

pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 합성
수산화인회석 결정성장에 대한 불소 농도의 영향

연세대학교 대학원

치 의 학 과

문 성 주

pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 합성
수산화인회석 결정성장에 대한 불소 농도의 영향

지도교수 이 찬 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2013년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

문 성 주

문성주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2013년 6월 일

감사의 글

“실험을 함에 있어 실수는 있을 수 있다. 하지만 그 실수를 스스로 찾아내고 그것을 바탕으로 제대로 된 방향으로 나아가는 것이 과학이다.”

이번 논문을 진행하면서 이 같은 큰 가르침을 주시고, 제대로 된 방향을 일러주신 이찬영 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 조금 더 진중하게 하지 못했던 점에 송구스럽기도 합니다. 부족한 논문에도 부드러운 미소로 진지하게 대해주신 박성호 선생님과, 처음이기에 서툴기만 했던 원고를 귀찮게 여기지 않으시고 많은 조언을 해주신 박정원 선생님께도 감사 드립니다.

그리고 항상 옆에서 참된 의사가 되는 길을 일러주시는 이승종 선생님, 노병덕 선생님, 김의성 선생님, 정일영 선생님, 신수정 선생님, 신유석 선생님께도 이 글을 빌어 진심으로 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

또한, 3년 동안 옆에서 큰 힘이 되어주고 있는 우리 동기들과, 이번 실험을 진행하면서 함께 고생하면서 많이 도와주었던 김건태 선생에게도 고맙다는 말을 전합니다.

지금까지 많이 부족한 자식을 항상 믿고 지켜봐 주시고, 제 편에 서서 응원 해주시는 사랑하는 부모님, 떨어져 있어 자주 보지 못해 안타까운 여동생, 그리고 항상 따뜻하게 배려해 주시고 챙겨주시는 장인, 장모님께도 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 마지막으로 저를 믿고 앞으로 남은 평생을 함께하기로 약속한 제 마지막 사랑 그녀에게 이 논문을 바칩니다.

2013년 6월

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
가. 결정 성장 반응 후 실험 용액의 이온 농도의 변화	8
나. 결정 성장 반응 후 seed 의 질량 증가량	9
4. 통계 분석	10

III. 결 과	11
1. 결정 성장 반응 후 실험 용액의 이온 농도의 변화	11
가. 결정 성장 반응 후 칼슘 이온 농도의 변화.....	12
나. 결정 성장 반응 후 인산 이온 농도의 변화.....	13
다. 결정 성장 반응 후 불소 이온 농도의 변화.....	14
2. 결정 성장 반응 후 seed 의 질량 증가량.....	15
IV. 고 찰	17
V. 결 론	22
참고 문헌.....	23
Abstract	26

그림 차례

Fig. 1. Schematic illustration of experimental set-up	8
Fig. 2. Schematic illustrations of calculating the amounts of crystal growth	10
Fig. 3. Calcium ion consumption after crystal growth	12
Fig. 4. Phosphate ion consumption after crystal growth	13
Fig. 5. Fluoride ion consumption after crystal growth	14
Fig. 6. Weight increment of the HA seed after crystal growth	16

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 increment of the seeded HA seed after crystal growth	16

국 문 요 약

pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 합성 수산화인회석

결정성장에 대한 불소 농도의 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.

포화도(Degree of saturation, DS)가 5.0 으로 동일하게 제작된 pH 4.3 과 7.0 두 종류의 인산칼슘 과포화 용액의 불소 농도를 0, 1, 2, 4 ppm 으로 달리하여 총 8 군의 실험 용액을 제조하였다. 각 실험용액은 HA seed 가 들어있는 반응주를 일정 유속으로 통과하도록 하여 인산칼슘 염이 HA seed 표면에 결정 성장이 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. 그 결과 pH 4.3 인 실험용액에서 불소 농도가 증가함에 따라 소모되는 칼슘, 인과 불소 이온의 양과 결정 성장 후 질량 증가가 유의차 있게 증가하는 것이 관찰되었다($p < 0.05$). 반면 pH 7.0 에서는 불소 농도가 증가함에 따라 소모되는 칼슘, 인 이온의 양과 결정 성장 후 질량 증가가 유의차 있게 증가하였으나($p < 0.05$, 일부 군 제외) 그 증가량이 pH 4.3 인 실험용액군에 비해 작은 것으로

확인되었다. 또한 불소 이온 농도의 변화는 유의차가 없는 것으로 확인 되었다 ($p>0.05$).

따라서, 이를 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. pH 4.3의 실험 용액을 통한 수산화인회석 결정 성장 반응에서 pH 7.0의 실험 용액의 경우보다 더 많은 양의 결정을 보였다.
2. pH 4.3 의 실험 용액을 통한 결정 성장 반응에서, 실험 용액의 불소 이온 농도가 증가함에 따라, 수산화인회석 결정량이 유의차있게 증가하였다.
3. pH 7.0 의 경우 불소 농도가 증가함에 따라 수산화인회석 결정량이 증가하기는 하나, pH 4.3 실험용액에 비해 작았다.

결론적으로 pH 7.0보다 pH 4.3에서 수산화인회석 결정 성장이 촉진되었으며, pH 4.3에서 불소 이온의 농도에 따라 더 큰 영향을 받았다.

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

pH 4.3과 pH 7.0의 과포화용액에서 합성 수산화인회석 결정성장에 대한 불소 농도의 영향

<지도교수 : 이 찬 영>

연세대학교 대학원 치의학과

문 성 주

I. 서 론

치아 우식은 치면 위에 쌓인 치태 내의 세균, 음식물과 타액의 반응에 의해 생성된 산으로 인해 발생된다. 그 중 치아의 초기 우식에 있어 법랑질은 끊임 없는 탈회와 재광화가 되풀이 되며 항상성을 유지하게 되고, 이런 탈회와 재광화가 균형을 이룰 때 초기 우식은 더 이상 진행되지 않고 멈출 수 있게 된다.

이러한 재광화 현상은 Head(Head, 1912) 등이 처음 보고한 이후, in vivo 에서 Anderson(Anderson, 1938)과 Backer-Dirks(Dirks, 1966)등의 연구자들이 재광화 능력을 증명함으로써 명백해 졌다. 이 연구들에서 재광화의 기전을 인산칼슘 염의 용해도 곡선을 통해 동력학적으로 설명하였는데, 여기서 용해도 곡선은 각각의

인산칼슘 염의 용해도를 pH 변화에 따라 나타낸 곡선으로, 이 곡선 위쪽은 광물이 침착 되는 방향으로 진행되며, 곡선 아래는 광물이 소실되는 방향으로 진행된다는 것을 의미한다.

