

pH, 온도 및 시간이 수산화인회석의 합성에 미치는 영향

부산대학교 치과대학 보존학교실
이희주 · 허 복

Abstract

THE EFFECTS OF pH, TEMPERATURE AND TIME ON THE SYNTHESIS OF HYDROXYAPATITE

Hee-Joo Lee, D.D.S., M.S.D., Bock, Hur, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Pusan National University

The purpose of this study was to determine the effects of pH, temperature and time on the synthesis of hydroxyapatite(HAP) by spontaneous precipitation under relatively physiologic condition. Specimens were obtained from aqueous system with various pH, temperature and experimental time. Chemical composition, crystallographic structure and crystallinity of the synthetic HAP were evaluated by Infrared spectroscopy and powdered X-ray diffraction method.

The following results were obtained.

1. No precipitate was obtained under pH 5.5.
2. All the specimens were concluded as HAP except one that was obtained under the condition of pH 6.5, 25°C and 1 day. It was concluded as dicalcium phosphate dihydrate(DCPD).
3. The crystallinity of HAP was enhanced by increases in pH, temperature and time of the preparation. But, the crystallinity of the synthetic HAP was lower than that of the mineral HAP.
4. Intermediates such as DCPD and octacalcium phosphate were formed on the process of the synthesis of HAP.

제1장 서론

치아의 법랑질은 인체에서 가장 단단한 물질이지만 연조직인 유기질에서 시작되어 잘 짜여진 계획에 의해 여러가지 단계를 거쳐 완성된다. 첫 단계는 형성기로서 내피상피(internal dental epithelium)에서 분화된 세포가 유기질을 분비하며 이 유기질은 곧 석회화 되는데, 이 과정은 법랑질의 전체 두께가 형성될 때까지 진행된다. 두번째는 성숙 단계로 무기질 결정이 성장하고 단백질과 물이 소실되는 단계이다. 세번째 단계에서는 더 많은 무기질이 첨가되면서 다공성(porosity)이 소실된다. 치배가 석회화 되는 과정에는 alkaline phosphatase의 활성도가 높아지는데 이 효소가 칼슘의 축적, 인산의 제공, 경화 억제제의 배제 등에 관여함으로써 석회화를 촉진시킨다^{1, 2)}.

이렇게 형성된 치아 경조직의 무기질은 인산칼슘염의 소결정(calcium phosphate microcrystals)으로 이루어져 있어, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 구조식을 가진 수산화인회석(hydroxyapatite, 이하 HAP)과 유사하고 소주상(rod-like)의 형태를 가지며 단면은 육각형이다^{3, 4)}.

치아 우식의 형성과 재광화에 대한 관심이 높아지면서 치아의 주요 구성 성분인 HAP의 결정 구조 및 우식과 재광화 과정에 나타나는 결정 변화를 추적하여 우식의 형성 및 재광화에 대한 기전을 규명하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

HAP에 관한 연구 방법을 살펴보면 열역학 또는 반응속도 이론에 근거를 둔 물리화화학적 방법^{5, 6)}으로 산성 용액 내에서의 결정의 용해도를 조사하거나 혹은 화학 분석^{7, 8)}에 의해 HAP의 주성분인 Ca, P 및 미량 원소의 함량 변화를 관찰하는 방법이 있다. 그리고 결정의 변화를 추적하는 방법으로는 적외선 분광법^{9, 10~12)}, X-선 회절법^{13~15)}, EPMA(electron mi-

croprobe analysis)¹⁶⁾ 또는 TEM(transmission electron microscopy)¹⁷⁾이 널리 사용되고 있다.

이러한 연구에는 자연 치질을 이용^{18~25)}하기도 하지만 자연치질은 non-stoichiometric HAP로 구성되어 있고 각 치아마다 구성 성분과 결정 구조가 동일하지 않으므로 시료의 표준화를 도모하기 위하여 합성된 HAP를 이용하는 연구^{26~32)}도 상당수 있다. 이렇게 시료를 표준화하는 이유는 동일한 조건으로 합성한 HAP는 성분과 결정 구조가 비교적 동일하므로 표준화된 시료를 이용한 실험으로 우식 및 재광화에 관여하는 여러가지 요소들의 영향을 분석하면 각각의 기전을 파악하는데 도움이 되기 때문이다.

HAP를 합성하는 방법에는 고온에서의 고체상 반응에 의한 비수용성 방법^{9, 10, 33)}과 수용액에서의 자발적인 침전과정에 의한 방법^{12, 34~45)}이 있는데 후자의 경우가 생리적인 반응과 유사하므로 이에 대한 연구가 많다.

그러나 이러한 침전 과정에서 초기에 형성되는 침전물이 최종적인 침전물과는 다른 물질이라는 사실을 고려해 볼 때, HAP는 초기 침전물이 여러 단계에 걸친 일련의 동적인 변화 과정을 거치면서 생성된 최종 산물이라고 할 수 있다. HAP가 생성되는 도중에 중간 산물로서 나타나는 인산 칼슘염으로는 dicalcium phosphate dihydrate(DCPD), octacalcium phosphate(OCP) 그리고 amorphous calcium phosphate (ACP)가 보고되었다^{37, 40)}.

Marshall과 Nancollas⁴⁶⁾는 DCPD가 HAP의 형성을 위한 전구체라고 주장한 반면, Eanes 등⁴⁰⁾은 ACP가 형성된 후에 HAP로의 자발적 변환이 유도된다고 하였다. Brown 등¹²⁾은 OCP가 HAP의 전구체이며 이것이 가수분해에 의해 HAP로 변환되는데 이 과정 중에 탄산염과 같은 불순물이 혼입되어 결정이 불안정하게 형성됨을 보고하였고, Nancollas와

Table 1-1. Experimental conditions according to time, pH and temperature

Specimen	Time(days)	pH	Temperature
A-1	1		37°C
2	3	7.5	
3	7		
B-1	1		
2	3	6.5	
3	7		
C-1	1		
2	3	5.5	
3	7		
D-1	1		
2	3	4.5	
3	7		

Table 1-2. Continued from Table 1-1.

Specimen	Time(days)	pH	Temperature
a-1	1		25°C
2	3	7.5	
3	7		
b-1	1		
2	3	6.5	
3	7		
c-1	1		
2	3	5.5	
3	7		
d-1	1		
2	3	4.5	
3	7		

Mohan⁴¹⁾은 불안정한 OCP가 침착된 후 인회석 결정이 성장된다고 보고하였다. 최근에 가장 넓게 받아들여지고 있는 주장은, ACP가 제일 먼저 침전되면 그 표면에 OCP상의 핵이 형성되고 최종적으로 OCP가 HAP로 변환된다는 것이다³⁷⁾. 이때 수용액의 조건에 따라 생성되는 침전물의 양상이 다르게 나타날 수 있다.

본 연구의 목적은 수용액 내에서 자발적인 침전이 일어나도록 하는 방법으로 HAP를 합성할 때, pH, 온도 및 합성시간이 침전물의 화학적 성분, 결정구조 및 결정도에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 적외선 분광법 및 X-선 회절법을 사용하여 분석하고 그 결과를 HAP의 생성과 우식의 형성 및 진행과정 그리고 재광화의 기전을 연구하는 기초로 삼고자 하는데 있다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

1. 수산화 인회석의 합성

24mM $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 와 14.4mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 용액을 각각 250ml씩 섞은 후, pH는 NH_4OH 를 사용하여 조절하고 표 1과 같은 실험조건에 따라 1, 3, 7일 후, 용액 내에 침전된 시료를 진공 여과기로 수거하였다.

채취한 침전물을 3차 증류수로 3회 충분히 세척한 후, 온도 차이에 의한 결정 변화를 방지하기 위하여 실험 조건에 따라 각각 37°C와 25°C 항온기에서 건조시켰다. 대조군으로는 mineral HAP(99.9%, Sigma Co., U.S.A.)를 사용하였다.

