

664.949  
L 293 /

최 종  
연구보고서

# 수산폐기물을 이용한 신소재 개발

Development of New Material by Using Marine Wastes

굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 이용  
Recovery and Utilization of Calcium  
from Oyster Shell

어뼈 유래의 천연 수산화아파타이트를  
이용한 바이오 세라믹스 소재 개발  
Development of Bioceramics Material Using  
Hydroxyapatite from Fish Bone

연구기관

부경대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “수산폐기물을 이용한 신소재 개발에 관한 연구” 과제의 최종  
보고서로 제출합니다.

1997. 10.

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 이응호(부경대학교 식품공학과 교수)

연 구 원 : 김세권(부경대학교 화학과 교수)

연 구 원 : 변희국(부경대학교 화학과 박사)

연 구 원 : 전유진(부경대학교 화학과 박사 수료)

# 요 약 문

## I. 제 목

수산폐기물을 이용한 신소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리 나라에서는 수산물의 이용 증가로 인하여 많은 부산물이나 폐기물들이 발생하고 있지만 이들을 효율적으로 이용하기 위한 연구 및 제도가 미흡하여 유용자원의 낭비 뿐만 아니라 환경오염을 초래하고 있다.

특히 우리 나라는 세계적인 굴 생산국으로 1995년도 한해 20만9천418톤이 생산되었는데, 이는 전년도의 생산량 19만3천23톤에 비해 8.5% 증가한 것이다. 그러나 굴의 가공처리 후 발생하는 굴패각은 전체 중량의 약 90%나 차지하는데 비해 그 처리방안은 제대로 마련되어 있지 않아 남해안 일대에 심각한 환경오염을 유발시키고 있어, 정부 권장사업 중의 하나인 굴양식업이 커다란 어려움에 봉착하고 있다. 이러한 굴패각은 대부분 탄산칼슘과 같은 칼슘화합물로 이루어져 있어 이를 활용하게 된다면 현재 수입에 대부분을 의존하고 있는 칼슘 화합물들을 국내에서 자체 생산하는 것이 가능하게 될 것이다.

또한 우리 나라의 수산물 이용 현황을 보면 1995년 한해 총어획량은 3,348천톤인데, 이중 선어로 유통되는 양이 592천톤이며 나머지 2,756천톤은 가공원료로써 이용되고 있으므로, 결국 총어획량의 82.3%가 수산가공식품으로 이용되고 있다. 수산가공식품 분야에 대한 이러한 증가는 어빠, 어두, 어피, 내장, 비늘, 지느러미 등과 같은 수산 가공 부산물의 증가도 함께 동반하

게 된다.

특히 참치는 우리 나라 수산가공식품 중 가장 풍부하게 이용되고 있는 품종이지만, 이를 가공함으로써 엄청난 양의 참치뼈가 부가적으로 발생하게 된다. 어뼈는 수산화아파타이트(hydroxyapatite;  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) 라는 물질로 구성되어 있어 우리 인간의 뼈와 거의 유사한 화학적 조성을 가지고 있기 때문에 이를 활용하게 되면 인공뼈, 인공치아 및 인공치근과 같은 바이오 세라믹스의 소재로서 이용이 가능할 것으로 판단된다. 현재 우리 나라의 바이오 세라믹스 분야는 기술력의 부족으로 인하여 전량을 수입에 의존하고 있는 실정이며, 이것의 수요는 날로 증가되고 있다. 따라서 참치뼈로부터 바이오 세라믹스 소재의 개발은 현재 매우 시급하게 요구되고 있다.

본 연구과제는 우리 나라 수산물의 이용에 수반하여 생성되는 수산 폐기물을 효율적으로 이용하여 환경오염의 예방은 물론 수산자원의 재활용에 관련된 기술개발과 고부가가치의 창출로 인한 국가경쟁력 제고에 역점을 두고자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 제 1 과제 굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 이용

- ▶ 굴껍질을 회수하여 분쇄한 후 고온처리하여 산화칼슘 회수
- ▶ 회수된 산화칼슘의 성분 분석
- ▶ 염화칼슘 및 인산칼슘 등의 화합물로 변환
- ▶ 칼슘화합물에 펩티드 및 키토산 올리고당의 도입
- ▶ Rat를 이용한 체내 흡수도 측정

#### 제 2 과제 어뼈 유래의 천연 수산화아파타이트를 이용한 바이오 세라믹스 소재 개발

- ▶ 어뼈 표면 및 내재되어 있는 단백질 제거
- ▶ 어뼈로부터 고온 처리에 의한 천연 수산화아파타이트의 회수

- ▶ 천연 수산화아파타이트를 이용하여 강도 및 생체 친화성이 우수한 바이오 세라믹스로의 물성 개량
- ▶ 바이오 세라믹스 소재를 이용한 용도 개발

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### ● 연구개발결과

##### 제 1 과제 굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 이용

1. 굴껍질을 회수하여 여러 깨끗이 수세한 다음 건조한 후 마쇄하여 온도가 1200℃인 전기로에서 회화(灰火)시킴으로써 고순도의 칼슘화합물(산화칼슘)을 회수하였다.
2. 회수한 칼슘화합물을 염산(HCl)과 반응시켜 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)을 제조하였으며, 또한 인산수소나트륨(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)과 반응시킴으로써 인산화칼슘도 제조하였다
3. 굴껍질로부터 회수한 칼슘을 체내의 흡수를 증가시키기 위하여 단백질(어피 젤라틴) 가수분해물과 당(키토산)의 가수분해물인 올리고당을 도입시킨 결과, 흡수효과가 약 50~70% 증가된 것을 *in vitro*법에 의해 확인하였다.
4. *In vivo*법에서 굴껍질 유래 칼슘화합물과 어피 젤라틴 가수분해물 및 키토산 올리고당을 함께 칼슘을 결핍시킨 흰쥐(rat)에 투여한 결과, 흰쥐의 성장 과정중 부적절한 대사 이상 증세는 전혀 발견되지 않았으며, 대퇴골 강도는 탄산칼슘을 섭취시킨 대조군에 비해 각각 12% 및 20% 증가되는 효과를 보였으며, 또한 뇨 및 분으로의 칼슘 배설은 각각 50% 이하로 감소된 것으로 나타났다. 이러한 것으로 보아 부작용이 없는 체내 칼슘원이라 판단되었다.

