

Na와 F 원소가 칼슘 포스페이트 글라스의 용해도 및 세포 활성도에 미치는 영향

김민철, 이병현, 김경남, 김광만, 이용근*

연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소

Effect of Na and F Elements on the Solubility and Cell Viability in Calcium Phosphate Glass

Min-Chul Kim, Byung-Hyun Lee, Kyoung-Nam Kim, Kwang-Mahn Kim, Yong-Keun Lee*

Department and Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering, Yonsei University College of Dentistry, Seoul 120-752, Korea

(Received: Mar. 19, 2010; Revised: Jun. 09, 2010; Accepted: Jun. 14 2010)

ABSTRACT

The development of phosphate glasses for clinical applications has attracted much interest because their chemical and physical properties make them suitable for use as bone-graft materials. We prepared various compositions of $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2\text{-Na}_2\text{O}$ glass system by conventional melting process. The objective of this work was to investigate the effect of sodium and fluorine elements on calcium phosphate glasses for bone regeneration by measuring solubility and biological response. Atomic ratio of $(\text{Ca}+\text{Na})/\text{P}$ and a content of P_2O_5 were fixed at 0.6 and 45.45 mol%, respectively. To measure solubility, the pellet was kept into 30 mL of distilled water. At the same time as the solubility measurements, the pH of the solution was also measured. Ca, P, and Na ion dissolution were measured by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrophotometer and the release of F ion was determined using Fluoride Ion Selective Electrode. Biological response of glass extracts was measured using WST-1 method. Glasses with high content of sodium oxides showed larger solubility rate, but in case of glasses with F element, there were few changes. The dissolved amount of Ca and P ion was related to solubility; with high solubility, the dissolved amount was increased. Except for glass with CaF_2 and Na_2O content of each 9 mol%, with increasing added oxides content and time, the pH value tended to be lower. pH values decreased with P ion content increasing. The viability of MG 63 cell in glass extracts of 2 weeks showed above 90%.

KEY WORDS: Calcium phosphate, Solubility, Dissolution, Ion release, Cell viability

서론

사고와 질병으로 인해 손상된 골조직을 재건하고자 하는 연구개발이 계속되어 지고 있다. 사람의 골은 단단한 무기질과 부드러운 유기질로 되어 있다. 무기질은 아파타이트의 미세결정으로, 유기질은 대부분이 콜라겐과 다당체를 포함하는 일부의 비 콜라겐 성 물질로 구성되어 있다. 수분을 제외한 골은 65%의 아파타이트와 35%의 콜라겐을 주성분으로 한

유기물로 되어 있다고 말할 수 있다. 그리고 치아를 구성하고 있는 주성분 또한 아파타이트이다. 이렇게 골과 치아에 존재하는 아파타이트는 칼슘 포스페이트(Ca-P)로 총치의 생성, 진행 및 억제와 관련이 있어 구강생물학과 구강의학에서 특별한 관심을 끌고 있다. 칼슘 포스페이트로는 amorphous calcium phosphate (ACP), dicalcium phosphate dihydrate (DCPD), dicalcium phosphate anhydrate (DCP), octacalcium phosphate (OCP), tricalcium phosphate (TCP), 그리고 가장 널리 알려진 hydroxyapatite (HA) 등이 있다 (LeGeros, 1991).

골 수복과 재생에 효과적인 골전도와 골유도 특성을 가진 다양한 형태의 세라믹 재료로 HA, Bioglass, A-W 결정화

* 교신저자: 서울시 서대문구 성산로 250 연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실, 이용근

Tel: 02-2228-3083, E-mail: leeyk@yuhs.ac

* 본 연구는 연세대학교 치과대학 2008년도 교수연구비(6-2008-0221)에 의해 이루어졌음.

유리 등과 같은 생체재료가 개발되었다(LeGeros, 1998; Hench, 1991). 이상적인 대체물은 주변 조직과 비슷한 조성을 가져야 하고, 부식의 영향을 최소화하며 염증 반응이 없어야 한다. 그러나 이러한 생체재료는 응용에 심각한 제한성이 있다. 칼슘 포스페이트를 기반으로 하는 재료는 대부분 결정 형태이어서 화학 조성을 쉽게 바꿀 수 없기 때문에 생체재료로서의 응용에 제한이 있다(Abrahams 등, 1997). 또한 Bioglass와 같은 실리케이트 재료는 생체 내에서 빠른 치료를 유도하는 특성을 나타냈지만, 불용성 실리카가 잔존하여 장기간의 효과를 확신하기 어렵다(Salih 등, 2000).

생체 조직을 대체할 수 있는 조직재생용 분해성 스키펴드는 일반적으로 폴리글리콜산과 폴리락트산계 중합체와 공중합체가 가수분해를 통해 분해되어 이산화탄소와 물로 변하기 때문에 사용되고 있다(Slivka 등, 1997). 하지만 이러한 중합체들은 비결정상과 결정상으로 구성되어 있어서(Li 등, 1990), 비결정상이 우선적으로 가수분해 되기 때문에 문제를 야기한다(Therin 등, 1992). 비결정상이 먼저 가수분해 되면 중합체의 구조가 허물어져 작은 결정 입자들이 용출됨으로써 염증을 야기할 수 있다고 보고되었다(Bahr 등, 1999; Kumar 등, 1997).

