pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 불소의 농도가 합성 수산화인회석의 결정 성장에 미치는 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

신 한 얼

pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 불소의 농도가 합성 수산화인회석의 결정 성장에 미치는 영향

지도교수 이 찬 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2011년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

신 한 얼

신한얼의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2011년 12월 일

감사의 글

"좋은 스승은 제자의 독창적인 표현과 지식의 희열을 불러일으킨다." Albert Einstein의 말입니다. 많이 부족한 저에게 이번 연구를 진행하면서 새로운 것을 알아가는 즐거움을 느낄 수 있게 해주신 이찬영 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 조금 더 열심히 하지 못했던 점에 송구스럽기도 합니다. 부족한 논문에도 많은 격려를 해주신 박성호 선생님, 서툴게 작성된 원고를 꼼꼼히 수정해 주신 박정원 선생님께도 감사드립니다.

수련 과정 동안 학문에 대한 깊이뿐 아니라, 사람을 치유하는 사람으로서의 기본을 알려주신 이승종 선생님, 노병덕 선생님, 김의성 선생님, 정일영 선생님, 신수정 선생님, 신유석 선생님께도 이 글을 빌어 진심으로 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

또한, 3년 동안 희로애락을 함께하면서 힘든 가운데 수련 생활을 웃으며 보낼 수 있는 힘을 주었던 동기 도현, 민영, 유란 누나 모두 자랑스럽고 고맙다는 말을 전합니다.

지금까지 부족한 자식을 항상 믿고 지켜봐 주시고, 제 편에 서서 응원해주시는 부모님, 평생 떨어져 본 적 없는 사랑하는 누나, 그리고 죄송스러울 정도로 항상 따뜻하게 배려해 주시는 장인, 장모님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 마지막으로 나에게 사랑을 알려주고 지금까지도 사랑의 열병을 앓게 하는 그녀에게 이 논문을 바칩니다.

2011년 12월

저자 씀

차 례

그림 차례 ····· iii

표 차례 ····· iv

국문요약 ····· v

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 5

1. Seed 재료의 준비 ····· 5

2. 실험 용액의 조제 ····· 5

가. Stock 용액의 조제 ····· 5

나. 실험 용액의 조제 ····· 6

3. Seeded crystal growth 실험 모형 ····· 8

4. 통계 분석 ····· 10

Ⅲ. 결 과 ····· 11

1. 실험 용액의 성분 변화 측정 ····· 11

가. 실험 용액의 칼슘 이온 소모량 ····· 12

나. 실험 용액의 인산 이온 소모량 ····· 13

다. 실험 용액의 불소 이온 소모량 ····· 14

2. Seed 의 질량 증가량 측정 ····· 15

3. 결정 침전 표본의 성분 분석 ····· 17

가. 결정 침전 표본의 불소 성분비 ····· 18

나. 결정 침전 표본에서 Ca/P 성분비 ····· 19

Ⅳ. 고 찰 ····· 20

Ⅴ. 결 론 ····· 26

참고 문헌 ····· 27

Abstract ····· 31

그림 차례

Fig. 1. Schematic illustration of experimental set-up ····· 8

Fig. 2. Schematic illustrations of calculating the amounts of crystal growth ····· 9

Fig. 3. Calcium ion consumption in experimental solution

after crystal growth ····· 12

Fig. 4. Phosphate ion consumption in experimental solution

after crystal growth ····· 13

Fig. 5. Fluoride ion consumption in experimental solution

after crystal growth ····· 14

Fig. 6. Weight increments of the HA seed after crystal growth ····· 16

Fig. 7. Fluoride molecular ratio to HA seeds in crystallized samples ····· 18

Fig. 8. Ca/P molecular ratio to HA seeds in crystallized samples ····· 19

표 차례

Table 1. Initial composition of experimental solutions ····· 7

Table 2. Changes in compositions of the experimental solution after experiments

····· 11

Table 3. Weight increments of the HA seed after crystal growth····· 16

Table 4. Molecular ratio in crystallized samples ····· 17

국 문 요 약

pH 4.3 과 pH 7.0 의 과포화용액에서 불소의 농도가 합성 수산화인회석의 결정 성장에 미치는 영향

이번 연구의 목적은 포화도가 동일하게 설계된 pH 4.3 과 pH 7.0, 두 종류의 과포화용액에서 불소 농도의 변화가 합성 수산화인회석(hydroxyapatite, HA)을 이용한 seeded crystal growth 에 미치는 영향을 정량적으로 분석하는 것이다.

pH 4.3 과 7.0 두 종류의 인산칼슘 과포화 용액의 불소 농도를 0, 1, 2, 4ppm 으로 달리하여 총 8 군의 실험 용액을 제조하였다. 각 실험용액은 HA seed 가 들어있는 반응주를 일정 유속으로 통과하도록 하여 인산칼슘 염이 HA seed 표면에 침착되어 결정성장이 일어나도록 하였다. 이러한 결정화 과정을 평가하기 위하여 실험 용액이 결정 성장 반응을 일으키기 전 후의 칼슘, 인산, 불소이온 농도의 차이를 평가하였고, 결정 성장 후 질량 증가량을 측정하였다. 또한 결정 성장 반응 이후의 표본의 분자 성분비를 조사하였다.

실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. pH 4.3 의 실험 용액을 통한 결정 성장 반응에서 pH 7.0 의 경우보다 유의하게 더 많은 칼슘, 인산, 불소 이온의 침착이 관찰되었다($p<0.05$).
2. 불소 농도가 4ppm 까지 증가함에 따라 pH 4.3 의 경우 유의하게 더 많은 칼슘, 인산, 불소 이온이 침착되고, 더 많은 양의 결정성장이 일어남을 관찰할 수

있었다($p<0.05$)(일부 군 예외). 그러나 pH 7.0 의 조건에서는 이러한 양상이 명확하지 않았다.

3. pH 7.0 의 실험 용액을 이용한 결정 성장에서 얻어진 결정의 Ca/P 비율은 불소의 농도가 4ppm 까지 증가함에 따라 유의하게 높게 측정되었다($p<0.05$). 그러나 pH 4.3 의 실험 용액을 이용한 결정 성장에서 얻어진 결정의 Ca/P 비율은 불소의 농도 변화에 따른 차이가 없었다.

결론적으로, pH 7.0보다 pH 4.3의 실험조건에서 더 결정 성장이 촉진되며, pH 4.3의 실험조건에서는 불소 농도가 증가함에 따라 HA를 seed로 한 결정 성장이 더 촉진되는 양상을 보였다.

핵심되는 말: seeded crystal growth, 수산화인회석(hydroxyapatite), 결정 성장, pH, 불소농도

pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 불소의 농도가 합성 수산화인회석의 결정 성장에 미치는 영향

<지도교수 : 이 찬 영>

연세대학교 대학원 치의학과

신 한 얼

Ⅰ. 서 론

법랑질의 초기 우식과 재광화 현상은 표면과 표면 하부에서 무기질의 용해와 침착이 동시에 일어나는 역동적인 과정임이 밝혀져 있고 이 기전은 인산칼슘 염의 용해도 곡선을 통해 동력학적으로 설명되고 있다(Aoba, 2004; Margolis and Moreno, 1985). 용해도 곡선은 각각의 인산칼슘 염의 용해도를 pH의 변화에 따라 나타낸 그래프로, 이 곡선 위쪽은 과포화 상태로 광물이 침착 되는 방향으로 동력을 받고, 곡선의 아래는 불포화 상태로 광물의 소실이 일어나는 방향으로 동력을 받게 된다. 구강 내 환경의 계속적인 변화로 법랑질을 둘러싸는 유체의 조성이 변화하면, 이에 따라 탈회와 재광화가 역동적으로 일어나게 된다. 따라서 치아 우식의 예방 및 초기

우식 병소의 재광화를 위한 연구가 이러한 인산칼슘 염의 동역학의 이해에 기본을 두고 있다는 것은 자명하다.

인산칼슘은 치아와 골조직의 무기질을 이루는 주성분이며 이 중에서 수산화인회석(hydroxyapatite, HA)은 이러한 광물질의 원형로 사료된다. 법랑질은 고도로 광화된 무기질로 구성되어 있으며 HA가 용적비로 90~92%의 비율을 차지한다(Robinson et al., 1997). 따라서 법랑질 결정의 광화 작용을 연구하는데 있어 합성 HA를 이용한 결정 성장의 기전을 조사하는 것은 의미 있는 일이다.

