용액을 제조한다. 용액 2는 인산 31 g을 증류수 450 mL에 넣

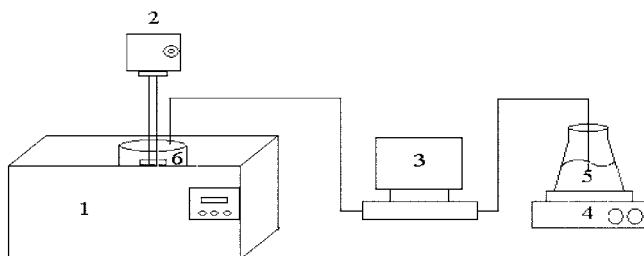


Fig. 1. Schematic diagram of Ag-hydroxyapatite synthesis process.

1. thermostat
2. lab stirrer
3. peristaltic pump
4. magnetic stirrer
5. H_3PO_4 solution
6. $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{AgNO}_3$ solution

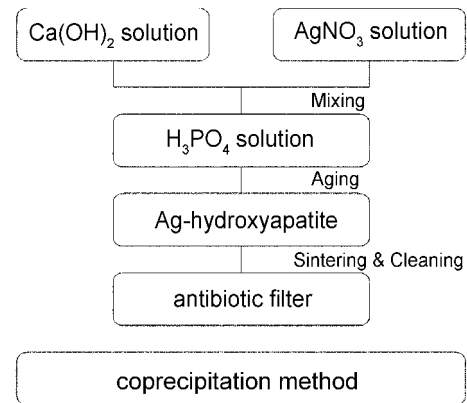


Fig. 2. Process of Ag-hydroxyapatite synthesis.

고 용해시켜서 인산수용액을 제조한다. 용액 1을 용액 2에 혼합한 후 30분간 교반하여 상온에서 숙성시간을 달리하여 숙성시킨 후 여과하고 질산은수용액(0.1~1.0 wt%)을 첨가하여 침전시킨 후 여과하여 건조한다. 전기로에서 700 °C, 3시간 동안 소결하고 5% 과산화수소수를 이용하여 여과물질을 세척하고 다시 물로 세척하여 은-수산화아파타이트를 제조하여 항균성을 가진 항균제로 활용하였다.

2-3. 은 함량의 측정

은-수산화아파타이트 무기항균제를 제조하여 항균성을 알아보기 위하여 은의 흡착방법과 온도와 압력의 양을 달리하여 은 함량을 조사하여 최적의 흡착조건을 찾았다. 제조된 은-수산화아파타이트는 ICP-MS(유도결합플라즈마, Perkin Elmer 330XL)를 이용하여 은 함량을 조사하였다.

2-4. 물리적·화학적 특성조사

제조된 은-수산화아파타이트의 열적 거동과 소결온도를 파악하기 위해서 열분석기(thermal analysis, Shimadzu TA-50)를 사용하여 air 조건에서 10 °C/min의 승온속도로 측정하였고, 상분석 및 결정도는 XRD(X-ray diffraction, Rigaku Denki., LTD D/max-IIIC)를 40 KV, 30 mA를 scan speed 3°/min으로 20~50° 범위에 측정하였다. 또한 SEM-EDAX(scanning electron microscope - energy dispersive X-ray spectrometer, JEOL JEM-5200)를 이용하여 은-수산화아파타이트의 형상과 Ag, Ca, P 성분들의 분포도를 관찰하였다.

2-5. 항균성 측정시험

본 연구에 제조된 은-수산화아파타이트를 항균성 실험에 일반적으로 쓰이는 진탕플라스크법(shake flask method, KS M-146-2003)을 이용하여 균주종류에 따른 항균성 실험을 하였다.

항균성을 테스트하기 위해서 양성 균주인 *staphylococcus aureus*와 음성 균주인 *escherichia coli*를 가지고 시료의 농도(1 g/50 mL)에 시험균액을 37±1 °C에서 24시간 진탕 배양 후 균수를 측정하여 초기전후의 변화량과 사진을 통해 항균성을 확인하였다.

2-6. 일반세균 측정시험

본 연구에서 제조된 다공성 은-수산화아파타이트의 항균성은 일반세균 시험법을 이용하여 일반세균수(CFU, 수/mL)의 측정을 통하여 확인하였다[12].

