

HAp, Zeolite에 여러 금속 Ion 치환시 나타나는 항균효과

김윤종¹ · 김택남^{2,3} · 김상배¹ · 조성백¹ · 조건준¹ · 이태형¹

¹한국지질자원연구소

²배재대학교 신소재공학부

³배재대학교 바이오 의학 연구센터

Antimicrobial Effect of Metal Ions Substitution to HAp, Zeolite

Yun Jong Kim¹, Taik Nam Kim^{2,3}, Sang Bae Kim¹, Sung Baek Cho¹, Keon Joon Cho¹ and Tae Hyung Lee¹

¹Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources, Taejon, 305-350, Korea

²Div. of Advanced Materials Engineering, Pai Chai University Taejon, 302-735, Korea

³Research Center for Biomedical Resources (Bio-Med RRC)

(2000년 8월 28일 받음, 2000년 12월 15일 최종수정본 받음)

초 록 흡착재료에는 hydroxyapatite (HAp), zeolite, 분자체탄소, 활성탄, 알루미늄 등의 재료가 많이 사용되고 있다. 이들 흡착재료 중에서 금속이온과 양이온 교환반응이 좋은 HAp, zeolite는 폐수처리과정에서 많이 사용되고 있지만, 그러나 이 폐수처리 과정에서 문제되는 것은 유해한 중금속뿐만 아니라 많은 세균들이 이 폐수에 존재하고 있어 수질오염 등의 여러 가지 문제를 야기시키고 있다. 본 연구는 여러 중금속 흡착재료 중에서 HAp, zeolite에 항균효과가 있다고 알려진 금속이온 (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) 들을 이온 치환시켜 항균성을 흡착재료에 부여하고자 한다. HAp, zeolite에 Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 의 금속이온들을 치환시킨 후, *E. Coli*로 항균효과를 측정하였다. HAp, zeolite와 여러 금속이온 치환후의 항균효과를 측정한 결과, Ag^+ 로 이온치환 시킨 HAp, zeolite에서는 1×10^{-2} cell/ml 농도의 *E. Coli*에서 24시간까지 완벽한 항균효과를 보였고, Cu^{2+} 와 Zn^{2+} 으로 이온치환 시킨 경우에는 좋은 항균효과를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Feng, et. al.이 발표한 바와 같이¹⁾ Ag ion이 cell 내부의 DNA에 영향을 끼쳐, 복제 능력을 떨어뜨리고 cell을 비활성화 시키기 때문이다.

Abstract Generally, hydroxyapatite(HAp), zeolite, carbon molecular sieve, activated carbon and alumina are used as heavy metal ions adsorption materials. Among those adsorption materials, HAp which has good positive ion-exchange ability with metal ion, and zeolite are utilized in wastewater treatment. Most of water pollutions are caused by hazardous heavy metals ions as well as bacteria in waste water. In this study, adsorption materials (HAp and zeolite) are ion-exchanged with a well known antimicrobial metal ions, such as Ag^+ , Cu^{2+} and Zn^{2+} , in order to give a adsorption of heavy metal ions and a killing effects of bacteria. The antimicrobial effects of adsorption materials are observed using by *E. Coli*. The results show that there is a complete antimicrobial effect in the adsorption materials with Ag^+ at the concentration of 1×10^{-2} cell/ml of *E. Coli* until 24 hours. However, there is not good antimicrobial effects in the adsorption materials with Cu^{2+} and Zn^{2+} substitution. Feng et. al. showed the denaturation effects of silver ions which induces the condensed DNA molecules and losing their replication abilities.¹⁾

Key words : HAp, zeolite, antimicrobial effect, ion-exchange

1. 서 론

흡착(adsorption)이란 어떤 성분들이 고체 흡착체의 표면으로 전달되는 분리공정이다. 흡착에는 Van der Waals force라 일컬어지는 쌍극자 또는 사극자 사이의 인력 및 분산력으로 생긴 분자간 응집력에 의해 분자구조에 변화를 주지 않고 전자이동이 없이 일어나는 물리흡착과 경계면과 흡착된 물질사이에 전자가 이동하여 정전기적 작용에 의한 화학흡착이 있다. 이러한 흡착 특성을 갖는 여러 종류의 흡착체들 중 hydroxyapatite (HAp)는 생체적합성이 우수하여 implant 재료로 많이 사용되고 있고, 또한 중금속 흡착재료로서도 사용되고 있다.²⁾ 또한 HAp를 이용한 항균성 연구