##### 제 2 과제 어뼈 유래의 천연 수산화아파타이트를 이용한 바이오 세라믹스 소재 개발

1. 원료어로는 우리 나라의 수산 가공식품으로 대량적으로 사용되고 있는 참치뼈를 원료로 선정하였다. 참치뼈에 부착된 단백질을 알칼리 처리 및 효소 처리로 제거하고, 남은 어뼈 성분을 850~1350℃로 회화시켜 추출한 수산화

의 고유 물성을 조사한 결과, X-선 분석에서  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 조성을 가지는 수산화아파타이트 상으로 나타났다. 입자 크기 분포상의 관찰에서 회화온도는  $1050^\circ\text{C}$  이하가 가장 적당할 것으로 판단되었다. 입자의 변화양상을 SEM으로 추적한 결과 입자형상의 변화는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 참치뼈로부터 추출한 수산화 아파타이트가 생체재료로써 충분한 이용가능성을 가지고 있음을 보여주었다.

2. 참치뼈로부터 추출한 수산화아파타이트 자체의 소결체와 강도 증가를 위하여 첨가한 wallastonite와의 고상반응법으로 얻은 소결체의 각각의 특성을 검토하였다. 수산화아파타이트 자체보다는 wallastonite와 무게비로 1:1 혼합한 것을  $1300^\circ\text{C}$ 에서 소결처리하여 제조된 소결체가 가장 양호한 것으로 나타났다. X-선 관찰에서 주 결정상은 수산화아파타이트였고 wallastonite가 부결정상인 바이오세라믹스로 관찰되었다. 그러나 그 강도는  $17.91 \pm 0.19$  MPa로서 해면골(cancellous bone)의 강도인 10~20 MPa과 유사하였으나, 관절연골(articular cartilage)의 최대강도인 40 MPa에는 미치지 못하였다.
3. 앞의 결과에서 강도의 개선을 위하여 수산화아파타이트에 wallastonite 및 글래스세라믹스를 첨가한 복합체를 제조하여 그 특성을 검토하였다. X-선 분석 결과 복합체들의 결정상은 psedowallostonite( $\alpha$ - $\text{CaSiO}_3$ )와 tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)로 나타났다. 그러나 수산화아파타이트의 분해에 따른 TCP의 생성 때문에 수산화아파타이트의 피크는 관찰되지 않았다. 수산화아파타이트에 wallastonite와  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ 계 세라믹스(35:35:30)의 강도는 소결온도가  $1200^\circ\text{C}$ 에서  $81.21 \pm 1.49$  MPa으로 강도면에서는 크게 개선되었다. 이는 관절연골의 최대강도인 40 MPa보다도 우수하였다.
4. 참치뼈로부터 추출한 수산화아파타이트를 출발물질로 이용하여 제조한 복합 소결체가 인공체액 중에서 소결체 간의 결합이 이루어질 것인가를 SEM을 통하여 관찰하여 *in vitro*에서의 친화성을 검토하였다. 사용된 모든 시료에 대하여 결합이 형성됨을 보였다. 수산화아파타이트의 함량이 상대적으로 높은 세라믹스는 전형적인 잎모양의 조직이 나타났으며, 수산화아파타이트의 함량이 적은 세라믹스는 방추형 입자모양으로 이루어져 있었다. 그리고 햄스

터를 통한 *in vivo* 실험에서도 부작용은 거의 없는 것으로 나타났다.

### ● 활용에 대한 건의

제 1과제로 수행한 “굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 이용”에 관한 연구는 굴껍질을 단순히 칼슘제로 이용하거나 수입대체 효과를 가져오는데 그치지 않고, 체내에서의 흡수율을 증가시킬 수 있는 제품으로 개발이 가능하도록 결과가 얻어졌다. 이 결과는 1997년 6월 11일 KBS 저녁 7시와 9시 뉴스에서 방영되었으며, 또한 6월 18일자 부산일보에서도 크게 보도됨으로서 여러 업체들로부터 큰 관심을 끌었으며, 현재 경남 고성지역에서 사업화가 진행중에 있다.

제 2 과제로 수행한 “어뼈 유래의 천연 수산화아파타이트를 이용한 바이오세라믹스 소재 개발”에 관한 연구에서, 원료어로 사용한 참치는 우리나라에서 가장 대량적으로 이용되고있을 뿐만 아니라 참치뼈 또한 대량으로 쉽게 얻을 수 있다. 지금까지는 이러한 참치뼈를 활용한 연구가 전무한 실정이라서 단순히 사료이상의 부가가치를 창출할 수 없었다. 본 연구에서 검토된 참치뼈는 알칼리 처리, 효소처리 및 회화에 의해서 쉽게 얻을 수가 있었으며 그 성분도 X-선 분석에서  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 조성을 가지는 수산화 아파타이트상으로 나타났다. 이를 그 자체로서 이용할 때에는 우수한 생체친화성을 가졌음에도 불구하고 그 강도가 약하여 wallostonite와  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ 계 세라믹스를 35:35:30 비로 혼합한 복합체를 제조하였다. 이렇게 제조된 바이오세라믹스는  $81.21 \pm 1.49$  MPa의 강도로 크게 개선되었으며, 연골 관절의 최대 강도인 40 MPa 보다 더 우수하였다. 그리고 동물실험을 통하여 부작용이 전혀 없는 것으로 나타나 생체친화성이 매우 뛰어난 것으로 밝혀졌다. 이에 관한 연구결과는 1997년 7월 16일자 부산일보에 소개되었으나, 이 분야에 있어서 아직까지 국내기업의 인식부족으로 산업화에 대한 가식적인 결과는 얻지 못하였다. 그러므로 보다 적극적인 기업화 모색을 추진하고 있다.

# S U M M A R Y

## 1. Recovery and Utilization of Calcium from Oyster Shell

Approximately 210 thousand tons of oyster are annually harvested in Korea. Oyster shell, more than 90% of oyster content, wasted and induced a serious environmental pollution. However, oyster shell contains a large quantity of calcium mainly composed of calcium carbonate. Therefore, oyster shell can be used as a calcium supplement.

Bioavailability of calcium compounds was investigated using calcium compounds in oyster shell. To this end, calcium oxide was prepared by burning of oyster shell at high temperature. Calcium compounds such as calcium chloride( $\text{CaCl}_2$ ) and calcium phosphate( $\text{CaHPO}_4$ ) were prepared by the calcium oxide. Then, the calcium compounds used experimented to *in vitro* and *in vivo* for testing bioavailability in body. The results from the present study were summarized as follows.