증류수 1 L에 nutrient agar 23 g을 넣고 121 °C에서 15분간 고압 멸균기(동양과학기술계 Model 0730)에서 고압증기 멸균한다. 무균대 클린벤치(biohazard clean bench) 안에서 페트리 접시에 일정량의 시료를 넣고 고압 멸균된 배지를 골고루 섞어 35±1 °C에서 24시간동안 배양기에서 배양한다. 24시간 후 집락계수기로 계수하여 이를 평균하여 일반세균수를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 흡착방법에 따른 은 흡착량

Fig. 3은 공침법과 침전법의 흡착방법에 따라 향균효과를 결정하기 위하여 사용된 질산은(AgNO_3) 수용액의 농도에 따른 은-수산화아파타이트의 흡착량을 나타낸 것이다.

질산은수용액 농도에 따른 공침법을 이용한 경우 약 10,000~50,000 ppm의 흡착량을 나타내었고, 침전법의 경우 10,000 ppm 이하의 흡착량을 보여서 공침법이 침전법보다 흡착량이 더 우수하다는 것을 확인하였고 각각의 질산은수용액 농도에 따라 흡착량은 선형적으로 증가함을 알 수 있었다.

3-2. 흡착방법과 온도 변화에 따른 은 흡착량

공침법에 의한 수산화아파타이트에 은을 담지시켜 온도변화에 따른 흡착량을 ICP-MS로 확인하여 Fig. 4에 나타내었다. 세 온도에서 (20, 40, 60 °C) 모두 질산은 수용액의 농도변화에 따라 선형적으로 흡착량이 증가함을 보여준다. 동일한 질산은 농도에서 온도변화에 따른 은 흡착량의 편차가 최대 12% 이내로써 실험의 오차범위 이내의 차이를 보여주고 있다. 따라서, 주어진 온도 영역(25~60 °C)에서는 온도변화에 따른 흡착량의 변화를 무시할 수 있다.

3-3. 압력변화에 따른 은흡착량

두 가지 농도조건에서 압력변화에 따른 흡착량의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 압력변화(1 bar~400 bar)에 따른 흡착량은 질산은의 농도가 무게분율로 0.1 wt%일 때 상압에 비하여 최대 4.5%의 차이를 보여주고 있으며, 질산은의 농도가 무게분율로 0.3 %일 때 상압

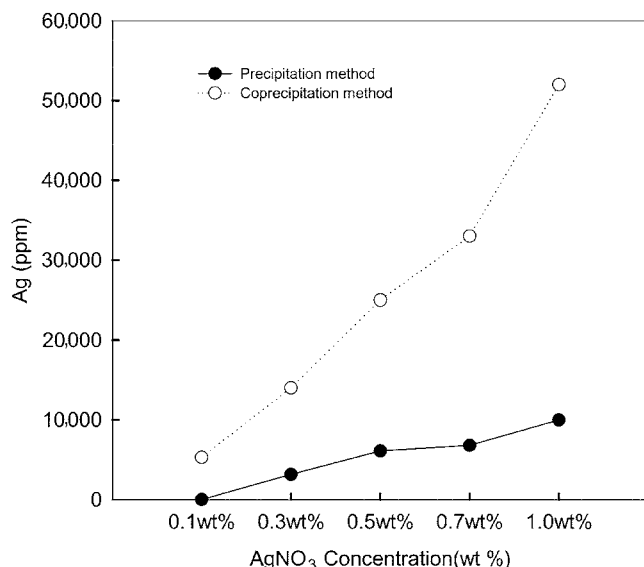


Fig. 3. Adsorbed Ag by coprecipitation method and Precipitation (20 °C).