2. 적외선 분광법

준비된 각 조건의 시료에 소량의 KBr을 첨가한 통상적인 KBr disk technique을 사용하여 4,000-400 cm^{-1} 의 범위에서 plotter와 computer가 부착된 FTIR(Fourier transform infra Red spectroscopy, Mattson Co., U.S.A.)로 spectrum을 얻은 후, 분석하였다.

3. X-선 회절법

준비된 각 조건의 시료를 이용하여 표 2와 같은 조건의 X-선 회절법에 의해 회절상을 얻은 후, $n\lambda = 2d \times \sin\theta$ 의 식으로부터 면간

거리인 d-값(d-value, Å)을 산출한 후, 그 값과 상대강도를 ASTM(American Society of Testing and Materials) card No.9-432 및 No.9-77의 자료와 대조하여 결정의 종류

Table 2. Condition of X-ray diffraction

Target	CuK α
Filter	Ni
Voltage	30kV
Current	15mA
Slit	0.3-1°-0.3
Time Constant	1 sec
Scanning Speed	2°/min.(2 θ)
Range	1,000cps

제3장 실험 결과

온도와 실험 기간에 관계없이 pH 5.5이하인 용액 내에서는 침전물이 형성되지 않았으며 pH 6.5 이상인 용액에서만 침전물이 형성되었다.

1. 적외선 분광상의 분석 (그림1-13, 표4,5)

b-1을 제외한 모든 시료의 적외선 분광상(그림 1-11)은 서로 비슷한 형태를 나타 내

를 동정하였다. 그 후 다시 표 3과 같은 조건의 X-선 회절법에 의해 얻어진 회절상에서 반가폭(full width half maximum value)을 측정하여 결정도를 조사하였다.

Table 3. Condition of enlarged view X-ray diffraction

Target	CuK α
Filter	Ni
Voltage	30kV
Current	25mA
Slit	0.3-1°-0.3
Time Constant	5 sec
Scanning Speed	1/2°/min.(2 θ)
Range	1,000cps

었는데, 흡수대의 세기(intensity)와 폭은 약간 차이가 있었다. 그러나, 전체 분광상과 주요 흡수대가 HAP(그림 13)의 적외선 분광상과 거의 유사하게 나타났기 때문에 HAP의 성분을 가진 물질이 형성되었음을 알 수 있었다. 즉, PO₄기와 OH기를 나타내는 흡수대는 표 4에서 처럼 거의 동일한 wavenumbers를 나타내었다. 그러나 CO₃기와 interphosphate oxygen bond를 나타내는 wavenumbers가 실험 시료에 의한 spectra에서만 나타났다.

Table 4. Infra-Red wavenumbers(cm⁻¹) of specimens and mineral HAP

A-1	A-2	A-3	B-1	B-2	B-3	a-1	a-2	a-3	b-2	b-3	HAP	Remark*
473	473	470	473	473	473	472	473	470	473	472	472	PO ₄
565	563	564	564	563	563	564	565	565	564	564	566	PO ₄
602	603	603	603	603	603	603	603	604	603	604	603	PO ₄
634	634	634	634	634	633	633	635	633	633	634	635	OH
876	875	875	875	871	872	875	875	876	873	875		CO ₃
962	962	962	962	962	962	962	962	962	962	962	962	PO ₄
1036	1020	1034	1033	1061	1016	1040	1040	1019	1043	1034	1041	PO ₄
1096	1098	1096	1093	1094	1100	1100	1100	1098	1097	1098	1091	PO ₄
1399	1398	1403	1399	1400	1402	1406	1400	1403	1401	1400		CO ₃
1457	1457	1455	1464	1459	1456	1460	1459	1458	1458	1474		CO ₃
1627	1646	1645	1636	1654	1644	1651	1648	1645	1640	1648	1633	OH
2345	2342	2445	2356	2363	2390	2361	2365	2408	2409	2396		O ₃ PO-OPO ₃
2921	3527	3527	3146	3189	3411	3423	3433	3446	3280	3391	2944	OH
3401			3427	3401					3404		3435	OH

* Remark was based on previous reports^{59, 66).}

한편 b-1 시료의 적외선 분광상(그림 12)은 나머지 실험 시료에 의한 것과는 다른 양상이었다. 표 5에서와 같이 HPO_4 기에 의한 흡수대가 나타났고 OH기에 의한 흡수대도 진동(vibration)과 신축(stretching)에 의해 다른 시료와는 구별되는 독특한 양상으로 나타났다. 그러나 이 시료에 의한 분광상에서도 CO_3 기에 의한 흡수대가 보였다. 이러한 분석 내용을 DCPD의 양상과 비교한 결과 표 5에서처럼 거의 동일한 흡수대를 나타내므로 b-1 시료는 DCPD와 같은 성분과 구조를 가지고 있다고 판정되었다.

Table 5. Infra-Red wavenumbers(cm^{-1}) of b-1 specimen and DCPD

b-1	DCPD**	Remark*
529	525	HPO_4
575	575	PO_4
603	658	PO_4
795	788	PO_4
875	872	CO_3
988	984	PO_4
1040	1000	PO_4
1059	1060	PO_4
	1070	HPO_4
1138	1132	HPO_4
1217	1215	HPO_4
1385		
1401		CO_3
1649	1646	OH
	1730	
2360	2360	OH
2849	2850	OH
2944		
3161	3165	OH
3295	3285	
3486	3490	
3539	3542	

* Remark was based on previous reports^{9, 59, 66)}

** IR wavenumbers of DCPD were analysed by Fowler, B.O., et al.⁹⁾

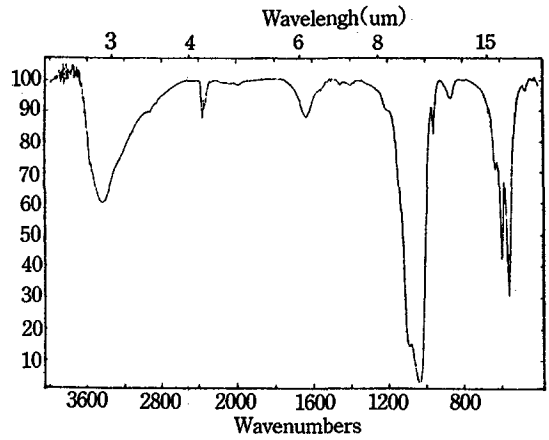


Fig.1 IR spectrum of specimen A-1
(pH 7.5, 37°C, 1day)

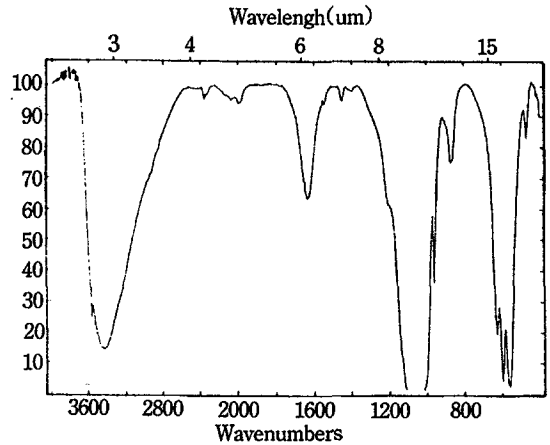


Fig.2 IR spectrum of specimen A-2
(pH 7.5, 37°C, 3days)

