

## 아세틸화 키토산 표면에서 의사체액에 의한 수산화인회석 결정의 생성

김홍성<sup>†</sup>

부산대학교 바이오소재과학과

### In-situ Crystalline Formation of Nano-hydroxyapatite Using Simulated Body Fluids on the Surface of Acetylated Chitosan

Hong Sung Kim<sup>†</sup>

Department of Biomaterial Science, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

<sup>†</sup>Corresponding Author: Hong Sung Kim  
E-mail: khs@pusan.ac.kr

Received January 24, 2022  
Revised February 16, 2022  
Accepted February 17, 2022

© 2022 The Korean Fiber Society

**Abstract:** Hydroxyapatite/chitosan composites are being researched as useful biomaterials for bone repair and regeneration. In order to make a biomimetic composite, the in vitro formation of apatite on the surface of the acetylated chitosan film using a simulated body fluid was tested. The formation and in-situ crystallization behavior of hydroxyapatite as a function of the degree of acetylation was investigated. The surface of the acetylated chitosan was densely covered by forming a cluster of a plate-shaped crystalline phase with a thickness of approximately 20 nm, and the crystalline cluster was identified with apatite, including hydroxyapatite. The closer the acetylation rate of chitosan was to 50%, the larger were the amount of crystalline phases formed, and the Ca/P ratio gradually increased to reach 1.67 of hydroxyapatite. As the ratio of glucosamine and acetylglucosamine in chitosan became identical, the formation of apatite was maximized and hydroxyapatite accounted for most of them.

**Keywords:** hydroxyapatite, apatite, acetylated chitosan, SBF, biomimetic composite

## 1. 서 론

인체의 경조직을 복원하는 성분으로 인회석(apatite)에 관한 관심이 높으며, 그 가운데 수산화인회석(hydroxyapatite)은 뼈의 주성분으로 골전도성과 단백질 흡착성이 뛰어나, 생체적합성을 높이기 위한 경조직 임플란트의 소재로 꾸준히 연구되고 있다[1,2]. 인회석을 비롯한 tricalcium phosphates(TCPs), octacalcium phosphate(OCP), dicalcium phosphates(DCPs), amorphous calcium phosphate(ACP) 등 인산화 칼슘계 화합물이 골대체재나 골수복재 또는 충전재 등으로 현재 사용되고 있다.

세라믹은 고유의 강한 경도와 취성을 가지므로 생체재료의 성형에 어려움이 있으며, 이를 개선하기 위하여 다양한 고분자들을 기질로 하여 복합체를 만든다. 전형적인 기질로는 천연고분자로 키토산[3,4]과 콜라겐[5], 합성고분자로 poly(lactic acid)[6], polycaprolactone[7], poly(ethylene

terephthalate)[8] 등이 이용된다.

근래에는 골전도성과 조직 손상에 재생 촉진성이 있는 키토산이 경조직 이식용 기질로 주목받고 있다. 키토산은 인체의 세포외기질의 주성분인 glycosaminoglycan을 구성하는 이량체 중 하나인 N-acetylglucosamine이 1,4-β glucoside로 결합한 천연고분자 키토산으로 부터 아세트아미드기를 탈아세틸화하여 아미노기로 치환시켜 얻은 글루코사민 고분자이다. 따라서 그 글루코사민의 일부를 의도적으로 다시 아세틸화한 키토산은 생체재료로서의 유용한 조직생리화학적 물성을 보인다[9].

수산화인회석과 키토산을 혼합한 복합체가 골 재생 유도(guided bone regeneration: GBR)를 위한 막[10]이나 약물 전달을 위한 담체[11]로, 또 세포배양을 위한 기질[12] 등으로 검토되어왔고, 금속 임플란트에 인산화 칼슘계 화합물이나 그 키토산 복합체로 코팅하여 신생골(new bone)의 생성 유도와 기존 피질골과의 융합을 향상하고[13,14] 치아

에나멜의 재석회화를 촉진하며[15] 이식 부위의 감염을 저하하는[16] 결과도 보고하고 있다.

수산화인회석의 합성은 소정의 칼슘염과 인산염을 반응시켜 고온에서 소결시키는 여러 방법이 있으며, 수산화인회석의 키토산 복합체는 질산칼슘과 인산이칼륨이나 인산이암모늄의 수용액에서 수산화인회석을 합성하여 고온에서 결정화한 나노~마이크로 크기의 입자를 키토산과 균일하게 혼합하여 만들거나[17], 근래에는 키토산 기질에서 합성한 ACP 등 비결정성 인산화 칼슘화합물로 부터 수산화인회석을 저온에서 결정화하여 만든다[18-20]. 이와 같이 수산화인회석 합성의 원료인 칼슘염과 인산염으로 부터 고분자 기질을 이용한 수산화인회석의 합성과 in-situ 결정화는 키토산[21-24]을 비롯하여 poly(lactic acid)[25]와 셀룰로스 등 다양한 다당류[26,27]에서도 조사되었다.

한편 수산화인회석은 체내에서 체액의 이온 성분만으로 생성되어 뼈를 구성한다. 혈장의 이온 조성에 근사하게 만든 염 수용액(의사체액: simulated body fluids: SBF)에서 콜라겐과 시트르산에 의한 in-vitro 수산화인회석의 생성과 결정화 연구[28]로 인위적으로 조성한 체내와 같은 이온 환경에서 수산화인회석의 체외 생성을 검증하였다. 생체재료에서 이러한 체액 성분에 의한 수산화인회석의 활용은 원료로부터 독성물질의 유입과 부기전을 낮추는 생체모방형 이식재료의 개발과 그 기능성 향상에 유용할 것이다.