1. The structure and purity of oyster shell burnt in various temperatures were analyzed by X-ray, SEM, and EDS, and the optimum temperature was to be  $1200^\circ\text{C}$ . On the basis of this result, calcium compounds,  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{CaHPO}_4$ , were prepared from the oyster shell burnt in  $1200^\circ\text{C}$ .
2. In the *in vitro* experiment using fish skin gelatin peptides(FSGP) and chitosan oligo saccharides(COS) as calcium-absorption promoting supplement for calcium compounds from oyster shell, FSGP and COS showed the highest hindrance effect against calcium phosphate. They were 70% and 50% more effective than those in control, respectively.
3. In the *in vivo* experiments of the calcium-absorption activation, the groups taken only calcium compounds from oyster shell showed almost the same

effect as the control group, used calcium carbonate.

However, those groups showed higher effects on the weight and strength of femur and showed tendency to some extent preventing the formation of insoluble calcium phosphate in intestine.

4. The groups taken the calcium compounds from oyster shells and FSGP showed significantly higher amounts of calcium and ash than those of the control group. Especially, the groups taken 3% FSGP as supplement were better than those of 1% FSGP. Furthermore, the higher absorption effect was observed not in the groups taken calcium chloride but in the groups taken calcium phosphate.
5. The groups taken calcium compounds with COS showed lower weight increase and food efficiency than those of the control group. However, they were better in the bone strength and in the amount of ash and calcium. Contrast to the groups taken FSGP, the groups taken 1% COS showed better affected, and the groups taken  $\text{CaCl}_2$  were even better affected than the groups taken  $\text{CaHPO}_4$ .

These results suggest that calcium compounds from oyster shell could be used as an effective dietary calcium source.

## **2. Development of Bioceramics Material Using Hydroxyapatite from Fish Bone**

For the effective utilization of the fish bone waste from seafood industry, the physical properties of the isolated hydroxyapatite from tuna bone has been investigated. On X-ray measurements, the phase of the bone calcined by various temperatures were identified as hydroxyapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . The mean particle size distribution was changed as functions of temperatures. However, the particle shape was a geometrically non-regular type. These trends are consistent with SEM images. The composition of the bioceramic batch by

calcined tuna bone were not perfectly agreed with the suggested data, but the partially substituted composition possibly has shown the application of it as a bioceramic materials. In order to study sintering properties of hydroxyapatite isolated from tuna bone, the hydroxyapatite-containing wollastonite( $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ ) sintered by solid state reaction has been investigated. The degree of sintering at the weight ratio, 1 : 1(hydroxyapatite : wollastonite) was good at 1350°C. The endothermic curves due to dehydration of moisture were identified at 80°C and the exothermic curves as  $\alpha$ - $\text{CaSiO}_3$ ,  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  phases nearby 1200°C and 1300°C on the DSC analysis, respectively. On X-ray measurements, the major phases of hydroxyapatite-containing wollastonite by solid state reaction were identified as hydroxyapatite and pseudowollastonite. These phases are close to the bioactive phase known as the A-W(Apatite-Wollastonite) glass-ceramics. The microstructure containing many porosities on SEM images was not changed by increasing sintering temperatures. The maximum strength of specimen prepared by solid state reaction was 17.91 0.19 MPa as a 4-point bending method and this value was close to the strength of cancellous bone, 10~20 MPa. The properties of composites consisted of the hydroxyapatite : wollastonite : bio-glasses(35 : 35 : 30) were studied. The major phases were identified as pseudowollastonite and tricalcium phosphate(TCP), respectively. These phases were differ from the solid-state reaction matters

For the glass-ceramic prepared by using hydroxyapatite, the major phases were identified as pseudowollastonite and tricalcium phosphate(TCP), respectively. The measured maximum strength was 90.05 0.05 MPa at 1200°C for 3hr. This value was lower than the maximum strength of frame bone of cortical bone, as 50-150 MPa. However, the bending strenght of glass-ceramic as more enhanced than other methods. The replacement of skeletal bone like a cortical bone in human body was possible by controlling treatment conditions and particle sizes. The replacement of skeletal bone like a cortical bone in human body was possible

by controlling treatment conditions and particle sizes.

Chemical bonding was investigated in simulated body fluid for several selected hydroxyapatite-containing composites. The hydroxyapatite-containing composites chemically bonded each other in Ringer's solution for 4 weeks. The bonding mechanism in simulated body fluid is heterogeneous nucleation and growth on the interface between two sintered bodies.

In order to develop the test of safety evaluation of hydroxyapatite powder which will be used as dental materials originated from tuna fish, oral mucous membrane irritation test was carried out. Oral mucous membrane test was studied with syrian hamsters which were injected as dose of 5 g/kg B.W. with hydroxyapatite under pentobarbital sodium anesthesia. Each animal's left cheek pouch was everted and cleaned, and the samples were loosely placed at the bottom of the pouch with a double-suture technique for 14 days. Hamsters of control group were same treated without inserting the hydroxylapatite powder. Any abnormal clinical signs in both treated and control pouchs were not observed for 14 days. There were no significant differences in mean body weight changes between control and treated hamsters. Any particular changes in hamster oral mucous membrane of both treatment and control group were not detected.

To evaluate the acute toxicity of hydroxyapatite powder isolated from tuna bone in Sprague-Dawley via subcutaneous routes, the study was performed. Hydroxyapatite powder was administered at dose levels of 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 and 0 g/kg. After single subcutaneous administration to SD rats of both sexes, we observed rats for 14 days. Hydroxyapatite powder in the acute toxicity study did not induce any toxic signs in the rats in mortalities, clinical findings, body weights and gross findings. In view of result, it is impossible to estimate LD50 values in rats. Therefore, it was concluded that hydroxyapatite have no effect on acute toxicity and side effect in rats.