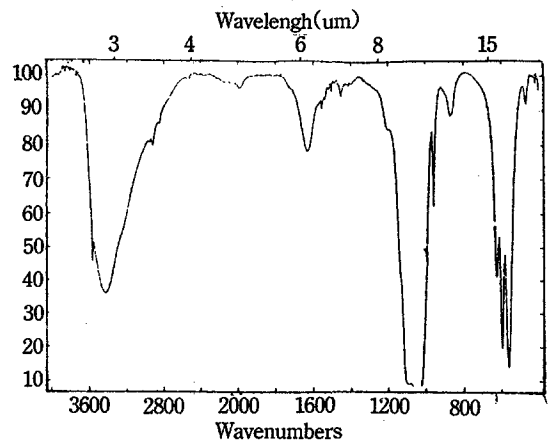


Fig.3 IR spectrum of specimen A-3
(pH 7.5, 37°C, 7days)

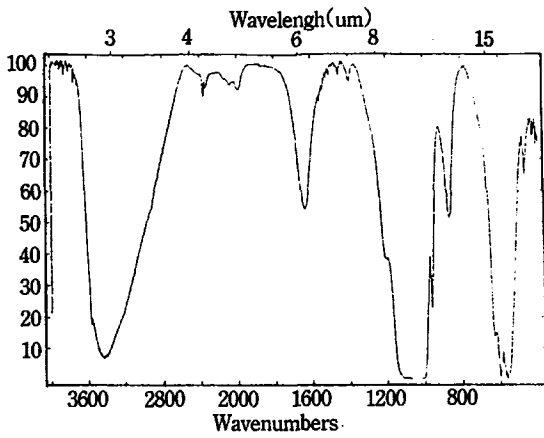


Fig.4 IR spectrum of specimen B-1
(pH 6.5, 37°C, 1day)

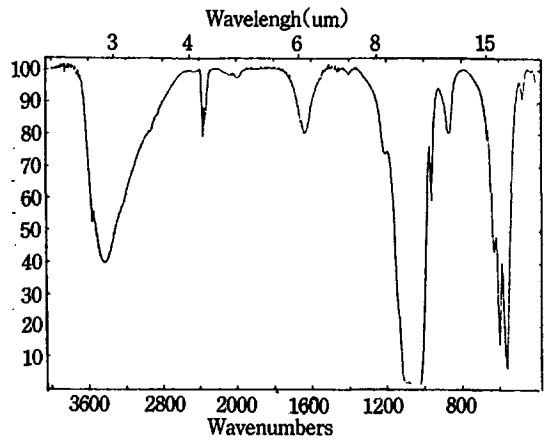


Fig.5 IR spectrum of specimen B-2
(pH 6.5, 37°C, 3days)

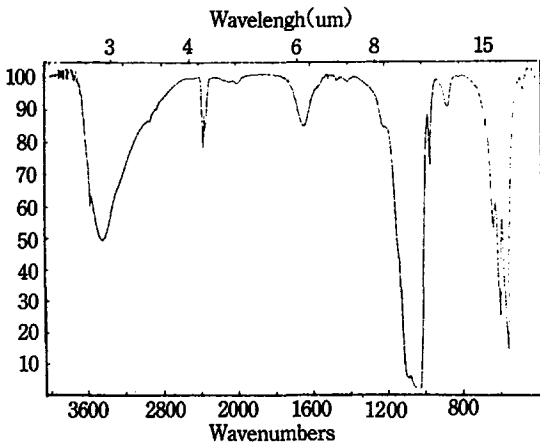


Fig.6 IR spectrum of specimen B-3
(pH 6.5, 37°C, 7days)

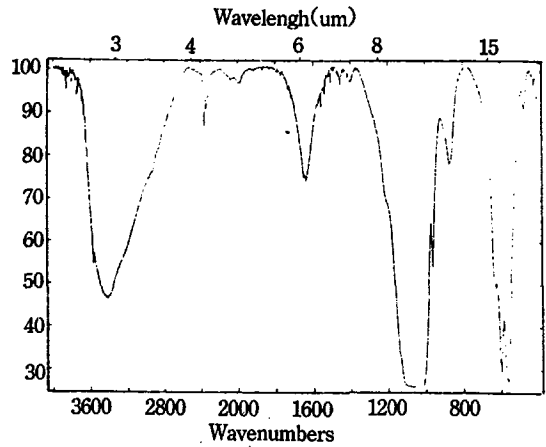


Fig.7 IR spectrum of specimen a-1
(pH 7.5, 25°C, 1day)

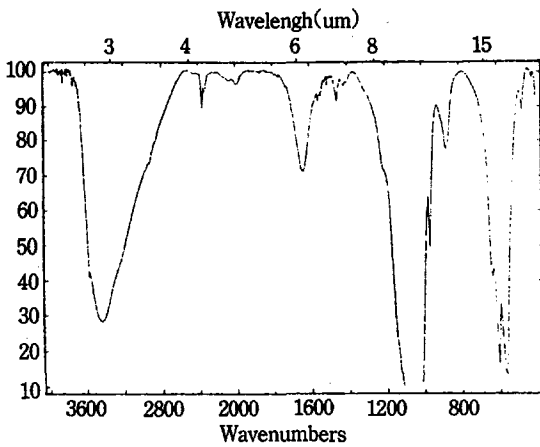


Fig.8 IR spectrum of specimen a-2
(pH 7.5, 25°C, 3days)

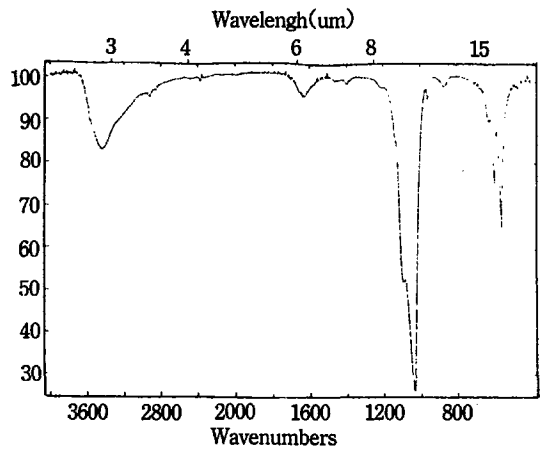


Fig.9 IR spectrum of specimen a-3
(pH 7.5, 25°C, 7days)

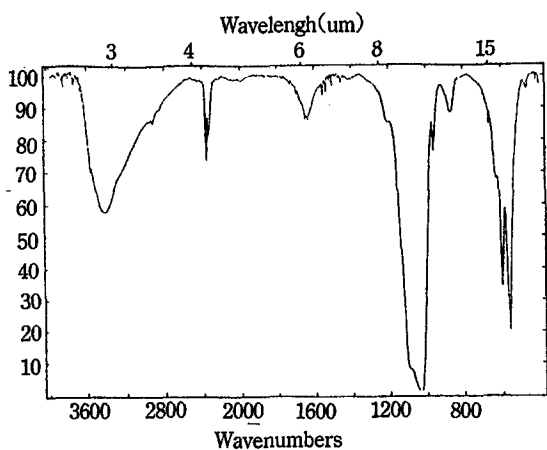


Fig.10 IR spectrum of specimen b-2
(pH 6.5, 25°C, 3days)

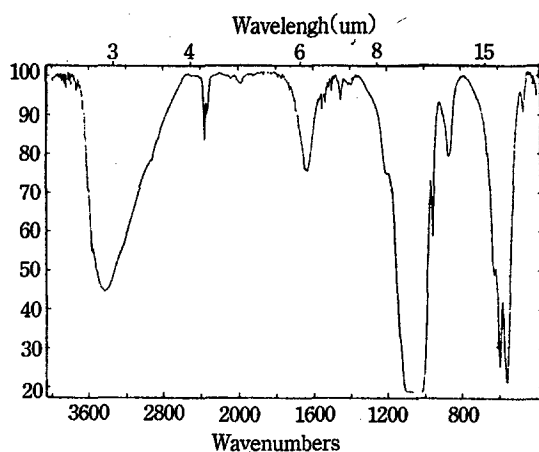


Fig.11 IR spectrum of specimen b-3
(pH 6.5, 25°C, 7days)