광화 기전을 연구하는 여러 방법론 중 "Seeded crystal growth" 실험 모형은 과포화용액에 의한 HA의 결정 성장의 관련 인자를 파악하는데 적절하다고 알려진 실험 방법이며 많은 연구가에 의해 이 방법을 이용한 결정 성장 실험이 이루어져 왔다(Aoba and Moreno, 1984; Barone et al., 1976; Eanes, 1980; Nancollas and Mohan, 1970).

이 중, 소형 반응주(reaction column), 연동 펌프(peristaltic pump) 그리고 양쪽 vessel을 연결하는 tube로 구성된 간단한 실험 모형이 Mura-Galleli(1992)에 의해 소개되었으며 이(1995), 오(1997), 권(1999) 등에 의해 결정 성장 반응 과정을 평가하는데 있어 유용함이 입증되었다. 또한 이, 권 등은 이 실험에서 seed 로 인간 법랑질과 합성 HA 두 종류를 사용하였는데, 이에 따른 결정의 형태와 양은 seed의 종류에 관계없이 그 표면적에만 영향을 받음이 밝혀졌다. 이를 통해 보아 합성 HA를 이용한 연구는 법랑질의 결정 침전 역학을 이해하는데 유용할 것으로 사료된다.

한편, 법랑질의 생물학적인 광화 작용을 조절하는 중요인자로 1)칼슘, 인산, 불소 등 mineral을 둘러싸고 있는 유체의 이온 조성, 2)단백질, 유기산 등의 유기질 성분(Fan et al., 2011; Iijima and Moradian-Oldak, 2005; Matsumoto et al., 2006)

그리고 3)포화도, 시간, pH 등의 mineral의 침전 역학에 영향을 끼치는 여러 조절 인자들이 알려져 있고 이들에 대한 많은 연구가 있어왔다.

이 중 불소는 광화를 촉진, 안정화시키는 주요 인자로 알려져 있는데, 이인산칼슘 이수화물(dicalcium phosphate dehydrate, DCPD)나 육인산칼슘(octacalcium phosphate, OCP) 등의 가수분해를 촉진하여 apatite의 침전을 유도하며(Aoba, 1997; Iijima et al., 1992), 직접 apatite 결정의 수산화기를 치환하여 불화인회석(fluoroapatite, FAp)를 형성하게 되면, 구조와 크기 변화가 관찰되며(Yanagisawa et al., 1989), 더 높은 정전기적 결합을 통해 화학적으로 더 안정해지는 것으로 알려져 있다(Elliott, 1994; Robinson et al., 2004).

그러나 법랑질의 광화를 이루는 가장 좋은 조건의 불소 농도에 대해서는 이견이 있다. 불소 농도에 따른 결정 성장 비교 연구에서 이(1995), 오(1997), 권(1999), Amjad와 Nancollas(1979) 등은 6ppm 이하의 범위에서 불소 농도가 증가할수록 결정 성장량이 증가한다고 하였다. 한편, 치아 시편을 이용한 재광화 연구에서는 Ten Cate (1977) 등은 불소가 없는 경우보다 1ppm의 불소가 포함되었을 때 2배의 재광화가 일어났다고 하였고, 한(1996) 등은 불소 농도가 1ppm이나 4ppm일 때보다 2ppm일 때 재광화 양상이 가장 뚜렷하다 하였다. 그러나 Lammers(1990) 등은 2ppm의 불소가 포함된 실험군에서 불소가 포함되지 않은 군보다 치아의 재광화가 유의하게 적게 일어났다고 하였다.

또한 pH의 변화에 따른 광화 정도의 차이에 대한 많은 연구가 있었으나 역시 이에 대해 의견 일치에 이르지 못하고 있다. 인간 치아 시편을 이용한 재광화 연구에서 Feagin(1971) 등은 법랑질 표층의 재광화와 완충용액의 pH 증가 사이에는 비례적 상관관계가 있다 하였고, Featherstone(1981) 등은 법랑질의 재광화에 있어 표층의

과침착 및 추가적인 탈회의 가능성을 최소로 하는 최적의 pH는 6.0 이라 하기도 하였다. 김(1997) 등은 pH 4.0에서 pH 5.5 사이의 완충용액에서의 법랑질의 재광화 양상을 비교하였는데 pH 5.5에서 가장 좋았다고 하였다. 반면, 권(2008) 등은 pH 6.0보다 pH 4.3의 환경에서 심부까지 재광화가 잘 일어남을 보고하였고, Yamazaki(2008) 등의 실험에서도 pH 7.0보다 pH 4.8의 환경에서 심부까지 재광화가 일어나는 것이 관찰되었다. 또한, 송(2009) 등은 산성의 환경에서 재광화시에 우식이 진행되는 diffusion pathway가 유지되어 심부까지 완충용액이 확산될 수 있음을 보고하였다.

위와 같이 불소와 pH 등이 치아 법랑질의 광화 작용에 미치는 영향에 대한 많은 연구에도 불구하고, 아직 그 기전에 대한 정확한 이해나 일치된 의견의 정립이 아직 이루어지지 못하고 있는 상태이다. 이에 치아의 광화에 있어 불소와 pH의 영향을 알아보고자 pH 4.3과 pH 7.0의 과포화 용액에서 불소 농도 변화에 따른 법랑질 인공 우식 절편의 재광화 양상을 비교한 연구가 선행된 바 있다(Song, 2011). 이 결과 pH 4.3에서는 불소의 농도가 증가됨에 따라 심부와 표면에서 재광화가 많이 일어남이 관찰되었고, pH 7.0에서는 불소 농도 증가에 따라 비교적 표면의 재광화가 우월하고 심부의 재광화가 잘 일어나지 못하는 양상을 보였다.

본 연구에서는 위의 재광화 연구에 이용된 과포화 용액의 실험군을 동일하게 이용하여 실험 모형의 유효성이 이미 밝혀진 소형 반응주를 통한 'seeded crystal growth' 실험을 시행하여 관찰된 광화 양상을 선행 연구결과와 비교하고자 한다.

따라서 본 연구의 목적은 포화도가 동일하게 설계된 pH 4.3과 pH 7.0, 두 종류의 과포화 용액에서 불소 농도의 변화가 합성 HA를 이용한 seeded crystal growth에 미치는 영향을 정량적으로 분석하는 것이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. Seed 재료의 준비

Crystal growth를 위한 seed로써 합성된 HA를 이용한다. HA 현탁액 (Sigma-Aldrich Co., St Louis., MO, U.S.A., 분자량 502.31)에 3차 증류수를 넣고 원심분리기(Micro 12, Hanil, Korea)를 이용하여 3회 이상 반복 세척 시행하였다. 이를 약 24시간 동안 동결 건조기(freeze dryer, Ilshin lab co., Korea)를 이용하여 동결 건조 후 이 분말을 seed material로 사용하였다.

2. 실험 용액의 조제

가. Stock 용액의 조제

(1) 30% 유산(Lactic acid) 수용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A., 분자량 90.08)으로 부터 1M의 용액을 조제하여 이를 stock 용액으로 사용하였다.

(2) 염화칼슘 2수화물($CaCl_2.2H_2O$) 분말(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A., 분자량 147.01)로 부터 0.1M 용액을 조제하여 이를 stock 용액으로 사용하였다.

(3) 인산칼륨(KH_2PO_4) 분말(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A., 분자량 136.09)로 부터 0.1M 용액을 조제하여 이를 stock 용액으로 사용하였다.

(4) 불화나트륨(NaF) 분말(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A., 분자량 41.99)로 부터 100ppm(5.26mM) 용액을 조제하여 이를 stock 용액으로 사용하였다.

유산 stock 용액은 8N 수산화칼륨(KOH) 표준용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A.) 및 페놀프탈레인 지시약(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A.)을 이용하여 적정하였고, 염화칼슘 및 인산칼륨 stock 용액은 용액의 칼슘 및 인산 이온의 농도를 ion chromatography(790 Personal IC, Metrohm, Herisau, Switzerland)를 통해 정량 분석하여 확인하였다. 또한 불화 나트륨 용액은 fluoride combination electrode(model. 9609, Thermo scientific, Waltham, MA, U.S.A.)를 이용하여 확인하였다.

나. 실험 용액의 조제

Seeded crystal growth를 위한 인산칼슘 과포화 용액을 제조하기 위하여 준비한 각 stock 용액으로부터 계산된 양만큼 취하여 사용하였고, 각 용액에는 방부제로써 3.08mM의 아지드화 나트륨(NaN_3) 분말(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A.)을 첨가하였다. 마지막으로 pH meter(Model 920A, Orion Research Inc., Beverly, U.S.A.) 계측 하에 수산화칼륨 용액을 첨가하여 실험 군에 따라 pH값이 4.3과 7.0이 되도록 조절하였다. 불소 농도는 각 pH 값마다 0, 1, 2, 4ppm 으로 변화를 주어 총 8군의 실험 용액을 조제하였다. 모든 군의 실험 용액의 포화도(degree of saturation, DS)는 일정하도록 설계되었다. 이렇게 조제한 실험 용액은 위의 stock 용액과 같은 방법으로 각 이온의 농도를 다시 정량 분석하여 Table 1과 같은 농도를 얻었고 이를 seeded crystal growth를 위한 실험용액으로 사용하였다.