는 Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 이온에서 시험되었으며 Ag^+ 이온치환 HAp에서 *E. Coli*, *S. Epidermis*, *P. Auregunosa* 등에서 매우 좋은 항균효과를 보여주었다.^{3,4)} Zeolite는 흡착제, 이온교환제, 촉매, 폐수처리제, 분리제, 건조제 등으로 널리 사용되고 있다.⁵⁻¹¹⁾

본 연구에서는 여러 중금속 흡착재료 중에서 HAp, zeolite에 화학흡착으로 항균효과가 있다고 알려진 금속이온 (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) 들을 이온 치환시켜 항균성기능을 부여하고자 하였고, 이들 재료에 Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 의 금속이온들을 치환시킨 후, *E. Coli*로 항균효과를 viable count method를 이용하여 측정하였고, scanning electron microscope (SEM)으로 비교 관찰하였다. 본 실험의 주요목

적은 폐수처리 또는 우리 일상생활에서 사용되는 흡착제에 항균성을 부여하여 항균성 흡착제를 개발하는데 있다.

2. 실험 방법

2.1. HAp, zeolite의 합성 및 금속 이온치환

2.1.1. HAp와 항균성 HAp 합성

Hydroxyapatite(HAp)와 Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 을 함유한 항균성 HAp는 습식화학법으로 만들었다.³⁾ Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} 을 함유한 항균성 HAp는 각각 334mℓ의 증류수에 $AgNO_3$ (Junsei Chemical Co., Ltd., 99.8%), $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ (덕산약품공업주식회사, 99%), $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (덕산약품공업주식회사, 95%)를 각각 0.01mol씩 넣어 자석교반기로 완전히 녹여 수용액 상태로 만든 후, $Ca(OH)_2$ (Junsei Chemical Co., Ltd., 95%)를 0.167mol을 넣어 24시간 동안 혼합시켰다. 혼합된 수용액의 pH를 관찰하면서 0.1mol의 H_3PO_4 를 한 방울씩 떨어뜨려 pH가 9.1이었을 때 완료하였다. 이때 수용액은 화학 반응동안 자석교반기로 교반시켰다. pH를 9.1에서 화학 반응을 완료한 이유는 Ca/P의 비율이 1.67인 화학양론적인 HAp를 만들 수 있기 때문이다.¹³⁾ 화학 반응이 끝난 후 수용액을 상온에서 24시간 동안 방치하여 침전물을 생성시키고, 이것을 120℃ 건조기에서 수분을 증발시킨 다음, 유발과 유봉으로 분쇄하였다. 제조된 HAp와 항균성 HAp 원료 분말에 대해 SEM(Topcone ABS 32, Japan)과 X-선 회절분석기(SHIMADZU XD-D1w)를 이용 HAp의 생성 유무와 결정성을 조사하였다. 이때 측정 조건은 Cu K α (30kV, 30mA), 주사범위(2 θ)는 10°~60°, 주사 속도는 4°/min이었다.

2.1.2. 금속이온치환 zeolite 제조

금속이온치환 zeolite는 증류수에 $AgNO_3$, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 를 각각 0.01mol씩 넣어 수용액상으로 만든 후, zeolite(4A type, WAKO Pure Chemical Industries, LTD)을 넣어 자석교반기로 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 그 후 60℃ 건조기에서 건조시켰다.

제조된 금속이온치환 zeolite 원료 분말에 대해 SEM(Topcone ABS 32, Japan)과 X-선 회절분석기를 이용하여 조사하였다. 이때 측정 조건은 Cu K α (30kV, 30mA), 주사범위(2 θ)는 20°~80°, 주사 속도는 4°/min이었다.