# CONTENTS

## Recovery and Utilization of Calcium from Oyster Shell

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	1
<b>Chapter 2. Materials and Methods</b> .....	4
<b>I. Materials</b> .....	4
<b>II. Methods</b> .....	5
1. Preparation of calcium compounds from oyster shell .....	5
2. Preparation of fish skin gelatin hydrolysates .....	5
3. Preparation of chitosan oligosaccharide .....	7
4. Calcium absorption by <i>in vitro</i> .....	8
5. Calcium absorption by <i>in vivo</i> using Rats .....	8
<b>Chapter 3. Result and Discussion</b> .....	14
<b>I. Preparations of calcium compounds</b> .....	14
<b>II. Hydrolysis of fish skin gelatin</b> .....	22
1. Degree of hydrolysis of fish skin gelatin .....	22
2. Amino acid compositions of fish skin gelatin .....	26
<b>III. Preparation of chitosan oligosaccharides</b> .....	29
<b>IV. Calcium absorption by <i>in vitro</i></b> .....	38
<b>V. Calcium absorption by <i>in vivo</i></b> .....	38
1 . Body weight, food intake and food efficiency .....	38
2 . Contents of calcium and phosphorous in serum .....	41
3 . Wet weight, length and strength of femur .....	41
4 . Mineral content of femur .....	47

5 . Urinary and fecal calcium excretion .....	50
<b>Chapter 4. Conclusion .....</b>	<b>54</b>
<b>Chapter 5. References .....</b>	<b>56</b>

## **Development of Bioceramics Material Using Hydroxyapatite from Fish Bone**

<b>Chapter 1. Characterization of Natural Hydroxyapatite                   Extracted from Tuna Bone .....</b>	<b>61</b>
<b>I . Introduction .....</b>	<b>61</b>
<b>II. Materials and Methods .....</b>	<b>64</b>
1. Materials .....	64
2. Methods .....	64
<b>III. Results and Discussion .....</b>	<b>67</b>
1. Structure of hydroxyapatite .....	67
2. Analysis of XRD diffraction of calcinated tuna bone .....	69
3. Analysis of TG/DTA .....	75
4. Analysis of FT-IR .....	75
5. Analysis of particle size distribution .....	77
6. Obseration of microstructure .....	82
7. Calculation of batch composition .....	85
<b>IV. Conclusion .....</b>	<b>88</b>
<b>V. References .....</b>	<b>89</b>

<b>Chapter 2. The Sintering Properties of Hydroxyapatite-Containing Wollastonite Crushed with Dry Milling Process</b>	92
<b>I. Introduction</b>	92
<b>II. Materials and Methods</b>	94
1. Starting materials	94
2. Methods and analysis of sintering	94
<b>III. Results and Discussion</b>	97
1. Particle size and sintering characterization	97
2. Analysis of XRD diffraction	97
3. Obseration of microstructure	99
4. Bending strength	101
<b>IV. Conclusion</b>	107
<b>V. References</b>	108

<b>Chapter 3. Sintering Properties of Hydroxyapatite Treated with Wet Milling Process</b>	110
<b>I. Introduction</b>	110
<b>II. Materials and Methods</b>	112
1. Preparation of starting and sintering materials	112
2. Methods of synthesis and analysis	112
<b>III. Results and Discussion</b>	114
1. Bulk density and open porosity	114
2. Analysis of XRD diffraction	118
3. Obseration of microstructure	118
4. Bending strength	121
<b>IV. Conclusion</b>	123
<b>V. References</b>	124

## **Chapter 4. Charaterization of Glass-Ceramics of Hydroxyapatite**

<b>Complexing Bioglass Added Bioglass</b> .....	125
<b>I . Introduction</b> .....	125
<b>II. Materials and Methods</b> .....	128
1. Materials .....	128
2. Experimental Methods .....	128
<b>III. Results and Discussion</b> .....	133
1. Analysis of XRD diffraction of complexes .....	133
2. Analysis of XRD diffraction of Glass-Ceramics .....	133
3. Bending strength of complexes .....	133
4. Bending strength of Glass-Ceramics .....	137
5. Obseration of microstructure of complexes .....	137
<b>IV. Conclusion</b> .....	145
<b>V. References</b> .....	147

## **Chapter 5. The Bonding Properties between Hydroxyapatite**

<b>Ceramics Composites in the Simulated Body Fluid</b> ...	150
<b>I . Introduction</b> .....	150
<b>II. Materials and Methods</b> .....	152
1. Starting materials .....	152
2. Preparation of sintered complexes .....	152
3. Preparation of simulated body fluid .....	154
4. Bonding test in simulated body fluid .....	154
<b>III. Results and Discussion</b> .....	156
<b>IV. Conclusion</b> .....	168
<b>V. References</b> .....	169

## **Chapter 6. Acute Toxic Test of Hydroxyapatite Extracted**

<b>from Tuna Bone in Rat</b> .....	170
<b>I. Introduction</b> .....	170
<b>II. Materials and Methods</b> .....	171
1. Materials .....	171
2. Experimental animal and breeding conditions .....	171
3. Compositions of testing groups .....	171
4. Methods and period of administration .....	173
5. Testing items .....	173
<b>III. Results</b> .....	174
1. LD <sub>50</sub> value .....	174
2. Death rate .....	174
3. Clinical symptoms .....	174
4. Variation of weight .....	174
5. Necropsy .....	174
6. Histopathology .....	179
<b>IV. Conclusion</b> .....	184
<b>V. References</b> .....	185

## **Chapter 7. Oral mucous Membrane Test of Hydroxyapatite**

<b>Extracted from Tuna Bone in Hamster</b> .....	186
<b>I. Introduction</b> .....	186
<b>II. Materials and Methods</b> .....	188
1. Experimental materials .....	188
2. Sample preparation .....	188
3. Experimental animal and breeding conditions .....	188
4. Experimental Methods .....	188
<b>III. Results</b> .....	190
1. Clinical symptoms and variation of weight .....	190

2. Variation of oral mucosa .....	190
<b>IV. Discussion</b> .....	<b>193</b>
<b>V. Conclusion</b> .....	<b>196</b>
<b>VI. References</b> .....	<b>197</b>
<b>Chapter 8. Overall Discussion</b> .....	<b>199</b>
<b>Chapter 9. Overall Conclusion</b> .....	<b>207</b>