Table 1. Initial composition of experimental solutions

Composition	Concentration			
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Lactic acid (mM)	10	10	10	10
Calcium (mM)	29.5	30.2	29.8	30.1
Phosphate (mM)	9.6	10.2	10.1	9.6
Sodium azide (mM)	3.08	3.08	3.08	3.08
pH	4.3	4.3	4.3	4.3
Fluoride (ppm)	0	1	2	4

	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8
Lactic acid (mM)	0	0	0	0
Calcium (mM)	0.30	0.30	0.30	0.30
Phosphate (mM)	0.10	0.10	0.10	0.10
Sodium azide (mM)	3.08	3.08	3.08	3.08
pH	7.0	7.0	7.0	7.0
Fluoride (ppm)	0	1	2	4

3. Seeded crystal growth 실험 모형

실험 모형은 Mura-Galelli가 개발한 것과 동일하며(Mura-Galelli, 1992), Fig. 1에 도식화 하였다. 실험 모형은 원래의 실험 용액을 담은 vessel A, 실험용액을 일정한 유속으로 흐르도록 해 주는 연동 펌프(peristaltic pump, Masterflex® 7524, Cole-Parmer, IL, U.S.A.), HA seed가 담긴 반응주(reaction column), 그리고 반응주를 통과한 실험 용액을 포집하기 위한 vessel B로 구성되어 있다. 각각의 부위는 Tygon tube(R-3603, Saint-Gobain, OH, U.S.A)로 연결하였으며 각 연결부위는 누수가 없도록 테프론 테이프와 파라핀 필름으로 단단히 체결하였다.

반응주는 1cc 일회용 주사기의 실린더를 절단하여 사용하였다. 반응주는 실린더 헤드가 아래로 향하도록 바닥에 수직으로 고정하였다. 실험 용액은 연동 펌프에 의해 일정 유속(평균 2.5ml/hr)으로 위쪽에서 주입되어 반응주를 통과하고 실린더 헤드를 통해 빠져나가게 된다. 반응주의 바닥부위에는 거름종이(Advantec, Toyo, Japan)를

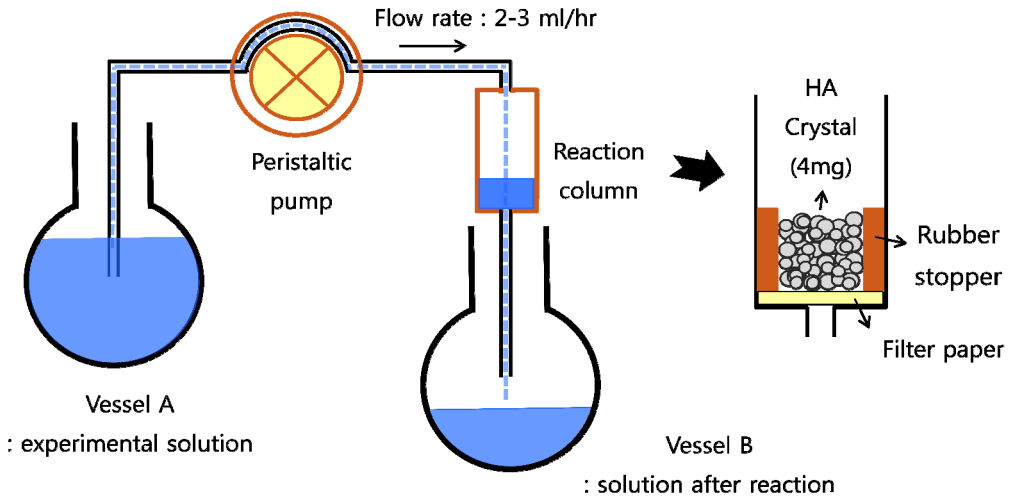

Fig. 1. Schematic illustration of experimental set-up

위치시켜 그 위로 결정이 침전되도록 하였고, 거름종이를 고정시키기 위하여 크기가 맞는 고무 링을 사용하였다. 반응주 내에는 seed로써 준비된 HA 분말을 거름종이 위에 위치시켰다. 미량 저울(microbalance, MC-5, Sartorius, Germany)을 이용하여 질량을 측정하여 각각 4mg의 HA가 seed로 사용되었다.

이 실험 모형을 이용한 seeded crystal growth 실험은 대기압 하의 실온에서 48시간 동안 지속하였으며 연동 펌프를 통한 실험용액의 투입 유속은 2~3ml/hr 사이 값으로 일정하게 유지하였다. 같은 실험을 한 군당 10차례 반복하여 시행하였다.

실험을 마친 후에는 반응주를 통과하고 포집된 용액(vessel B)의 칼슘, 인산 및 불소 이온의 농도를 측정하여 투입 전의 실험 용액의 값과 비교하였다. 여기서 측정된 이온 농도의 감소값, 즉, 이온 소모량만큼 각 이온이 결정성장에 참여하였다고 짐작할 수 있고 이를 통해 간접적으로 결정의 성분을 정량적으로 확인할 수 있다.

결정 침전 반응 후 얻어진 결정 표본은 다시 동결 건조시킨 후 질량을 측정하였고, 이 무게에서 반응 전의 seed의 무게를 빼면 순수하게 성장한 결정 만의 무게를 산출할 수 있다 (Fig. 2 참조).

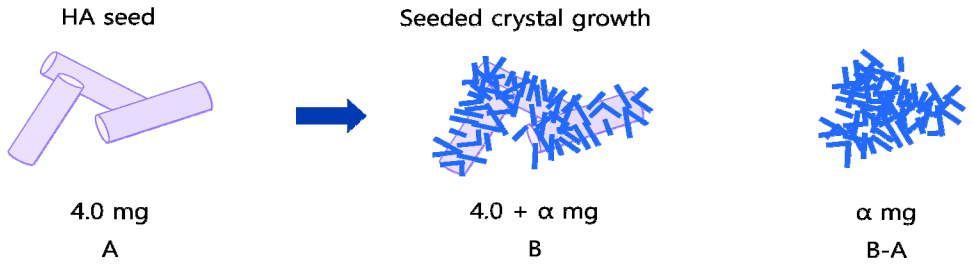

Fig. 2. Schematic illustrations of calculating the amounts of crystal growth

A : Amounts of seed crystals originally placed in the reaction column
B : Weighed amounts of solid sample recovered at the end of experiment
B-A : Difference between B and A, amounts of crystal growth

또한 얻어진 결정 표본은 결정 5mg당 700㎕의 3N perchloric acid($HClO_4$) 용액(Sigma-Aldrich Co., St. Louis., MO, U.S.A.)의 비율로 용해시켜 이를 ion chromatography를 통해 분석하여 결정 표본의 칼슘, 인산, 불소 분자의 구성비를 확인하고, 이를 통해 결정의 특성을 이해하고자 하였다.

4. 통계 분석

실험을 통해 측정된 결과 자료를 SPSS Statistics 18.0 (PASW Statistics) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 불소 농도와 pH 값, 두 변수에 대한 군 간의 차이를 검정하기 위해 이원변량분석(Two-way ANOVA)을 사용하였다. 두 변수 간 교호작용이 있을 경우에는 일원변량분석(One-way ANOVA)으로 집단 간 차이를 비교하였다. 유의 차 발생시 사후 검정으로 Tukey test를 실시하였으며 가설 검증을 위한 유의수준은 0.05로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 실험 용액의 성분 변화 측정

결정 침전 반응 후, 실험용액의 각 이온의 소모량을 측정하여 분석한 결과를 Table 2에 첨부하였다.

Table 2. Changes in compositions of the experimental solution after experiments (Mean ± S.D.) (n=10)

group	pH	F (ppm)	Changes in experimental solution, (inlet−outlet)		
			⊿Ca (mM)	⊿P (mM)	⊿F (ppm)
1	4.3	0	1.27 ± .50	1.83 ± .28	NM
2		1	2.26 ± .61	3.56 ± .35	0.73 ± .07
3		2	3.91 ± .48	3.31 ± .40	1.43 ± .09
4		4	4.09 ± .32	4.00 ± .41	3.35 ± .09
			⊿Ca (10^{-2}mM)	⊿P (10^{-2}mM)	⊿F (ppm)
5	7.0	0	1.42 ± .55	5.72 ± .45	NM
6		1	6.50 ± .41	7.12 ± .52	0.23 ± .07
7		2	7.89 ± .37	7.12 ± .58	0.19 ± .09
8		4	8.55 ± .23	7.96 ± .26	0.02 ± .07

NM : Not measurable, no fluoride was added to the experimental solutions.