이에 반해 칼슘 포스페이트 글라스는 완전한 비결정성이어서 분해를 예측할 수 있고, 조성 변화에 따라 생분해 속도를 용이하게 변화시킬 수 있고(Abrahams 등, 1997), 용해성이 우수할 뿐 아니라, 제어할 수 있고, 낮은 용융점, 유리 전이온도 및 연화 온도를 갖는다(Shih 등, 1998)는 특징이 있다. 이러한 칼슘 포스페이트 글라스는 다양한 조성 변화로 골과 화학적으로 유사하기 때문에 적당한 양의 이온이 용출되어 신생골의 생성을 자극하기 때문에 경조직 수술 및 정형외과용 개발로 충분한 가능성이 있다(Salih 등, 2000; Hench, 1991; Burine 등, 1983). 이온의 용출량을 조절하여 재료의 독성을 감소시킬 수 있으며, 주위 세포들이 용출된

이온을 이용하여 신생 골조직을 형성할 수 있다(Bhaskar 등, 1971). 골 아파타이트는 실제로 미량의 Na, K, Mg, Zn, Cl, F, CO₃ 등 다양한 원소들이 포함되어 있다. 그 중 F는 골 결정의 특성에 영향을 미쳐서 골의 광물화에 관여한다고 알려져 있다. 골 결정의 OH기와 F가 치환하여 골 아파타이트의 용해도를 낮춘다. 즉 F로 치환된 골 아파타이트는 골 광물화와 관련된 체액의 과포화를 증가시키고, 이러한 증가가 F 치환에 의해 골 결정을 더 크게 하여 골 apatite의 용해도가 감소하는 것이다(Posner, 1996). 또한, 골다공증에 있어서 NaF 치료는 골 생성을 자극하여 골의 양을 증가시키고(Eriksen, 1988), in vitro에서 골세포의 증식 및 분화를 향상시킨다고 보고되었다(Kassem 등, 1994).

따라서 본 연구는 경조직 재생을 촉진할 수 있는 칼슘 포스페이트 글라스의 개발을 위하여 Na와 F 원소를 첨가한 사성분계 칼슘 포스페이트 글라스를 제조하여, Na 및 F 원소가 칼슘 포스페이트 글라스의 용해도 및 세포 활성에 미치는 영향을 보고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

(1) 칼슘 포스페이트 글라스

Table 1에 나타낸 바와 같이 CaO, P₂O₅, CaF₂, Na₂O를 함유한 다양한 조성의 CaO-P₂O₅-CaF₂-Na₂O계 칼슘 포스페이트 글라스를 제조하였다. 출발 원료로는 CaCO₃(Yakuri, Japan), H₃PO₄(Duksan, Korea), CaF₂(Junsei, Japan), Na₂CO₃(Duksan, Korea)를 사용하였다. P₂O₅의 양을 45.45 mol%로 고정하고, (Ca+Na)/P의 원자비가 0.6이 되도록 혼합하였으므로, Na₂O의 함량이 증가할수록 CaO의 함량은 감

Table 1. Sample codes and their compositions prepared in this study

Sample code	CaO (mol%)	CaF ₂ (mol%)	P ₂ O ₅ (mol%)	Na ₂ O (mol%)	Ca/P ratio
F1Na1	52.55	1	45.45	1	0.59
F5Na1	48.55	5	45.45	1	0.59
F9Na1	44.55	9	45.45	1	0.59
F1Na5	48.55	1	45.45	5	0.55
F5Na5	44.55	5	45.45	5	0.55
F9Na5	40.55	9	45.45	5	0.55
F1Na9	44.55	1	45.45	9	0.5
F5Na9	40.55	5	45.45	9	0.5
F9Na9	36.55	9	45.45	9	0.5

소하였다. 따라서 Na₂O를 1, 5, 9 mol% 첨가했을 때, Ca/P의 원자비는 각각 0.59, 0.55, 0.5이었다. CaF₂는 1, 5, 9 mol% 첨가하였다. 혼합한 배치를 백금 도가니에 넣고 1150~1250°C의 온도에서 2시간 동안 용융하여 급냉한 후에, 잔류 응력을 제거하기 위해 서냉하였다. 서냉 후 10×10×3 mm³의 크기로 절단한 후 연마하였다.

(2) 세포

세포 활성도를 측정하기 위하여 human osteoblast-like line의 MG 63 세포(KCLB 번호 21427, Korean Cell Line Bank, Korea)를 사용하였다. 동결 MG 63 세포가 들어있는 앰플을 40°C 수조에 넣어 60초간 신속히 녹인 후, 상온의 70% 알코올에 넣어 소독하였다. 이후 clean bench에서 작업하였다. DMSO(dimethylsulfoxide)를 제거하기 위하여 50 mL 튜브에 10% 우태아 혈청(FBS; Gibco, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 10 mL 넣은 후, 앰플 속의 세포 부유액을 옮기고, 1,200 rpm으로 3분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 5 mL의 배지에 cell pellet을 부유하여, 배양용 플라스크에 옮기고 37°C, 5% CO₂, 100% 습도를 유지하는 CO₂ 배양기(VS-9108MS, Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다. 배지는 매 2일마다 교체하였다.

2. 연구 방법

(1) 용해도 측정

제조한 시편의 표면적을 digital vernier callipers를 이용하여 측정한 후, 증류수 30 mL가 담긴 conical tube에 넣고 37°C의 water bath에서 용해도 시험을 행하였다. 침지 1일, 3일, 1주 및 2주째 시편을 꺼내어 건조한 후, 무게 변화를 측정하였다. 표면적 당의 무게 감소를 계산한 후, 시간으로 나누어 용해도를 계산하였다.

(2) pH 및 이온 측정

용해도 시험을 행한 용출액을 pore 크기가 0.2 μm인 syringe filter로 여과한 다음 pH를 측정하였다. 또한 ICP-AES (138 Ultrace, Jobin Yvon, UK)를 이용하여 Ca, P 및 Na 이온의 용출량을 검출하였다. F 이온은 Ionplus fluoride standard 0.1 MF⁻ (Orion research Inc., No. 940906, MA, USA)를 희석하여서 0.019, 0.19, 1.9 ppm으로 용액을 제조하여 표준값을 보정한 후, Fluoride Ion Selective Electrode (Orion Model 720A pH/ISE Meter)을 이용하여 용출량을 측정하였다.