본 연구는 체액의 이온 조성에 근접하게 조성한 의사체액에 의한 아세틸화 키토산의 표면에서 아세틸화 정도에 따른 수산화인회석의 생성과 in-situ 결정화 거동을 고찰하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 재료

키토산(Mw ca. 400,000, Taehoon-Bio)은 초산으로 정제하여 사용하였으며, 무수아세트산, 초산, 암모니아수, 염산, 에틸알콜, 메틸알콜, 수산화나트륨, 사염화탄소, N/400 글루타알데히드, 폴리비닐황산칼륨 용액(PVSK), 트리스(히드록시메틸)아미노메테인, 톨루이딘 블루, 0.4 M 아세테이트 완충액(pH 4.0)는 시그마알드리치에서, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 알드리치에서 특급시약으로 구입하여 정제없이 사용하였다.

### 2.2. 키토산의 아세틸화

키토산에 무수아세트산을 반응시켜 글루코사민 아미노기에 아세틸기를 도입하였다. 키토산을 0.1 M 초산용액에 용해하여 메틸알콜로 희석한 후 치환율에 해당하는 몰수의 무수아세트산을 첨가하여 25 °C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 암모니아수로 반응을 종료시키고 반응물을 침

**Table 1.** Acetylated chitosans and their degree of acetylation according to mole ratio of acetic anhydride to glucosamine group

Specimen code	Feed mole ratios	Degrees of acetylation
	Acetic anhydride/glucosamine	
AC03	—	0.03
AC15	0.2	0.15
AC33	0.625	0.33
AC45	1.25	0.45
AC59	2	0.59

전시켰으며, 중성에서 75% 메틸알콜 수용액으로 여러 번 세척하여 미반응물을 제거하였다.

시료의 아세틸화율은 아래와 같이 콜로이드 적정법을 사용하여 구하였다. 아세틸화 키토산을 0.4 M 아세테이트 완충액(pH 4.0)에 용해하고, 톨루이딘 블루를 첨가 후 PVSK로 적정하여 다음 식으로 구하였다.

$$Ac(\%) = 1 - \frac{1}{\left(\frac{50}{4.30V} - 1\right)0.793 + 1}$$

여기서 V는 적정액의 부피(ml)이다. 측정 결과, 무수아세트산과 키토산의 글루코사민 몰비에 따른 시료의 아세틸화율은 Table 1과 같다.

### 2.3. 가교와 성형

아세틸화 키토산은 아세틸화율이 50%에 근접할수록 수산화인회석의 생성을 위한 SBF 수용액에서 용해되는 것을 막기 위하여 글루타알데히드로 가교하여 필름으로 성형하였다. 아세틸화 키토산의 2% 초산수용액에 글루코사민:글루타알데히드=100:1의 몰비에 해당하는 농도의 글루타알데히드를 혼합하여 60 °C에서 5시간 동안 캐스팅한 후, 이를 NaOH 수용액에 중화시켜 성형하고 탈이온수로 세척하여 건조하였다[29].

### 2.4. 수산화인회석 결정의 생성

아세틸화 키토산 필름(이하 시료) 표면에서 수산화인회석 결정의 생성을 SBF를 이용하여 유도하였다. SBF를 조성하기 위하여 사용된 염은 NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>이며 트리스(히드록시메틸)아미노메테인과 염산으로 pH 7.4로 완충하였다. 이렇게 조성된 SBF 용액은 혈청의 이온 조성과 Table 2에서 비교하였다. 실험에서는 골 손상 부위의 평균 체액보다 높은 이온농도를 고려하고 결정 생성의 시간을 줄이기 위하여 1.5 배의 이온농도(1.5x SBF)를 배양액으로 사용하였다.

시료는 진탕 배양기에서 배양액에 침지하여 37 °C에서 30 rpm으로 3주 동안 반응시켜 수산화인회석을 생성하고,

**Table 2.** Ion concentrations of simulated body fluids (SBF) and human blood plasma

	Ion concentration (mM)							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Blood plasma	142.0	5.0	2.5	1.0	27.0	103.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	2.5	1.0	27.0	125.0	1.0	0.5
1.5x SBF	213.0	7.5	3.8	1.5	40.5	187.5	1.5	0.75

동시에 결정을 성장시켰다. 배양액은 3일에 한 번씩 교환해 주었다.

**2.5. 분석**

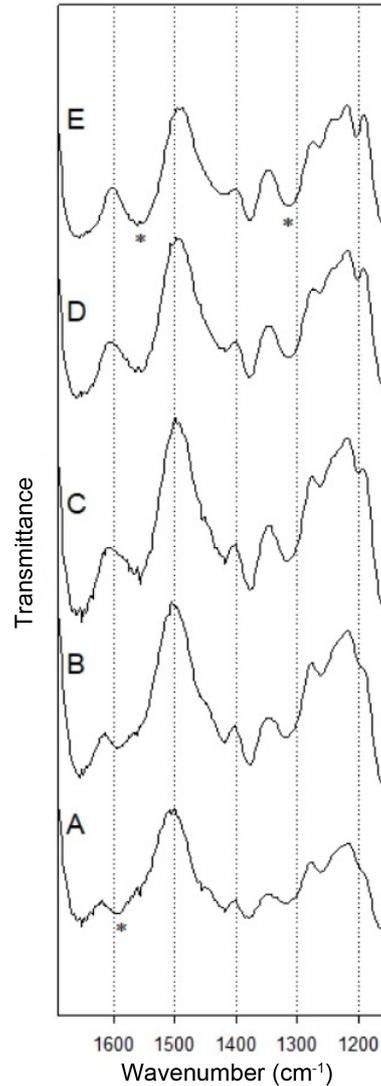
적외선분광분석(Fourier transformation infrared spectroscopy: FT-IR) spectra는 IRAffinity-1(Shimadzu corp., Japan)으로 400–4000 cm<sup>-1</sup> 파장에서 KBr 분말법으로 측정하였다. X-선 회절 분석(X-ray diffractometry: XRD)은 Rigaku III vertical diffractometer(Rigaku corp., Japan)로 40 kV, 30 mA에서 monochromatic CuKα radiation에 의한 반사측정법으로 2θ 5–60°에서 scan speed 5°/min으로 측정하였다. 결정체 형상의 관찰을 위한 전계방사형 주사식 전자현미경(field emission scanning electronic microscopy: FE-SEM)은 HITACHI-S4700 (Hitachi corp., Japan)을 사용하였고, 탈이온수로 세척 건조한 시료는 ion sputter를 이용하여 백금으로 전처리한 후에 15 kV에서 시료의 표면을 촬영하였다. 결정 조성의 정성 및 정량 분석을 위해 FE-SEM에 부착된 energy dispersive X-ray spectroscopy(EDX)에 의해 산란하는 2차 X-선의 파장을 각 시료에서 3점 이상 측정하여 그 평균값으로 표면에 생성된 결정의 원소 비율(atomic%)을 구하였다.