가. 실험 용액의 칼슘 이온 소모량

Two-way ANOVA를 이용하여 칼슘 이온의 소모량을 분석한 결과 실험군에서 pH와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다 (Fig. 3).

pH가 4.3인 실험용액에서 pH가 7.0인 실험용액보다 모든 불소 농도에서 유의하게 더 많은 칼슘 이온의 소모량을 보였다 ($p<0.05$).

한편, pH가 7.0으로 조절된 실험 용액에서는 불소 농도 차에 따른 칼슘 이온의 소모량에 유의한 차이가 없었다. 그러나 pH가 4.3인 실험 용액은 불소의 농도가 2ppm인 3군과 불소의 농도가 4ppm인 4군 사이를 제외하고 유의하게 불소 농도가 높아짐에 따라 많은 칼슘 이온 소모량을 보였다 ($p<0.05$).

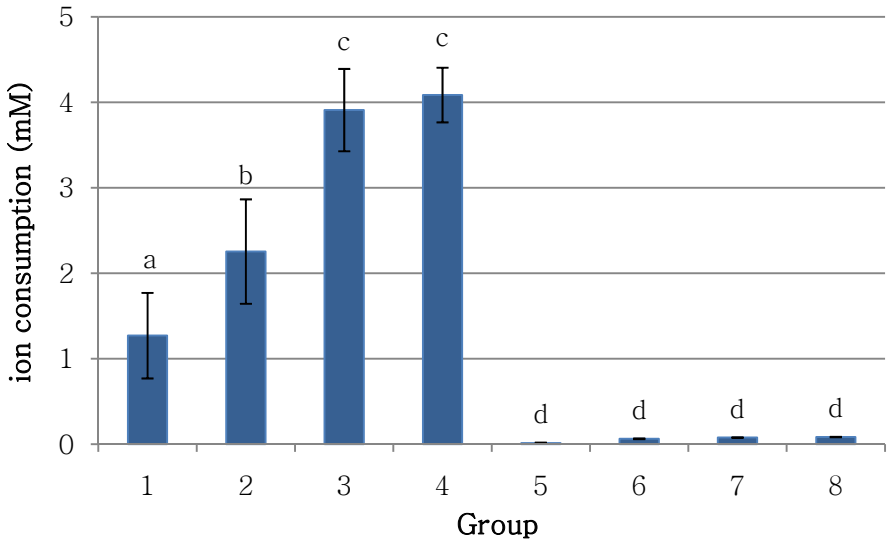

Fig. 3. Calcium ion consumption in experimental solution after crystal growth

Different letters denote statistically different ($p<0.05$).

나. 실험 용액의 인산 이온 소모량

Two-way ANOVA를 이용하여 인산 이온의 소모량을 분석한 결과 실험군에서 pH와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다 (Fig. 4).

pH가 4.3인 실험용액에서 pH가 7.0인 실험용액보다 모든 불소 농도에서 유의하게 더 많은 P 이온의 소모량을 보였다 ($p<0.05$).

한편, pH가 7.0인 실험 용액에서는 불소 농도 차이에 따른 인산 이온의 소모량에 유의한 차이가 없었다. 그러나 pH가 4.3인 실험 용액에서는 불소농도가 1ppm인 2군과 2ppm인 3군 사이를 제외하고 모든 군 간에 유의하게 불소 농도가 높아짐에 따라 많은 인산 이온의 소모량을 보였다 ($p<0.05$).

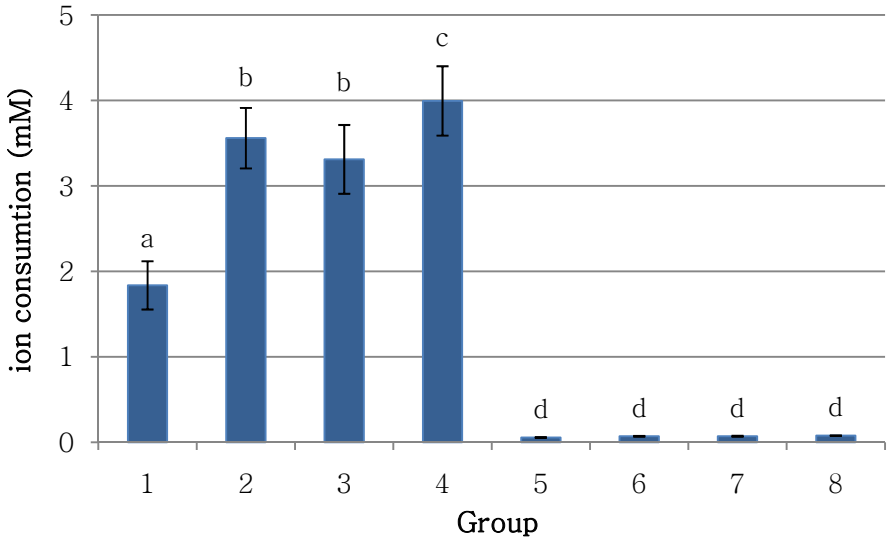

Fig. 4. Phosphate ion consumption in experimental solution after crystal growth

Different letters denote statistically different ($p<0.05$).

다. 실험 용액의 불소 이온 소모량

Two-way ANOVA를 이용하여 불소 이온의 소모량을 분석한 결과 실험군에서 pH와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다 (Fig. 5).

불소가 포함되지 않은 1군과 5군을 제외한 다른 6개의 실험군의 불소 이온 소모량을 비교하였다. pH가 4.3인 실험용액에서 pH가 7.0 보다 첨가된 불소 농도에 관계 없이 유의하게 더 많은 불소 이온의 소모량을 보였다 ($p<0.05$).

한편, pH가 7.0인 실험 용액에서의 불소 이온의 소모량은 불소 농도가 1ppm인 6군과 4ppm인 8군 사이에만 유의차가 존재하였고 ($p<0.05$), 6군에서 더 많은 소모량을 보였다. 그러나 pH가 4.3인 실험 용액에서는 1, 2, 4ppm으로 불소 농도가 높아짐에 따라 불소 이온의 소모량이 유의하게 많아졌다 ($p<0.05$).

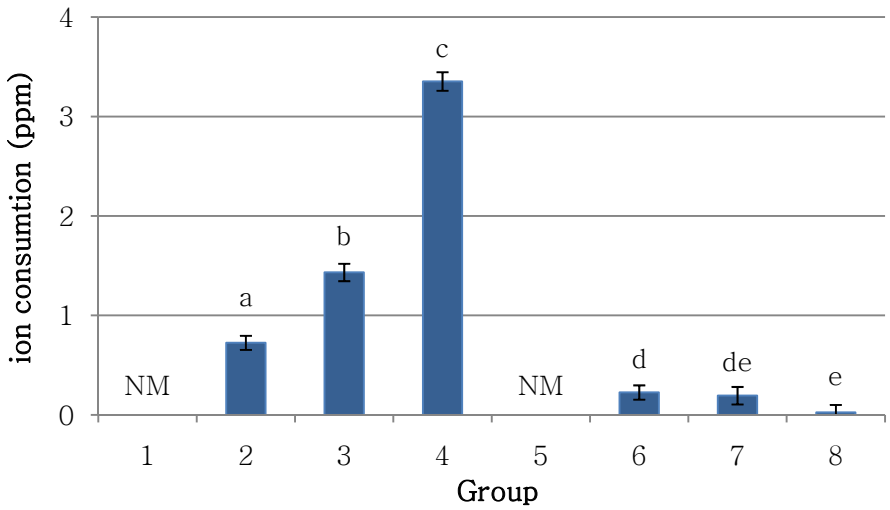

Fig. 5. Fluoride ion consumption in experimental solution after crystal growth

Different letters denote statistically different ($p<0.05$).

NM : Not measurable, no fluoride was added to the experimental solutions.

2. Seed의 질량 증가량 측정

결정 침전 반응 후, 반응주 내 표본의 결정 성장량을 측정하기 위해 시편을 동결 건조시킨 후 미량 저울을 이용하여 다시 질량을 측정하였다. 이 값에서 실험 전의 seed 질량을 빼서 seed의 질량 증가량을 측정하였다. 증가량을 분석한 결과를 Table 3 및 Fig. 6에 첨부하였다.