2.2. 항균효과 측정

먼저 1mℓ LB 용액에 *E. Coli* colony 한 개를 멸균된 백금선으로 떠서 1mℓ LB 용액에 넣은 후 27.5℃ 150rpm의 교반배양기(중도종합상사 Model:SCS-301)에 넣어 12시간 동안 혼합하였다. 그런 후 0.1mℓ를 채취해 9.9mℓ PBS 용액에 넣어 다시 30분간 혼합했다. 잘 혼합된 *E. Coli*가 들어있는 PBS 용액에서 다시 0.1mℓ를 취해서 9.9mℓ PBS 용액에 넣고 30분간 혼합하였다. 이렇게 만든 용액에는 1×10^{-2} /mℓ의 *E. Coli*가 들어있다. 이 용액을 PBS 용액으로 1×10^{-4} /mℓ의 *E. Coli*가 9.9mℓ PBS 용액에 들어있게 희석하여 출발물질을 만들었다. 10mℓ Phosphate Buffer Sa-

line(PBS) 용액이 들어있는 각각의 시험관에 1×10^{-4} cell/mℓ의 양을 포함하는 *E. Coli*를 각각 0.1mℓ씩 넣고, 항균효과를 알아보기 위해 HAp, zeolite와 금속이온치환 HAp, zeolite를 각각 PBS 용액과 *E. Coli*가 들어있는 시험관에 넣었다. 그 후 교반배양기에서 37℃, 150rpm의 속도로 24시간 동안 교반한 후 각각의 시험관으로부터 0.1mℓ씩 채취하여, 20mℓ LB agar plate에 잘 분산하여 넣고 37℃의 배양기에서 배양하면서 매 시간마다 colony의 수를 세었다.³⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. HAp, zeolite의 합성 및 금속 이온치환

HAp, zeolite와 금속이온치환 HAp, zeolite의 XRD 관찰 결과를 그림 1, 2에 각각 나타내었다. 먼저 HAp와 금속이온 치환된 HAp를 비교해 보면, HAp, Cu-HAp, Zn-HAp에서는 뚜렷한 HAp(JCPDS 34-0010)의 상을 발견할 수 있었으나, Ag-HAp에서는 HAp 상이 뚜렷하지 않고, Ag 치환에 의한 Nitrate-apatite상(Ref. 3)이 나타나는 것으로 보고되었다.³⁾ 이러한 XRD 결과로 보아 Ag^+ 이온치환 HAp가 다른 성질을 보일 것으로 유추할 수 있다. 한편 금속이온치환 zeolite에서도 이와 비슷한 현상을 발견할 수 있는데, Ag 이온치환 zeolite에서 주요 peak는 zeolite와 같으나 minor peak는 다른 금속이온치환 zeolite에서는 나타났으나, Ag-zeolite에서는 약하거나 거의 나타나지 않았다. 이것으로부터 Ag^+ 치환한 HAp나 zeolite는 다른 금속이온 치환한 것과 다른 성질을 보일 것으로 유추할 수 있다.

습식화학법으로 제조된 HAp와 금속이온 치환된 HAp 분말을 SEM으로 관찰한 결과의 사진을 그림 3(a), (b),

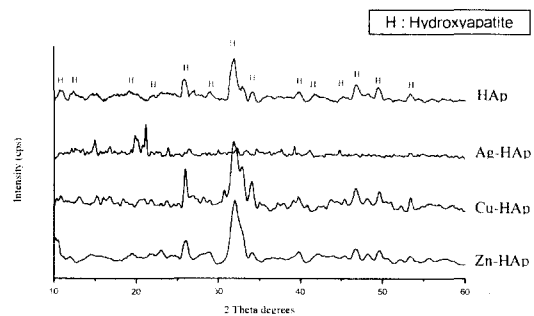


Fig. 1. The X-ray diffraction pattern of HAp, Ag-HAp, Cu-HAp and Zn-HAp.

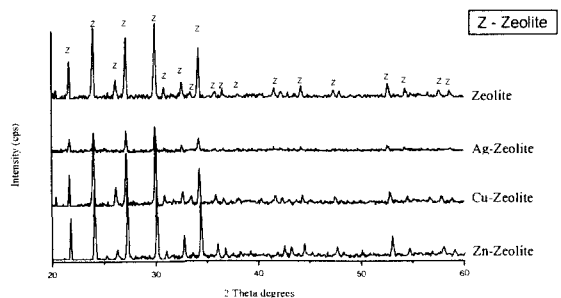


Fig. 2. The X-ray diffraction pattern of zeolite, Ag-zeolite, Cu-zeolite and Zn-zeolite.