시료의 밀도는 23 °C에서 에틸알콜과 사염화탄소 혼합용액을 이용한 밀도구배관으로 측정하였으며, 시료의 가교도는 시료를 23 °C와 53 °C의 탈이온수에서 각각 2시간 침지한 후 시료의 부피 팽윤 차를 측정하여 Flory-Huggins theory[30]을 이용하여 산출하였다. 시료의 흡수성은 37 °C의 SBF 용액에 2시간 침지 후, 시료에 흡수된 SBF와 건조 시료의 중량비로 나타내었다. 시료에 생성된 인회석의 양은 결정을 생성시킨 시료를 탈이온수로 세척하여 진공 건조한 후 칭량하여 결정 생성 전후의 시료의 무게 차로 인회석의 생성량을 구하였으며, 생성전 시료와의 중량비로 나타내었다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 아세틸화로 인한 키토산의 변화**

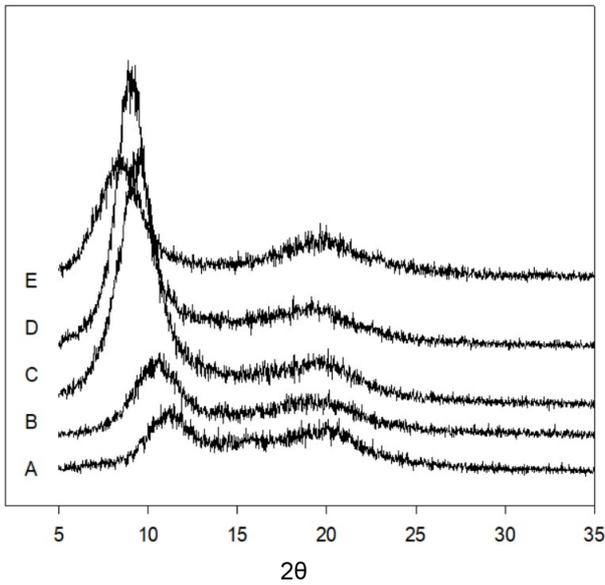
아세틸화로 인한 화학 조성의 변화를 FT-IR로 분석하여 Figure 1에 나타내었다. 아세틸화 3% 시료(AC03)의 스펙트럼에서 키토산의 특성 진동 흡수대인 1593 cm<sup>-1</sup>의 아미노



**Figure 1.** FT-IR spectra of the acetylated chitosans; (A) AC03, (B) AC15, (C) AC33, (D) AC45, and (E) AC59.

기 신축진동이 나타난 반면에 아세틸화 59%의 시료(AC59)에서는 키토산의 특성 진동 흡수대인 1560 cm<sup>-1</sup>의 amide II와 1314 cm<sup>-1</sup>의 amide III 신축진동이 관찰되었다. 이로써 아세틸화로 인한 acetamide의 형성이 확인되었다.

X-선 회절 분석으로 아세틸화로 인한 결정구조의 변화와 그 측정값을 Figure 2와 Table 3에 나타내었다. 시료 AC03에서 키토산의 (020)면이 11.15°에, (040)면이 20.17°에 나



**Figure 2.** X-ray diffractograms of the acetylated chitosans; (A) AC03, (B) AC15, (C) AC33, (D) AC45, and (E) AC59.

**Table 3.** XRD parameters of the acetylated chitosans

	2θ	d-spacing (Å)	Crystal face	Reference [31]
AC03	11.15	7.93	(020)	Chitosan
	20.17	4.40	(040)	
AC15	10.68	8.27	-	superposition
	20.09	4.41		
AC33	9.55	9.25	-	"
	19.76	4.49		
AC45	9.07	9.74	-	"
	19.36	4.58		
AC59	8.58	10.29	(020)	chitin
	19.20	4.62	(110)	

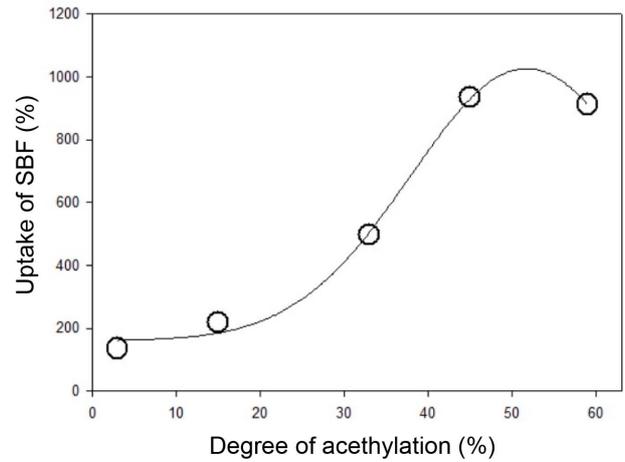
타났고, 시료 AC59에서는 키틴의 (020)면이 8.58°에, (110)면이 19.20°에서 나타났다. 그 사이의 비율에서는 두 결정이 공존하여 회절이 중첩되어 나타났다.