Two-way ANOVA를 이용하여 질량 증가량을 분석한 결과, pH와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

각각의 실험용액을 통해 결정 침전 반응 시행 후 seed의 질량 증가량은 불소의 농도가 0과 1ppm일 때는 pH가 4.3과 pH 7.0 간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 농도가 2ppm과 4ppm인 경우에는 pH가 4.3인 군에서 pH가 7.0인 군보다 유의하게 더 많은 질량 증가량을 보였다 ($p<0.05$).

pH 가 4.3인 실험용액에서는 불소 농도가 증가함에 따라 seed의 질량이 유의차 있게 증가하였으나 pH가 7.0인 군에서는 불소 농도가 0인 5군과 4ppm인 8군 사이에만 유의차가 존재하였다 ($p<0.05$).

Table 3. Weight increments of the HA seed after crystal growth (Mean ± S.D.) (n=10)

group	pH	F (ppm)	Amounts of solid(mg)			Increase rate (%)
			Before	After	⊿weight	
1	4.3	0	4.00	4.34	0.34 ± 0.32	8.50
2		1	4.01	5.89	1.88 ± 0.82	46.88
3		2	4.00	7.81	3.81 ± 1.29	95.25
4		4	4.00	9.97	5.97 ± 0.82	149.25
5	7.0	0	3.99	4.35	0.36 ± 0.30	9.02
6		1	4.00	5.15	1.15 ± 0.54	28.75
7		2	4.00	5.21	1.21 ± 0.27	30.25
8		4	4.01	5.50	1.49 ± 0.41	37.16

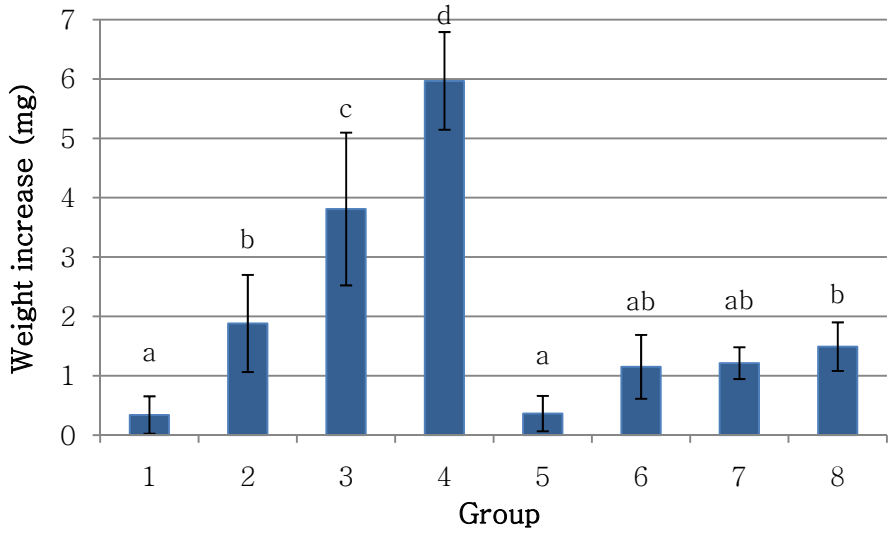

Fig. 6. Weight increments of the HA seed after crystal growth

Different letters denote statistically different ($p<0.05$).

3. 결정 침전 표본의 성분 분석

결정 침전 반응 후의 표본의 칼슘, 인, 불소 성분비를 분석한 결과를 Table 4에 첨부하였다. 성분비는 앞의 실험 방법에 기술된 것과 같이 결정 침전 반응 후의 표본을 과염소산에 용해시켜 각 분자의 몰농도를 측정함으로써 이루어졌다. 표본과 같은 질량의 합성 HA를 과염소산에 용해시켜 여기에서 측정된 인의 몰농도를 기준값 1로 하여 각 표본의 성분의 양을 나타내었다. 또한 각 표본에서 Ca/P 비율을 계산하여 이 값을 확인하였다.

Table 4. Molecular ratio in crystallized samples (Mean ± S.D.) (n=10)

group	pH	F (ppm)	Molecular ratio in crystallized samples			
			Ca	P	F	Ca/P
1	4.3	0	1.57± .13	0.96± .01	0.01± .01	1.64± .14
2		1	1.66± .09	1.00± .01	0.25± .09	1.66± .10
3		2	1.71± .08	1.00± .01	0.38± .09	1.71± .08
4		4	1.68± .07	1.02± .01	0.50± .08	1.65± .07
5	7.0	0	1.36± .05	0.95± .01	0.00± .01	1.44± .05
6*		1	1.38± .06	0.96± .00	0.12± .02	1.45± .07
7		2	1.63± .10	0.98± .01	0.14± .02	1.67± .11
8*		4	1.80± .12	0.97± .01	0.17± .03	1.86± .12

group* : 1 sample is missed in two groups (group 6, 8) (n=9)

가. 결정 침전 표본의 불소 성분비

결정 표본의 상대적 불소의 양을 Two-way ANOVA를 이용하여 분석한 결과, pH와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다 (Fig. 7).

실험 용액의 불소 농도가 0인 1군과 5군 사이를 제외하고 pH가 4.3인 실험 용액에 의한 결정 침전 표본에서 pH가 7.0인 표본보다 유의하게 더 많은 불소량이 측정되었다 ($p<0.05$). 한편, pH가 4.3인 실험 용액에 의한 결정 침전 표본에서의 불소량은 모든 군 사이에 유의차가 존재하였으며 ($p<0.05$), 실험 용액의 불소 농도가 증가할수록 더 큰 값을 나타냈다. 그러나 pH가 7.0인 용액에 의한 표본에서의 불소량은 불소가 포함되지 않은 실험용액인 5군만 다른 세 군보다 유의하게 낮게 측정되었으며 ($p<0.05$), 다른 측정치들은 유의차가 없었다.

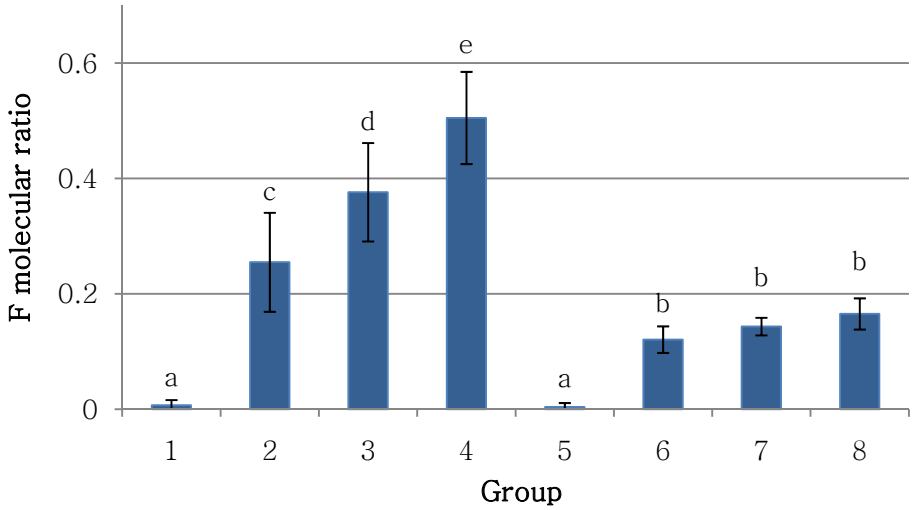

Fig. 7. Fluoride molecular ratio to HA seeds in crystallized samples

Different letters denote statistically different ($p<0.05$).

나. 결정 침전 표본에서 Ca/P 성분비

결정 표본의 Ca/P 비율을 Two-way ANOVA를 이용하여 분석한 결과, pH와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다 (Fig. 8).

실험 용액의 불소 농도가 0과 1ppm인 경우에는 pH 4.3의 실험용액에 의한 결정 표본의 Ca/P 가 pH 7.0의 경우보다 유의하게 높았다 ($p<0.05$). 그러나 실험 용액의 불소 농도가 2ppm인 경우 pH 4.3과 pH 7.0 의 군 간에는 유의차가 없었으며, 4ppm인 경우에는 반대로 pH 4.3 군이 pH 7.0 군보다 유의하게 낮았다 ($p<0.05$).

pH 4.3인 실험 군 간에는 불소 농도 변수에 따른 유의차가 나타나지 않았으며, pH 7.0인 실험 군에서는 불소 농도가 0인 5군과 1ppm인 6군 사이를 제외하면 각 실험군 사이에 유의차가 있었으며 ($p<0.05$), 불소 농도가 증가할수록 Ca/P 비율이 높게 측정되었다.