# 목 차

## 제 1 세부과제 굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 이용

제 1 장 서 론 .....	1
제 2 장 재료 및 방법 .....	4
제 1 절 재료 .....	4
제 2 절 방법 .....	5
1. 굴껍질로부터 칼슘 화합물의 조제 .....	5
2. 어피 단백질 가수분해물의 조제 .....	5
3. 키토산 올리고당의 조제 .....	7
4. <i>in vitro</i> 에 의한 칼슘 흡수 촉진 효과 .....	8
5. 흰쥐(Rat)를 이용한 <i>in vivo</i> 에서의 칼슘 흡수 촉진 효과 .....	8
제 3 장 결과 및 고찰 .....	14
제 1 절 굴껍질 유래의 칼슘염 조제 .....	14
제 2 절 어피 단백질의 가수분해 .....	22
1. 어피 젤라틴의 가수분해도 .....	22
2. 어피 젤라틴의 가수분해물의 아미노산 조성 .....	22
제 3 절 키토산 올리고당의 제조 .....	26
제 4 절 <i>In vitro</i> 에 의한 칼슘흡수촉진 효과 .....	29
제 5 절 <i>In vivo</i> 에 의한 칼슘흡수촉진 효과 .....	38
1. 성장, 식이 섭취량 및 식이 효율 .....	38
2. 혈중 칼슘 및 무기인의 농도 .....	41
3. 대퇴골의 무게, 길이 및 강도 .....	41
4. 대퇴골의 무기질 함량 .....	47

5. 노와 분 중의 칼슘 배설량 .....	50
<b>제 4 장 요약</b> .....	54
<b>제 5 장 참고문헌</b> .....	56

## 제 2 세부과제 **어뼈 유래의 수산화아파타이트를 이용한 바이오 세라믹스 소재의 개발**

<b>제 1 장 참치뼈로부터 추출한 천연 Hydroxyapatite의 특성</b> .....	61
제 1 절 서론 .....	61
제 2 절 재료 및 방법 .....	64
1. 재료 .....	64
2. 방법 .....	64
제 3 절 결과 및 고찰 .....	67
1. Hydroxyapatite 구조 .....	67
2. 회화한 참치뼈의 XRD 회절분석 .....	69
3. TG/DTA 분석 .....	75
4. FT-IR분석 .....	75
5. 입자크기 분포 분석 .....	77
6. 미세구조 관찰 .....	82
7. 배치(batch)계산 .....	85
제 4 절 결론 .....	88
제 5 절 참고문헌 .....	89

<b>제 2 장</b>	<b>건식법으로 분쇄한 Hydroxyapatite 및 Wollastonite가</b>	
	<b>첨가된 소결체의 특성</b>	92
제 1 절	서론	92
제 2 절	실험	94
	1. 출발물질	94
	2. 소결방법 및 분석	94
제 3 절	결과 및 고찰	97
	1. 입자크기와 소결성	97
	2. XRD 회절분석	97
	3. 미세구조관찰	99
	4. 꺾임강도(Bending strength)	101
제 4 절	결론	107
제 5 절	참고문헌	108
<b>제 3 장</b>	<b>습식법에 의한 Hydroxyapatite 소결체의 특성</b>	110
제 1 절	서론	110
제 2 절	재료 및 방법	112
	1. 출발물질 및 소결체 제조	112
	2. 합성 및 분석방법	112
제 3 절	결과 및 고찰	114
	1. 소결체의 밀도 및 기공율	114
	2. XRD 회절분석	118
	3. 미세구조관찰	118
	4. 강도(bending strength) 측정	121
제 4 절	결론	123
제 5 절	참고문헌	124

<b>제 4 장 바이오 글래스가 첨가된 Hydroxyapatite 복합체 및 Glass-Ceramics의 특성</b>	125
<b>제 1 절 서론</b>	125
<b>제 2 절 재료 및 방법</b>	128
1. 재료	128
2. 실험방법	128
<b>제 3 절 결과 및 고찰</b>	133
1. 복합체의 XRD 회절분석	133
2. Glass-Ceramics의 XRD 분석	133
3. 복합체의 강도측정	133
4. Glass-Ceramics의 강도	137
5. 복합체의 미세구조 관찰	137
<b>제 4 절 결론</b>	145
<b>제 5 절 참고문헌</b>	147
<b>제 5 장 인공체액에서의 Hydroxyapatite 세라믹 복합체간의 결합</b>	150
<b>제 1 절 서론</b>	150
<b>제 2 절 재료 및 방법</b>	152
1. 출발물질	152
2. 소결 복합체의 제조	152
3. 인공 체액의 제조	154
4. 인공체액 중에서의 bonding test	154
<b>제 3 절 결과 및 고찰</b>	156
<b>제 4 절 결론</b>	168
<b>제 5 절 참고문헌</b>	169

<b>제 6 장</b>	<b>참치뼈로부터 추출한 Hydroxyapatite의 랫드에 대한</b>	
	<b>금성피하 독성시험</b>	170
제 1 절	서론	170
제 2 절	재료 및 방법	171
1	시험물질	171
2	실험동물 및 사육조건	171
3	시험군의 구성	171
4	투여방법 및 투여기간	173
5	검사 항목	173
제 3 절	실험결과	174
1.	LD <sub>50</sub> 치	174
2.	사망률	174
3.	임상증상	174
4.	체중변화	174
5.	부검소견	174
6.	병리조직학적 소견	174
제 4 절	결론	184
제 5 절	참고문헌	185
<b>제 7 장</b>	<b>참치뼈로부터 추출한 Hydroxyapatite의 햄스터에</b>	
	<b>대한 구강점막자극시험</b>	186
제 1 절	서론	186
제 2 절	재료 및 방법	188
1.	시험재료	188
2.	시료제작	188
3.	실험동물 및 사육환경	188
4.	시험방법	188
제 3 절	결과	190

1. 임상증상 및 체중의 변화 .....	190
2. 구강점막의 변화 .....	190
제 4 절 고찰 .....	193
제 5 절 결론 .....	196
제 6 절 참고문헌 .....	197
제 8 장 종합 고찰 .....	199
제 9 장 종합 결론 .....	207

제 1 세부과제

굴껍질로부터 칼슘의 회수 및 이용

Recovery and Utilization of Calcium from Oyster Shell

# 제 1 장 서 론

칼슘은 체내에 가장 많이 존재하는 무기질로, 보통 성인 체중의 1.5~2%인 1,000~1,200 g 정도를 체내에 보유하고 있다. 체내 칼슘의 99% 정도는 골격과 치아를 형성하고 있으며 나머지 1% 정도만이 근육의 수축과 이완, 규칙적 심장 박동, 혈액 응고, 효소의 활성화, 세포내 자극과 흥분의 전달과 같은 생리활성 조절 기능을 담당하고 있다(Einhorn 등, 1990; Allen 등, 1994).