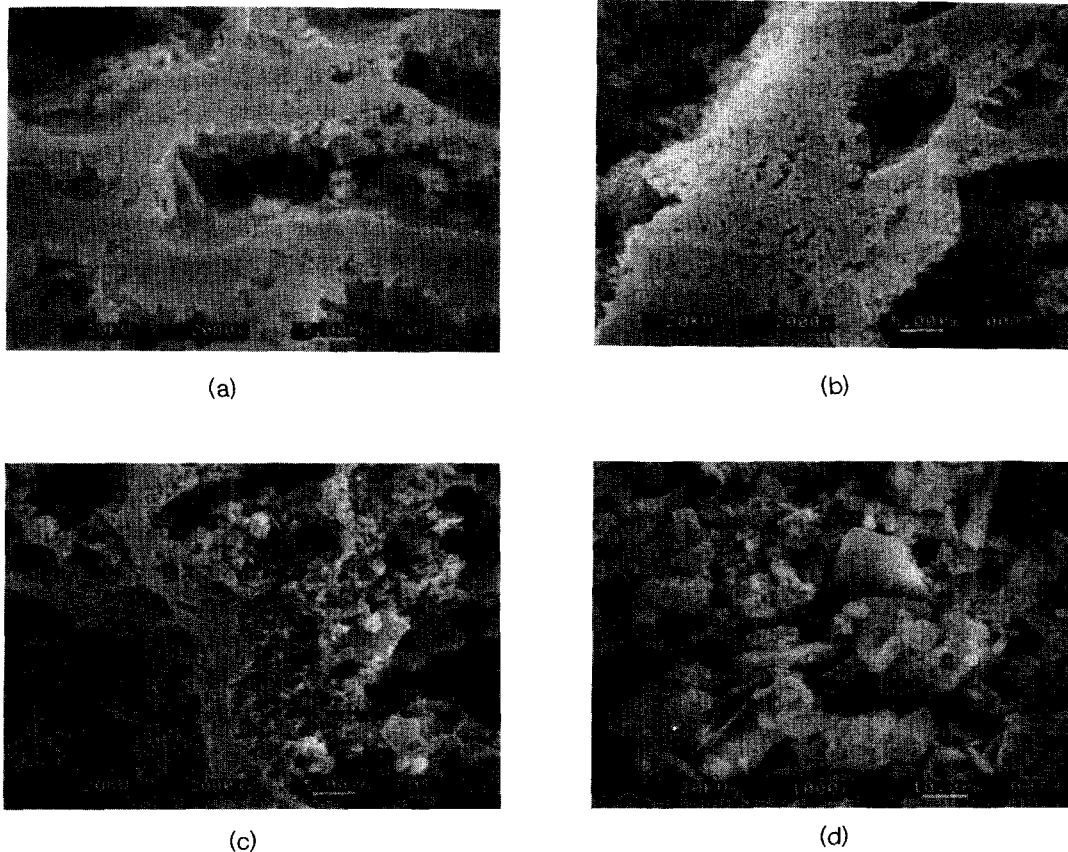


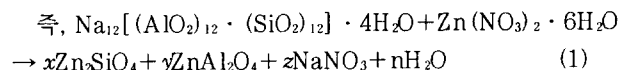
Fig. 3. SEM photograph of (a) HAp (b) Ag-HAp (c) Cu-HAp (d) Zn-HAp.

(c), (d)에 나타내었다. 습식방법으로 제조된 HAp는 입자 크기가 1~3 μm 로 관찰되며, 판상의 입자로 구상과 함께 발견된다. 또한 입자들이 유발과 유봉으로 미분쇄하였음에도 불구하고 뭉쳐진 형태를 보여주고 있다. 이러한 현상은 시판되는 Aldrich 제품의 HAp에서도 같은 현상으로 보이는 것으로 보아, 이것은 HAp의 (OH)기 때문에 기인하는 것으로 생각된다.