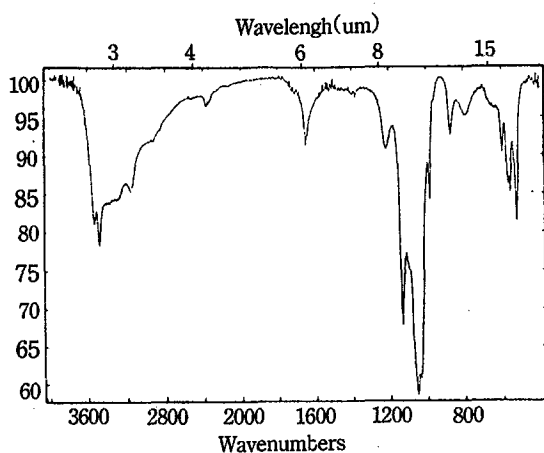


Fig.12 IR spectrum of specimen b-1
(pH 6.5, 25°C, 1day)

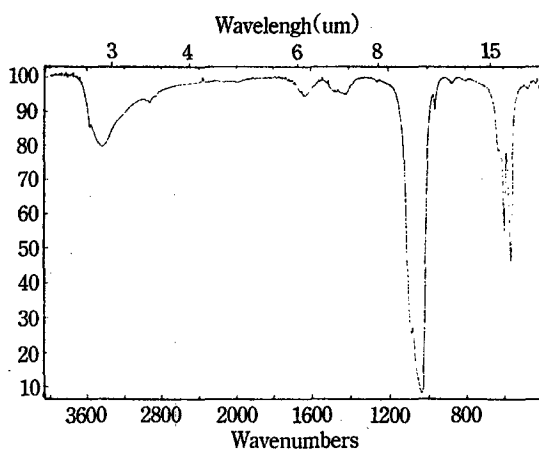


Fig.13 IR spectrum of specimen HAP

2. X-선 회절상 분석(그림 14-26, 표 6-9)

b-1을 제외한 각 시료의 회절상(그림 14-24)은 모두 유사한 양상을 나타내었으며 HAP의 회절상(그림 26)과 비교해 볼 때, 상대강도가 낮고 peak의 폭이 더 넓었으나 회절상은 비슷하여 실험 시료는 HAP의 결정구조를 가진 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위하여 회절상에서 산출한 d-값(표 6)을 ASTM card 9-432(hydroxyapatite)의 자료와 비교

한 바 (211), (112), (300), (002), (202)와 같은 주요한 peak의 d-값이 거의 동일한 수치이므로 HAP의 구조를 가진 결정인 것으로 확인되었다. 한편 결정도를 평가하기 위해 (202), (300), (002) peak의 반가폭을 측정된 결과(표 7), 실험 기간이 길수록, pH가 높을수록, 그리고 온도가 높을수록 결정도가 더 양호하였다.

그러나, 모든 시료의 결정도는 mineral HAP에 비해 불량하였다.

Table 6. $d(\text{\AA})$ values of various specimens except b-1

Specimens Miller index	(202)	(300)	(112)	(211)	(002)
A-1	2.635	2.712	2.761	2.812	3.437
A-2	2.635	2.736	2.786	2.820	3.450
A-3	2.642	2.720	2.786	2.812	3.437
B-1	2.634	2.720	2.792	2.812	3.437
B-2	2.634	2.728	2.786	2.812	3.437
B-3	2.634	2.720	2.786	2.812	3.437
a-2	2.634	2.728	2.786	2.812	3.437
a-2	2.634	2.720	2.777	2.812	3.437
a-3	2.627	2.720	2.786	2.812	3.424
b-2	2.642	2.720	2.786	2.812	3.450
b-3	2.634	2.728	2.786	2.812	3.437
mineral HAP	2.632	2.720	2.778	2.812	3.440
ASTM card No.9-432	2.631	2.720	2.778	2.834	3.443

Table 7. Full width half maximum values(2θ) of various peaks

Specimens\ Miller index	(002)	(300)	(202)
A-1	0.35	0.58	0.45
A-2	0.30	0.52	0.42
A-3	0.30	0.44	0.40
B-1	0.30	0.70	0.47
B-2	0.30	0.60	0.44
B-3	0.30	0.50	0.42
a-1	0.32	0.90	0.50
a-2	0.32	0.80	0.47
a-3	0.30	0.58	0.45
b-2	0.32	0.78	0.52
b-3	0.30	0.87	0.52
mineral HAP	0.24	0.30	0.31

b-1의 회절양상(그림 25)은 나머지 시료들과는 다른 독특한 형태를 가졌는데, 상대강도가 높은 3개 peak의 d-값으로 미지 물질의 종류를 알 수 있는 조건표와 대조한 바 DCPD인 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위해 다시 각 peak의 d-값을 측정하고 ASTM card No. 9-77(DCPD)에서 Miller index (020), (021), (040), (111), (221)의 d-값과 비교한 결과(표 8) DCPD의 결정 구조를 가진 물질인 것으로 확인되었다. 그러나 전체 X-선 회절상을 보면 DCPD의 회절양상 이외의 peak들도 나타나므로 다른 물질도 혼합되어 있는 것으로 보였다. 결정도를 평가하기 위해 (020), (021), (221)에서 반가폭을 측정한 결과(표 9) 양호하였다.

Table 8. d -value(\AA) of specimen b-1

Specimens\ Miller index	(020)	(021)	(040)	(111)	(221)
b-1	7.622	4.246	3.798	3.045	2.928
ASTM card No 9-77	7.570	4.240	3.800	3.050	2.928