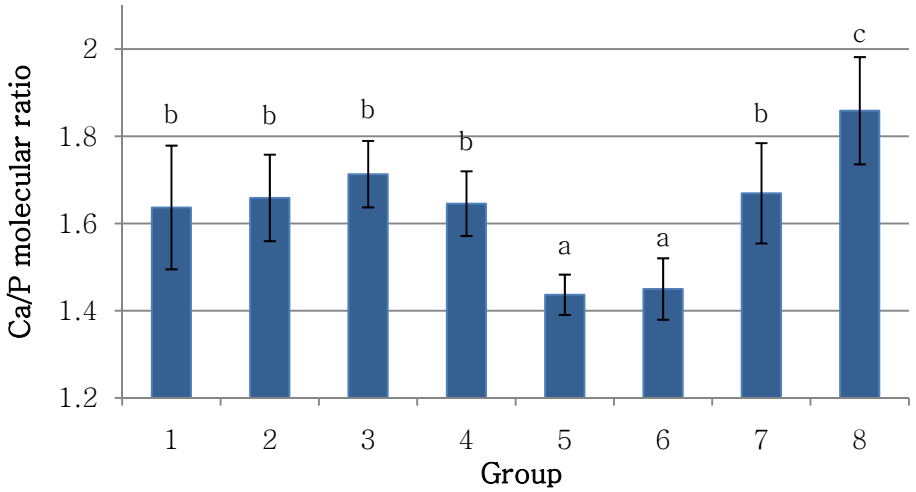

Fig. 8. Ca/P molecular ratio to HA seeds in crystallized samples

Different letters denote statistically different ($p<0.05$).

Ⅳ. 고 찰

본 연구에 사용된 실험 모형은 과포화 상태의 실험 용액을 seed material이 놓인 소형 반응주에 일정한 속도로 통과시킴으로써 일어난 결정성장 반응을 평가하고 그 조절 인자들을 밝히기 위한 것이다. 본 연구에서는 pH 4.3과 pH 7.0로 조절된 용액에서 불소의 변화에 따른 결정 성장을 정량적으로 분석하였다.

이 실험 모형은 이미 형성된 법랑질 결정에 인접한 좁은 부위에서 발생하는 광화 과정을 재현한 것으로, 일정 속도로 일정한 농도의 유액을 흐르게 함으로써 법랑질 결정을 둘러싸는 유체의 생리적 환경과 유사하도록 한 것이다.(Mura-Galelli, 1992) 그러나 반응주의 국소 부위에 따라 침전을 위한 용액 조성이나 이온의 동력이 다를 수 있으므로 결정 침전 역학을 정확히 규명하기 어려울 수도 있다. 그러나 기존의 같은 모형을 사용한 연구 및 본 연구를 통해 어느 정도 실험의 유효성 및 일관성을 보여, 이러한 제한적 요소는 무시할 수 있을 것이라 사료된다.

또한 이 실험 모형은 치아 법랑질의 구조를 재현하지 못한다는 점에서 acid buffer system에서 치아 절편을 이용한 재광화 연구와는 차이를 보인다. 따라서 법랑질의 표층과 표면 하층의 광화 양상의 차이, 광화 깊이 등에 대한 고찰은 불가능하다. 그러나 본 모형을 이용한 연구 방법은 유체의 이온 조성에 따른 결정 성장의 기전과 그 역학을 더 심도 있게 이해하기에 유용한 실험 방법이라 사료된다.

본 실험 모형을 이용한 기존의 연구에서 과포화 용액의 조성은 대부분 porcine의 amelogenesis 과정의 enamel fluid 를 기준으로 제작된 칼슘 1.0mM, 인산 3.0mM, pH 7.2~7.4 정도로 맞추어진 경우가 많았다(Kwon, 1999; Lee, 1995; Mura-Galleli, 1992; Oh, 1997). 그러나 이 용액의 포화도는 법랑질의 재광화 연구에 직접

적용하기에는 다소 높다. 곽(2008), 이(2009), 박(2010) 등은 치아 절편을 이용한 재광화 연구에서 더 낮은 포화도를 보이는 완충용액에서 더 심부까지 재광화가 일어남을 보고하였다. 따라서 본 실험 모형을 이용한 연구에서는 치아 절편을 이용한 재광화 연구(Song, 2011)에서 치아 절편에서의 유효성이 이미 증명된 과포화 완충용액의 조성을 그대로 이용하여 진행되었다.

본 연구에서 재광화의 양상을 정량적으로 분석하는 것은 세 가지 방법으로 이루어졌다. 첫 번째는 실험 후 포집된 용액의 각 이온 농도를 분석하여 각 이온의 소모량을 측정하고 이를 통해 결정 성장 반응에 참여한 이온의 양을 간접적으로 알아보는 방법이다. 두 번째는 결정 성장 반응 전 후의 seed의 무게 차이를 통해 결정 성장량을 측정하는 방법이고, 세 번째는 반응 후 얻어진 결정 표본의 성분을 분석하여 결정이 일어나는 양상을 분석하는 것이다. 각 방법을 통해 얻어진 결과를 통해 다소간의 지견을 얻을 수 있었다.

이온 소모량에 있어 각 pH에 따른 이온 소모 양상의 차이가 명확했다. 칼슘과 인산 이온의 경우 pH 4.3이 pH 7.0의 경우보다 현저히 많은 이온 소모량을 보였고, pH 4.3의 경우에는 불소 농도의 변화에 따라 두 이온의 소모량에 일부 유의차가 있었으나 pH 7.0의 경우에는 불소 농도 변화에 따른 유의차가 존재하지 않았다. 따라서 pH 7.0 보다 pH 4.3에서 더 많은 양의 칼슘, 인산 이온이 재광화에 투입되며, 실험 용액의 불소 농도에 따른 영향도 더 크다고 할 수 있을 것이다. Habelitz(2005) 등은 amelogenin 단백질과 함께 pH의 변화에 따른 apatite의 결정 성장 비교 연구에서 pH가 8.8에서 6.5까지 낮아질수록 더 많은 결정 성장이 관찰된다 하였다. 그러나 저자는 이 원인을 추론하면서 pH가 낮아질수록 amelogenin의 활성도가 높아지기 때문이라 설명하였다.

인산 칼슘염의 용해도는 pH 가 증가함에 따라 감소한다. 따라서 동일한 포화도로 맞추어진 본 실험 모형에서 pH 4.3의 경우에 pH 7.0의 경우보다 칼슘과 인산 이온의 농도가 100배 가량 높았다. 본 실험에서 pH가 4.3인 실험 용액에서 더 많은 이온의 소모량을 보인 것, 즉, 더 많은 결정의 침착이 일어난 것이 실제로 pH가 낮은 환경에서 이온의 침전되는 driving force가 더 강한 것인지, 단지 더 많은 이온이 용액 내에 존재하기 때문에 더 많은 양의 결정이 침착된 것인지 정확히 알기는 어렵다. 이를 알아보기 위해서 pH와 이온 구성에 변화를 준 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

반응 후 불소 이온 소모량 역시 pH 4.3과 7.0에서 전혀 다른 양상으로 나타났다. pH 4.3에서는 실험 용액 내에 포함된 대부분의 불소가 소모되는 양상을 보였고, 소모된 불소이온의 양은 각 군마다 유의차가 존재했다, 그러나 pH 7.0에서는 모든 군 사이에 유의차가 없었으며 그 소모량도 매우 적었다. 또한 반응 후 결정 표본의 성분 분석에서 불소의 비율도 이에 상응하는 결과를 보였다. pH 4.3에서는 결정 표본내의 불소 성분비가 실험용액의 불소 농도가 올라감에 따라 유의하게 상승하는 양상을 보였으나 pH 7.0에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 실제로 pH 4.3의 조건에서는 실험 용액에 용해되어 있던 대부분의 불소가 결정 성장 과정에서 결정에 직접 침착되었으며, pH 7.0에서 형성된 결정에는 불소의 침착이 일정량에 그쳤다.

권(1999) 등은, 첨가된 불소 농도에 관계 없이 결정 형성에 소모된 불소 이온의 양은 일정하다 하였다. 그러나 본 실험에서는 권 등의 실험 조건인 pH 7.3-7.4와 유사한 pH 7.0의 조건에서는 소모된 불소 이온의 양이 불소 농도 변화에 따른 유의한 차이가 없고, 그 양도 매우 적었으나, pH 4.3의 조건에서는 실험 용액에 포함된 불소 이온의 대부분이 소모되는, 즉 불소 농도가 증가함에 따라 소모된 불소 이온의 양이 증가하는, 서로 다른 양상을 보였다.