따라서 법랑질을 재광화 시킬 수 있는 환경을 만들어 주는 것이 중요한데, 이런 광화작용을 조절하는 요소로 1)칼슘, 인산, 불소 등 유체의 이온조성, 2)단백질, 유기산 등의 유기질 성분(Matsumoto et al., 2006) 외에 포화도, 시간, pH 등 여러 가지가 존재하는 것으로 알려졌으며 이에 대한 많은 연구들이 있었다.

이 중 불소는 fluoroapatite의 형성으로 유기산에 대한 용해 저항성이 증가하는 것으로 여겨지고 있으며, Ten Cate(Ten Cate and Arends, 2009) 등은 치아시편을 이용한 실험에서 1 ppm의 불소가 있을 때가 불소가 포함되지 않았을 때보다 2배의 재광화가 일어났다고 보고하였고, 한(Han et al., 1996) 등은 불소 농도가 1 ppm이나 4 ppm일 때보다 2 ppm일 때 재광화에 가장 유리하다고 하였다. 하지만 Amjad와 Nancollas(Amjad and Nancollas, 2009) 등과 이(Lee and Aoba, 1995), 신(Shin et al., 2012) 등은 6 ppm 이하의 농도에서는 불소의 농도가 증가할수록 결정 성장량이 많아진다고 보고하고 있어 재광화에 가장 효과적인 불소 농도에 대해서는 아직 논란이 지속되고 있다.

또한 재광화에 있어 pH의 영향도 중요한 요소인데, Feagin(Feagin et al., 1971) 등은 재광화와 완충 용액의 pH 증가 사이에 비례적 상관관계가 있다고 보고하였고, Featherstone(Featherstone et al., 1981) 등은 재광화에 적당한 pH를 6-8이라고 보고하였다. 김(Kim et al., 1997) 등은 pH 4.0보다 pH 5.5에서 재광화 양상이 더 좋았다고 발표하였고, 권(Kwon et al., 2008) 등은 pH 6.0보다 pH 4.3의 환경에서 심부까지 재광화가 잘 일어남을 보고하였으며 Yamazaki(Yamazaki and Margolis,

2008) 등의 실험에서는 pH 7.0 보다 pH 4.8의 환경에서 심부까지 재광화가 일어나는 것이 관찰되었다. 또한 신(Shin et al., 2012) 등은 결정성장을 정량적으로 측정한 실험에서 pH 7.0 보다 pH 4.3에서 유의하게 많은 결정 성장이 일어났음을 보고하였다. 이처럼 다수의 실험이 진행되어 왔지만, 현재 확실한 의견의 일치는 보이지 못하고 있는 상태이다.

한편 광화 기전을 연구하는 여러 방법 중 “Seeded crystal growth” 실험 모형은 수산화인회석(hydroxyapatite, HA) 결정 성장에 영향을 미칠 수 있는 인자를 파악하는데 적절하다고 알려져 있는 방법이며, Mura-Galleli(Mura-Galleli et al., 1992)는 반응주(reaction column), 연동 펌프(peristaltic pump)를 이용한 간단한 실험모형을 소개하였는데 이(Lee and Aoba, 1995), 권(Kwun et al., 1999), 신(Shin et al., 2012) 등에 의해 결정 성장 반응 과정을 평가할 경우 유용함이 입증되었다. 또한 이(Lee and Aoba, 1995), 오(Oh, 1998), 권(Kwun et al., 1999) 등은 seed로 사용되는 재료가 인간의 법랑질인지 합성 수산화인회석인지에 관계 없이 사용된 재료의 표면적에만 영향을 받음을 밝혔고, 이를 통해 볼 때, 치아 시편을 대신하여 합성 수산화인회석을 이용하는 실험은 재광화 역학을 이해하는데 유용할 것으로 판단된다.

신(Shin et al., 2012) 등은 불소와 pH 등이 법랑질의 결정성장에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 seeded crystal growth model을 이용하여 합성 수산화인회석의 결정 성장을 정량적으로 분석한 연구를 하였는데, 실험 결과에 따르면 pH 4.3의 실험 용액에서 pH 7.0인 실험 용액보다 더 많은 결정이 성장 되는 것이 관찰되었다.

한편 Moreno(Moreno and Zahradnik, 1974)와 Margolis (Margolis et al., 1985) 등은 법랑질의 탈회와 재광화 역학에 있어서 포화도가 중요한 요소가 된다고 하였으며, 이(Yi et al., 2009), 박(Park et al., 2010) 등이 실험을 통해 포화도가 높아짐에 따라 건전표층의 폭이 증가한다고 밝힌 바 있다.

따라서 본 연구의 목적은 5.0 의 포화도를 가지도록 설계된 pH 4.3 과 pH 7.0, 두 종류의 과포화 용액에서 불소 농도의 변화가 seeded hydroxyapatite 의 성장에 미치는 영향을 정량적으로 분석하는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. Seed 재료의 준비

수산화인회석 현탁액 (Sigma-Aldrich Co., St Louis., MO, U.S.A., 분자량 502.31)에 3차 증류수를 넣고 원심분리기(Micro 12, Hanil, Gangneung, Korea)를 이용하여 3회 반복 세척한 것을 사용한다. 그 후 이를 24시간 동안 동결건조기(freeze dryer, Ilshin lab co., Seoul, Korea)에 동결 건조 시킨 후 이 분말을 seed material로 이용하였다.

2. 실험 용액의 조제

가. Stock 용액의 조제

- (1) 30% 유산(Lactic acid) 수용액(Sigma-Aldrich Co., 분자량 90.08)으로 부터 1M의 용액을 조제하여 이를 stock 용액으로 사용하였다.
- (2) 염화칼슘 2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 분말(Sigma-Aldrich Co., 분자량 147.01)로부터 1M 용액의 용액을 제조하여 실험군 중 1~4군 제조에 사용하였고, 0.1M 용액을 조제하여 이를 실험군 중 5~8군의 stock 용액으로 사용하였다.
- (3) 인산칼륨(KH_2PO_4) 분말(Sigma-Aldrich Co., 분자량 136.09)로 부터 1M 용액의 용액을 제조하여 실험군 중 1~4군 제조에 사용하였고, 0.1M 용액을 조제하여 이를 실험군 중 5~8군의 stock 용액으로 사용하였다.

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

유산 stock 용액을 적정하기 위하여 8N 수산화칼륨(KOH) 표준용액(Sigma-Aldrich Co.) 과 페놀프탈레인 지시약(Sigma-Aldrich Co.)을 사용하였다. 염화칼슘 및 인산칼슘 stock 용액은 ion chromatography(790 Personal IC, Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용하여 적정하였다. 불화나트륨 용액은 fluoride combination electrode(model. 9609, Thermo scientific, Waltham, MA, U.S.A.)를 이용하여 확인하였다.