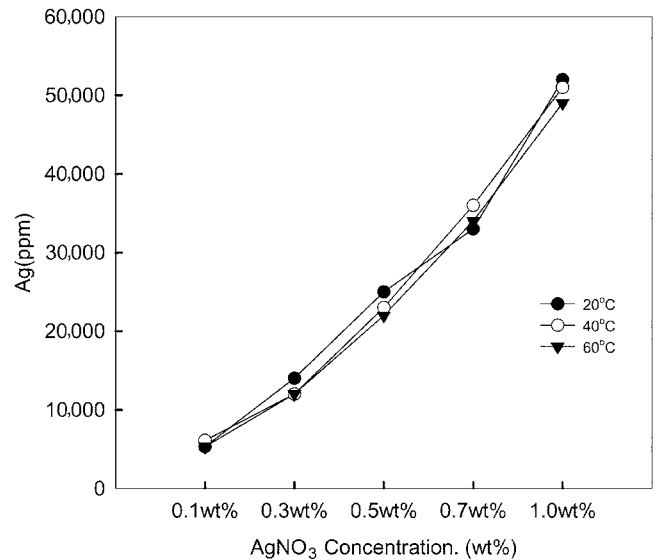


Fig. 4. Adsorbed Ag of coprecipitation method at 20 °C[●], 40 °C[○], 60 °C[▽].

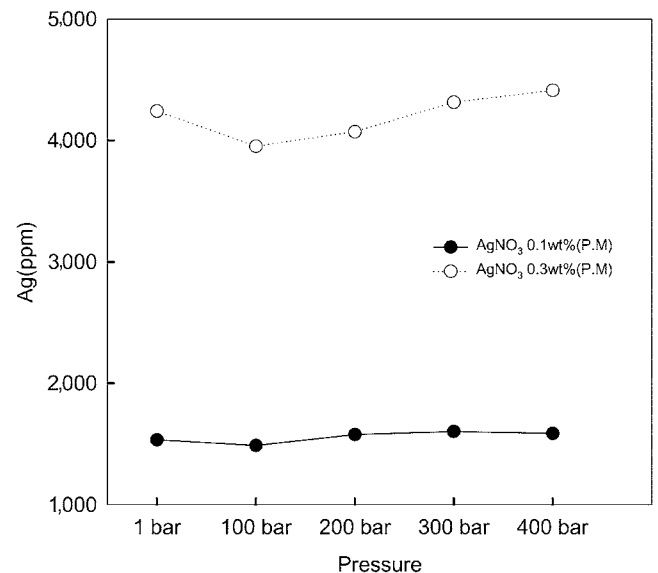


Fig. 5. Adsorbed Ag of precipitation method at various pressure.

대비 최대 6.8%의 편차를 보이고 있다. 이러한 편차는 실험의 오차범위 내에 들어가므로 주어진 압력조건(1 bar~400 bar)에서 압력에 따른 흡착량의 변화는 미비한 것으로 판단된다.

3-4. 열적거동 변화

DSC(differential scanning calorimeter)를 이용한 열분석 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 반응온도 25 °C, Ca/P 몰비가 1.67인 은-수산화아파타이트를 700 °C까지 열을 가하여 60 °C 부근에서 H_2O 가 증발되는 변화가 나타나 탈수가 일어나는 것을 알 수 있으며, 150 °C 부근에서 흡열반응이 일어나고, 300 °C 근처에서 서서히 탈수 되면서 발열반응이 일어나는데 H_3PO_4 기에 인한 peak로 판단된다. 700 °C 근처에서 열적 변화가 나타났으며, 그이상의 온도에서는 일정하였다.

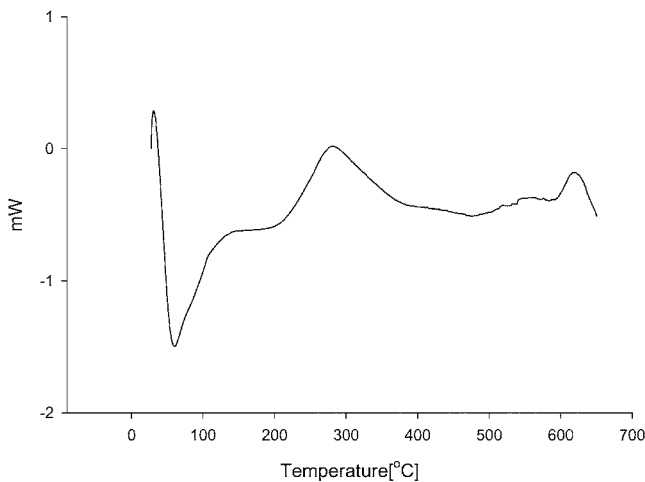


Fig. 6. DSC spectra of Ag-hydroxyapatite prepared by coprecipitation method.