(3) WST-1 시험

WST-1 시험법은 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase에 의해 WST-1이 환원되어 formazan 결정이 생성되는 것을 이용한 방법으로, 분광분석기로 흡광도를 측정하여 간접적으로 살아있는 세포수를 측정하는 방법이다. 배양한 MG 63 세포를 0.05% trypsin(Sigma, USA)과 0.5 mM EDTA(Sigma, USA)로 conical tube에 넣고, Hank's balanced salt solution(HBSS, Sigma, USA)으로 2회 세척한 후 1,200 rpm에서 3분간 원심 분리하여 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 배양배지(DMEM) 0.18 mL 당 5×10³이 되게 부유한 후, 96 well plate에 각 well 당 0.18 mL씩 분주하고, 칼슘 포스페이트 글라스 용출물을 0.02 mL씩 첨가하여 incubator에서 4시간 배양하였다. 칼슘 포스페이트 글라스 용출물 대신 배양배지 0.02 mL을 첨가한 것을 대조군으로 하였다. PreMix WST-1(TaKaRa, Japan) 용액 0.02 mL을 각 well에 넣고 4 시간 동안 배양한 후, ELISA reader로 450 nm 파장에서 각 well의 흡광도를 측정하여 세포활성 정도를 대조군과 비교평가하였다.

결과

1. 용해도

Fig. 1에 시간에 따른 무게 감소를 mg/cm²의 단위로 나타내었다. 모든 조성에서 시간이 경과함에 따라 무게 감소가 증가하는 경향을 나타내었으며, Na의 첨가량이 증가할수록 용해도가 증가하였고, F 원소는 Na에 함량에 따라 다른 경향을 나타내었다. 그러나 F의 경우에는 첨가량이 무게 변화에 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 1). 대부분의 경우에 Ca/P ratio가 낮을수록 무게 감소가 증가하는 것을 알 수 있었다. 본 실험 범위 내에서 F5Na9가 가장 큰 용해도를 나타내었다. Na₂O가 9 mol% 첨가된 조성과 F9Na5는 3일 이후부터 다른 조성보다 높은 무게 감소를 나타내었고, 나머지 조성에서는 1주까지 용해도가 거의 비슷하게 직선적으로 나타났고, 1주 후부터 감소하는 경향을 나타내었다.

2. pH 측정

시간에 따른 용출액의 pH 변화를 Fig. 2에 나타내었다. CPG의 경우에는 1주 후에 pH가 약간 높아지다가 이후 낮아지는 경향을 나타내었다. 1 mol%의 Na가 첨가되었을 때, 3일 이후 낮아지다 1주 이후에 다시 높아지는 경향을 나타내

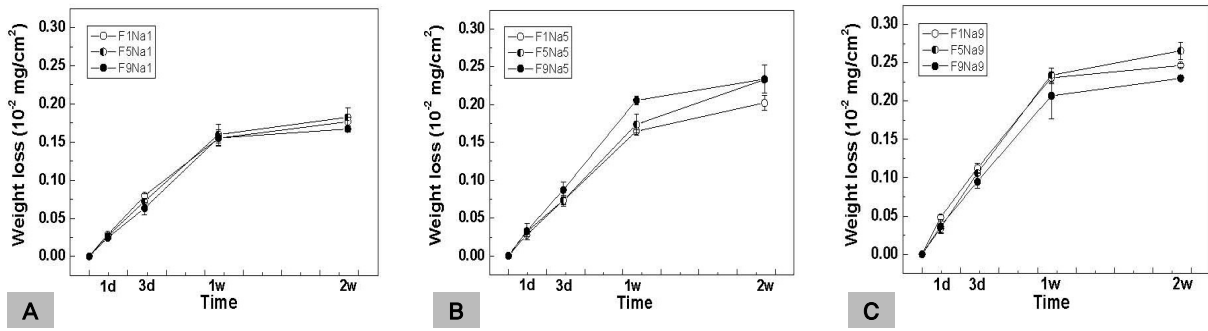


Figure 1. Weight loss of samples containing (A) 1, (B) 5, and (C) 9 mol% of Na_2O at 37°C in distilled water.

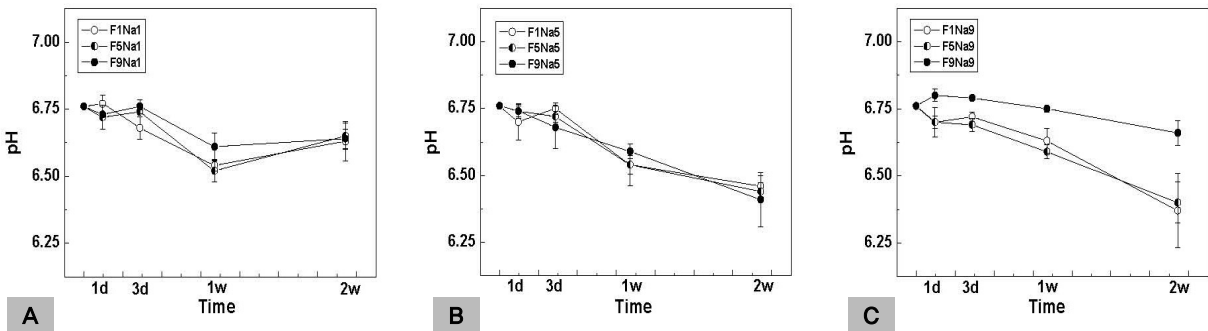


Figure 2. Solution pH of samples containing (A) 1, (B) 5, and (C) 9 mol% of Na_2O at 37°C in distilled water.