Table 9. Full width half maximum value(2θ) of b-1 peaks

Specimens\ Miller index	(020)	(111)	(021)
b-1	0.17	0.20	0.20

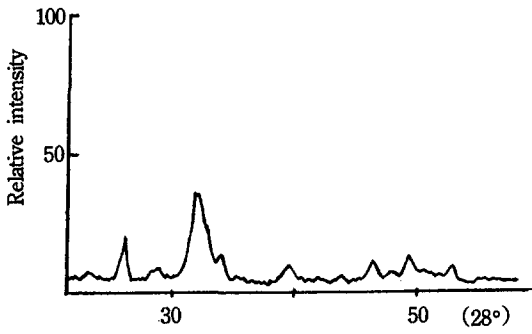


Fig.14 X-ray diffraction pattern of specimen A-1

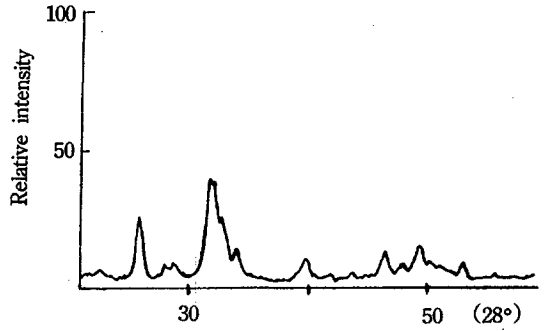


Fig.15 X-ray diffraction pattern of specimen A-2

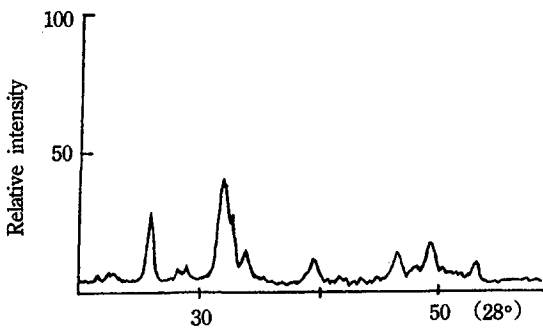


Fig.16 X-ray diffraction pattern of specimen A-3

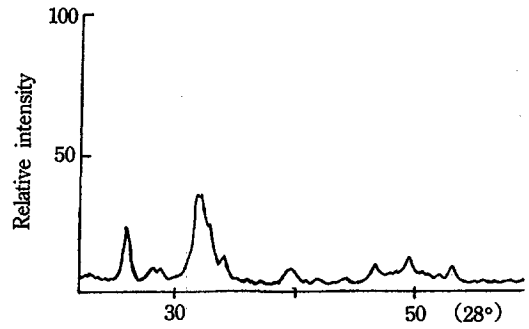


Fig.17 X-ray diffraction pattern of specimen B-1

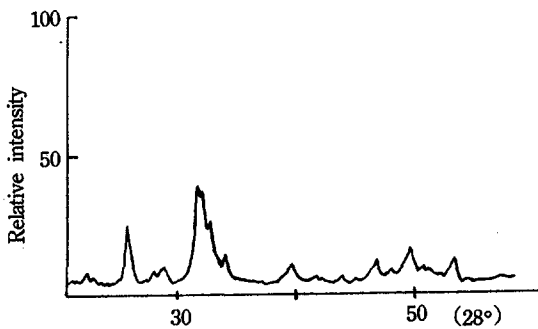


Fig.18 X-ray diffraction pattern of specimen B-2

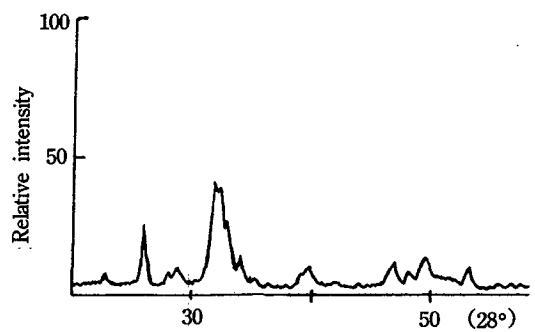


Fig.19 X-ray diffraction pattern of specimen B-3

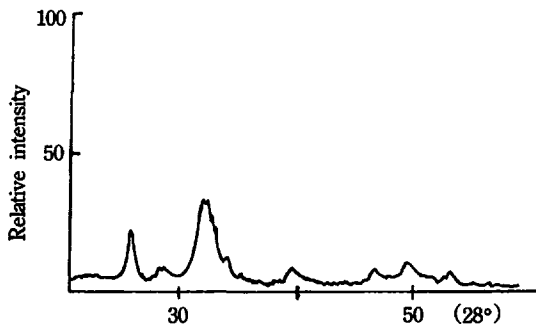


Fig.20 X-ray diffraction pattern of specimen a-1

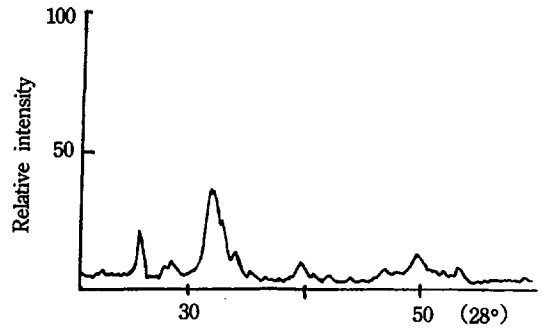


Fig.21 X-ray diffraction pattern of specimen a-2

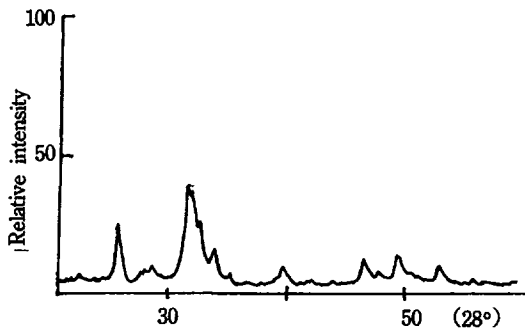


Fig.22 X-ray diffraction pattern of specimen a-3

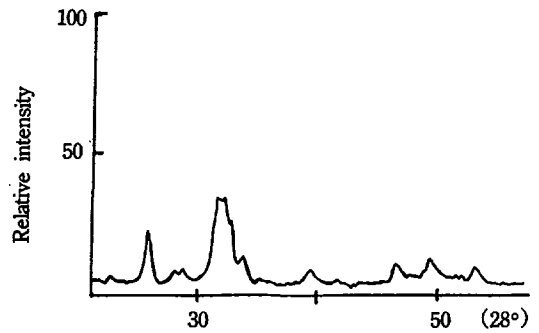


Fig.23 X-ray diffraction pattern of specimen b-2

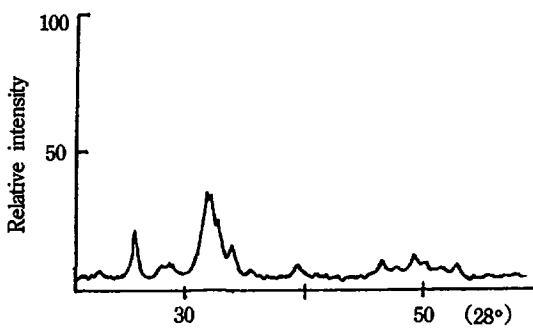


Fig.24 X-ray diffraction pattern of specimen b-3

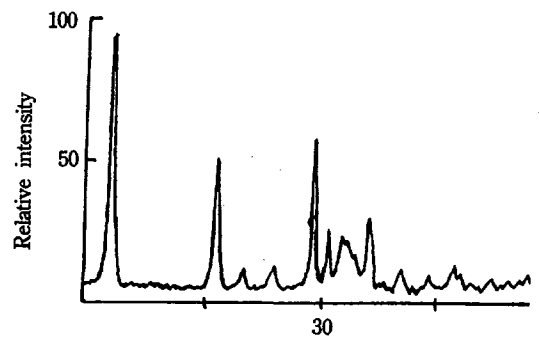


Fig.25 X-ray diffraction pattern of specimen b-1

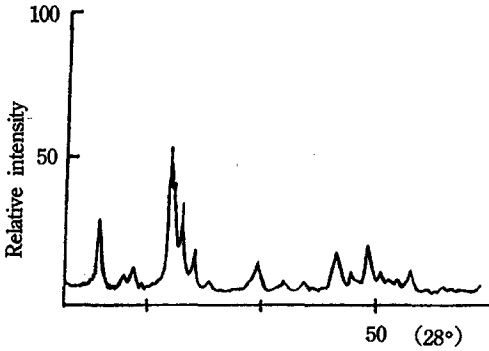


Fig.26 X-ray diffraction pattern of specimen HAP

제 4 장 총괄 및 고안

치아의 법랑질은 HAP와 유사한 육각형의 결정(hexagonal crystal)으로 구성된 무기질이 약 96%를 차지하고 있다. 그러나 이 결정들은 Ca, PO₄, OH 만으로 이루어진 stoichiometric HAP가 아니라 그 외에 CO₃, Mg, Na, Cl 등이 포함되어 있는 non-stoichiometric HAP로 구성되어 있다^{2, 47, 48}. Driessens²⁾은 치아 법랑질이 3가지 종류의 결정, 즉 20%의 NCCA(Na-and-CO₃-containing apatite), 15-20%의 MWH(magnesium whitlockite) 그리고 60-65%의 SCOHA(slightly carbonated HA)로 구성되어 있다는 3-phase model을 제시하였다. 선행들^{2, 33, 47)}에 의하면 탄산염은 치아 법랑질에 약 2-5% 정도 포함되어 있어 가장 중요한 불순물로서 작용함을 알 수 있는데 이러한 불순물이 혼입됨에 따라 결정은 구조적인 결함을 나타내어 격자의 변위 또는 변형, grain boundaries 그리고 육각형 구조의 대칭성이 소실된다^{49, 50}. 결함을 가진 결정은 산(acid)에 접촉될 때 우선적으로 용해된다고 알려져 있다^{4, 49}.