한편 Ag-HAp의 SEM 조직에서는 구형의 입자가 1 μm 정도로 발견되며 이것또한 마찬가지로 미분쇄하였음에도 불구하고, 뭉쳐진 형태를 보이고 있다. Cu로 치환된 HAp는 그림 3(c)에서 볼수 있는데, 구형의 입자와 판상이 서로 섞여 있는 것을 발견 할 수 있다. 또한 구형 입자의 크기는 1 μm 이하로서 판상의 5 μm 정도와 크게 차이가 남을 알 수 있다. HAp와 마찬가지로 입자들이 뭉쳐져 있음을 알 수 있다. 한편 Zn로 치환된 HAp는(그림 3(d)) 판상과 각주상이 서로 섞여있고 구형의 입자는 거의 발견할 수 없었다. 이러한 미세조직으로부터 Ag 치환 HAp에서 입자 표면적이 다른 금속치환 HAp에 비해 크게 보이므로 Ag이온의 방출이 더욱 효과적일것으로 생각되고, 그에 따라서 항균효과가 더 크게 나타날 것으로 생각할 수 있다.

Zeolite와 금속이온 치환된 zeolite를 SEM으로 관찰한 결과는 그림 4(a), (b), (c), (d)에 나타내었다. Zeolite의 경우는 그림 4(a)에 나타내었다. 육면체의 0.5 μm ~4 μm 크기의 zeolite를 발견할 수 있다. 한편 Ag로 치환한 zeolite의 미세조직은 그림 4(b)에 나타내었는데, 치환하지 않은

zeolite와 거의 차이를 발견할 수 없었다. 이는 Ag⁺ 이온이 zeolite의 5Å의 기공크기 안에 흡착되어 생기는 현상으로 생각할 수 있다. 왜냐하면 Ag⁺의 크기가 0.97Å으로 zeolite의 기공크기 보다 작기 때문이다. Cu를 치환한 zeolite에서도 HAp와 비슷한 미세조직을 보이고 있으며 이 또한 Cu²⁺ 이온의 크기가 0.72Å으로 zeolite 기공 보다 작기 때문으로 생각할 수 있다. 한편 Zn-zeolite의 경우에는 zeolite 표면에 침전된 물질들이 붙어 있는 것을 발견할 수 있는데(그림 4(d)) 이것은 열역학 자료로부터 다음과 같은 화합물을 유추할 수 있다. 즉 zeolite와 Zn(NO₃)₂·6H₂O를 상온에서 반응시켰을 때, silicate와 aluminate형인 Zn₂SiO₄와 ZnAl₂O₄가 생겨날 수 있으며, 이 물질이 zeolite 표면을 덮은 것으로 생각된다.