용액 내의 불소 이온은 그 농도나 다른 용액의 조성에 따라 apatite 등과 반응할 수 있으며, 이를 통해 F-OH 교환이 일어나 fluorohydroxyapatite를 형성할 수 있다. 이러한 반응의 정도에는 불소 농도가 영향을 미친다고 하였으며 (Eanes and Meyer, 1978; LeGeros, 1991), 높은 산성도도 용액 내의 CaF_2, 혹은 phosphate containing CaF_2 유사 물질을 더 많이 형성하고 이들이 불소 이온의 reservoir로 작용해 더 많은 불소가 반응에 참여할 수 있도록 한다고 하였다(Nelson et al., 1983). 본 연구에서 산성의 환경인 pH 4.3에서 더 활발한 불소의 이온 침착이 일어난 원인은 이를 통해 추측해 볼 수 있을 것이다.

결정 반응 후 질량 상승을 통한 결정 반응량의 추정에 있어서도 이온 소모량의 결과와 같은 맥락의 결과를 얻을 수 있었다. pH 4.3에서는 불소의 농도가 증가함에 따라 유의하게 높은 질량 증가량이 측정되었고, pH 7.0에서는 유의한 증가가 나타나지 않았다. pH 4.3에서 불소의 농도가 증가함에 따라 더 활발한 결정 성장이 일어나지만, pH 7.0에서 불소의 농도는 결정 성장의 양에 있어 큰 영향을 주지 못함을 짐작할 수 있다.

그러나 얻어진 결정 표본의 성분 분석을 통해 pH 7.0의 환경에서 얻어진 결정이 불소 농도의 변화에 따라 서로 다른 특성을 가지게 되는 것을 확인할 수 있었다. 결정에서 Ca/P 분자 비를 확인한 결과 pH 4.3에서는 군에 따른 차이가 유의한 차이를 보이지 않는 것에 비해 pH 7.0에서는 불소농도가 0, 1ppm일 때는 다른 군들보다 유의하게 작은 Ca/P 값을 보이다가 불소 농도가 2ppm, 4ppm으로 상승하면서 유의한 Ca/P 의 증가를 보였다. 이는 불소 농도가 낮은 상태에서는 낮은 Ca/P 비율을 가진 화합물의 인산칼슘 결정이 침착 되다가, 불소 농도가 높은 상태에서는 높은 Ca/P 비율을 가진 인산칼슘으로 결정 성장이 이루어짐을 의미하는 것이다.

생물학적으로 apatite의 형성 과정에서 전구체로써 몇 가지 상의 인산칼슘 염이 존재하게 되는데, amorphous tricalcium phosphate(ACP), DCPD, OCP 등이 그것이다. 이들 중 DCPD, OCP 등은 HA만큼 안정하지 못하며, 생리적 환경에서 HA로 가수분해될 수 있으나 이 전환 과정에 있어서의 역학은 여러 조절인자의 영향을 받는다(Wu and Nancollas, 1999). 불소는 이러한 전구체들의 가수분해를 촉진하여 HA로 변환시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Aoba, 1997; Barone and Nancollas, 1978; Robinson et al., 2004). DCPD, OCP 의 각각의 Ca/P 값은 각각 1과 1.33으로 HA의 1.67보다 작다. 따라서 본 실험에서 pH 7.0에서 Ca/P 가 불소의 농도에 따라 증가하는 것으로 보아 저농도의 불소에서는 이러한 전구체의 형태로 결정이 침착되다가 고농도의 불소의 환경에서 불소가 이러한 전구체를 HA로 전환시키는데 기여하여 결정의 조성이 변환되는 것으로 사료된다.

pH 7.0의 경우와는 다르게, pH 4.3에서는 결정의 분석 결과 비교적 높은 값의 Ca/P 값이 전 불소 농도에 걸쳐 유의차 없이 나타났고, 이 값은 HA의 Ca/P 값인 1.67과 큰 차이가 없었다. 따라서 pH 4.3에서 만들어진 결정은 apatite와 같이 Ca/P 가 높은 형태가 큰 비율을 차지할 가능성이 높을 것으로 사료된다.

본 실험과 같은 조성의 과포화 용액을 이용하여 법랑질 절편의 재광화 양상을 비교한 선행 연구(Song, 2011)와 함께 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때, pH가 4.3일 경우에는 불소 농도의 영향을 보다 많이 받으며, 불소의 농도가 높아지면서 결정 성장량이 증가하며, 재광화의 깊이도 깊어짐이 관찰되었다. 한편, pH 7.0의 경우에는 불소의 농도 증가에 따른 결정 성장의 양에는 차이가 없으나 농도가 높아질수록 안정된 결정 형태로 전환되는 양상을 추론할 수 있었다. 재광화의 깊이에

있어서는 pH 4.3의 경우와 큰 차이가 없으나 불소 농도가 높아질수록 표면의 재광화에 의해 심부의 재광화가 억제되는 것이 관찰되었다.

이번 연구에서는 침전 결정 반응 후 남은 시편을 분석하는데 그 양이 제한적인 관계로 그 결정의 화학적 조성비를 통해서 그 특징을 간접적으로 추측해보는 것에 그쳤다. 따라서 이후의 실험에서는 이러한 결정의 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 X-ray 회절 분석, FTIR 및 SEM 영상 분석 등의 평가 방법들이 병행되는 것이 좋겠다.

또한, pH와 불소 이온의 농도 변화에 따른 침전 역학의 차이를 더 명확히 고찰하기 위해 용액 조성을 변화시킨 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

이번 연구의 목적은 포화도가 동일하게 설계된 pH 4.3과 pH 7.0, 두 종류의 과포화 용액에서 불소 농도의 변화가 합성 HA를 이용한 seeded crystal growth에 미치는 영향을 정량적으로 분석하는 것이다. 이에 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pH 4.3의 실험 용액을 통한 결정 침전 반응에서 pH 7.0의 경우보다 더 많은 칼슘, 인, 불소 이온이 결정으로 침착 되었다.

2. 실험 용액의 불소 농도가 높아질수록 pH 4.3의 실험 용액을 통한 결정 침전 반응에서 결정 침착의 양이 증가하였다. 실험 용액에 포함된 불소는 결정에 직접 참여하는 형태로 결정 성장이 일어났다. 그러나 pH 7.0에서 불소 농도 변화에 따른 결정 성장의 변화는 미미하였다.

3. pH 7.0의 실험 용액을 통한 결정 침전 반응에서 불소 농도가 높아질수록 Ca/P 비가 높은 분자 형태의 인산칼슘 염이 결정으로 침착되었다.

본 실험의 결과, 중성 pH인 7.0보다 산성인 pH 4.3에서 결정 성장이 촉진되었으며, pH 4.3에서 불소 이온의 농도에 따라 더 큰 영향을 받는 것으로 나타나, 불소 농도가 증가함에 따라 많은 결정 침착이 관찰되었다.

참고문헌

송윤정: 법랑질 표면에서 완충용액에 의한 초기 인공우식 유발 시 diffusion pathway 의 형성. In 박사학위논문, 연세대학교 대학원, 2009.

Amjad, Z., Nancollas, G. H. 1979. "Effect of fluoride on the growth of hydroxyapatite and human dental enamel". *Caries Res* 13(5): 250-258.

Aoba, T. 1997. "The effect of fluoride on apatite structure and growth". *Crit Rev Oral Biol Med* 8(2): 136-153.

Aoba, T. 2004. "Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries". *Oral Dis* 10(5): 249-257.

Aoba, T., Moreno, E. C. 1984. "Preparation of hydroxyapatite crystals and their behavior as seeds for crystal growth". *J Dent Res* 63(6): 874-880.

Barone, J. P., Nancollas, G. H. 1978. "The growth of calcium phosphates on hydroxyapatite crystals. The effect of fluoride and phosphonate". *J Dent Res* 57(5-6): 735-742.

Barone, J. P., Nancollas, G. H., Tomson, M. 1976. "The seeded growth of calcium phosphates. The kinetics of growth of dicalcium phosphate dihydrate on hydroxyapatite". *Calcif Tissue Res* 21(3): 171-182.

Eanes, E. D. 1980. "The influence of fluoride on the seeded growth of apatite from stable supersaturated solutions at pH 7.4". *J Dent Res* 59(2): 144-150.

Eanes, E. D., Meyer, J. L. 1978. "The influence of fluoride on apatite formation from unstable supersaturated solutions at pH 7.4". *J Dent Res* 57(4): 617-624.

Elliott, J. C.: Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. In Studies in inorganic chemistry, 1994, Elsevier, Amsterdam.