한편 법랑질은 환경 조건에 따라 무기질이 소실되거나 재침착되는 과정이 반복적으로 일

어날 수 있는데 여러 문헌^{51~56)}에 의하면 pH와 용액의 HAP에 대한 포화도에 의해 많은 영향을 받는다. 그러나 그 기전에 대해서는 명확하게 규명되어 있지 않다. 따라서 결정 구조에 대한 정확한 이해와 우식 및 재광화 과정에서 나타나는 결정의 변화를 추적함으로써 그 기전에 대한 정보를 축적할 수 있을 것으로 사료된다. 이때 실험의 조건을 표준화할 수 있는 합성된 HAP의 결정을 사용하는 것이 보다 더 효과적이므로 HAP의 합성에 관한 연구가 활발해졌는데, 높은 pH와 높은 온도에서 합성한 결정을 실온이나 생리적인 온도에서 연구하는 경우가 많다. 이렇게 얻어진 결정은 결정도가 양호하기는 하지만 합성 조건과 다른 상태에서 실험할 경우 온도 및 pH 차이가 결과에 영향을 미칠 수 있으며 무엇보다도 높은 pH와 고온 처리는 생리적인 반응과는 거리가 멀다. 따라서 본 실험에서는 구강 내에서 변화되는 정도의 pH 범위와 생리적인 온도 및 실온에서 합성하였다.

합성 기간에 따른 생성물의 변화에 대한 연구 중, Nancollas와 Tomazic³⁸⁾은 과포화 상태의 용액에서 1일 경과한 시료를 Ca/P 비율과 적외선 분광법으로 분석한 결과 OCP와 HAP가 혼합된 침전물 또는 defective HAP가 생성되었고 약 5일이 경과한 후에는 DCPD가 순수한 HAP로 변환되었다고 보고하였으며 Moriwaki 등³⁷⁾은 과포화 용액에서 1일 경과한 경우에는 DCPD가, 7일 경과한 경우에는 DCPD와 HAP가 혼합되어 있는 양상을 보인다고 주장하였다. 이를 토대로 시간 경과가 결정의 형성과 구조에 미치는 영향을 알고자 1, 3, 7일에 걸쳐 실험하였다.

용액은 타액과 같이^{57, 58)} HAP에 대해 과포화된 용액을 사용하였다.

HAP를 연구하는 여러 가지 방법 중, 적외선 분광법⁵⁹⁾으로는 물질을 이루는 분자의 성분과 분자의 결합 양식을 파악하여 구조에 대한 정

보를 얻을 수 있고, X-선 회절법⁶⁰⁾으로는 결정으로 이루어진 미지 물질을 동정하고 그 결정도를 평가할 수 있으므로 이 두가지 방법을 병행하여 사용하였다.

실험 결과에 의하면 pH 5.5 이하에서는 침전물이 형성되지 않아, pH 6-8인 경우에 무기질의 침착이 가능하며 법랑질의 용해가 일어나지 않는다는 Featherstone 등⁶¹⁾의 견해와는 유사하나, pH 3-6인 경우에는 DCPD가 형성된다는 Le Geros 등⁶²⁾의 보고와는 상이하였다.

1. 적외선 분광상에 관한 분석

적외선 분광상의 전체적인 형태와 각 흡수대의 범위가 HAP와 거의 일치하나 흡수대가 HAP에 비해 넓게 나타나 결정도가 낮고 불순물의 혼입이 있음을 짐작할 수 있었다. 특히 모든 시료에서 나타나는 875cm^{-1} 와 $1,400-1,470\text{cm}^{-1}$ 부위의 흡수대는 탄산염에 의한 것인데, 이는 실험 과정에서 대기 중의 이산화탄소가 용액내로 유입되어 나타난 것으로 사료된다. 탄산염이 결정에 혼입되는 기전으로는 고온에서는 CO_3 기가 더 작은 OH기와 치환되므로 a-축이 증가되나³⁵⁾, 대개는 CO_3 가 더 큰 PO_4 기와 치환되므로 a-축이 감소되며 결정의 크기가 감소된다는 의견이 지배적이다^{34, 47)}. 이러한 탄산염의 치환량이 증가될수록 X-선 회절상의 상대강도가 감소되며 peak의 폭이 넓고 불규칙한 양상을 나타낸다. 그리고 적외선 분광상에도 흡수대의 폭이 넓어지면서 peak의 예민성(sharpness)이 감소되며 870cm^{-1} 과 $1,400, 1,470\text{cm}^{-1}$ 에서 특징적인 C-O 진동형태(vibration mode)가 나타난다³⁴⁻³⁶⁾. 실험 시료에 대한 적외선 분광상에 의하면 탄산염이 인산염과 치환되어 결정도의 감소 요인 중의 한 부분을 담당한 것으로 사료된다.

한편, Posner 등⁶³⁾과 Posner와 stutman⁶⁴⁾은 $3,400\text{cm}^{-1}$ 부위에서 나타나는 흡수대의 강

도는 Ca/P 비와 반비례하는데 이는 칼슘 이온이 부족한 자리에 수소 이온이 치환되어 interphosphate hydrogen bond를 형성함에 따라 흡수대의 강도가 증가한다고 주장한 반면, Winand 등⁶⁵⁾과 Winand와 Marcel⁶⁶⁾은 이 부분의 흡수대는 결정에 흡수되어 있는 물 분자에 의해 나타나는 것이라고 주장하였다. 본 실험에서는 $3,300-3,500\text{cm}^{-1}$ 의 흡수대가 강하게 나타났으나, Ca와 P의 정량 분석을 시행하지 않았으므로 상기 두가지 의견 중 어느 것에 의한 것인지는 확인할 수 없었다.

Winand와 Marcel⁶⁶⁾은 $2,400\text{cm}^{-1}$ 부위에서 나타나는 약한 흡수대가 OCP에서 $\text{O}_3\text{PO}-\text{OPO}_3$ 에 의해 나타나는 특징적인 band라고 보고했는데, 그 의견에 의하면 시료에는 OCP로 추정되는 물질이 함유되어 있다고 볼 수 있다.

한편, b-1 시료의 적외선 분광상은 DCPD ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)의 적외선 분광상⁹⁾과 거의 일치하여 DCPD라고 확인할 수 있었다. 온도와 pH가 낮고 합성 기간이 짧아 변환이 미처 이루어지지 않은 경우라고 여겨지는 바, HAP의 합성과정에 나타나는 중간 산물 중의 하나인 것으로 사료된다. 한편 이 시료에도 탄산염이 혼입되어 있었다.

우식 과정 중 산 접촉에 의해 선택적으로 탄산염이 제거됨에 따라 결정도가 더 향상된다는 보고⁶⁷⁻⁶⁹⁾와 이때 재광화 용액에 노출되면 결정이 더 커진다는 보고^{70, 71)}가 있다. 이를 참고하면 치아 법랑질은 carbonated HAP라고 할 수 있으므로 표준화된 조건을 가진 carbonated HAP로 우식 및 재광화에 대해 연구하면 그 기전을 파악하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

2. X-선 회절상의 분석

b-1을 제외한 모든 시료의 회절상을 분석

하고 이를 ASTM card 9-432와 대조한 결과 Miller index에 따른 모든 d-값들이 일치하기 때문에 HAP의 구조를 가지고 있다고 판정할 수 있었다. 그러나 HAP에 비해 상대강도가 낮고 (002), (202), (300) peaks의 반가폭 값이 더 큰 것을 고려할 때, 결정도와 결정의 완전성(perfection)이 낮음을 알 수 있었다. (211)과 (112)의 peak는 거의 겹쳐진 상태로 나타나 이 두가지 peaks에서의 반가폭은 결정할 수 없었는데, 이는 Trautz 등⁷³⁾의 결과와 동일하였다.