수산화인회석의 생성을 위한 SBF 환경에서 아세틸화 키

**Table 4.** The cross-link parameters of the acetylated chitosans

	$d_r$	Q	$\Delta\mu_{mix}$	$\chi_1$	$\bar{M}_c$	$\nu$	$\rho_x$
AC03	1.3124	2.27	6238.16	21.77	2.58	0.3881	0.5094
AC15	1.3274	3.40	-19.21	6.77	19.19	0.0521	0.0692
AC33	1.3405	5.18	-347.99	4.12	72.39	0.0138	0.0185
AC45	1.3536	10.57	-128.02	7.05	140.23	0.0071	0.0097
AC59	1.3630	10.95	20.86	14.25	71.36	0.0140	0.0191

\* $d_r$ : the density of the polymer, Q: the volume degree of swelling = volume of swollen/volume of polymer =  $1/\nu_s$ ,  $\Delta\mu_{mix}$ : the chemical potential difference,  $\Delta\mu_{mix} = RT(\ln(1 - 2\nu_s) + \nu_s + \chi_1\nu_s^2)$ ,  $\chi_1$ : the polymer-solvent interaction parameter,  $\bar{M}_c$ : the molecular weight between cross-links,  $\nu$ : the effective number of moles of cross-linked chains per gram of polymer [32],  $\nu = 1/\bar{M}_c = [\ln(1 - \nu_s) + \nu_s + \chi_1\nu_s^2]/d_r V_1(\nu_s^{1/3} - \nu_s/2)$ ,  $V_1$ : the molal volume of solvent,  $\rho_x$ : the cross-linking density,  $\rho_x = d_r/\bar{M}_c$ .



**Figure 3.** The uptake of SBF for the acetylated chitosan.

토산 필름의 용해를 방지하기 위하여 가교하였고, 그 가교 정도를 고분자 팽윤 거동의 Flory-Huggins theory에 의해 시료별로 밀도와 부피팽윤도를 측정하여 분석하였다. 비결정성 팽윤 기질에 대한 화학포텐셜과 가교된 고분자의 팽윤상태식[32]을 적용하여 계산한 시료의 그램 당 가교된 분자의 유효 몰수와 가교 밀도를 Table 4에 나타내었다. 아세틸화율이 증가할수록 시료의 밀도는 증가하였고, 아세틸화 15% 이상에서는 자발적 흡수(- $\Delta\mu$ )로 부피팽윤도가 증가하였으며, 가교밀도는 아세틸화 45%까지 감소하였다.

시료의 흡수율은 인회석의 생성에 영향을 크게 미치므로 SBF 흡수에 의한 시료의 중량 변화율을 측정하여 Figure 3에 나타내었다. 약 50%까지 아세틸화가 증가할수록 흡수율이 크게 증가하였다. 이는 화학포텐셜과 가교 밀도의 감소로 인한 것으로 보인다.

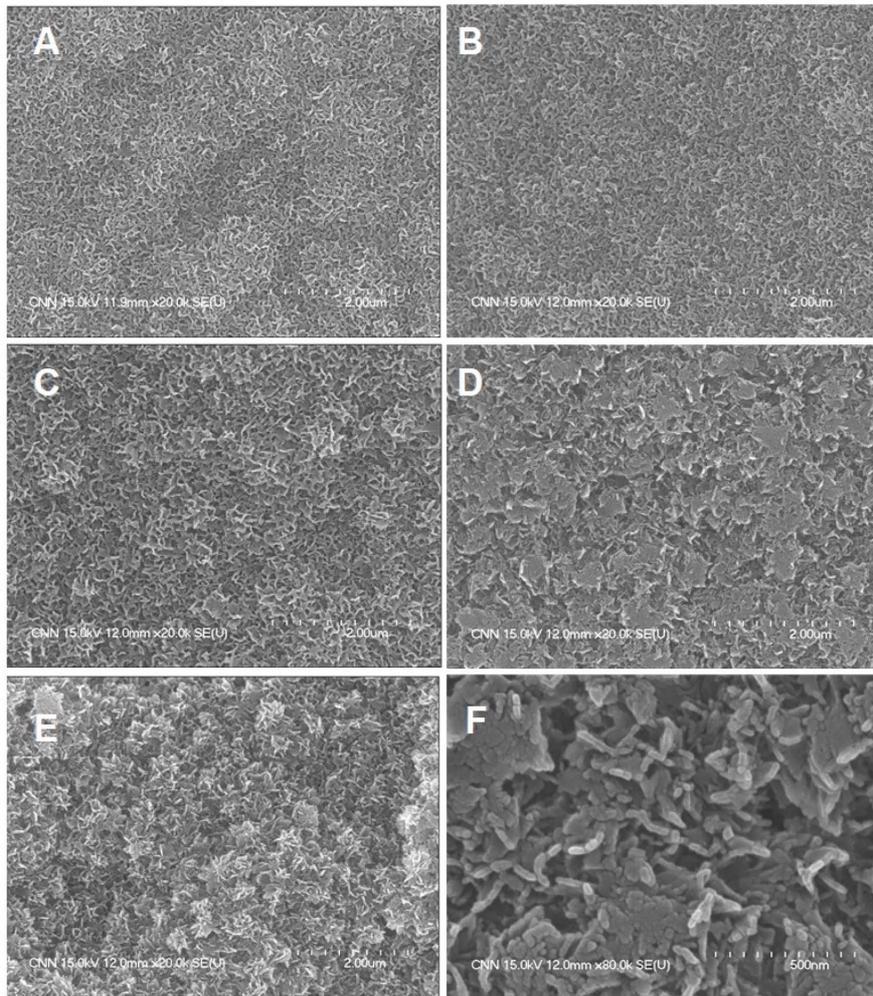
### 3.2. 수산화인회석 결정의 생성

이식한 골재료의 계면에는 조골세포에 의한 bone morphogenic proteins(BMPs) 등 여러 성장인자들의 촉진작용으로 뼈를 구성하는 수산화인회석을 비롯한 비결정성 인산칼슘(ACP)와 탄산인회석(carbonate apatite) 등이 효율적