나. 실험 용액의 조제

인산칼슘 과포화 용액을 제조하기 위해 각 stock 용액으로부터 필요한 양을 취해 제조 하였다. 각 실험 용액에는 방부제로써 3.08mM의 아지드화 나트륨(NaN_3) 분말(Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하였다.

변수인 pH는 pH meter(Model 920A, Orion Research Inc., Beverly, MA, U.S.A.) 계측 하에 수산화칼륨 용액을 첨가하여 1~4군은 pH 4.3, 5~8군은 pH 7.0 에 맞도록 제작하였다.

또 다른 변수인 불소 농도는 각 pH 값마다 0, 1, 2, 4 ppm 으로 변화를 주어 총 8군의 실험 용액을 조제하였다. 모든 군의 실험 용액의 포화도 (degree of saturation, DS)는 5.0으로 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

group	pH	Concentration			
		Ca (mM)	P (mM)	F (ppm)	Lactic acid (mM)
1	4.3	52.7	20.1	0	10
2		52.7	20.4	1	10
3		52.1	20.0	2	10
4		51.2	20.0	4	10
5	7.0	3.0	1.0	0	10
6		3.0	1.0	1	10
7		3.0	1.0	2	10
8		3.0	1.0	4	10

Degree of saturation of all experimental solutions were adjusted as 5.0

3. Seeded crystal growth 실험 모형

가. 결정 성장 반응 후 실험 용액의 이온 농도의 변화

실험 모형은 Mura-Galelli가 개발한 것과 동일하며(Mura-Galelli, 1992), Fig. 1에 도식화 하였다. (도식은 신(Shin et al., 2012)의 논문에서 인용하였다.) Vessel에는 제조된 실험용액을 담고, 이를 연동 펌프(peristaltic pump, Masterflex[®] 7524, Cole-Parmer, IL, U.S.A.)를 이용하여 일정한 유속(평균 2.5 ± 0.3 ml/hr)으로 흐르게 하였다. 이 용액은 수산화인회석 seed가 담긴 반응주(reaction column)를 통과하게 되고, 반응을 마친 실험용액은 vessel B에 포집 되게 된다. 각 구성요소는 Tygon tube(R-3603, Saint-Gobain, OH, U.S.A)를 이용하여 연결하였으며, 이음새 부분에는 테프론 테이프와 파라핀 필름으로 감싸 중간에 실험용액이 새지 않도록 구성하였다.

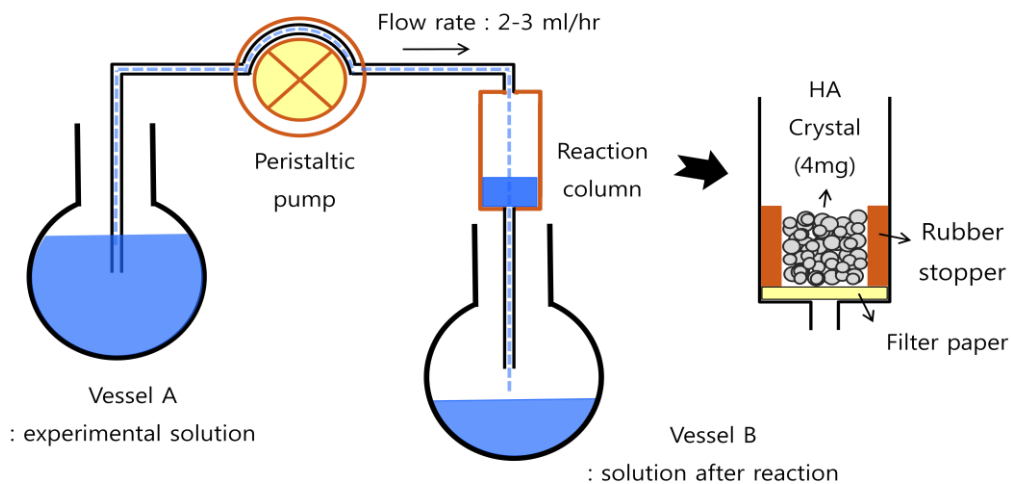


Fig. 1. Schematic illustration of experimental set-up.

HA: hydroxyapatite

반응주는 1 cc 일회용 주사기의 실린더를 절단하여 사용하였으며 반응 중에는 실린더 헤드가 바닥에 수직하게 아래로 향하도록 고정하였다.

각 실험군은 대기압 하의 실온에서 48시간 지속하였으며, 각 실험의 유속은 2.5 ± 0.3 ml/hr 의 값을 갖도록 설계하였고, 이를 각 실험군마다 10차례 반복하여 시행하였다.

이를 통해 얻어진 반응 전과 후의 용액들의 칼슘, 인산과 불소 이온 농도를 측정하였고, 그 결과로 반응 전후의 이온 값의 변화를 통하여 결정성장에 이용된 이온의 양을 정량적으로 확인하였다.

나. 결정 성장 반응 후 seed의 질량 증가량

반응주 내부에서 실험용액이 반응을 하기 전과 후의 질량을 측정함으로써 실제 반응으로 생긴 결정의 양을 측정하였다. 우선 반응주는 1 cc 일회용 주사기의 실린더를 절단하여 사용하였고, 그 내부에는 거름종이(Advantec, Toyo, Tokyo, Japan)를 위치시켰으며, 이를 고정하기 위해 크기가 맞는 고무링을 제작해 사용하였다. 그 후 seed 로 준비된 동결건조 된 수산화인회석 분말을 미량 저울(microbalance, MC-5, Sartorius, Germany)을 이용해 반응주 내부에 4mg 의 질량의 수산화인회석을 거름종이 위에 올려놓았다.

반응이 끝난 후에는 반응주를 다시 24시간 동안 동결 건조하고, 그 질량을 측정함으로써 실제 결정성장이 일어난 질량을 정량적으로 측정하였다. (Fig. 2 참조)

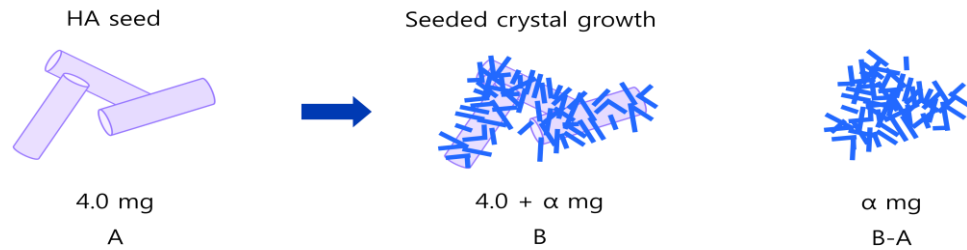


Fig. 2. Schematic illustrations of calculating the amounts of crystal growth

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

(This illustration is cited from Shin(Shin et al., 2012).)