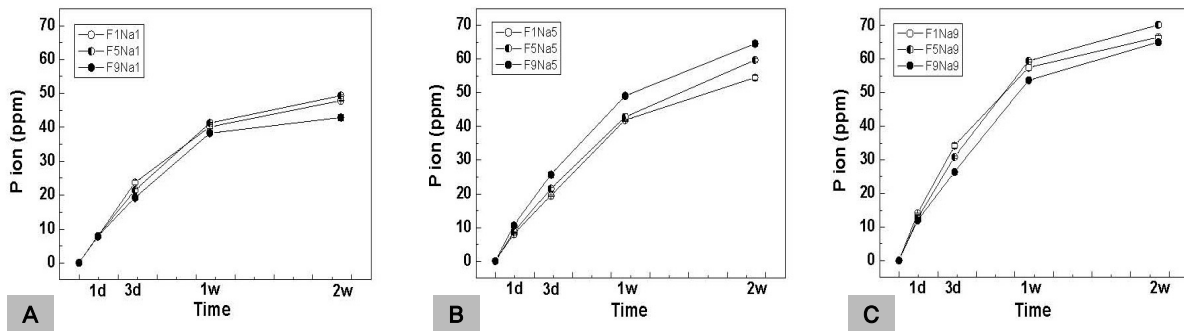


Figure 3. Dissolved P ion of samples containing (A) 1, (B) 5, and (C) 9 mol% of Na_2O at 37°C in distilled water.

었고, 5 mol%의 Na가 첨가된 조성에서는 낮아지는 경향을 나타내었다. 그리고 Na가 9 mol% 첨가되었을 때에는 5 mol%와 비슷한 경향을 보였다. 그러나 F9Na9는 다른 조성보다 pH가 가장 높았고, 가장 적은 pH 변화를 나타내었다. F는 F9Na9를 제외하고 pH 변화에 거의 영향을 미치지 않았다.

3. 이온 용출

시간에 따른 P, Ca, Na 및 F 이온의 용출량을 Fig. 3-6에 나타내었다. 모든 조성에서 이온의 종류에 관계없이 시간이 경과함에 따라 용출량이 증가하는 경향을 나타내었으며, P, Ca 및 Na 이온은 Na의 첨가량이 증가할수록 용출량이 증가하였다. 그러나 F 이온의 경우 F9Na9를 제외하고 F 및

Na의 첨가량이 증가할수록 용출량이 증가하였다.

P 이온의 용출량은 용해도가 가장 큰 F5Na9에서 64.6 ppm으로 최대를 나타내었고, F9Na1에서 42.9 ppm으로 최소를 나타내었다. Na 첨가량이 증가할수록 P 이온의 용출량은 증가하였다. 그러나 F의 첨가량에 따른 P 이온의 용출량은 Na_2O 가 5 mol% 첨가되었을 때, F 이온의 첨가량이 증가할수록 P 이온의 용출량은 증가하였고, Na_2O 가 1 또는 9 mol%가 첨가된 조성에서는 F가 9 mol%인 F9Na1과 F9Na9에서 1 mol%의 F가 첨가된 조성보다 낮은 용출량을 나타내었다(Fig. 3). Ca 이온의 용출량은 F9Na9가 50 ppm으로 최대를 나타내었으며, F9Na1이 35 ppm으로 최소를 나타내었다. P 이온과 마찬가지로 Na 첨가량이 증가할수록 Ca 이온의 용출량은 증가하였지만, F의 경우 F9Na1을 제외하고 F

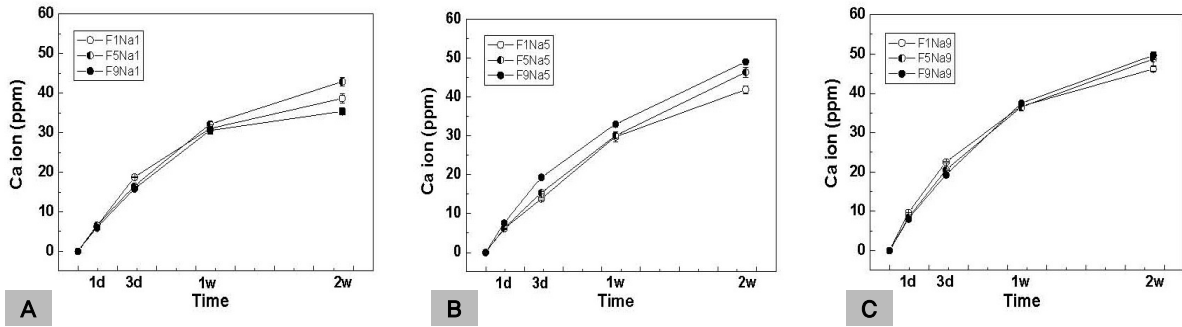


Figure 4. Dissolved Ca ion of samples containing (A) 1, (B) 5, and (C) 9 mol% of Na₂O at 37°C in distilled water.