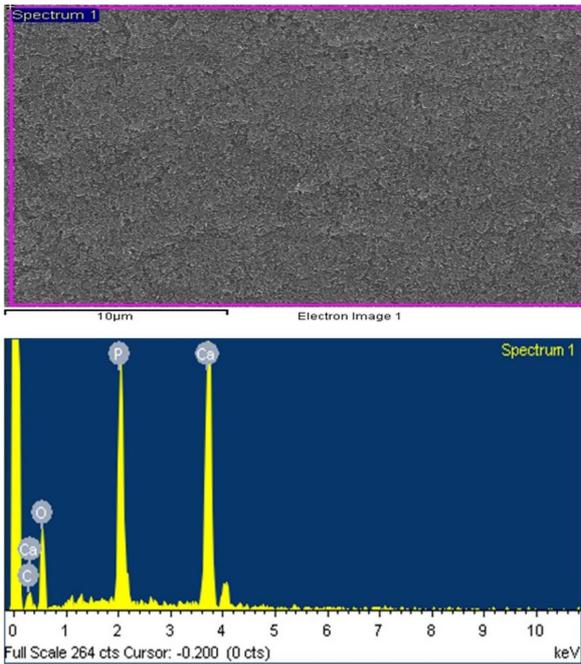
으로 생성된다[33]. 탄산인회석은 수산화인회석 결정의 계면에 형성되는 성분으로 뼈의 3-6%를 차지하고 내부의 수산화인회석의 알칼리성을 차단하며 골재생을 촉진한다[34]. 그러나 체액의 조성이 수산화인회석을 만들기 위한 미네랄 원소를 모두 갖추고 있으므로, SBF 환경에서의 in-vitro 소재 계면에도 카르복실기와 같은 핵화 사이트와 적정 조건을 갖추면 미네랄 이온들이 Posner's cluster[35]를 형성하여 중간체인 ACP를 형성하고 다시 재배열 핵화하여 수산화인회석을 생성한다[28,36,37]. 아세틸화 키토산의 표면에 있는 아미노기, 아세트아미드기, 수산기, 그리고 환경 pH에 따른 하이드로늄 이온에 의한 암모니아기 등이 SBF의 인산 이온과 탄산 이온을 유인하고 이어 칼슘 이온을 클러스터로 집적하여 전구체인 비결정성 탄산칼슘(amorphous calcium carbonate; ACC)이나 ACP를 형성하고 핵화하여 수산화인회석을 생성할 수 있다.

시료의 표면에 생성된 인회석의 조성구 구조를 SEM-EDX, XRD, 그리고 FT-IR로 분석하였다. Figure 4는 전계방사형

주사식 전자현미경(SEM)으로 관찰한 아세틸화 키토산 필름의 표면에 형성된 인회석의 2만배에서 8만배 확대한 SEM 사진이다. 모든 시료 표면은 조밀하게 성장한 판상 결정으로 조밀하게 겹쳐진 군집체로 덮여 있었으며, 시료의 아세틸화가 클수록 더 많고 더 크게 성장한 결정상의 군집이 관찰되었고, 시료 AC45에서 판상 결정의 두께는 약 20 nm였다. 이 결정상의 성분을 EDX로 SEM 관찰과 동시에 분석하여 Figure 5과 Table 5에 나타내었다. EDX로 분석한 결정상의 원소 조성은 모든 시료에서 atomic% 순으로 O, C, Ca, P 순이지만, 아세틸화율이 높은 시료일수록 Ca/P의 비율이 증가하여 1.67에 근접하였다. 전형적인 불활성 수산화인회석의 Ca/P 비율이 1.67이므로 시료의 아세틸화율이 50%에 가까울수록 수산화인회석을 형성하였으며, 인회석의 생성양도 많았다. 1.67보다 낮은 Ca/P 비율의 결정상은 그 정도에 따라서 활성을 가지는 calcium deficient hydroxyapatite이거나 ACP 등 다른 인회석으로 구성될 수 있다.



**Figure 4.** The morphologies (x20,000) of apatite in situ deposited on the surface of the acetylated chitosan film; (A) AC03, (B) AC15, (C) AC33, (D) AC45, (E) AC59, and (F) AC45 magnified x80,000.

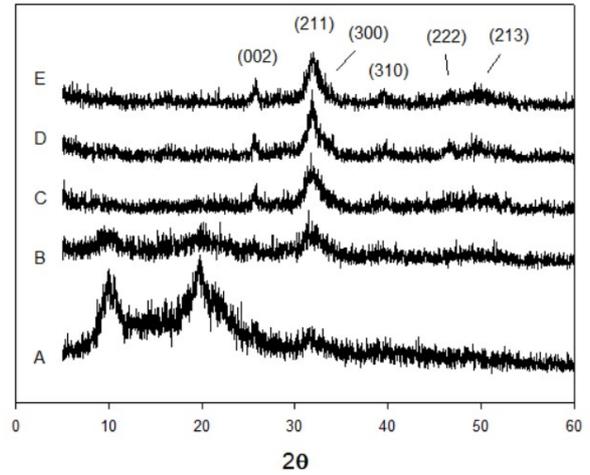


**Figure 5.** The apatite-deposited surface morphology (upper) of specimen AC45 that collected EDX data, and the typical spectrum (below) indicating composition and content of its constituent elements.