4. 통계 분석

실험을 통해 측정된 결과 자료를 SPSS Statistics 18.0 (PASW Statistics, Hongkong, China) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각 군간의 차이를 검정하기 위해 이원 변량 분석 (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. 결정 성장 반응 후 실험 용액의 이온 농도의 변화

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

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

group	pH	F (ppm)	Changes in experimental solution, (inlet-outlet)		
			Δ Ca (mM)	Δ P (mM)	Δ F (ppm)
1	4.3	0	0.06 $\pm$.00	0.05 $\pm$.00	NM
2		1	0.40 $\pm$.00	0.13 $\pm$.01	0.16 $\pm$.01
3		2	0.90 $\pm$.02	0.17 $\pm$.01	1.15 $\pm$.11
4		4	1.00 $\pm$.04	0.34 $\pm$.02	2.51 $\pm$.18
5	7.0	0	0.04 $\pm$.00	0.02 $\pm$.00	NM
6		1	0.05 $\pm$.01	0.03 $\pm$.00	0.15 $\pm$.01
7		2	0.08 $\pm$.01	0.04 $\pm$.00	0.15 $\pm$.01
8		4	0.11 $\pm$.02	0.05 $\pm$.01	0.15 $\pm$.01

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

가. 결정 성장 반응 후 칼슘 이온 농도의 변화

Two-way ANOVA 를 이용하여 칼슘 이온 농도의 감소량을 분석한 결과 실험군에서 pH 와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA 를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

결정 침전 반응 후, pH 가 4.3 인 실험 용액에서 1 군을 제외한 모든 군에서 pH 가 7.0 인 실험 용액보다 모든 불소 농도에서 유의하게 더 많은 칼슘 이온 농도의 감소량을 보였다 ($p<0.05$). 또한 각 군 내에서도, 불소 농도가 증가함에 따라, 칼슘 이온 농도 감소량도 증가하는 결과를 보였다.

한편 pH 가 7.0 으로 조절된 실험용액에서는, 불소의 농도가 0 ppm, 1 ppm 인 5 군과 6 군에서는 불소의 농도차에 따른 감소량에 유의차가 없었다. 다만 2 ppm, 4 ppm 으로 농도가 증가할수록 유의차 있게 칼슘 이온 농도의 감소량이 증가하였다 ($p<0.05$).

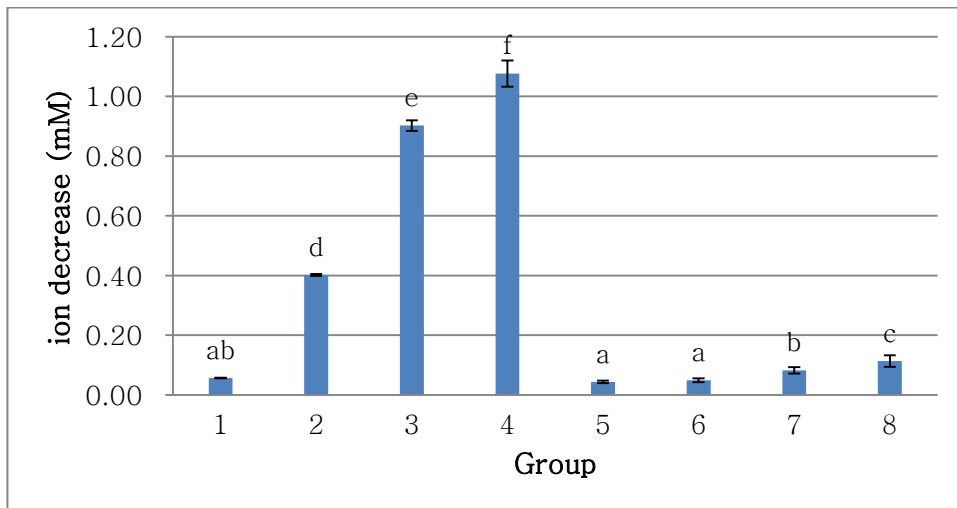


Fig. 3. Calcium ion consumption after crystal growth

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

나. 결정 성장 반응 후 인산 이온 농도의 변화

Two-way ANOVA 를 이용하여 인산 이온 농도의 감소량을 분석한 결과 실험군에서 pH 와 불소 농도 사이에 교호작용이 있었다 ($p<0.001$). 이에 one-way ANOVA 를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

결정 침전 반응 후, pH 가 4.3 인 실험 용액에서 1 군과 pH 7.0 에서 8 군 사이에는 인산 농도 감소량에 있어 유의차가 없었다. 이를 제외한 다른 모든 군에서는 pH 가 4.3 인 실험용액이 pH 가 7.0 인 실험 용액보다 모든 불소 농도에서 유의하게 많은 인산 이온 농도의 감소량을 보였다($p<0.05$). 또한 pH 가 4.3 인 실험용액에서, 불소 이온 농도가 증가함에 따라, 인산 이온 농도 감소량도 증가하는 결과를 보였다.

한편 pH 가 7.0 으로 조절된 실험용액에서는, 불소의 농도가 0 ppm, 1 ppm 인 5 군과 6 군에서는 불소의 농도차에 따른 감소량에 유의차가 없었다. 다만 2 ppm, 4 ppm 으로 농도가 증가할수록 유의차 있게 인산 이온 농도의 감소량이 증가하였다. ($p<0.05$)

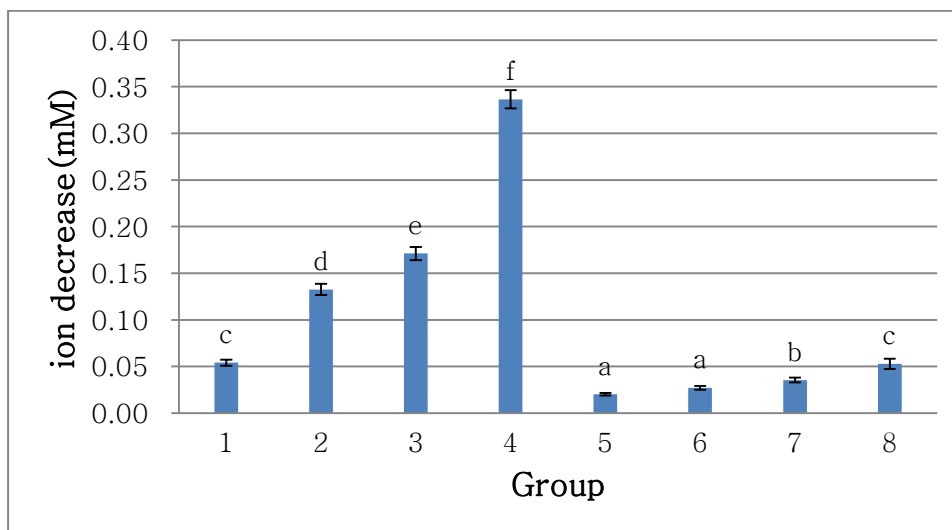


Fig. 4. Phosphate ion consumption after crystal growth

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

다. 결정 성장 반응 후 불소 이온 농도의 변화

Two-way ANOVA 를 이용하여 불소 이온 농도의 감소량을 분석한 결과 실험군에서 pH 와 불소 농도 두 변수 사이에 교호작용이 있었다 ($p < 0.001$). 이에 one-way ANOVA 를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