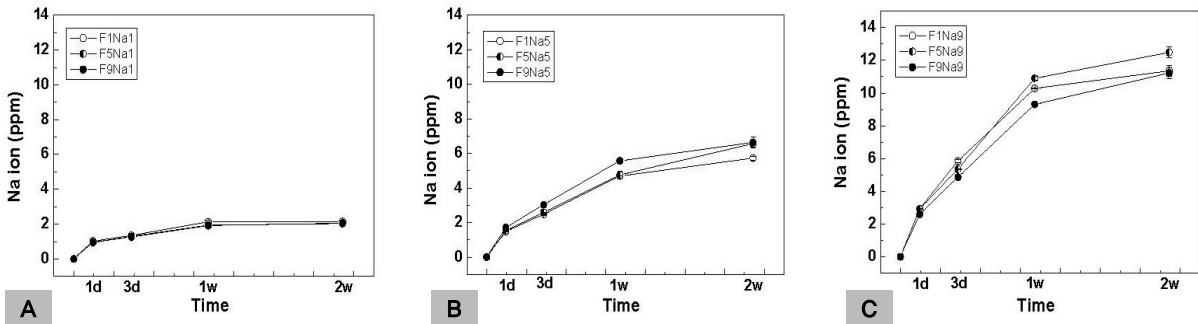


Figure 5. Dissolved Na ion of samples containing (A) 1, (B) 5, and (C) 9 mol% of Na₂O at 37°C in distilled water.

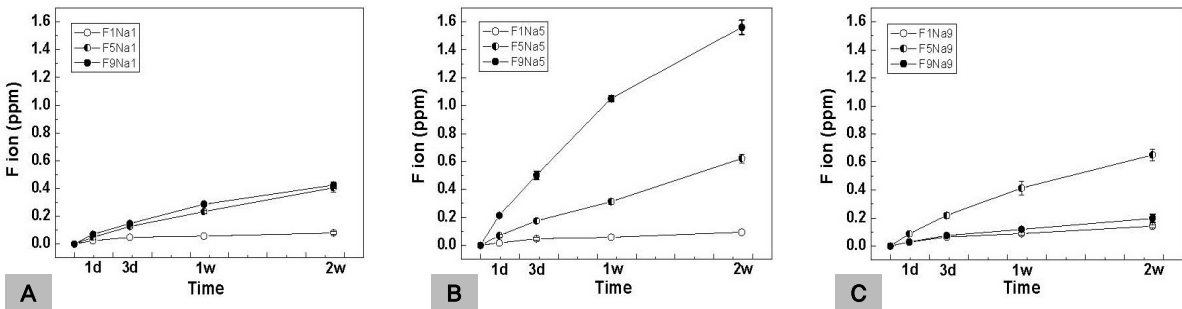


Figure 6. Dissolved F ion of samples containing (A) 1, (B) 5, and (C) 9 mol% of Na₂O at 37°C in distilled water.

의 첨가량이 증가할수록 Ca 이온 용출량은 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4). Na 이온의 용출량은 Na 첨가량이 많을수록

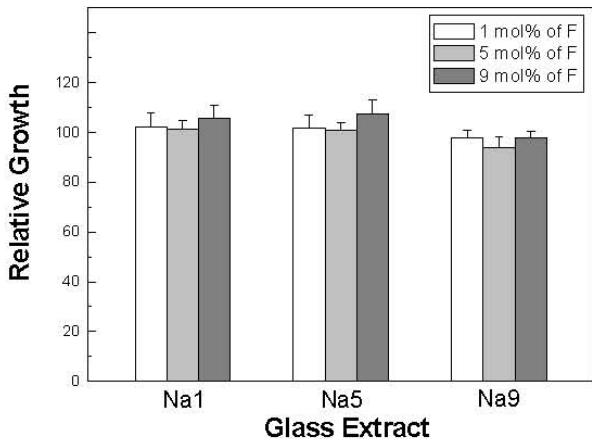


Figure 7. WST-1 assay of the effect of glass extract on the viability of MG63 cells.

용출량이 증가하였고, F의 영향은 거의 없었다. F5Na9의 Na 이온 용출량이 12.5 ppm으로 가장 많이 용출되었다(Fig. 5). F 이온 또한 F의 첨가량이 많을수록 용출량도 증가하였으나, F9Na9에서는 오히려 F 이온의 용출량이 F5Na9 보다 적게 용출되었다. F9Na5에서 가장 높은 용출량을 나타내었다(Fig. 6).

4. 세포 활성도

WST-1 방법으로 시험한 세포 활성도를 Fig. 7에 나타내었다. 4성분계의 모든 조성에서 CPG 보다 높은 세포 활성도를 나타내었다. Na₂O가 1 또는 5 mol%가 첨가되었을 때, 대조군과 거의 같은 100%의 세포 활성도를 나타냈고, 9 mol%의 F가 첨가된 조성에서 다른 조성보다 높은 세포 활성도를

보였다. Na_2O 가 9 mol%가 첨가된 조성에서는 90% 이상을 나타내었다.

고찰

골 아파타이트는 실제로 미량의 Na, K, Mg, Zn, Cl, F, CO_3 등 다양한 원소들이 0.01~7.0 wt% 존재한다. 또한 골과 치아의 생물학적 아파타이트는 비화학양론적인 조성을 갖고 있고, 화합물의 결정 크기 및 형상도 달라서 자연골과 동일한 아파타이트를 합성하는 것이 매우 곤란하다고 알려져 있다. 특히 이러한 미량 원소들이 아파타이트 형성에 큰 영향을 미친다고 알려져 있다(LeGeros, 1991). 따라서 미량 원소의 첨가가 용이하며, 화학적으로 뼈와 유사하고 용해성이 우수한 칼슘 포스페이트 글라스에 관한 연구가 진행되어 왔다. LeGeros와 Lee(2004)는 칼슘 포스페이트 글라스의 생분해성과 생체활성에 관하여 보고하였다. Ca/P 비가 0.6 이하일 때 비정질 구조를 갖는 칼슘 포스페이트 글라스를 제조할 수 있었으며, HA 및 TCP 등의 칼슘 포스페이트 화합물에 비해 매우 낮은 Ca/P로 인해 생분해 속도가 빠르고, 의사체액 및 우태아 혈청에 일주일간 침적하여 표면에 아파타이트와 유사한 결정이 침착되는 생체 활성을 확인하였다.