한편, Eanes 등⁴⁰⁾과 Meyer 등⁷³⁾은 X-선 회절법과 적외선 분광법에 의한 실험에서 온도가 증가할수록 결정도가 증가한다는 보고를 했으며, Boskey와 Posner⁴²⁾는 시간(t)이 경과할수록 결정도가 증가하는데, 결정의 평균 길이(l)는 $l = 13.7 \times 10^{-8} t^{0.37}$ (cm)의 식에 따라 증가한다고 하였다. 표 7의 반가폭 값에 의하면 온도가 높을수록, 시간이 길수록 결정도가 향상됨을 알 수 있어 상기 연구자들의 견해와 일치하였다.

b-1 시료는 HAP와는 다른 독특한 회절상을 나타내었으므로 상대강도가 높은 3개 peaks의 d-값과 물질을 대조할 수 있는 조건표에 의해 검증하고 ASTM card No 9-77과 대조한 결과 DCPD인 것으로 판정되었다. Nancollas와 Marshall⁷⁴⁾은 DCPD가 생체 경조직의 생성과 파괴 과정의 중간 단계에 생성되는 불안정한 고체상으로 법랑질 우식증의 표층 형성에 중요한 역할을 한다고 주장하였고 野々村⁴⁵⁾는 DCPD와 whitlockite 및 HAP의 형성 조건에 대한 연구에서 Mg을 포함한 Ca, P의 농도가 낮은 경우에는 HAP가 형성되고 농도가 비교적 높은 경우에는 pH 6.0 이하에서는 DCPD가, pH 6.2 이상에서는 whitlockite 및 HAP가 형성된다고 주장하였으며, Le Geros⁶²⁾는 Ca와 P만을 사용한 경우 37°C에서 pH 3-6에서는 DCPD가, pH 6.8

-7.0에서는 OCP가 형성되고, pH 7.5-11에서는 ACP가 형성되어 pH가 높아질수록 결정도가 감소된다고 주장하였다. 본 실험에서는 과포화된 용액에서 25°C, pH 6.5인 경우에 DCPD가 형성되었고, pH가 높을수록 결정도가 향상되어 상기 연구자들의 보고와는 다른 결과였다. 한편 Brown 등¹²⁾이 결정도가 낮은 물질과 혼합되어 있는 OCP는 분말 X-선 회절상으로 확인하기 어렵다고 보고했듯이, 적외선 분광상에서 나타난 OCP 유사물질을 X-선 회절상으로 확인할 수 없었다.

이상에서의 같이 적외선 분광법과 X-선 회절법에 의해 분석한 결과, Newesley⁴⁴⁾가 주장한 바와 같이 생리적인 온도와 pH 범위에서 생성된 HAP는 mineral HAP 뿐 아니라 생체 내의 HAP에 비해서도 결정도가 떨어졌는데, 생체 내에서는 효소의 작용이 큰 역할을 담당하기 때문이라고 생각된다. HAP의 합성 과정에서 중간 산물로 DCPD, OCP등이 형성되었으며 변환 반응에 의해 HAP가 생성된다고 추정할 수 있었다. 합성 온도와 pH가 높을수록 그리고 시간이 경과될수록 변환된 정도가 증가되어 HAP의 결정도가 향상되었다.

제5장 결 론

비교적 생리적인 조건의 수용액에서 자발적인 침전반응에 의해 HAP를 합성할 때, 온도와 pH 그리고 합성시간이 HAP의 성분, 결정구조 및 결정도에 미치는 영향을 파악하기 위하여 각각 조건을 달리하여 분말 시료를 얻은 후, 적외선 분광법과 X-선 회절법으로 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. pH 5.5 이하에서는 온도와 합성시간에 관계없이 침전물이 형성되지 않았다.
2. pH 6.5, 25°C, 1일 경과 후의 시료만 DCPD의 양상을 나타내었고 그 외의 시료

는 모두 HAP의 양상을 나타내었다.

3. 온도와 pH가 높을수록, 합성기간이 길수록 합성된 HAP의 결정도가 향상되었으나, mineral HAP에 비해서는 결정도가 떨어졌다.
4. HAP가 형성 되기까지 중간 산물로서 DCPD와 OCP가 생성되었다.

참 고 문 헌

1. ten Cate, A.R. : Oral histology; Development, structure and function. 2nd ed. Mosby pp.183-197, 1985
2. Driessens, F.C.M. and Wöltgens, J.H.M. : Tooth development and caries. CRC press Vol.1, pp. 2-23, 95-131, 1986
3. ten Cate, A.R. : Oral histology, Development, structure and function. 2nd ed. Mosby pp.198-217, 1985
4. Nikiforuk, G. : Understanding dental caries. Karger pp.83-116, 1985
5. Christoffersen, J. and Arends, J. : Progress of artificial carious lesions in enamel. Caries Res. 16:433-439, 1982
6. Chow, L.C. and Brown, W.E : A physicochemical bench-scale caries model. J. Dent. Res. 63:868-873, 1984.
7. de Rooij, J.F. and Nancollas, G.H. : The formation and remineralization of artificial white spot lesions.: A constant composition approach. J. Dent. Res. 63: 864-867, 1984.
8. Patel, M.V., et al. : Physical model for non-steady-state dissolution of dental enamel. J. Dent. Res. 66:1418-1424, 1987.
9. Fowler, B.O., et al. : Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. Arch.oral Biol. 11:477-492, 1966
10. Doi, Y., et al. : Carbonate apatites from aqueous and non-aqueous media studied by ESR, IR, and X-ray diffraction : Effect of NH₄ ions on crystallographic parameters. J. Dent. Res. 61:429-434, 1982
11. Doi, Y., et al. : ESR and IR studies of carbonates-containing hydroxyapatites. Calcif. Tissue Int. 34:178-181, 1982
12. Brown, W.E., et al. : Crystallographic and chemical relationship between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. Nature. 196 :1050-1054, 1962
13. Budz, J.A., et al. : The influence of high- and low-molecular-weight inhibitors on dissolution kinetics of hydroxyapatite and human enamel in lactate buffers : A constant composition study. J. Dent. Res. 67:1493-1498, 1988.
14. Larsen, M.J. and Lensen, S.J. : An X-ray diffraction and solubility study of equilibration of human enamel powder suspensions in fluoride-containing buffer. Archs. Oral Biol. 30:471-475, 1985.
15. Okazaki, M., et al. : Crystallinity patterns of fluoridated hydroxyapatites before and after incubation in acidic buffer solution. Caries Res. 18:499-504, 1984.
16. Chu, J.S., et al. : Electron probe microanalysis for subsurface demineralization and remineralization of