불소가 포함되지 않은 1 군과 5 군을 제외한 다른 6 개의 실험군의 불소 이온 농도의 감소량을 비교하였다. pH 4.3 인 실험용액에서 1 ppm 이 첨가된 2 군을 제외한 다른 군에서 첨가된 불소의 농도에 관계없이 유의하게 더 많은 불소 이온 농도의 감소량을 보였다($p < 0.05$).

한편 pH 가 7.0 인 실험 용액에서는 불소 농도 차이에 따른 불소이온의 감소량에 유의한 차이가 없었다.

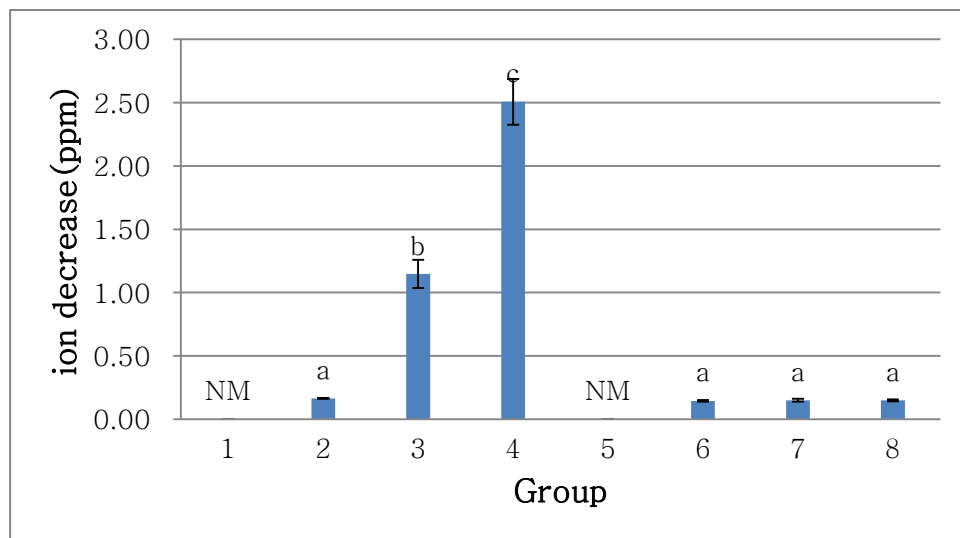


Fig. 5. Fluoride ion consumption after crystal growth

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

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

2. 결정 성장 반응 후 seed의 질량 증가량

결정 침전 반응 후, 반응주 내 표본의 결정 성장량을 측정하기 위해 반응주를 24시간 동안 동결 건조시킨 후 미량 저울을 이용하여 다시 질량을 측정하였다. 이 값에서 실험 전의 seed가 포함된 반응주의 질량을 빼서 seed의 질량 증가량을 측정하였다. 증가량을 분석한 결과를 Table 3 및 Fig. 6에 첨부하였다.

Two-way ANOVA 를 이용하여 질량 증가량을 분석한 결과 실험군에서 pH 와 불소 농도 사이에 교호작용이 있었다 ($p < 0.001$). 이에 one-way ANOVA 를 이용하여 각 군 간의 차이를 비교하였다.

각각의 실험용액을 통해 결정 침전 반응 시행 후 seed 의 질량 증가량은 pH 가 4.3 인 실험용액 중 불소가 포함되지 않은 1 군과 pH 가 7.0 인 군에서 불소의 농도가 2 ppm, 4 ppm 인 군은 유의차가 없었으나, 그외의 모든 군에서 pH 4.3 인 용액에서 질량 증가량은 pH 가 7.0 인 군들 보다 유의하게 많았다($p < 0.05$).

pH가 4.3인 실험용액에서는 불소 농도가 증가함에 따라 seed의 질량이 유의차 있게 증가하였고, pH 가 7.0인 실험용액에서는 5군과 6군, 6군과 7군, 7군과 8군 사이에는 불소농도에 따른 질량 증가의 유의차가 없으나, 5군과 7,8군, 6군과 8군 사이에는 불소 농도에 따른 유의차있는 질량 증가를 보였다.

Table 3. Weight increment of the seeded hydroxyapatite(HA) after crystal growth (Mean $\pm$ S.D.) (n=10)

group	pH	F (ppm)	Amounts of solid(mg)			Increase rate (%)
			Before	After	Δ weight	
1	4.3	0	4.00	4.39	0.39 $\pm$.01	9.75
2		1	4.00	4.60	1.60 $\pm$.13	40.00
3		2	4.00	7.59	3.59 $\pm$.10	89.75
4		4	4.00	9.35	5.35 $\pm$.24	133.75
5	7.0	0	4.00	4.15	0.15 $\pm$.02	3.75
6		1	4.00	4.24	0.24 $\pm$.01	6.00
7		2	4.00	4.37	0.37 $\pm$.02	9.25
8		4	4.00	4.45	0.45 $\pm$.01	11.25

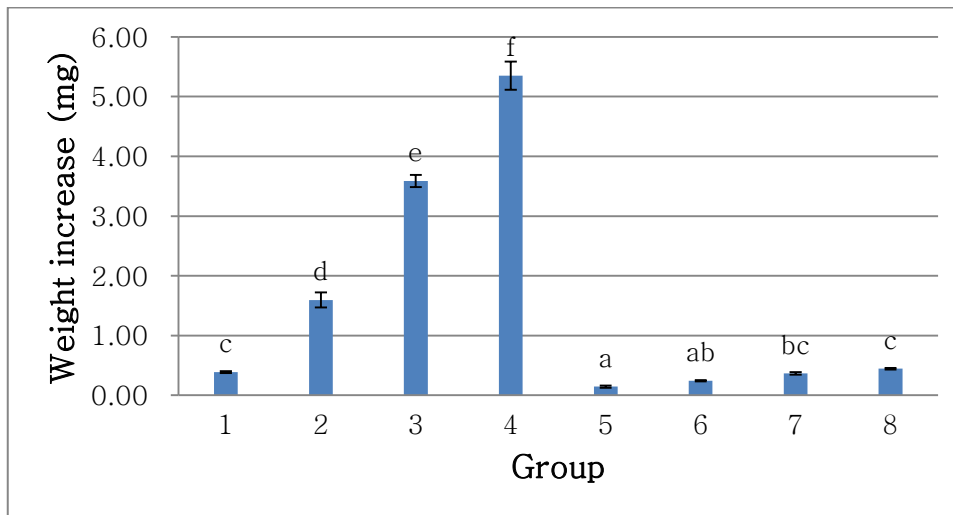


Fig. 6. Weight increment of the HA seed after crystal growth
Different letters denote statistically different ($p < 0.05$).