Knowles 등(2001)은 $\text{K}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ 계 칼슘 포스페이트 글라스에서 CaO의 함량이 증가함에 따라 Ca 이온의 용출량은 증가하고 용해도는 감소한 반면, Na_2O 의 함량이 증가하면 Ca 이온의 용출량 뿐 아니라 용해도도 증가한다고 보고하였다. Franks 등(2002)은 CaO를 MgO로 치환한 $\text{MgO}-\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ 계 칼슘 포스페이트 글라스에서 CaO의 함량이 증가할수록 용해도가 낮아져서, 용해도를 좌우하는 주요 변수가 CaO의 함량이라고 보고하였다. Ahmed 등(2004)은 다양한 함량의 P_2O_5 와 CaO를 가진 $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{Na}_2\text{O}$ 계 칼슘 포스페이트 글라스에서 P_2O_5 의 함량에 따라 포스페이트 글라스의 용해도 특성이 다르다고 보고하였다. 그리고 김 등(2005)은 칼슘 포스페이트 글라스에 일가 원소인 Li, Na, K가 첨가 되었을 때는 첨가량이 증가함에 따라 용해도가 증가하는데, 이것은 첨가한 원소들이 글라스의 망목수식제로 작용하여 구조를 끊어 연결이 약해졌기 때문이라고 보고하였다. 그리고 각각의 이온의 크기가 $\text{Li} < \text{Na} < \text{K}$ 의 순서로 크기가 클수록 이온장 세기가 상대적으로 작게 나타남으로 인해 결합력이 약해져 글라스의 구조 결합력이 약해지므로 $\text{Li} < \text{Na} < \text{K}$ 순으로 용해도가 커진다고 보고하였다.

본 연구에서는 P_2O_5 를 45.45 mol%로 고정하고, Na와 F를 첨가하여 사성분계 칼슘 포스페이트 글라스를 제조하고,

Na와 F의 첨가량에 따른 용해도를 측정하였다. Na의 첨가는 용해도를 증가시켰는데, 이것은 첨가한 Na가 글라스의 망목 수식제로 작용하여 구조를 끊어 연결이 약해져서 이온의 용출이 용이해지기 때문이다(Knowles 등, 2001). 그러나 F의 첨가는 Na의 함량에 따라 용해도에 미치는 영향은 달랐다. 글라스에 함유된 F^- 이온은 글라스의 망목 구조를 형성하고 있는 P_2O_5 의 O와 교환되거나 망목 구조의 PO_3^- 와 교환된다. F가 O와의 교환은 P_2O_5 의 망목구조 사슬을 끊어 연결 사슬의 길이가 짧아져(Videau JJ 등, 1982), 용해도를 높이는 결과를 야기할 것이다. 그리고 PO_3^- 이온과의 교환은 F 이온 볼륨이 3배 정도 작으므로 전체적으로 글라스의 부피는 감소한다(Lebullenger R 등, 2001). 이것은 결국 용해도를 낮추는 역할을 하게 될 것이다. 이렇게 F가 함유된 플루오르포스페이트 글라스의 구조는 Na^+ , Ca^{2+} , Al^{3+} 와 같은 양이온과 O^- 와 같은 음이온의 함량과 F의 함량에 따라 여러 가지 구조를 가질 수 있다고 알려져 있다(Liao M 등, 2006; Gan F 등, 1982). 본 연구에서 Na 함량이 5 mol% 일 때는 F의 함량이 증가할수록 용해도는 증가하였다. 그러나 1 또는 9 mol%의 Na를 함유한 조성에서는 F의 함량이 9 mol% 일 때 오히려 용해도가 감소하였는데, 이것은 F의 함량에 따른 다양한 용해도는 칼슘 포스페이트 글라스의 조성에 따른 영향이라고 생각되어 진다.

글라스 분해의 일반적인 이론에 따르면 포스페이트 글라스는 수용액에서 실리케이트 글라스와 유사하게 서로 의존하는 수화 반응과 네트워크 붕괴에 의해 분해된다. 수화 반응은 물에 있는 수소 이온과 글라스의 Na 이온이 교환하여 글라스-물 계면의 글라스 표면에 수화층이 생성되는 것이다. 그리고 망목 구조의 붕괴는 수소 이온과 물 분자에 의해 수화층에서 P-O-P 결합이 끊어지면서 글라스 망목 구조의 붕괴와 포스페이트 분자들이 용출되는 결과를 초래한다(GaO 등, 2004). Liu 등(1996)은 $25\text{Na}_2\text{O}-25\text{CaO}-50\text{P}_2\text{O}_5$ 계 포스페이트 글라스의 분해 과정에서 망목 구조의 붕괴 반응이 지배적이라고 보고하였고, Na-H 이온 교환 반응은 망목 구조의 붕괴가 일어나면 더 이상 역할을 하지 않는다고 결론지었다.