Zn₂SiO₄와 ZnAl₂O₄의 열역학 data는 표 1과 같다.¹³⁾

또한 이러한 반응을 Cu(NO₃)₂·3H₂O 용액에서 열역학 data를 조사하여 보면 표 2와 같다.¹³⁾

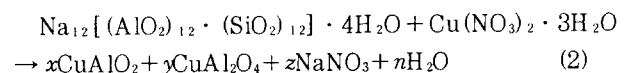


표 2에서와 같이 Cu(NO₃)₂·3H₂O 용액에서는 zeolite

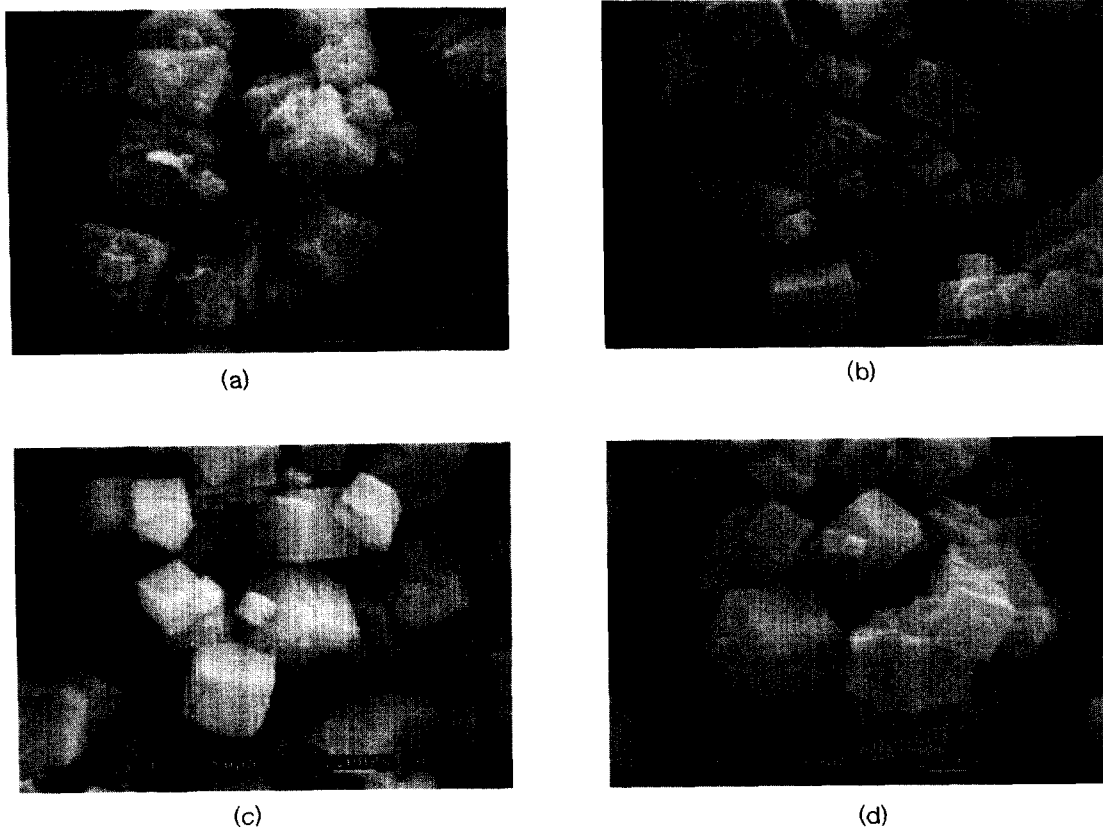


Fig. 4. SEM photograph of (a) zeolite (b) Ag-zeolite (c) Cu-zeolite (d) Zn-zeolite.

Table 1. The Result of thermodynamic for Zn_2SiO_4 and $ZnAl_2O_4$.¹³⁾

	ΔH°_{298} (kJ/mole)	S°_{298} (J/deg mole)	ΔG_{298} (kJ)
Zn_2SiO_4	-1.85 ± 0.5	7.47 ± 0.3	-4.16
$ZnAl_2O_4$	-2.55 ± 0.4	4.95 ± 0.5	-4.03

Table 2. The Result of thermodynamic for $CuAlO_2$ and $CuAl_2O_4$.¹³⁾

	ΔH°_{298} (kJ/mole)	S°_{298} (J/deg mole)	ΔG_{298} (kJ)
$CuAlO_2$	-0.67 ± 0.5	3.80 ± 0.3	-1.81
$CuAl_2O_4$	$+1.04 \pm 0.5$	6.33 ± 0.4	-0.84

가 반응하여 $CuAlO_2$ 또는 $CuAl_2O_4$ 가 생길수 있으나 ΔG_{298} 이 적은편이어서 그 생성 정도가 매우 적어서 SEM 조직에서는 관찰되지 않은 것으로 생각할 수 있다. 그러나 Zn(NO_3)₂·6H₂O 용액에서 zeolite는 Zn_2SiO_4 와 $ZnAl_2O_4$ 의 두가지 물질을 생성할 수 있으며 ΔG_{298} 이 -4.16kJ/mol, -4.03kJ/mol로 매우 큼을 알 수 있다.

즉, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ 용액에 비하여 훨씬 많은 제2상을 생성하고 그것이 zeolite 표면에 붙게 되며 Zn^{2+} 이온이 zeolite pore에 흡착되어 들어가지 않게 될 것이다. EPMA 확인은 다음 실험에서 확인할 예정이다.

한편 $Ag(NO_3)_2$ 에서는 silicate나 aluminate를 형성하지

않으므로 Ag^+ 이온이 zeolite의 pore에 잘 흡착되어 들어갈 수 있음을 알 수 있다.