IV. 고찰

재광화 연구에 사용되는 실험 평가 방법으로 X-ray diffraction study (Aoba et al., 1978), 전자현미경 (Haikel et al., 1983), 시편의 미세경도 측정 방법 (Featherstone et al., 1983), 미세 용해도 검사, Microradiology (Groeneveld et al., 1974), 편광현미경을 이용한 관찰 (Silverstone, 1968), electron probe micro-analysis (Groeneveld et al., 1974), 그리고 seeded crystal growth 실험 모형 (Mura-Galelli et al., 1992)을 이용한 이온의 정량적 분석 방법 등이 있고 많은 실험들을 통해 그 효용성이 증명되었다.

본 연구에서 사용된 seeded crystal growth 모형은 일정한 농도의 유액을 일정한 속도로 seed material 에 흐르게 함으로써, 법랑질 결정을 둘러싸는 유체의 생리적 환경과 유사하도록 하여 이를 통한 재광화의 양상을 관찰할 수 있게 한다 (Mura-Galelli et al., 1992). 이 실험 모형이 비록 치아 법랑질의 구조를 재현하지 못한다는 점에 있어, 치아 절편을 이용한 재광화 연구와는 차이가 있으나, 오 (Oh, 1998) 등은 seed로 사용되는 재료가 치아의 법랑질인지 합성 수산화인회석인지에 관계 없이 결과가 일정함을 보였고, 이를 통해 신 (Shin et al., 2012) 등은 이 실험 모형을 이용하여 연구를 진행함으로써 이 방법의 유용함을 증명 하였다. 따라서 본 연구에서는 기존의 유용함이 확인된 seeded crystal growth 실험 모형을 이용하여 합성 수산화인회석을 seed로 사용하여 결정 성장이 일어나는 양상을 정량적으로 평가하였다.

Margolis 등 (Margolis et al., 1985)은 법랑질 탈회율 및 재광화율이 포화도에 의하여 조절된다고 하였으며, 이러한 포화도는 산의 농도, 초기 pH, 칼슘과 인의

농도 등에 의해 영향을 받는다고 하였다. Moreno (Moreno and Zahradnik, 1974) 등도 치아의 우식이 일어날 때 포화도가 중요한 영향을 미친다고 하였는데, 치아가 저포화상태의 용액 하에 존재할 때 탈회가 일어나며, 이 때 빠져나간 용액의 칼슘, 인 이온이 dicalcium phosphate dehydrate(DCPD)의 형태로 법랑질 표면에 성장이 일어나 표면하층을 형성한다고 하였다. 또한 박(Park JW, 2000) 등에 의하면 법랑질에서 용액의 포화도가 증가할수록 재광화의 양이 증가하는 경향을 보였다고 하였다. 이처럼 법랑질에 접촉하는 용액의 포화도가 다를 경우, 그에 따라 재광화의 정도도 달라지게 된다.

반면 신 등(Shin et al., 2012) 은 합성 수산화인회석을 이용하여 seeded crystal growth 실험 모형을 통해 연구를 진행하였는데, 이 때 사용된 실험 용액의 pH는 달랐으나 포화도는 같게 유지되었다. 그리고 그 포화도는 기존에 송(Song, 2011)등이 치아 절편을 이용한 재광화 연구에서 유효성이 증명된 용액 조성을 그대로 이용하였는데, 그 결과 같은 포화도를 가진 용액에서, pH 4.3인 군에서 pH 7.0인 군보다 결정 성장량 및 이온 소모량이 많은 것을 관찰하였다. 따라서 본 연구에서는 보다 효율적인 재광화 용액의 조성을 파악하기 위해, 신 등(Shin et al., 2012) 의 연구와 같은 두 개의 변수(pH, 불소의 농도)를 사용하되, 포화도를 더 높게 형성하여 진행되었다.

본 연구에서는 재광화의 양상을 정량적으로 분석하기 위하여, 실험 용액이 반응주를 통과하기 전과 후의 각 이온 농도를 측정하여 그 감소량을 계산하였다. 이를 통해 결정 성장에 참여한 각 이온의 양을 간접적으로 평가할 수 있었다. 그리고 반응주 안에 놓았던 합성 수산화인회석의 전과 후의 질량을 제어, 반응으로 인해 실제 늘어난 결정 성장량을 평가하였다.

이온 소모량을 통해 분석한 결과, pH 4.3 과 pH 7.0 사이에는 확연한 차이를 보였는데, pH 4.3인 군에서 pH 7.0인 군보다 월등히 많은 양의 이온 농도 감소량을 확인 할 수 있었다. pH 4.3인 군에서는 불소의 농도가 0 ppm 에서 4 ppm 으로 증가함에 따라, 칼슘과 인 이온 농도의 감소량도 함께 유의차 있게 증가하는 양상을 보였다. pH 7.0인 군에서는 불소의 농도가 0 ppm 일때와 1 ppm 일 때에는 유의차가 없었으나, 2 ppm 에서 4 ppm 으로 증가할 때, 칼슘과 인 이온의 감소량이 증가함을 알 수 있었다. 이는 본 연구의 선행연구인 신 등(Shin et al., 2012)의 결과와 유사한 경향을 보이는 것이다. 반면, 본 연구에서는 이온 소모량의 값 자체는 선행연구보다 대체로 더 낮게 측정되었는데, 이는 박 등(Park JW, 2000)이 보고한 내용으로 설명할 수 있다. 이 연구에서는 법랑질에서 용액의 포화도가 증가할수록 재광화의 양이 증가하는 경향을 보였고, 포화도가 높을 경우 무기질의 성장이 표층에 국한되는 경향을 보였다고 설명하였다. 또한 Aoba 등(Aoba et al., 1978) 은 높은 포화도로 인하여 재광화 과정에서 표층에 성장된 결정의 크기가 커지고 결정 사이의 확산통로가 축소되어 내부로의 무기질 침투가 차단되어 높은 포화도에서 표면의 재광화가 많이 일어남을 보고하였다. 이를 통해 볼 때 동결건조 된 합성 수산화인회석을 이용한 본 연구에서는, 포화도가 높은 실험 용액이 발치된 치아와는 다르게 합성 수산화인회석과 넓은 면적으로 접촉하면서, 보다 적은 양의 이온으로도 결정 성장 반응을 일으킬 수 있었던 것으로 추측된다.