본 연구에서 진행한 이온 용출 측정 결과에서는 P 이온의 용출량이 가장 높게 나타났으며, 용해도와 이온 용출과의 관계에서 Ca 이온 용출보다는 P 이온의 용출이 용해도에 더 큰 영향을 미쳤다. 즉, P 이온의 용출 경과와 시편의 무게 감소 경향이 매우 유사했는데, 이것은 P_2O_5 가 글라스의 망목 구조를 형성하고 있는데 P 이온 용출이 많다는 것은 글라스 구조가 끊어져 더 많은 이온들이 용출됨을 의미한다. 글라스의 망목 구조 붕괴에 의한 용해도가 증가할수록 용출된 이온의 양이 증가하였다. 첨가된 Na의 함량이 증가함에 따라 P 이온의 용출량은 증가하였고, Ca의 경우는 함량은 적어지지

만, Ca 이온의 용출량은 조금 증가하였다. 그리고 F의 첨가에 따른 P 이온과 Ca 이온의 용출 특성은 용해도 결과와 유사한 특성을 보였다. 즉 F가 9 mol%의 함량을 가진 조성에서 Na의 함량이 1 또는 9 mol% 일 때, 용해도가 다른 조성에 비해 감소하고, P 및 Ca 이온의 용출량이 적었다. 결과에 따르면 F9Na1과 F9Na9 조성에서 F 이온이 O 이온과의 교환보다는 글라스 구조의 PO₃ 이온과의 교환이 더 많아서 오히려 P 이온과 Ca 이온의 용출량이 더 적었다고 생각되어진다. 그러나 정확한 구조는 구조에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다. Na 이온의 용출량은 Na 함량이 많을수록 증가하였고, F 함량 따른 영향은 거의 없었다. 그리고 F 이온 용출은 역시 Na의 함량이 증가함에 따라 증가하였다. F의 함량이 증가할수록 F9Na9를 제외하고 F 이온의 용출도 증가하였다. F9Na9에서 F 이온의 용출 경향은 1 mol%의 F가 함유된 조성보다 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 pH도 P 이온 용출량이 증가할수록 낮아졌다. 이것은 PO₄³⁻ 이온과 HPO₄ 용출에 의하여 pH가 낮아지기 때문이다. 1 mol%의 Na가 함유된 조성에서는 1주 후 pH가 약간 증가하는 경향을 보였는데 이것은 P 이온의 용출 경향에서 용출량이 줄어드는 것을 보면 이해할 수 있다. 그러나 F9Na9에서 pH의 값은 다른 조성보다 달리 초기에 조금 높아진 후 낮아졌고, 상대적으로 높은 pH 값을 보였다. F9Na9에서의 P 이온 용출은 9 mol%의 Na를 함유한 조성에서 오히려 용출량이 가장 적었다. 나머지 조성에서는 비슷한 pH 변화를 보였다.

글라스 용출액의 세포 반응을 평가하여 칼슘 포스페이트 글라스의 골대체재로서의 사용 가능성을 알아보려고 하였다. 칼슘 포스페이트 글라스의 골과의 유사성과 생체 내 미량원소 함유에 따른 조성변화가 쉬우므로 좋은 생체적합성과 낮은 세포 독성을 기대할 수 있다. 본 연구에서는 P₂O₅의 함량이 고정된 사성분계 글라스를 제조하여 분해시험에 사용한 용출액(2주)을 세포 시험에 사용하였다. Uo 등(1998)은 Na₂O - CaO - P₂O₅ 글라스의 분해 특성과 세포 독성을 연구하였는데, 세포 독성은 P₂O₅의 함량이 적고, CaO 함량이 증가할수록 낮아진다고 보고하였다. 이것은 용출액내의 pH와 이온 강도 변화에 따른 결과로 설명하였고, 분해특성과 세포 독성의 경향이 유사하다고 보고하였다. WST-1 시험 결과, 용출액의 pH가 6.3 이상으로 세포 활성도는 90% 이상을 나타내었고, 9 mol%의 F가 첨가된 조성에서 다른 조성보다 높은 세포 활성도를 보였는데, In vitro에서 NaF가 골세포의 증식 및 분화를 향상시킨다고 보고되었지만(Farley SM 등, 1987), 본 연구에서는 단순히 독성의 유무만을 확인한 시험으로 F의 영향이라고 단정하기는 어려울 것 같다. 그러나 이전 연구(Kim 등, 2005)에서 일가 및 이가의 양이온들이 용출액의 pH에 기여하고, 용출액의 pH가 4.5 이상인 경우에

는 세포 활성도가 80%이라고 보고하였다. 따라서 pH 뿐만 아니라 글라스 조성에 따른 용출액에 포함된 여러 이온 또한 세포 활성도에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 Na 및 F 원소를 첨가한 사성분계 칼슘 포스페이트 글라스를 제조하여 용해도, 이온 용출, pH 변화 및 MG 63 세포에 대한 세포 활성도를 연구하였다. Na 및 F 원소를 첨가함에 따라 용해도를 변화시킬 수 있었다. Na₂O 함량이 증가할수록, 즉 CaO 함량이 감소할수록 용해도는 증가하였다. F의 첨가에 따른 칼슘 포스페이트 글라스의 구조가 플루오르 포스페이트 글라스 구조로 바뀌면서 F가 용해도 및 이온 용출에 미치는 영향은 글라스의 조성에 따라 달랐다. 또한 유리 구성 성분 중에서 P 이온이 가장 많이 용출되어 용출액의 pH를 감소시키는 주된 원인을 알 수 있었다. 칼슘 포스페이트 글라스에 Na 및 F 원소를 첨가하여 용해도 및 이온 용출을 제어할 수 있었고, Na 및 F가 첨가된 조성에서 90% 이상의 높은 세포 활성도를 나타내어 생체적합성을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Abrahams I, Franks K, Hawkes GE, Philippou G, Knowles JC, Bodart P, Nunes T (1997). ²³Na, ²⁷Al and ³¹P NMR and X-ray powder diffraction study of Na/Ca/Al phosphate glasses and ceramics. *J Mater Chem* 7(8):1573-80.
- Ahmed I, Lewis M, Olsen I, Knowles JC (2004) Phosphate glasses for tissue engineering: Part 1. Processing and characterisation of a ternary-based P₂O₅-CaO-Na₂O glass system. *Biomaterials* 25:491-499.
- Bahr W, Stricker A, Gutwald R, Wellens E (1999). Biodegradable osteosynthesis material for stabilization of midface fractures: experimental investigation in sheep. *J Cranio Maxill Surg* 27:51-7.
- Bunker BC, Arnold GW, Wilder JA (1984). Phosphate glass dissolution in aqueous solutions. *J Non-Cryst Solids* 64:291-316.
- Burnie J and Gilchrist T (1983). *Ceramics in Surgery*, Elsevier, Netherlands.
- Delahaye F, Montagne L, Palavit G, Touray JC, Baillif P (1998). Acid dissolution of sodium, calcium metaphosphate glasses. *J Non-Cryst Solids* 242:25-32.