3-5. 미세구조 및 X-ray 회절 특성 변화

Fig. 7은 X-ray 회절 특성을 측정된 결과를 보여주고 있다. 제조된 은-수산화아파타이트의 소결온도(100~700 °C)를 다르게 하여 실험한 결과로 XRD 패턴이 거의 차이가 없어 다른 불순물이 생성되지 않은 것으로 볼 수 있고 동일하게 합성되었음을 확인하였다.

Fig. 8은 질산은수용액을 공침시킨 수산화아파타이트들의 미세구조를 나타낸 SEM 사진이다. 1.0 wt% 질산은수용액을 흡착시킨 은-수산화아파타이트를 35배, 3,500배, 10,000배로 확대하여 살펴보면 표면 기공이 상당부분 막힘 현상이 나타나고 그에 따른 SEM-EDAX를 살펴보면 Ag, Ca, P가 일정하게 분포되어 있는 것을 확인하였다.

3-6. 항균성 분석

수산화아파타이트의 경우 항균성은 거의 나타나지 않고 균의 담체로 작용하여 2, 3차 오염원이 될 수 있다. 수산화아파타이트에 은을 공침시켜 항균성을 알아보기 위하여 질산은수용액의 농도에 따른 항균성을 관찰하기 위하여 그람 양성균인 황색포도상구균(*staphylococcus aureus*, ATCC 6538)과 그람 음성균인 대장균(*escherichia coli*, ATCC 25922)을 진탕플라스크실험법(shake flask method, KS M-146-2003)을 이용하여 항균성을 측정하였다. 은-수산화아파타이트의 항균성 분석 결과는 Table 1에 정리하였다. Fig. 9는 황색포도상구균과 대장균에 대하여 은이 첨가되지 않은 수산화아파타이트와 10,000, 30,000, 50,000 ppm의 은 농도를 갖는 은-수산화아파타이트에 대하여 초기 균주에 대한 24시간 후 세균감소를 관찰한 사진이다. Ag가 들어 있지 않은 수산화아파타이트는 시간이 지속될 때 세균수가 증가하여 항균성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다. Ag가 첨가된 경우 Ag 흡착량에 따라 항균성의 세기는 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

3-7. 일반세균수 조사

본 연구에서 제조된 은-수산화아파타이트의 항균성을 확인하고 항균 필터로서 활용성을 적용해보기 위해서 제조된 복합항균제 20 g을 1일간 저수조 내에서 방치한 후의 항균효과를 일반세균수의 변화를 통하여 확인하였다. 용량이 16 L인 저수조 내에 정수된 물속에 복합항균제를 두고 24시간 후의 항균성을 일반세균 검사를 통하여 확인한 후, 복합항균제는 그대로 둔 채 20 L를 새로운 정수된 물로 치환한 후에 반복실험을 수행하였다. 질산은 농도가 0.1 wt%인 경우와 질산은 농도가 0.3 wt%인 경우에 각각 17회, 32회 정수를 반복치환 실험하여 100 CFU 정도의 일반세균 검출 결과를 확인하