Fan, Y., Nelson, J. R., Alvarez, J. R., Hagan, J., Berrier, A., Xu, X. 2011. "Amelogenin-assisted ex vivo remineralization of human enamel: Effects of supersaturation degree and fluoride concentration". *Acta Biomater* 7(5): 2293-2302.

Feagin, F., Patel, P. R., Koulourides, T., Pigman, W. 1971. "Study of the effect of calcium, phosphate, fluoride and hydrogen ion concentrations on the remineralization of partially demineralized human and bovine enamel surfaces". *Arch Oral Biol* 16(5): 535-548.

Featherstone, J. D., Rodgers, B. E., Smith, M. W. 1981. "Physicochemical requirements for rapid remineralization of early carious lesions". *Caries Res* 15(3): 221-235.

Habelitz, S., Denbesten, P. K., Marshall, S. J., Marshall, G. W., Li, W. 2005. "Amelogenin control over apatite crystal growth is affected by the pH and degree of ionic saturation". *Orthod Craniofac Res* 8(4): 232-238.

Han, W. S., Kum, K.Y., Lee. C.Y. 1996. "The influence of fluoride on remineralization of artificial dental caries". *J Korean Acad Conserv Dent* 21(1): 161-173.

Iijima, M., Moradian-Oldak, J. 2005. "Control of apatite crystal growth in a fluoride containing amelogenin-rich matrix". *Biomaterials* 26(13): 1595-1603.

Iijima, M., Tohda, H., Suzuki, H., Yanagisawa, T., Moriwaki, Y. 1992. "Effects of fluoride on apatite-octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation". *Calcif Tissue Int*(4): 357-361.

Kim, M. K., Kum, K.Y., Lee. C.Y. 1997. "The influence of pH on remineralization of artificial dental caries". *J Korean Acad Conserv Dent* 22(1): 193-208.

Kwak, Y. J., Kim, E.S., Park, S.H., Kong, H.K., Lee, Y., Lee, C.Y. 2008. "The remineralizing features of pH 5.5 solutions of different degree of saturations on artifically demineralized enamel". *J Korean Acad Conserv Dent* 33(5): 481-492.

Kwon, J. W., Kum, K.Y., Lee, S.J., Jung, I.Y., Lee, C.Y. 1999. "The effect of the supersaturated solutions containing high concentrations of fluoride on seeded crystal growth". *J Korean Acad Conserv Dent* 24(2): 330-336.

Kwon, J. W., Seo, D.K., Song, Y.J., Lee, Y., Lee, C.Y. 2008. "The effect of lactic acid concentration and pH of lactic acid buffer solutions on enamel remineralization". *J Korean Acad Conserv Dent* 33(6): 507-517.

Lammers, P. C., Borggreven, J. M., Driessens, F. C. 1990. "Influence of fluoride on in vitro remineralization of artificial subsurface lesions determined with a sandwich technique". *Caries Res* 24(2): 81-85.

Lee, C. Y., Aoba, T. 1995. "Seeded crystal growth onto enamal mineral and synthetic hydroxyapatite in dilute supersaturated solutions containing low concentration of fluoride". *J Korean Acad Conserv Dent* 20(2): 818-826.

Lee, J. S., Rhoh, B.D., Shin, S.J., Lee, Y., Kong, H.K, Lee, C.Y. 2009. "The dynamic change of artificially demineralized enamel by degree of saturation of remineralization soultion at pH 4.3". *J Korean Acad Conserv Dent* 34(1): 20-29.

LeGeros, R. Z. 1991. "Calcium phosphates in oral biology and medicine". *Monogr Oral Sci* 15: 1-201.

Margolis, H. C., Moreno, E. C. 1985. "Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization". *Caries Res* 19(1): 22-35.

Matsumoto, T., Okazaki, M., Inoue, M., Sasaki, J., Hamada, Y., Takahashi, J. 2006. "Role of acidic amino acid for regulating hydroxyapatite crystal growth". *Dent Mater J* 25(2): 360-364.

Mura-Galelli, M. J., Narusawa H., Shimada T., Iijima M., Aoba T. 1992. "Effect of fluoride on precipitation and hydrolysis of octacalcium phosphate in an experimental model simulating enamel mineralization during amelogenesis". *Cells Materials* 2: 221-230.

Nancollas, G. H., Mohan, M. S. 1970. "The growth of hydroxyapatite crystals". *Arch Oral Biol* 15(8): 731-745.

Nelson, D. G., Featherstone, J. D., Duncan, J. F., Cutress, T. W. 1983. "Effect of carbonate and fluoride on the dissolution behaviour of synthetic apatites". *Caries Res* 17(3): 200-211.

Oh, S. Y., Jung, I.Y., Kum, K.Y., Lee,C.Y. 1997. "The effects of fluoride concentration and seed material on seeded crystal growth". *J Korean Acad Conserv Dent* 22(2): 560-674.

Park, J. S., Park, S.H., Park, J.W., Lee, C.Y. 2010. "The remineralization aspect of enamel according to change of the degree of saturation of the organic acid buffering solution in pH 5.5". *J Korean Acad Conserv Dent* 35(2): 96-105.

Robinson, C., Brookes, S. J., Bonass, W. A., Shore, R. C., Kirkham, J. 1997. "Enamel maturation". *Ciba Found Symp* 205: 156-170; discussion 170-154.

Robinson, C., Connell, S., Kirkham, J., Brookes, S. J., Shore, R. C., Smith, A. M. 2004. "The effect of fluoride on the developing tooth". *Caries Res* 38(3): 268-276.

Song, S. C.: Effect of fluoride on remineralization of artificial enamel caries in pH 4.3 and pH 7.0 remineralized solution. In Doctoral Dissertation, the Graduate School of Yonsei University, 2011.

Ten Cate, J. M., Arends, J. 1977. "Remineralization of artificial enamel lesions in vitro". *Caries Res* 11(5): 277-286.

Wu, W., Nancollas, G. H. 1999. "Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: a comparison with other methods". *Adv Colloid Interface Sci* 79(2-3): 229-279.

Yamazaki, H., Margolis, H. C. 2008. "Enhanced enamel remineralization under acidic conditions in vitro". *J Dent Res* 87(6): 569-574.

Yanagisawa, T., Takuma, S., Tohda, H., Fejerskov, O., Fearnhead, R. W. 1989. "High resolution electron microscopy of enamel crystals in cases of human dental fluorosis". *J Electron Microsc (Tokyo)* 38(6): 441-448.

Abstract

Crystal Growth of Hydroxyapatite : Effect of Fluoride Concentration in pH 4.3 and pH 7.0 Supersaturated Solutions

Haneol Shin

Department of Dentistry

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Chan-Young Lee, D.D.S., M.S.D., D.D.Sc.)

The present study was undertaken to investigate the crystal growth onto synthetic hydroxyapatite (HA) seeds in pH 4.3 and pH 7.0 supersaturated solutions with different fluoride concentrations.

8 groups of pH 4.3 and 7.0 calcium phosphate supersaturated solutions were prepared with different fluoride concentration (0, 1, 2 and 4ppm). Each solution was introduced into the reactive column containing HA seed by the use of a peristaltic pump. Calcium phosphate precipitate yield crystal growth onto the HA seed surface while solutions flow the reactive column. For evaluating of crystallizing process, the changes of calcium, phosphate and fluoride ion concentrations of the inlet and outlet solutions were determined. The recovered solid samples were weighed to assess the amount of minerals precipitated

during the experimental period, and finally determined their composition to deduce characteristics of crystals.

Results of the study are as follows.

1. During the seeded crystal growth, there were significantly more consumption of calcium, phosphate and fluoride ions in pH 4.3 experimental solutions than 7.0 ($p<0.05$).
2. As fluoride concentration increased in pH 4.3 experimental solution, 1) Calcium, phosphate and fluoride ion consumption in experimental solutions, 2) weight increment of HA seed, and 3) fluoride ratio in crystallized samples were increased. There were significant differences among the groups ($p<0.05$) (except between group 3 and 4 in calcium ion consumption, and between group 2 and 3 in phosphate ion consumption). But in pH 7.0 solution, these phenomena were not significant.
3. In pH 7.0 experimental solutions, analysis of crystallized samples showed higher Ca/P ratio in higher fluoride concentration. There were significant difference among the groups ($p<0.05$). But in pH 4.3 experimental solution, there were not significant differences in Ca/P ratio.

In conclusion, in supersaturated solutions with same DS, more seeded crystal growth were observed in pH 4.3 solutions than pH 7.0. In pH 4.3 solutions, more seeded crystal growth showed in higher fluoride concentration until 4ppm.

Key words: seeded crystal growth, hydroxyapatite, fluoride concentration, pH