- Ducheyne P, van Raemdonck W, Heughebaert JC, Heughebaert M (1986). Structural analysis of hydroxyapatite coatings on titanium. *Biomaterials* 7:97-103.
- Eriksen EF, Hodgson SF, Riggs BL (1988). Treatment of osteoporosis with sodium fluoride. Osteoporosis, etiology, diagnosis and management. Raven Press, USA.
- Farley SM, Wergedal L, Smith L et al (1987). Fluoride therapy for osteoporosis. Characterisation of the skeletal response by serial measurements of serum alkaline phosphatase. *Metabolism* 36:211-218.
- Fejerskov Ole, Ekstrand J, Burt BA (1996). Fluoride in dentistry. Munksgaard, Denmark.
- Franks K, Salih V, Knowles JC, Olsen I (2002). The effect of MgO on the solubility behaviour and cell proliferation in a quaternary soluble phosphate based glass system. *J Mater Sci- Mater Med* 13:549-56.
- Franks K, Abrahams I, Georgiou G, Knowles JC (2001). Investigation of thermal parameters and crystallisation in a ternary CaO-Na₂O-P₂O₅-based glass system. *Biomaterials* 22:497-501.
- Gao H, Tan T, Wang D (2004). Dissolution mechanism and release kinetics of phosphate controlled release glasses in aqueous medium. *J Control Release* 96:29-36.
- Geesink RGT, Degroot K, Klein CPAT (1987). Chemical implant fixation using hydroxyl-apatite coating-the development of a human total hip-prosthesis for chemical fixation to bone using hydroxyl-apatite coatings on titanium substrates. *Clin Orthop Relat R* 225:147-70.
- Gan F, Jiang Y, Jiang F (1982). Formation and structure of Al(PO₃)₃-containing fluorophosphate glass. *J Non-Cryst Solids* 52:263-273
- Hench LL (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc* 74(7):1487-510.
- Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF (1994). Effects of fluoride on human bone cells in vitro: differences in responsiveness between stromal osteoblast precursors and mature osteoblasts. *Metabolism* 130:381-6.
- Kim MC, Kim KN, Kim KM, Choi SH, Kim CK, Lee YK (2004). Effect of Monovalent and Divalent Atoms on Solubility and Cell Activity in Calcium Phosphate Glass. *J Korea Res Soc Dent Mater* 32(3):249-261
- Knowles JC, Franks K, Abrahams I (2001). Investigation of the solubility and ion release in the glass system K₂O - Na₂O - CaO - P₂O₅. *Biomaterials* 22:3091-6.
- Kumar AV, Stalenberg DA, Petronio JA, Wood RJ (1997). Bioabsorbable plates and screws in pediatric craniofacial surgery: a review of 22 cases. *J Craniofac Surg* 8:97-9.
- Lebullenger R, Nunes LAO, Hernandez AC (2001). Properties of glasses from fluoride to phosphate composition. *J Non-Cryst Solids* 284:55-60
- LeGeros RZ (1991). Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Science, Vol. 15, Karger, Switzerland.
- LeGeros RZ (1998). Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Adv Dent Res* 2:164-83.
- LeGeros RZ, Lee YK (2004). Synthesis of amorphous calcium phosphates for hard tissue repair using conventional melting technique. *J Mater Sci* 39:5577-5579.
- Li SM, Garreau H, Vert M (1990). Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous-media. 3. Influence of the morphology of poly(L-lactic acid). *J Mater Sci-Mater Med* 1:198-206.
- Liao M, Sun H, Wen L, Fang Y, Hu L (2006). Effect of alkali and alkaline earth fluoride introduction on thermal stability and structure of fluorophosphate glasses. *Mater Chem Phys* 98:154-158
- Liu QX, Chen XM, Li X (1996). The hydrolysis of Na₂O-CaO-P₂O₅ bioglass. *J Wuhan Univ Technol* 18(1):26-29.
- Salih V, Franks K, James M, Hastings GW, Knowles JC, Olsen I (2000). Development of soluble glasses for biomedical use part II: The biological response of human osteoblast cell lines to phosphate-based soluble glasses. *J Mater Sci-Mater Med* 11:615-20.
- Slivka MA, Chu CC, Adisaputro IA (1997). Fiber-matrix interface studies on bioabsorbable composite materials for internal fixation of bone fractures. 1. Raw material evaluation and measurement of fiber-matrix interfacial adhesion. *J Biomed Mater Res* 36:469-77.
- Therin M, Christel P, Li SM, Garreau H, Vert M (1992). In vivo degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids)-validation of in vitro findings. *Biomaterials* 13:594-600.
- Uo M, Mizuno M, Kuboki Y, Makishima A, Watari F (1998). Properties and cytotoxicity of water soluble Na₂O - CaO - P₂O₅ glasses. *Biomaterials* 19:2277-84.
- Videau JJ, Portier J, Piriou B (1982). Raman spectroscopic studies of fluorophosphate glasses. *J Non-Cryst Solids* 48: 385-392