불소 이온 농도의 감소량은 pH 4.3인 군에서는 불소 농도가 증가함에 따라 유의차 있게 증가하는 것으로 관찰되었다. 하지만 pH 7.0인 군에서는 실험용액에 첨가된 불소의 농도가 증가에 관계없이 감소되는 불소 이온의 양은 증가하지 않는 결과를 보였다. Nelson 등(Nelson et al., 1983)에 의하면 산성도가 높을 경우 CaF_2 나 phosphate containing CaF_2 유사물질을 더 많이 형성하고 이들이 불소 이온의

reservoir로 작용해 불소가 반응에 더 참여할 수 있도록 한다고 하였다. 본 연구에서도 이와 같은 원인으로 pH 4.3인 군에서 더 많은 불소 이온 농도의 감소를 보인 것으로 볼 수 있다.

반응 후의 반응주 내 합성 수산화인회석 질량 증가의 추세는, 이온 농도의 감소량의 경향과 거의 유사한 결과를 보였다. pH 4.3인 군에서 pH 7.0인 군보다 질량이 전반적으로 많이 증가하였는데, 각 군에 대해 각각 살펴보면, pH 4.3인 군에서는 불소 이온의 농도가 증가함에 따라, 질량의 증가량도 가파르게 증가하는 반면에, pH 7.0인 군에서는 불소 이온의 농도가 증가함에 따라 질량이 증가하는 양상은 보이나, 그 증가량 자체는 pH 4.3인 군과 비교하였을 때 상당히 작은 것을 확인할 수 있다. 더군다나 그 증가량은 pH 4.3인 군들에서는 선행연구인 신 등(Shin et al., 2012)이 발표한 결정의 질량 증가량보다 유사한 결과를 보인 것에 비해, pH 7.0인 군들에서는 오히려 작은 것을 발견할 수 있다. 이는 신 등(Shin et al., 2012)의 선행연구와 다르게, 본 연구에서는 pH 7.0인 군에 10 mM의 유산이 포함되었기 때문이라고 추측해 볼 수 있는데, Gray 등(Gray and Francis, 1963)에 따르면 초기 우식의 진행에 영향을 미치는 요소로 산의 농도와 pH, 산의 해리 상수 등을 꼽았으며, Featherstone 등(Featherstone et al., 1978, 1979; Featherstone et al., 1981)에 의하면 이온화되지 않은 산의 농도가 가장 중요한 요소라고 언급하였다. 비록 Henderson-Hasselbalch의 공식에 의하여 비이온화된 유산의 농도가 높지 않더라도, 이 유산이 반응에 작용하여 결정 성장을 저해하는 결과를 가져온 것으로 해석되며, 이로 인해 pH 7.0에서 결정 성장이 더 작은 결과를 보이는 것으로 생각된다.

본 연구의 이온 소모량과 결정의 질량 증가량을 선행연구와 종합적으로 비교해 보았을 때, pH 4.3인 군에서는 비슷한 결정의 질량 증가량을 보였으나 이온 농도의

감소량은 상대적으로 작게 나타났다. 이는, 실험 시 평균 유속이 미세하게나마 차이가 남으로써, 상대적으로 동일한 양의 실험 용액이 합성 수산화인회석과 접촉하는 시간의 측면에 있어 차이가 났었을 변수가 존재하기는 하지만, 높은 포화도에서 결정 성장을 증가시킬 수 있는 driving force 가 강하게 작용했었을 것이라고 생각된다. 반면, pH 7.0 인 군에서는 결정의 질량 증가량과 이온 농도의 감소량이 더 낮은 것이 관찰되었는데, 이는 위에서 언급했듯이, 포화도가 높아진 반면, 유산이 첨가됨으로써 나타날 수 있는 결과로 해석된다.

본 연구의 한계점은 실제로 결정이 생성되는데 불소가 어떠한 영향을 미치는지 구조적으로 확인할 수 없다는 것이다. 이는 crystal growth model 을 이용한 실험의 한계로 여겨진다. 또한 본 실험에서 사용된 불소의 농도는, 실제 임상에서 사용되는 불소의 농도에 비해 매우 낮은 값이다. 따라서, 본 실험에서 소모된 불소 이온이 어떠한 방식으로 결정 성장에 영향을 미쳤는지, 정확히 알 수 없는 단점이 있다. 따라서 이후의 실험에서는 FTIR 등의 실험방법을 통하여, 보다 확실하게 생성된 결정의 성분 및 구조를 분석할 수 있는 평가 방법들이 병행되어야 할 것으로 보인다. 또한 pH와 불소 이온의 농도변화에 따른 침전 역학의 차이를 더 확실히 하기 위해서는 포화도를 다르게 설정하고, 유산의 농도와 불소의 농도를 변화시킨 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 포화도가 5.0으로 동일하게 설계된 pH 4.3 과 pH 7.0 의 과포화 용액에서 불소의 농도를 0, 1, 2, 4 ppm 으로 달리하여 실험 용액을 제조한 후 합성 수산화인회석을 seed 로 한 seeded crystal growth 실험 모형을 진행하였을 때, 어떠한 영향이 있는지를 알아보는 것이다. 이에 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pH 4.3의 실험 용액을 통한 수산화인회석 결정 성장 반응에서 pH 7.0의 실험 용액의 경우보다 더 많은 양의 결정을 보였다.
2. pH 4.3 의 실험 용액을 통한 결정 성장 반응에서, 실험 용액의 불소 이온 농도가 증가함에 따라, 수산화인회석 결정량이 유의차있게 증가하였다.
3. pH 7.0 의 경우 불소 농도가 증가함에 따라 수산화인회석 결정량이 증가하기는 하나, pH 4.3 실험용액에 비해 작았다.

결론적으로 pH 7.0보다 pH 4.3에서 수산화인회석 결정 성장이 촉진되었으며, pH 4.3에서 불소 이온의 농도에 따라 더 큰 영향을 받았다.