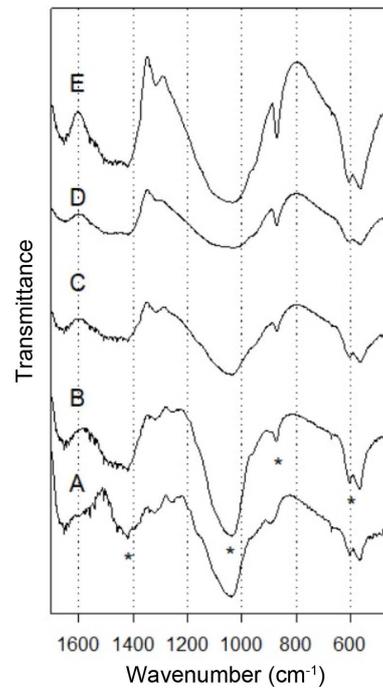
**Table 5.** The element ratios from the apatites deposited on the surface of the acetylated chitosan film

	Atomic %		Ca/P
	Ca	P	
AC03	16.37	11.70	1.40
AC15	14.52	10.16	1.43
AC33	18.58	11.68	1.59
AC45	27.01	16.04	1.68
AC59	17.25	11.22	1.54

결정구조를 확인하기 위한 X-선 회절 프로파일을 Figure 6에 나타내었다. 수산화인회석 결정의 (211), (112), (300)면이 중첩되어  $2\theta=32^\circ$  부근에서 나타났고,  $25.9^\circ$ 에서 (002),  $39.7^\circ$ 에서 (310),  $46.7^\circ$ 에서 (222) 등 비교적 넓은 회절폭의 수산화인회석의 특성 회절들이 나타났다. 따라서 시료에 따라 회절강도에 차이는 있지만 모든 시료에서 수산화인회석의 결정이 형성되었으며, 이러한 넓은 피크의 XRD 패턴은 결정성이 낮은 인회석의 전형적인 프로파일이다[38]. 그리고 인산 삼칼슘(tricalcium phosphate: TCP) 결정의  $2\theta=28^\circ$ 의 (214)면과  $34.5^\circ$ 의 (220)면의 특성 회절이 나타나지 않은 것으로 보아 TCP 결정은 유의미하게 형성되지 않았다. 아세틸화 3% 시료에서의  $2\theta=10.2^\circ$ 와  $20.2^\circ$  회절은 키토산의 (020)과 (040)면으로 아세틸화가 진행될수록 기질의 팽윤으로 인한 키토산/키틴 결정은 붕괴하고 수산화인회석



**Figure 6.** X-ray diffractograms of the acetylated chitosan films with apatite on its surface by SBF; (A) AC03, (B) AC15, (C) AC33, (D) AC45, and (E) AC59.

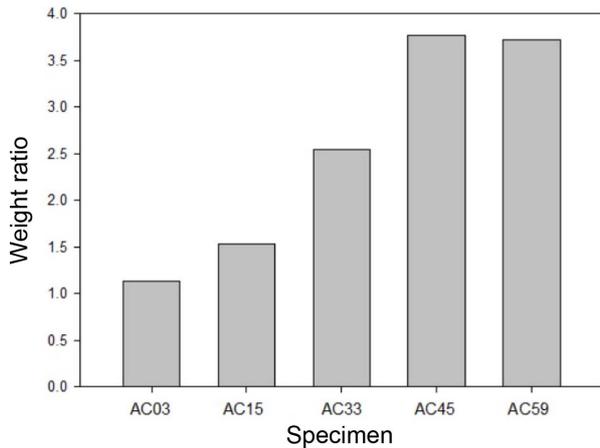


**Figure 7.** FT-IR spectra of apatites on the surface of the acetylated chitosan films; (A) AC03, (B) AC15, (C) AC33, (D) AC45, and (E) AC59.

결정은 증가하였다.

시료 표면에 생성된 인회석을 분석한 FT-IR spectra를 Figure 7에 나타내었다. 모든 시료에서  $1034\text{ cm}^{-1}$ ,  $653\text{ cm}^{-1}$ ,  $604\text{ cm}^{-1}$ 의 인회석의 phosphate( $\text{PO}_4^{3-}$ ) 특성 흡수대와  $1420\text{ cm}^{-1}$ ,  $872\text{ cm}^{-1}$ 의 carbonat( $\text{CO}_3^{2-}$ ) 특성 흡수대가 확인되었다. 이로써 생성된 인회석에는 탄산인회석의 성분도 포함되어 있는 것으로 분석된다.

합성 ACC로부터 인산에 의한 ACP 변환으로 수산화인회석의 형성을 보고한 M. Sawada의 연구[39]와 키토산에



**Figure 8.** The weight ratios of the acetylated chitosan film on which the apatite is deposited.

서 질산칼슘과 인산이암모늄으로부터 ACP나 낮은 결정성의 인회석 형성을 조사한 E. Toufik의 연구[37], 그리고 키토산에서 ACP로부터 수산화인회석으로 in-situ 전환에 대한 V. E. Silant'ev의 연구[40]에서와 같이 SBF에 의해서도 아세틸화 정도에 따라 키토산 표면에서 인산화 칼슘계 중간체를 거쳐 핵화하여 탄산염을 포함하는 나노 크기의 수산화인회석을 생성할 수 있었다.

동일한 배양 조건에서 인회석을 생성시킨 시료들의 중량 비를 Figure 8에 나타내었다. 아세틸화율이 50%에 가까운 시료일수록 더 많은 인회석을 생성하였다. 이는 키토산의 글루코사민 아미노기와 아세틸글루코사민 아세트아미노기의 수가 같아지는 비율에서 팽윤에 의한 SBF 흡수가 최대가 되어 인회석을 형성하는 이온들이 더 많이 집적할 수 있는 조건을 이루기 때문으로 생각된다.

#### 4. 결 론

아세틸화 키토산 필름의 표면에서 SBF에 의해 생성되는 수산화인회석의 생성과 결정화를 아세틸화 정도에 따라 조사하였다. 시료는 아세틸화율 3%에서 59% 사이의 아세틸화 키토산을 동일 조건으로 화학 가교와 동시에 필름으로 성형하여 준비하였다. 이렇게 준비된 시료 필름을 37 °C와 pH 7.4의 일정 유동 조건에서 SBF에 침지하여 표면에 수산화인회석을 생성시켜 결정으로 배양하였다.