2.3. 항균효과 결과

HAp, zeolite와 금속이온치환 HAp, zeolite의 *E. Coli*에 대한 항균효과 결과를 그림 5, 6에 나타내었다. *E. Coli* 항균효과 시험에서 Ag로 치환된 HAp에서는 24시간까지 98% 이상 완벽한 항균효과를 보이고 있으나, Cu와 Zn이온으로 치환된 HAp에서는 colony 숫자가 20~30으로 약 70~80%의 다소 미흡한 항균효과를 나타내고 있다. 즉 HAp나 control sample에 비하여는 좋은 결과를 보이나, Ag 처리한 HAp에 비해서는 좋지 않은 항균효과를 보이고 있다. 한편 Ag 이온처리한 zeolite에서도 colony 숫자가 5개 이하의 95% 이상의 항균효과를 24시간까지 보이고 있고, 이것은 미세조직에서 검토한 것과 잘 일치 하고 있다. 또한 Cu와 Zn으로 처리한 zeolite의 경우도 비교적 양호한 항균효과를 나타내는 것으로 그림 6에서 보이고 있다. 그러나 Ag-zeolite에 비하여 좋지 않은 이유는 zeolite 표면에 Cu-aluminate와 Zn-silicate, Zn-aluminate가 생성되어 Cu와 Zn 이온의 항균효과를 떨어뜨려서 나타나는 결과로 생각할 수 있다. 한편 Zn에 비하여 일반적으로 Cu 이온이 효과적인 이유는 Zn 이온이 HAp와 반응하는 경우 $CaZn$, $CaZn_2$, $CaZn_5$, $CaHPO_4$ 등의 생성물이 생기게되고 이것으로 인하여 물질중 치환될 수 있는 Zn 이온의 양이 Cu에 비하여 적기 때문에 나타나는 것으로 생각할 수 있다. 이러한 결과는 zeolite에서도 비슷하게 나타나는데, 즉 Zn-silicate,

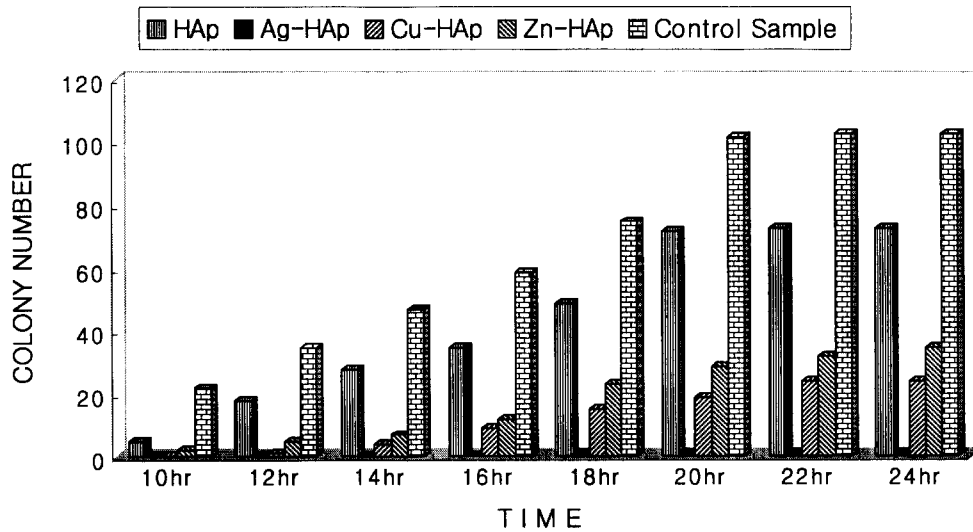


Fig. 5. Graphs of antimicrobial effects of HAp and Ag-HAp, Cu-HAp and Zn-HAp.