체내 칼슘 농도는 항상 일정한 농도(약 10 mg/100 ml)로 유지되어야 하는데, 만일 장기간 동안 칼슘 섭취가 부족해지면 골다공증(osteoporosis), 구루병(rickets), 테타니(tetany)와 같은 결핍증이 유발된다. 뿐만 아니라 칼슘은 골격과 관련된 질환 이외에, 순환기 계통 질환(Allen 등, 1994), 대장 질환(Scalmati 등, 1992), 고혈압(McCarren, 1997) 등 각종 성인병과 관련지어져 그 중요성이 강조되고 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해서는 적당한 칼슘의 섭취와 적절한 소장내 칼슘 흡수량의 증가 등이 중요하다는 연구가 보고되고 있다(Avioli, 1988; Williams, 1985).

칼슘의 섭취는 적절한 칼슘 공급원을 통해서 일어나는데, 식품 중 칼슘 공급원의 가치는 칼슘 함량뿐만 아니라 체내 이용성에 의해서 평가된다. 이러한 체내 이용성은 칼슘염의 형태, 신체의 생리적 상태, 나이 및 식이 인자에 의해 결정된다. 최근 여러 나라에서 소뼈 회분(bone ash), 난각분말(egg shell), 패각분말(shell powder), CCM(calcium citrate malate)과 같은 칼슘 공급원 및 칼슘 보충제가 개발되어 보급되고 있다. 이러한 칼슘 공급원의 체내 이용성은 흰쥐(이 등, 1992; 五十嵐, 1990)와 사람(Fugita 등, 1993; 1995)을 대상으로 연구한 것들이 보고되어 있다.

체내에 흡수된 칼슘은 위산에 의해  $Ca^{2+}$  상태로 가용화 되고, 소장에서 능동수송(active transport)과 단순확산(passive diffusion) 과정에 의해 흡수된다. 소장에서

의 흡수에 관여하는 것으로는 비타민 D, 칼슘 결합 단백질(calcium binding protein), 펩티드, 유당 및 올리고당 등이 있다. Allen(1982)과 Heaney 등(1991)에 의하면 비타민 D를 제외한 나머지 인자들은 칼슘이 소장내에서 수산기, 인산기, 피틴산 등과 불용성 칼슘염을 형성하여 흡수되지 않고 체외로 배출되는 것을 막아 주는 역할을 한다고 보고하였다.

칼슘의 이용성을 증진시키기 위해 단백질을 특정 효소로 분해시켜 얻은 칼슘 흡수 펩티드(Alder-Nissen, 1986)와 특정 단백질이나 펩티드를 화학적으로 수식한 인산화 단백질 혹은 펩티드가 널리 이용되고 있으며(Hirotsuka 등, 1984; Seguro 등, 1990; Sung 등, 1983), 이러한 것들 중 널리 알려진 것이 CPP(casein phosphopeptide)이다. CPP는 카제인의 소화시 생성되는 펩티드로 카제인의 serine 잔기가 인산화 되어 있어 소장내 가용성 칼슘과 결합하여 체내 흡수를 용이하게 해 주는 물질로 알려져 있다(Lee 등, 1980; Lee 등 1983).

최근 주목을 받고 있는 키토산은 글루코사민의  $\beta$ -1, 4-중합체로 셀룰로오스와 유사한 구조를 갖는 동물성 섬유소이며, 장내 지방의 제거 및 노폐물 배설을 돕는 역할을 한다. 또 키토산은 중금속 및 칼슘 흡수를 촉진하고, 인산과 수산 등과 같은 불용성 칼슘 화합물을 형성하는 물질을 체외로 배출하기도 한다. 伊藤(1995)은 키토산이 유산균과 같은 장내 칼슘 흡수를 촉진시키는 세균을 증식시키고, 골대사를 촉진하는 대식 세포(macrophage)를 활성화시킨다고 보고하였다.

굴은 우리 나라에서 1994년 세계 총생산량의 15.5%(양식)를 차지할 만큼 많이 생산되고 있다. 1995년 현재 우리 나라의 굴 생산량은 약 21만 톤 가량인데(1996, 수산 연감), 그 중 약 90%를 차지하는 굴껍질은, 바다나 해안가에 폐기되어져 심각한 환경오염을 초래하고 있다.

따라서 본 연구에서는 우리 나라 양식 사업에 있어 큰 걸림돌이 되어 온 굴껍질로부터 산화 칼슘을 제조하고, 이를 화학적 수식을 통해 체내에서 이용 가능한 칼슘 화합물로 제조하였으며, 또한 칼슘 공급원으로서의 생물학적 유용성과 타당성을 조사하였다. 그리고 여러 칼슘 공급원들에 대한 칼슘 흡수를 효과적으

로 촉진시키기 위하여 우리 나라 수산 공장에서 부산물로 대량 생산되는 가자미  
피 젤라틴을 효소적으로 분해시켜 만든 어피 젤라틴 가수분해물과 키토산을 가  
수분해시킨 키토산 올리고당을 이용하여 칼슘 운반체로서의 역할도 검토하였다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 제 1 절 재료

실험에 사용된 굴껍질은 길이가 약  $10 \pm 3.1$ cm, 높이가  $5 \pm 1.8$ cm 정도이며, 무게는 약  $20 \pm 3.7$ g로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 두고 실험에 사용하였다. 참치 유문수 유래의 단백질 가수분해효소(TPCCE; tuna pyloric caeca crude enzyme)를 제조하기 위한 참치 유문수는 동원산업(주)으로부터 제공받았으며, 시판 효소인  $\alpha$ -chymotrypsin(EC 3.4.21.1; from bovine pancrease, Type II), papain(EC 3.4.21.2; from papayas latex, Type IV) 및 pronase E(from *Streptomyces griseus*, Proteinase Type XIV) 등은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고, Alcalase는 Novo Co. 제품을 이용하였다. Proteinase의 가수분해도 측정에 대한 기질인 TNBS(trinitro benzene sulfonic acid)는 日本 東京化學(株) 제품을 사용하였으며, 올리고당의 탈아세틸화 측정에 사용된 acetyl-acetone은 日本 純正化學(株)의 제품을 이용하였다.

칼슘 흡수 촉진을 위하여 사용된 단백질은 강 등(1992)의 방법으로 제조한 가자미피 젤라틴을 사용하였으며, 키토산은 (주)키토라이프로부터 탈아세틸화도가 80%인 것을 제공받아 사용하였다. 그 외 사용한 모든 분석 시약은 특급 시약을 사용하였다.