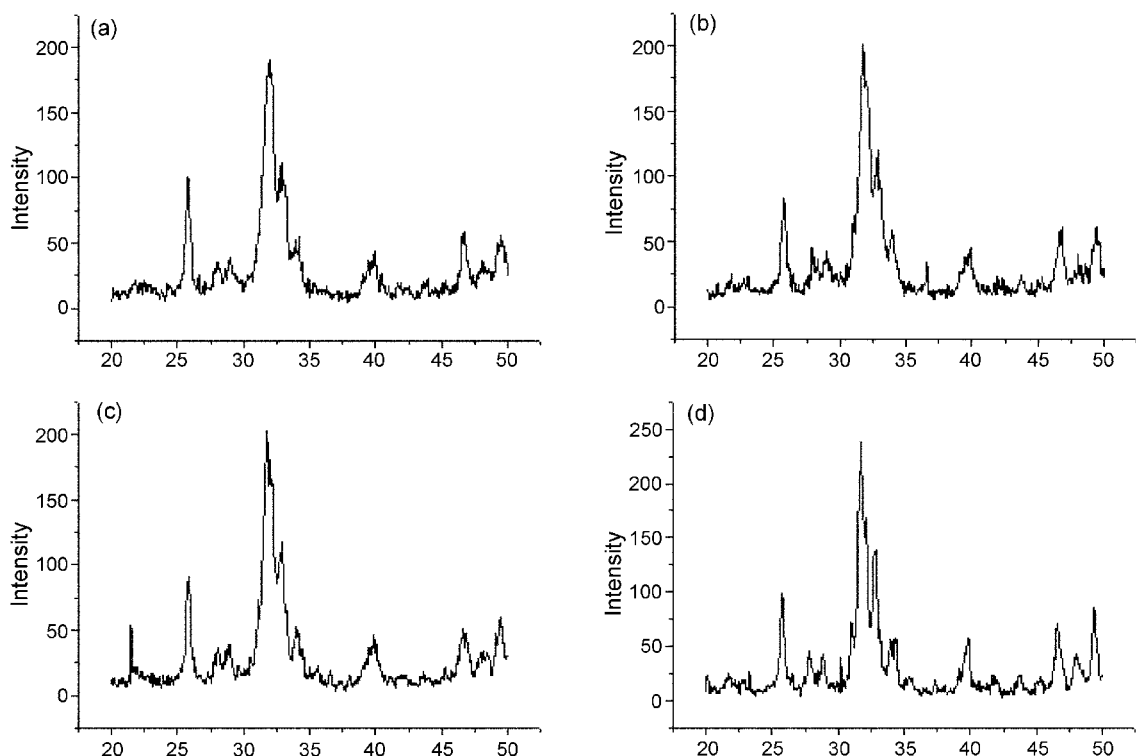


Fig. 7. XRD patterns of Ag-hydroxyapatite (a) 100 °C, (b) 300 °C, (c) 500 °C, (d) 700 °C.