먼저 시료는 아세틸화율이 50%에 가까울수록 가교 밀도는 낮아져 자발적 팽윤은 증가하였으며, SBF의 흡수율도 크게 증가하였다.

SBF에 배양한 모든 시료의 표면에서 인회석이 생성되었고, 동시에 형성된 수산화인회석 결정도 확인하였다. 표면에 생성된 결정상은 수산화인회석을 비롯한 인회석으로 약 20 nm 두께의 판상 결정을 형성하였다. 키토산의 아세틸화

율이 50%에 가까울수록 더 큰 결정상을 형성하였으며, 그 생성량도 증가하였고, 결정상의 Ca/P 비율도 점차 증가하여 1.67에 근접함으로써 수산화인회석이 주로 생성되었다.

**감사의 글:** 이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

#### References

1. H. Shi, Z. Zhou, W. Li, Y. Fan, Z. Li, and J. Wei, "Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering: A Brief and Comprehensive Introduction", *Crystals*, 2021, **11**, 149–166.
2. M. Du, J. Chen, K. Liu, H. Xing, and C. Song, "Recent Advances in Biomedical Engineering of Nano-Hydroxyapatite Including Dentistry, Cancer Treatment and Bone Repair", *Compos. Part B*, 2021, **215**, 108790.
3. H. Liu, H. Li, W. Cheng, Y. Yang, M. Zhu, and C. Zhou, "Novel Injectable Calcium Phosphate/Chitosan Composites for Bone Substitute Materials", *Acta Biomaterialia*, 2006, **2**, 557–565.
4. J. Chen, P. Pan, Y. Zhang, S. Zhong, and Q. Zhang, "Preparation of Chitosan/Nano Hydroxyapatite Organic-Inorganic Hybrid Microspheres for Bone Repair", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, **134**, 401–407.
5. Y. Zhai, F. Z. Cui, and Y. Wang, "Formation of Nano-Hydroxyapatite on Recombinant Human-like Collagen Fibrils", *Current Appl. Phys.*, 2005, **5**, 429–432.
6. G. Sui, X. Yang, F. Mei, X. Hu, G. Chen, X. Deng, and S. Ryu, "Poly-L-lactic Acid/Hydroxyapatite Hybrid Membrane for Bone Tissue Regeneration", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2007, **82A**, 445–454.
7. X. Xiao, R. Liu, Q. Huang, and X. Ding, "Preparation and Characterization of Hydroxyapatite/Polycaprolactone-Chitosan Composites", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2009, **20**, 2375–2383.
8. V. M. Correlo, L. F. Boesel, M. Bhattacharya, J. F. Mano, N. M. Neves, and R. L. Reis, "Hydroxyapatite Reinforced Chitosan and Polyester Blends for Biomedical Applications", *Macromol. Mater. Eng.*, 2005, **290**, 1157–1165.
9. Y. Hidaka, M. Ito, K. Mori, H. Yagasaki, and A. H. Kafrawy, "Histopathological and Immunohistochemical Studies of Membranes of Deacetylated Chitin Derivatives Implanted over Rat Calvaria", *J. Biomed. Mater. Res.*, 1999, **46**, 418–423.
10. B. M. Chesnutt, Y. Yuan, N. Brahmmandam, Y. Yang, J. L. Ong, W. O. Haggard, and J. D. Bumgardner, "Characterization of Biomimetic Calcium Phosphate on Phosphorylated Chitosan Films", *J. Biomed. Mater. Res.*, 2007, **82A**, 343–353.
11. M. L. Martins, T. S. Pinto, A. M. Gomes, J. P. R. L. L. Parra, G. C. Franchi Jr., W. F. Zambuzzi, and C. G. Rodrigues, "Immobilization of Paclitaxel on Hydroxyapatite for Breast Cancer Investigations", *Langmuir* 2020, **36**, 8723–8732.
12. B. Gieroba, A. Przekora, G. Kalisz, P. Kazimierzczak, C. L. Song, M. Wojcik, G. Ginalska, S. G. Kazarian, and A. Sroka-Bartnicka, "Collagen Maturity and Mineralization in