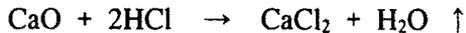
## 제 2 절 방법

### 1. 굴껍질로부터 칼슘 화합물의 조제

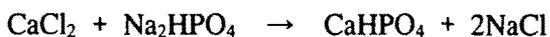
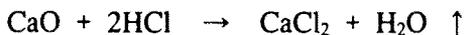
본 실험에서 칼슘 공급원으로 사용한 굴껍질 유래의 칼슘 화합물은 아래와 같은 방법으로 만들었다.

굴 가공 후에 폐기된 굴껍질을 회수하여 자연광에서 완전히 건조시킨 후 마쇄하였다. 이를 고온 전기로에서 800~1200℃로 회화시켜 산화칼슘을 얻었다. 이 산화칼슘을 유발(乳鉢)로 미세하게 분쇄한 후 주사형 전자 현미경(SEM; Jeol, JSM-6100)과 energy dispersive X-ray spectrometer(EDS; Link, QX-2000) 및 X-ray diffractometer(XRD; IKAKU, DMAX-2400)를 이용하여 산화칼슘의 함유량과 결정성을 확인하였다.

염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)은 앞에서 만든 산화칼슘 5.6 g에 진한 염산 17.75 ml을 가하여 만든 후 건조시켰다. 제조된 CaCl<sub>2</sub>는 수분의 흡수를 방지하기 위해 진공감압 상태로 보관하였다.



인산칼슘(CaHPO<sub>4</sub>)은 앞에서 만든 CaCl<sub>2</sub>에 같은 당량의 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 가하여 만들어진 침전을 여과하고, 남은 부분을 탈이온수로 여러 번 세정하여 탈염시킨 후 건조시켰다.



### 2. 어피 단백질 가수분해물의 조제

### 가. 어피 젤라틴의 효소적 가수분해와 가수분해도의 측정

굴껍질로부터 추출한 칼슘화합물들의 체내 흡수를 증진시키는 펩티드를 제조하기 위해 Kim 등(1997)의 방법으로 제조한 참치 유문수 유래의 가수분해효소 (TPCCE; tuna pyloric caeca crude enzyme)와 시판 효소를 사용하여 다음과 같이 가자미피 젤라틴을 가수분해시켰다. 가자미피 젤라틴을 0.3g 취하여 1%(w/v)로 되게 한 후, TPCCE는 pH 10.0, 온도 50℃, Alcalase는 pH 8.0, 온도 37℃, 그리고 이를 제외한 나머지 시판 효소 pronase E, papain,  $\alpha$ -chymotrypsin은 모두 pH 7.0, 온도 37℃로 조절한 반응액에 효소대 기질비가 1:100(w/w)로 되도록 첨가하여 시간경과에 따른 가수분해도를 측정하였다. 가수분해 반응 후, 100℃에서 효소를 불활성화시키고, 추출액은 원심분리(4,650×g, 20 min)하여 각각을 동결 건조한 후, 어피 젤라틴 펩티드(fish skin gelatin peptide; FSGP)의 시료로 사용하였다.

어피 젤라틴의 가수분해도는 Montecalvo(1981)의 방법을 수정하여 사용하였는데, 4% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액(pH 8.2) 2ml에 0.25ml의 시료를 넣은 후 0.1% TNBS(trinitro benzene sulfonic acid)를 2ml 가하고 50℃의 항온조에서 1시간 반응시켰다. 반응이 종료된 후 0.1N HCl을 4ml 가하여 반응을 종결시키고, 30분 간 방치한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 중의 유리  $\alpha$ -아미노 잔기를 측정하였다. 가수분해도는 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{\text{시료 중의 } \alpha\text{-아미노 잔기의 수}}{\text{총 } \alpha\text{-아미노 잔기의 수}} \times 100$$

### 나. 가수분해물의 아미노산 조성

펩티드의 아미노산 조성은 다음과 같이 분석하였다. 시료 40 mg을 정평한 후 6N HCl 15ml를 가하여 진공 밀봉한 다음 24시간 동안 105℃ 항온기에서 산 분해하였다. 이 산 분해물을 glass filter로 여과하고 감압 건조 과정을 거치면서 HCl을 완전히 제거한 다음, citrate buffer (pH 2.2)를 이용하여 50 ml가 되도록 한

후 아미노산 자동 분석 장치(Amino acid analyzer; 626-LC System, Waters Co.)로 분석하였다. 또한 hydroxyproline 정량은 Edwards and O'Brien(1980)의 방법을 사용하여 측정하였다.

### 3. 키토산 올리고당의 조제

#### 가. 키토산의 산 분해

키토산 1g에 12N HCl 10ml을 가하여 60℃에서 반응시간을 1, 2, 4, 6, 8시간으로 하여 분해시켰다. 반응이 끝난 후 동량의 증류수를 첨가하고 6N NaOH로 중화시킨 다음 분해되지 않은 키토산을 여과하여 제거하였다. 얻어진 여과액을 Sephadex G-15로 탈염시킨 다음 동결 건조하여 키토산 올리고당(chitosan oligosaccharides; COS)을 제조하였다.

제조된 키토산 올리고당의 조성은 HPLC로 분석하였다. 즉, 키토산 올리고당 용액 1ml(10mg/ml)을 아세토니트릴 용액 1ml과 혼합하여 그 중 20 $\mu$ l를 TSK NH<sub>3</sub>-60 칼럼(Toyo Co., 4.6 × 250 mm)에 주입하였다. 이 때 이동상은 60% 아세토니트릴로 하여 분당 0.8ml의 유속으로 흘렸다. 분리한 피크는 RI 검출기(×8 attenuation, Shodex RI-71)를 이용하여 확인하였다.