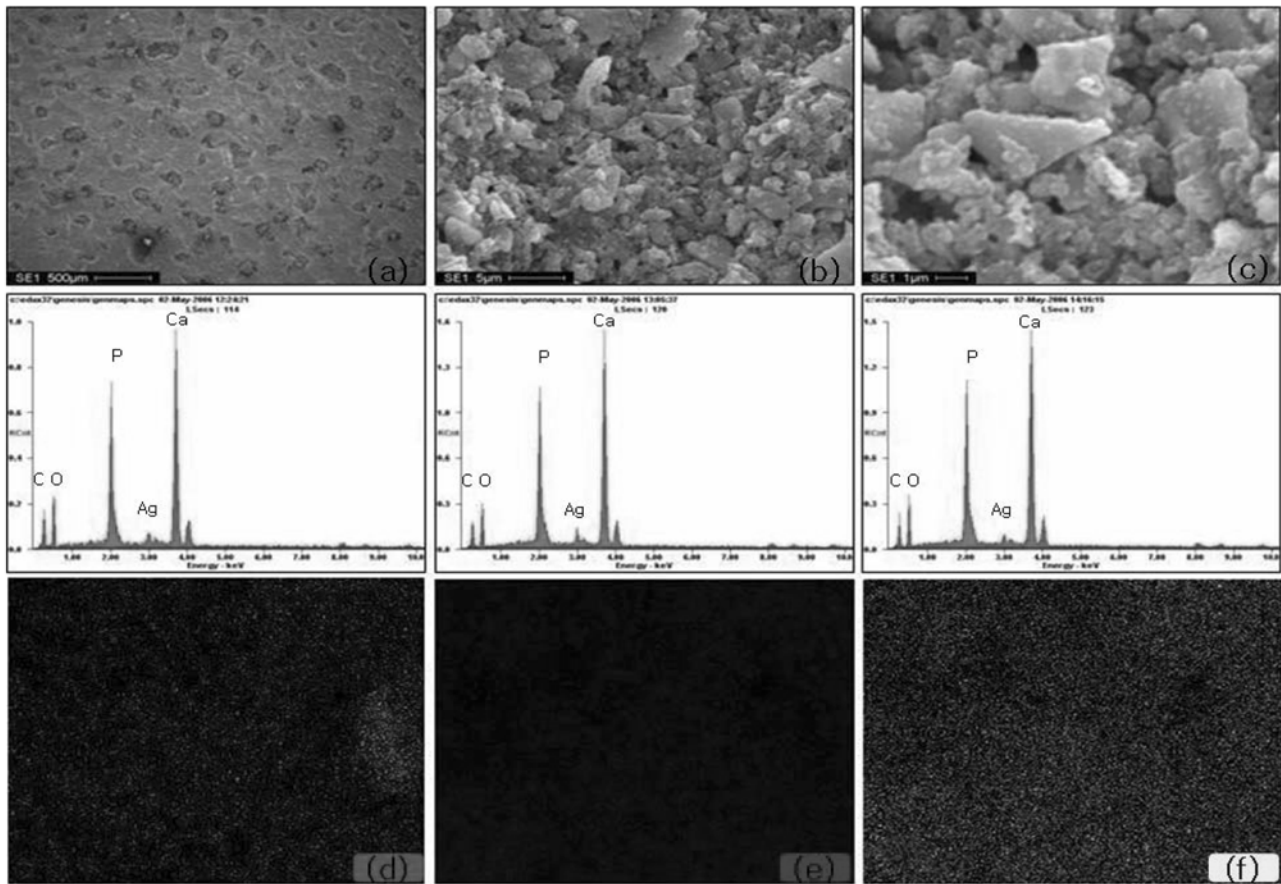


Fig. 8. SEM-EDAX of Ag-hydroxyapatite (a) 35 times, (b) 3,500 times, (c) 10,000 times, (d) Ag, (e) Ca, (f) P.

Table 1. *Staphylococcus aureus*(1) and *Escherichia coli*(2) by the change of Ag concentration

		Hydroxyapatite (Blank test)	Ag-Hydroxyapatite (Ag 10,000 ppm)	Ag-Hydroxyapatite (Ag 30,000 ppm)	Ag-Hydroxyapatite (Ag 50,000 ppm)
bacteria 1	0 h	1.5×10^4	1.5×10^4	1.5×10^4	1.5×10^4
	24 h	1.2×10^7	< 10	< 10	< 10
	decreased bacteria(%)	-	99.9	99.9	99.9
bacteria 2	0 h	1.2×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4	1.2×10^4
	24 h	1.2×10^8	< 10	< 10	< 10
	decreased bacteria(%)	-	99.9	99.9	99.9

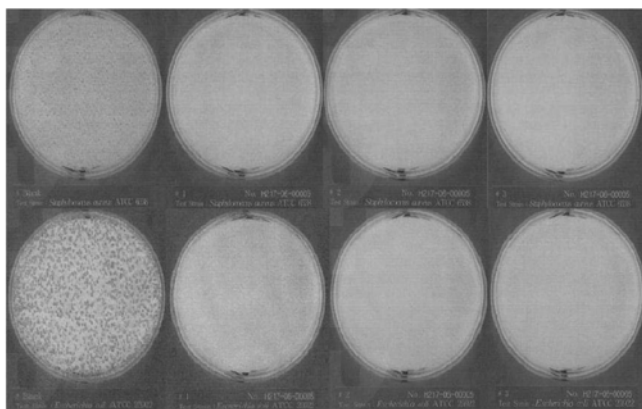


Fig. 9. Antimicrobial of Ag-hydroxyapatite prepared by coprecipitation method (*Staphylococcus aureus* - blank, 10,000 ppm, 30,000 ppm, 50,000 ppm, *Escherichia coli* - blank, 10,000 ppm, 30,000 ppm, 50,000 ppm).

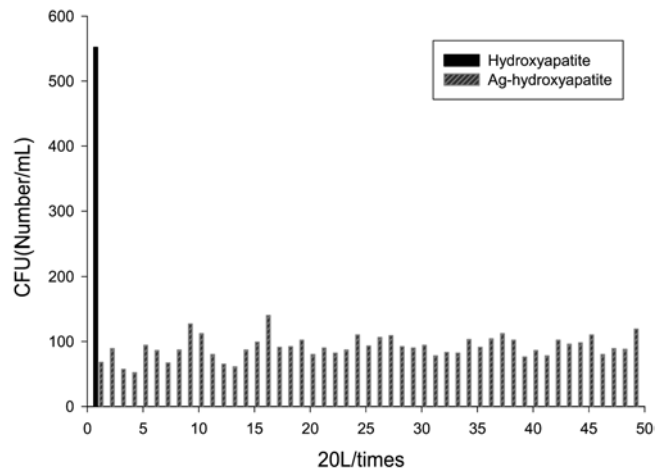


Fig. 10. Changing mode general bacteria of Ag-hydroxyapatite prepared by coprecipitation method.