참고문헌

- Amjad Z, Nancollas G. 2009. "Effect of fluoride on the growth of hydroxyapatite and human dental enamel." *Caries Research*. 13(5):250-258.
- Anderson BG. 1938. "Clinical study of arresting dental caries." *Journal of Dental Research*. 17(6):443-452.
- Aoba T, Okazaki M, Takahashi J, Moriwaki Y. 1978. "X-ray diffraction study on remineralization using synthetic hydroxyapatite pellets." *Caries Res*. 12(4):223-230.
- Dirks OB. 1966. "Posteruptive changes in dental enamel." *Journal of Dental Research*. 45(3):503-511.
- Feagin F, Patel P, 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." *Archives of oral biology*. 16(5):535-548.
- Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. 1978. "Surface layer phenomena in in-vitro early caries-like lesions of human tooth enamel." *Arch Oral Biol*. 23(5):397-404.
- Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. 1979. "A mechanism for dental caries based on chemical processes and diffusion phenomena during in-vitro caries simulation on human tooth enamel." *Arch Oral Biol*. 24(2):101-112.
- Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. 1983. "Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles." *Caries Res*. 17(5):385-391.
- Featherstone JDB, Rodgers BE, Smith MW. 1981. "Physicochemical Requirements for Rapid Remineralization of Early Carious Lesions." *Caries Research*. 15(3):221-235.
- Gray JA, Francis MD. 1963. "Physical chemistry of enamel dissolution." *Sognnaes, Mechanisms*.
- Groeneveld A, Jongebloed W, Arends J. 1974. "The mineral content of decalcified surface enamel. A combined microprobe- quantitative microradiography study." *Caries Res*. 8(3):267-274.

- Haikel Y, Frank RM, Voegel JC. 1983. "Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions." *Caries Res.* 17(1):1-13.
- Han W, Kum K, Lee C. 1996. "The influence of fluoride on remineralization of artificial dental caries." *J Korean Acad Conserv Dent.* 21:161-173.
- Head J. 1912. "A study of saliva and its action on tooth enamel in reference to its hardening and softening." *Journal of the American Medical Association.* 59(24):2118-2122.
- Kim M, Kum K, Lee C. 1997. "The influence of pH on remineralization of artificial dental caries." *J Korean Acad Conserv Dent.* 22:193-208.
- Kwon J, Suh D, Song Y, Lee Y, Lee C. 2008. "The effect of lactic acid concentration and pH of lactic acid buffer solutions on enamel remineralization." *J Korean Acad Conserv Dent.* 33:507-517.
- Kwon J, Kim K, Lee S, Jung I, Lee C. 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.
- Lee C, Aoba T. 1995. "Seeded crystal growth onto enamel mineral and synthetic hydroxyapatite in dilute supersaturated solutions containing low concentration of fluoride." *J Korean Acad Conserv Dent.* 20:818-826.
- Margolis HC, Murphy BJ, Moreno EC. 1985. "Development of carious-like lesions in partially saturated lactate buffers." *Caries Res.* 19(1):36-45.
- Matsumoto T, OKAZAKI M, INOUE M, SASAKI J-I, HAMADA Y, TAKAHASHI J. 2006. "Role of acidic amino acid for regulating hydroxyapatite crystal growth." *Dental materials journal.* 25(2):360-364.
- Moreno EC, Zahradnik RT. 1974. "Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro." *J Dent Res.* 53(2):226-235.
- Mura-Galelli M, Narusawa H, Shimada T, Iijima M. 1992. "Effects of fluoride on precipitation and hydrolysis of octacalcium phosphate in an experimental model simulating enamel mineralization during amelogenesis." *Cells and Materials.* 2:221-221.
- Mura-Galelli MJ, 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.
- Nelson DG, Featherstone JD, Duncan JF, Cutress TW. 1983. "Effect of carbonate and fluoride on the dissolution behaviour of synthetic apatites." *Caries Res*. 17(3):200-211.
- Oh SY, Jung IY, Kum K. Y., Lee C. Y. 1998. The effects of fluoride concentration and seed material on seeded crystal growth., *J Korean Acad Conserv Dent*.
- 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." *Journal of Korean Academy of Conservative Dentistry*. 35(2):96-105.
- Park JW HB, Lee CY. 2000. The effects of the degree of saturation of acidulated buffer solutions in enamel and dentin remineralization and afm observation of hydroxyapatite crystals., *J Korean Acad Conserv Dent*
- Shin H, Park S-H, Park J-W, Lee C-Y. 2012. "Effect of fluoride concentration in pH 4.3 and pH 7.0 supersaturated solutions on the crystal growth of hydroxyapatite." *Restorative Dentistry & Endodontics*. 37(1):16-23.
- Silverstone LM. 1968. "The surface zone in caries and in caries-like lesions produced in vitro." *Br Dent J*. 125(4):145-157.
- Song SC. 2011. Effect of fluoride on remineralization of artificial enamel caries in pH 4.3 and pH 7.0 remineralizing solution =. Graduate School, Yonsei University, Seoul .:
- Ten Cate J, Arends J. 2009. "Remineralization of artificial enamel lesions in vitro." *Caries Research*. 12(4):213-222.
- Yamazaki H, Margolis H. 2008. "Enhanced enamel remineralization under acidic conditions in vitro." *Journal of dental research*. 87(6):569-574.
- Yi J, Roh B, Shin S, Lee Y, Kong H, Lee C. 2009. "The dynamic change of artificially demineralized enamel by degree of saturation of remineralization solution at pH 4.3." *J Korean Acad Conserv Dent*. 34:20-29.

Abstract

Effect of Fluoride Concentration on the crystal growth of hydroxyapatite in pH 4.3 and pH 7.0 Supersaturated Solutions

Sungjoo Moon

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) and the all of solutions were set to have same degree of saturation (5.0). Each solution was introduced into the reactive column containing seeded HA by the use of a peristaltic pump. Calcium phosphate precipitate yield crystal growth onto the seeded HA 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. As results, there were significantly more concentration decrease of calcium, phosphate and fluoride ions in pH 4.3 and weight increment of seeded HA ($p < 0.05$). As fluoride concentration increased in pH 7.0 experimental solutions, consumption of calcium and phosphate ion, and weight increment were significantly increased ($p < 0.05$, except some groups.), but consumption of fluoride ion did not ($p > 0.05$). Comparing the amount of ion consumption and weight increase to pH 4.3 experimental solutions, the amount of increment was much lower.

Conclusion of the study is as follows.

1. During the seeded crystal growth, there were significantly more concentration decrease of calcium, phosphate and fluoride ions in pH 4.3 experimental solutions than 7.0.
2. As fluoride concentration increased in pH 4.3 experimental solution, crystal of seeded HA was increased.
3. As fluoride concentration increased in pH 7.0 experimental solution, crystal of seeded HA were increased. But, comparing the amount of crystal growth to pH 4.3 experimental solutions, the amount was much lower.

In conclusion, in supersaturated solutions with same DS, more ion consumption and seeded crystal growth were observed in pH 4.3 solutions than pH 7.0. Also, fluoride ion had more positive effect on crystal growth in pH 4.3 than pH 7.0.

Key words: seeded crystal growth, hydroxyapatite, fluoride concentration, pH,
Degree of saturation (DS)