- Mesenchymal Stem Cells Cultured on the Hydroxyapatite-Based Bone Scaffold Analyzed by ATR-FTIR Spectroscopic Imaging”, *Mater. Sci. Eng. C*, 2021, **119**, 111634.
13. J. Redepenning, G. Venkataraman, J. Chen, and N. Stafford, “Electrochemical Preparation of Chitosan/Hydroxyapatite Composite Coatings on Titanium Substrates”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, **66A**, 411–416.
  14. Z. Ansari, M. Kalantar, A. Soriente, I. Fasolino, M. Kharaziha, L. Ambrosio, and M. G. Raucci, “In-situ Synthesis and Characterization of Chitosan/Hydroxyapatite Nanocomposite Coatings to Improve the Bioactive Properties of Ti6Al4V Substrates”, *Materials*, 2020, **13**, 3772–3789.
  15. W. M. Alsamolly, “Comparative Assessment of Remineralizing Potential of Recent Biomimetic Remineralizing Agents on Sub-surface Carious Lesions: An In Vitro Study”, *Egyptian Dental Journal*, 2021, **67**, 1711–1722.
  16. A. R. Costa-Pinto, A. L. Lemos, F. K. Tavaría, and M. Pintado, “Chitosan and Hydroxyapatite Based Biomaterials to Circumvent Periprosthetic Joint Infections”, *Materials*, 2021, **14**, 804–823.
  17. S. Balhuc, R. Campian, A. Labunet, M. Negucioiu, S. Buduru, and A. Kui, “Dental Applications of Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles — An Evidence-Based Update”, *Crystals*, 2021, **11**, 674–692.
  18. I. V. Fadeeva, S. M. Barinov, A. Y. Fedotov, and V. S. Komlev, “Interactions of Calcium Phosphates with Chitosan”, *Doklady Chemistry*, 2011, **441**, 387–390.
  19. A. Rogina, M. Ivanković, and H. Ivanković, “Preparation and Characterization of Nano-Hydroxyapatite within Chitosan Matrix”, *Mater. Sci. Eng. C*, 2013, **33**, 4539–4544.
  20. R. Kumar, K. H. Prakash, P. Cheang, L. Gower, and K. A. Khor, “Chitosan-Mediated Crystallization and Assembly of Hydroxyapatite Nanoparticles into Hybrid Nanostructured Films”, *J. R. Soc. Interface*, 2008, **5**, 427–439.
  21. J. Chen, K. Nan, S. Yin, Y. Wang, T. Wu, and Q. Zhang, “Characterization and Biocompatibility of Nanohybrid Scaffold Prepared via In Situ Crystallization of Hydroxyapatite in Chitosan Matrix”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, **81**, 640–647.
  22. Y. Hu, J. Chen, T. Fan, Y. Zhang, Y. Zhao, X. Shi, and Q. Zhang, “Biomimetic Mineralized Hierarchical Hybrid Scaffolds Based on In situ Synthesis of Nano-Hydroxyapatite/Chitosan/Chondroitin Sulfate/Hyaluronic Acid for Bone Tissue Engineering”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, **157**, 93–100.
  23. D. Huang, M. Xu, L. Niu, M. Pérez, J. Du, Y. Wei, Y. Hu, X. Lian, and W. Chen, “In Situ Biomimetic Formation of Nano-Hydroxyapatite Crystals on Chitosan Microspheres”, *Polym. Adv. Technol.*, 2020, **31**, 36–43.
  24. C.-H. Lin, Y.-S. Chen, W.-L. Huang, T.-C. Hung, and T.-C. Wen, “Hydroxyapatite Formation with the Interface of Chitin and Chitosan”, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2021, **118**, 294–300.
  25. J. Chen, B. Chu, and B. S. Hsiao, “Mineralization of Hydroxyapatite in Electrospun Nanofibrous Poly(L-lactic acid) Scaffolds”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2006, **79A**, 307–317.
  26. S.-H. Rhee and J. Tanaka, “Hydroxyapatite Formation on Cellulose Cloth Induced by Citric Acid”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2000, **11**, 449–452.
  27. A. O. Serhienko, T. A. Dontsova, T. Y. Mitchenko, S. V. Nahirniak, O. I. Yanushevska, and A. V. Lapinskyi, “Synthesis of Hydroxyapatite Using Various Saccharate Types”, *J. Chem. Technol.*, 2021, **29**, 10–18.
  28. S.-H. Rhee and J. Tanaka, “Effect of Citric Acid on the Nucleation of Hydroxyapatite in a Simulated Body Fluid”, *Biomaterials*, 1999, **20**, 2155–2160.
  29. M. M. Beppu, R. S. Vieira, C. G. Aimoli, and C. C. Santana, “Crosslinking of Chitosan Membranes Using Glutaraldehyde: Effect on Ion Permeability and Water Absorption”, *J. Membr. Sci.*, 2007, **301**, 126–130.
  30. P. J. Flory, “Principles of Polymer Chemistry”, Cornell University Press, 1953, pp.576–580.
  31. Y. Zhang, C. Xue, Y. Xue, R. Gao, and X. Zhang, “Determination of the Degree of Deacetylation of Chitin and Chitosan by X-ray Powder Diffraction”, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 1914–1917.
  32. N. A. Peppas in “Biomaterials Science”, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons Eds., 2nd Ed., Elsevier Academic Press, 2004, pp.100–106.
  33. Y. J. Park, K. H. Kim, J. Y. Lee, Y. Ku, S. J. Lee, B. M. Min, and C. P. Chung, “Immobilization of Bone Morphogenetic Protein-2 on a Nanofibrous Chitosan Membrane for Enhanced Guided Bone Regeneration”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2006, **43**, 17–24.
  34. R. Murugan, S. Ramakrishna, and K. P. Rao, “Nanoporous Hydroxy-Carbonate Apatite Scaffold Made of Natural Bone”, *Mater. Lett.*, 2006, **60**, 2844–2847.
  35. A. S. Posner and F. Betts, “Synthetic Amorphous Calcium Phosphate and Its Relation to Bone Mineral Structure”, *Acc. Chem. Res.*, 1975, **8**, 273–281.
  36. S. Ucar, S. H. Bjørnøy, D. C. Bassett, B. L. Strand, P. Sikorski, and J.-P. Andreassen, “Formation of Hydroxyapatite via Transformation of Amorphous Calcium Phosphate in the Presence of Alginate Additives”, *Crystal Growth & Design*, 2019, **19**, 7077–7087.
  37. A. Lotsari, A. K. Rajasekharan, M. Halvarsson, and M. Andersson, “Transformation of Amorphous Calcium Phosphate to Bone-like Apatite”, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 4170.
  38. E. Toufik, H. Noukrati, S. Abouricha, A. Barroug, and H. Benyoucef, “Novel Biocomposite Based on Functionalized Poorly Crystalline Apatite and Chitosan: A Physicochemical Evaluation”, *Materials Today: Proceedings*, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.649>.
  39. M. Sawada, K. Sridhar, Y. Kanda, and S. Yamanaka, “Pure Hydroxyapatite Synthesis Originating from Amorphous Calcium Carbonate”, *Scientific Reports*, 2021, **11**, 11546.
  40. V. E. Silant’ev, V. S. Egorin, L. A. Zemskova, S. L. Sinebryukhov, and S. V. Gnedenkov, “Synthesis of Phosphate Phases on Polysaccharide Template”, *Solid State Phenomena*, 2020, **312**, 314–318.