였다. 본 연구에서 0.3% 질산은 용액을 이용하여 제조된 은-수산화아파타이트 복합항균제의 항균성의 지속성은 일정량의 복합항균제를 치환하지 않은 상태에서 50회 정수를 반복치환 실험하여 100 CFU 정도의 일반세균 검출 결과를 Fig. 10에서 확인할 수 있다. 또한 Ag를 흡착하지 않은 무기담체의 일반세균수의 변화는 제조된 복합항균제에 비하여 약 5배 정도 큰 일반세균 수의 차이를 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 항균성을 가진 다공성 은-수산화아파타이트 복합항균소재의 제조방법에 따른 은 흡착량을 조사하였다. 공침법과 침전법 중에 공침법을 통하여 더 많은 은이 흡착된 복합제를 얻을 수 있었다. 질산은 수용액의 농도와 온도, 압력의 변화에 따른 흡착된 은이온의 양의 변화를 측정하였다. 공침법에 의한 상온, 상압 최적 조건에서 흡착된 Ag는 다공성을 갖는 복합항균제 내부에 균일하게 분포함을 확인하였다.

그람 양성균인 황색포도상구균과 그람 음성균인 대장균을 진탕플라스크실험법을 이용하여 항균성을 확인하였다. Ag 농도의 변화에 따라 항균효과는 크게 변화하지 않았으며 일반세균 검출실험도 100 CFU 수준을 나타내었고, 정수부문에서 은의 용출속도의 안정성이 확인되어 항균지속성도 확인하였다. 본 연구에서 제조된 은-수산화아파타이트 무기 항균제는 항균성과 열적안정성이 우수하였고, 항균성 평가에 재현성이 있는 것을 확인하였다.

감 사

본 연구는 중소기업청의 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Lim, Y. T., Choi, H. K. and Ahn, Y. H., "Antimicrobial Activity Assessment of Functional Plastics which Contained Ag-Hydroxyl

- Apatite Agent," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **16**(2), 123-127 (2001).
2. Tomioka, Y., Miyaji, T., Oka, H., Tomita, K. and Nishino, A., "Antifouling Effect of Silver-Thio-sulfate Absorbed," *J. Antibact. Antifug Agents*, **21**(9), 503-505(1993).
3. Shin, C. H., Jung, S. H. and Park, D. K., "Effect of Inorganic Antimicrobial Agent Exchanged with Silver Ion on the Respiration Rate of Activated Sludge," *J. KSEE*, **19**(2), 177-185(1997).
4. Lee, J. I., Shin, C. H. and Park, D. K., "Chemical Design for the Water Treatment Agents to Prevent Microorganism from Activities," *J. KSEE*, **17**(2), 137-144(1995).
5. Hill, W. R. and Pillsbury, D. M., *the Pharmacology of Silver*, The Williams & Wilkins Co., Baltimore(1973).
6. Richard, L. D. and Samuel, F. E., "The Development and Functions of Silver in Water Purification and Disease Control," *Catal. Today*, **36**, 107-114(1997).
7. Cecil, W. C., Charles, M. P. and Paul, W. K., "Bactericidal Effect of Low Concentrations of Silver," *J. AWWA*, **54**, 208-216(1962).
8. Richard, L. W., "Review of Bactericidal Effectiveness of Silver," *J. AWWA*, **55**, 881-886(1963).
9. Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z. and Kim, J. O., "A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus," *Biomed. Mat. Res.*, **52**(4), 662-668(2000).
10. Kang, H. Y., Jung, M. J. and Jung, Y. K., "Antibacterial Activity and the Stability of an Ag⁺ Solution made using Metallic Silver," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**(5), 521-524(2000).
11. http://www.standard.go.kr/skin3/default.asp?ebook_path=/KS_EBOOK_DN/&ebook_name=KSM0146_2003_04.htm.
12. Chung, H. M., "Analysis of Microbiological Parameters in Drinking Water : the Current Status and Future Progress," *Inst. Glob. Envi.*, **9**(0), 71-88(1998).