- dental enamel. *J. Dent. Res.* 68:26, 1989
17. Nelson, D.G.A., et al. : Lattice parameters of apatite materials using high-resolution transmission electron microscopy fringe techniques. *Caries Res.* 21: 117-125, 1987
 18. Apostolopoulos, A.X. and Buonocore, N. B. : Comparative dissolution rates of enamel, dentin and bone. I. Effect of the organic matter. *J. Dent. Res.* 45:1093-1100, 1966
 19. Frazier, P.D. and Engen, D.W. : X-ray diffraction study of reaction for acidulated fluoride with powdered enamel. *J. Dent. Res.* 45:1144-1148, 1966
 20. Patel, P.R. and Brown, W.E. : Thermodynamic solubility product of human tooth enamel : Powdered sample. *J. Dent. Res.* 54:728-736, 1975
 21. Shellis, R.P. : Relationship between human enamel structure and the formation of caries-like lesions in vitro. *Archs. Oral Biol.* 29:975-981, 1986.
 22. Hirota, F. : An explanation for the "Two fiber axes" problem in human enamel by X-ray diffraction. *J. Dent. Res.* 65:978-981, 1986
 23. Hoppenbrouwers, P.M.M., et al. : The demineralization of human dental roots in the presence of fluoride. *J. Dent. Res.* 66:1370-1374, 1987
 24. Sakae, T. : X-ray diffraction and thermal studies of crystals from the outer and inner layers of human dental enamel. *Archs. Oral Biol.* 33:707-713, 1988
 25. 김 신 : 맹출기 영구치 표층 법랑질의 석회화 상태와 표면 및 결정 구조에 관한 전자 현미경적 연구. 서울 치대 논문집 12: 169-193, 1988
 26. Brown, W.E., et al. : Formation of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ from enamel mineral and its relationship to caries mechanism. *J. Dent. Res.* 54:475-481, 1975
 27. Nancollas, G.H. and Wefel, J.S. : Seeded growth of calcium phosphates : Effect of different calcium phosphate seed material. *J. Dent. Res.* 55:617-624, 1976
 28. Wu, M.S., et al. : Kinetics and mechanism of hydroxyapatite crystals dissolution in weak acid buffers using the rotating disk method. *J. Dent. Res.* 55: 496-505, 1976
 29. Vogel, J.C., et al. : Calcium release from powdered enamel and synthetic apatite after pretreatment with various low molecular weight organic acid. *Caries Res.* 17:212-220, 1983
 30. Larsen, M.J. : An investigation of the theoretical background for the stability of the calcium-phosphate salts and their mutual conversion in aqueous solutions. *Archs. Oral Biol.* 31:757-761, 1986
 31. Wong, L., et al. : The influence of incorporated and absorbed fluoride on the dissolution of powdered and pelletized hydroxyapatite in fluoridated and non-fluoridated acid buffers. *J. Dent. Res.* 66:1735-1741, 1987
 32. Daculsi, G., et al. : Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J. Dent. Res.* 66:1356-1359, 1987
 33. Driessen, F.C.M. : Mineral aspects in dentistry; Mineral in tooth enamel. S. Karger pp.49-71, 1982

34. Chickerur, N.S., et al. : A mechanism for incorporation of carbonate into apatite. *Calcif. Tissue Int.* 32:55-62, 1980
35. Le Geros, R.Z.: Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. *Nature* 205:403-404, 1965
36. Le Geros, R.Z. and Tung, M.S. : Chemical stability of carbonate- and fluoride containing apatite. *Caries Res.* 17:419-429, 1983
37. Moriwaki, Y., et al. : Synthesis of enamel-like apatite at physiological temperature and pH using ion-selective membranes. *Quintessence* pp239-256, 1983
38. Nancollas, G.M. and Tomazic, B. : Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals ; Effect of supersaturation and ionic medium. *J. Phys. Chem.* 78:2218-2225, 1974
39. Barone, J.P. and Nancollas, G.H. : The growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals ; The Effect of fluoride and phosphonate. *J. Dent. Res.* 57:735-742, 1978
40. Eanes, E.D., et al. : Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature* 208:365-367, 1965
41. Nancollas, G.H. and Mohan, M.S. : The growth of hydroxyapatite. *Archs. Oral Biol.* 15:731-745, 1970
42. Boskey, A.L. and Posner, A.S. : Formation of hydroxyapatite at low supersaturation. *J. Phys. Chem.* 80:40-45, 1976
43. Boulet, M., et al. : Effect of magnesium on formation of calcium phosphate precipitates. *Archs. Biochem. Biophys.* 96:629-636, 1962
44. Newesely, H. : Changed in crystal types of low solubility calcium phosphate on the presence of accompanying ions. *Archs. Oral Biol.* 6:174-180, 1961
45. 野々村榮二 : う蝕病巣における whitlockite, brushite の 生成機序にする研究. *日本小児歯科学雑誌.* 18:393-412, 1980
46. Marshall, R.W. and Nancollas, G.H. : The kinetics of crystal growth of dicalcium phosphate dihydrate. *J. Phys. Chem.* 73:3838-3844, 1969
47. Eanes, E.D. : Enamel apatite : Chemistry, structure and properties. *J. Dent. Res.* 58(B):829-834, 1979
48. Cole, A.S. and Eastoe, J.E. : Biochemistry and biology ; Biological mineral. 2nd ed. Wright pp.425-434, 1976
49. Arends, J. and Jongebloed, W.L. : Ultrastructural studies of synthetic apatite crystals. *J. Dent. Res.* 58(B):837-846, 1979
50. Frank, R.M., et al. : High resolution electron microscopy of young apatite crystals in human fetal enamel. *J. Biol. Buccale* 18:149-154, 1990
51. Theuns, H.M., et al. : Effect of the pH of buffer solutions on artificial lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 18:7-11, 1984
52. Theuns, H.M., et al. : Effect of undersaturation and supersaturation with respect to some apatites in demineralizing buffers on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 20:315-323, 1986
53. Theuns, H.M., van Dijk, J.W.E. : Effect

- of time and degree of saturation of buffer solutions on artificial caries lesion formation in human tooth enamel. *Caries Res.* 17:315–323, 1986
54. Theuns, H.M., et al. : The influence of the composition of demineralizing buffers on the surface layers of artificial caries lesions. *Caries Res.* 18:509–518, 1984
 55. Margolis, H.C., et al. : Development of caries-like lesions in partially saturated lactate buffers. *Caries Res.* 19:36–45, 1985
 56. Soni, N.N. and Brudevold, F. : Microradiographic and polarized light study of initial caries lesion. *J. Dent. Res.* 59:233–240, 1960
 57. Driessen, F.C.M. : Mineral aspects in dentistry ; Saliva and enamel mineral. S. Karger pp.68–70, 1982
 58. Nikiforuk, G. : Understanding dental caries ; Saliva and caries. Karger pp. 236–258, 1985
 59. Donald, L.P. : Introduction to spectroscopy ; Infrared spectroscopy. Saunders, pp.13–80, 1979
 60. 韓鳳熙 : X-線 回折の 基礎. 修訂版 東明社, pp.181–230, 1991
 61. Featherstone, J.D.B., et al. : Physicochemical requirements for rapid remineralization of early caries lesions. *Caries Res.* 15:221, 1981
 62. Le Geros, R.Z. : Chemical and crystallographic events in the caries process. *J. Dent. Res.* 69(Speci. Iss.): 567–574, 1990
 63. Posner, A.S., et al. : Hydrogen-bonding in calcium-deficient hydroxyapatite. *Nature* 188:486–489, 1960
 64. Posner, A.S. and Stutman, J.M. : Hydrogen-bonding in the calcium phosphates. *Nature* 193:368–369, 1962
 65. Winand, L., et al. : Hydrogen-bonding in the apatitic calcium phosphates. *Nature* 190:164–165, 1961
 66. Winand, L. and Marcel, J.D. : Hydrogen-bonding in the calcium phosphates. *Nature* 193:369–370, 1962
 67. Aoba, T., et al. : The intact surface layer in natural enamel caries and acid-dissolved hydroxyapatite pellets. *J. Oral Path.* 10:32–39, 1981
 68. Aoba, T., et al. : X-ray diffraction study on remineralization using synthetic hydroxyapatite pellets. *Caries Res.* 12:223–230, 1978
 69. Bergman, G. and Lind, P.O. : A quantitative microradiographic study of incipient enamel caries. *J. Dent. Res.* 24: 1477–1484, 1965
 70. Silverstone, J.S., et al. : Remineralization of natural and artificial lesions in human dental enamel in vitro. *Caries Res.* 15:138–157, 1981
 71. ten Cate, J.M. and Arends, J. : Remineralization of artificial enamel lesions in vitro. *Caries Res.* 11:277–286, 1977
 72. Trautz, O.R., et al. : The interpretation of the X-ray diffractograms obtained from human dental enamel. *J. Dent. Res.* 32:420–431, 1953.
 73. Meyer, J.L., et al. : The effects of pH and temperature on the crystal growth of hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.* 17: 1623–1627, 1972

74. Nancollas, G.H. and Marshall, R.W.: Kinetics of dissolution of dicalcium phos-

phate dihydrate crystals. J. Dent. Res. 50:1268–1272, 1971.