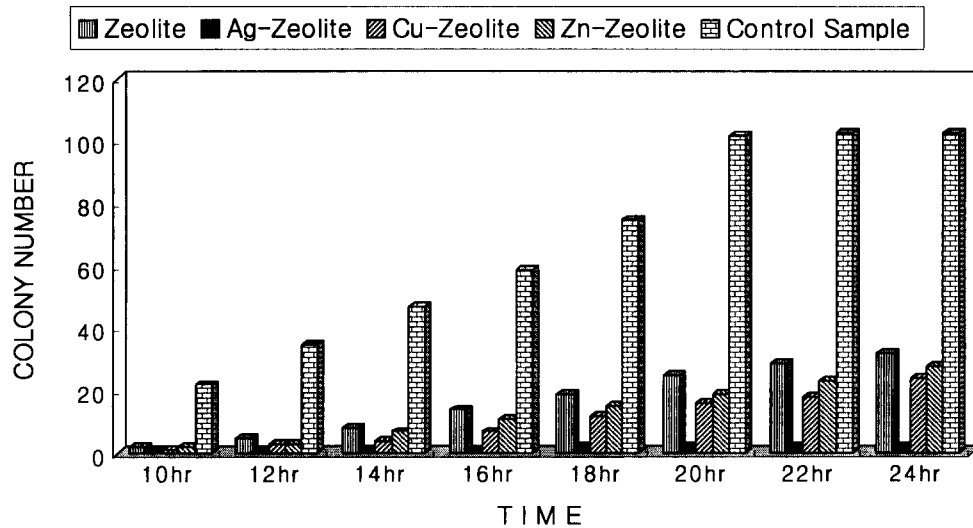


Fig. 6. Graphs of antimicrobial effects of zeolite and Ag-zeolite, Cu-zeolite and Zn-zeolite.

Zn-aluminate의 생성이 많아 Zn 이온농도가 떨어지고 그로 인하여 항균력이 같은 농도의 Cu에 비하여 떨어지는 것으로 생각된다. 즉, Cu 이온은 Cu-aluminate 만을 생성하게 되고 ΔG의 (-)폭이 적어 생성량이 적게되고 남아있는 Cu 이온의 양이 Zn 이온의 양보다 많으므로 항균력은 Cu가 Zn에 비하여 좋음을 알 수 있다. 이러한 현상은 그림 5와 그림 6에서 잘 일치하고 있다.

4. 결 론

Ag⁺로 치환된 HAp, zeolite에서는 *E. Coli*에 대하여 98% 이상의 항균효과를 보이고 있으며 Cu²⁺로 치환된 HAp와 zeolite는 Zn²⁺으로 치환된 것에 비하여 좋은 항균효과를 나타내고 있다. 이것은 Cu-aluminate와 Zn-silicate, Zn-aluminate에 의한 금속이온 잠식 때문에 나타나는 현상으로 생각된다. 또한 Zn-zeolite의 표면에 부착된 물질은 Zn-silicate 또는 Zn-aluminate로 생각된다.

5. 감사의 글

본 논문은 1999년도 배재대학교 교내학술연구비지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다. 또한 배재대학교 바이오 의약 연구센터의 연구비 지원에 감사드립니다 (No. 1999-08 RRC).

참 고 문 헌

1. Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J. O. Kim, *J. of Biomed. Mater. Res.*, **52**, 662 (2000).
2. Hideki Monma, "Bioceramics-Apatite Bio-ceramics", *Proceedings of the First Korea-Japan Seminar on New Ceramics*, **176** (1984).
3. T.N. Kim, Q.L. Feng, J.O. Kim, J. Wu, H. Wang, G. Q. Chen, F.Z. Cui, "Antimicrobial Effects of Metal Ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in Hydroxyapatite." *J. Mat.*

- Sci. Mat. Med., **9**, 129 (1998).
4. T.N. Kim, Q.L. Feng, J. Wu, J.O. Kim, "Silver-impregnated HAp-coating on alumina substrate for prevention of infection", J. of Korean Vaccum Society, **6**, 57 (1997).
 5. D.W. Breck, J. Chem. Educ., **41**, 478, (1964).
 6. H.G. Smolka, M.J. Schwuger, Colloid and Polymer Sci., **256**, 270, (1978).
 7. C.L. Angell, J. Phys. Chem., **69**, 3463. (1965).
 8. H.S. Sherry. "The Ion-Exchange Properties of Zeolites". J. Phys. Chem., **70**, 1158 (1966)
 9. T. Ikeda, M. Sasaki, T. Yasunaga, "Kinetic Studies of Ion Exchange of Alkylammonium Ion for Sodium Ion in Aqueous Suspensions of Zeolite 4A Using the pressure-Jump Method". J. Phys. Chem., **87**, 745 (1983).
 10. H. Gaus, W. Lutze, "Kinetics of Sr/Ba and Sr/Ca Ion Exchange in Synthetic Zeolite A", J. Phys. Chem., **85**, 79 (1981).
 11. D. Drummond, A.D. Jonge, L.C. Rees, "Ion-Exchange Kinetics in Zeolite A", J. Phys. Chem., **87**, 1967 (1983).
 12. Hiddki Aoki, "Science and Medical Applications of Hydroxyapatite", JAAS. (1991).
 13. O. Kubaschewski, C.B. Alcock, Metallurgical thermochemistry 5th Edition, pp. 282, 322, Int., Series on Mat., Sci., and Technology.