#### 나. 가수분해도의 측정

산에 의한 키토산의 가수분해도는 Blix(1948)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 6N HCl과 가수분해액을 1:1로 ampule에 넣어 105℃로 24시간 분해시킨 후 여과한 다음, 증발시켜 산을 제거하였다. 이렇게 처리한 시료 0.5ml와 acetylacetone 1.0ml를 가하여 90℃에서 1시간 반응한 후 96% ethanol 10ml와 Ehrlich's reagent 1ml를 가하고 실온에서 1시간 방치하였다. 이를 530nm에서 흡광도를 측정하여 유리 글루코사민 함량을 측정하였다. 가수분해도는 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{\text{시료 중의 글루코사민의 양}}{\text{총 글루코사민의 양}} \times 100$$

#### 4. *In vitro*에 의한 칼슘 흡수 촉진 효과

*In vitro*에 의한 시간별 칼슘 흡수 촉진 효과에 대한 측정은 內藤(1986)의 방법에 따라 인산화 칼슘(calcium phosphate) 형성에 대한 침전 저지 실험에 의하여 검토하였다. 즉, 0.2ml 시료 용액(40 $\mu$ g/ml)에 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1ml를 첨가한 후, 20mM CaCl<sub>2</sub> 0.25ml를 가하여 37 $^{\circ}$ C, 0~12시간 동안 반응시키고 원심분리(1,520 $\times$  g, 5min)하여 상층액 중의 칼슘 농도를 ICP 분광광도계(SPS 1200A plasmaspectrometer S II)로 측정하였다.

#### 5. 흰쥐(Rat)를 이용한 *in vivo*에서의 칼슘 흡수 촉진 효과

##### 가. 실험 설계 및 실험식이

##### 1) 실험 설계

단백질 가수분해물과 키토산 올리고당을 도입한 굴껍질 유래의 칼슘 화합물이 칼슘 이용성에 미치는 영향을 생체내에서 검토하기 위하여 다음과 같이 2차례에 걸쳐 실험을 하였다.

먼저 실험 I에서는 어피 젤라틴 가수분해물이 칼슘 대사에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 갓 이유한 생후 3주령의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rats, male : 서울 대학교 실험 동물 사육장에서 구입) 48마리에게 3주간 칼슘 결핍 식이(Ca-deficient diet)를 급여시켜 칼슘 결핍을 유도하였고(basal), 이후 3주간 칼슘이 첨가된 실험식이를 제공하였다. 실험식이 군은 대조군(control)을 포함하여 무첨가군, 1% 및 3% 가수분해물 첨가군의 7군(대조군을 제외한 나머지 각 군은 칼슘 공급원으로 굴껍질 유래의 CaCl<sub>2</sub>와 CaHPO<sub>4</sub>로 나누어서 식이 제공)으로 완전 임의 배치법으로 1군당 6마리씩 나누었다.

실험 II에서는 키토산 올리고당이 칼슘 대사에 미치는 영향을 검토하기 위하

여 갓 이유한 생후 3주령의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawly rats, male : 서울 대학교 실험 동물 사육장에서 구입) 48마리에게 동일한 실험 I 과 동일한 방법으로 칼슘 결핍을 유도하였고(basal), 이후 3주간 칼슘이 첨가된 실험식을 제공하였다. 실험식이 군은 대조군(control)을 포함하여 무첨가군, 1% 및 3% 키토산 올리고당 첨가군의 7군(대조군을 제외한 나머지 각 군은 칼슘 공급원으로 굴껍질 유래의  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{CaHPO}_4$ 로 나누어서 식이 제공)으로 완전 임의 배치법으로 1군당 6마리씩 나누었다.

실험 동물은 모두 Shoe-box cage에서 사육하였으며, 사육실의 환경은 일정하게 유지하였다(온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대 습도  $65 \pm 5\%$ , 조명 6:00 a.m.-6:00 p.m.). 실험식와 탈이온수는 완전 자유 급식법 (ad libitum)으로 공급하였으며, 실험 기간동안 2일마다 일정한 시각에 식이 섭취량과 체중 증가량을 측정하였다. 또 실험 종료 전 4일간의 대사 실험을 수행하였다.

## 2) 실험식이

실험 I 과 실험 II에 사용된 식이는 정제식으로 대체로 AIN-76 조성을 따랐다 (Table 1, 2). 실험식이의 원료로는 질소급원으로 대두 단백질(isolated soy protein, ISP : PP500E, Ralston Purina International Co.), 옥수수 전분(미원식품(주)), 옥수수 기름(동방유량(주)), 비타민 혼합물(AIN-76; Oriental 酵母工業(주), 東京)과 칼슘을 결핍시킨 무기질 혼합물(AIN-76)이 포함되어 있었다. 칼슘 공급원으로는 시판  $\text{CaCO}_3$ , 굴껍질 유래의  $\text{CaCl}_2$  및  $\text{CaHPO}_4$ 를 사용하였으며, 식이 중 칼슘 함유량은 0.51% 되도록 조정하였고, 식이 중 칼슘과 인의 함량 비는 대략 1.3:1이 되도록  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하여 조정하였다.

### 나. 시료 수집

실험 최종일에 실험 동물을 12시간 절식시킨 후 식이를 1.5시간 동안 급여시켰다. 식이 섭취 종료 1시간 후, diethyl ether로 마취하여 시료를 채취하였다.

Table 1. Composition of diets in Exp. I (g/kg)

Ingredients	Basal (Ca absent)	Control (CaCO <sub>3</sub> )	Non addition		FSGH			
					1%		3%	
					CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>
ISP	200	200	200	200	200	200	200	200
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3
Starch	562.5	550.01	547.65	563.03	537.65	553.03	517.65	533.03
Fiber	50	50	50	50	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Min. mix. <sup>4)</sup>	35	35	35	35	35	35	35	35
Vit. mix. <sup>5)</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10
Choline chloride	2	2	2	2	2	2	2	2
PEG #4000	20	20	20	20	20	20	20	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.5	17.5	17.5	-	17.5	-	17.5	-
FSGH <sup>6)</sup>	-	-	-	-	10	10	30	30
CaCO <sub>3</sub> <sup>3)</sup>	-	12.49	-	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> <sup>5)</sup>	-	-	14.85	-	14.85	-	14.85	-
CaHPO <sub>4</sub> <sup>6)</sup>	-	-	-	16.97	-	16.97	-	16.97

1) Calcium-free mineral mixture(AIN-76)

2) Vitamin mixture(AIN-76)

3) FSGH : Fish skin gelatin hydrolysates

4) CaCO<sub>3</sub>(commercial) contained 40.04% Ca

5) CaCl<sub>2</sub>(calcium from oyster shell) contained 36.11% Ca

6) CaHPO<sub>4</sub>(calcium from Oyster shell) contained 29.46% Ca

Table 2. Composition of diets in Exp. II (g/kg)

Ingredients	Basal (Ca absent)	Control (CaCO <sub>3</sub> )	Non addition		COS			
			CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	1%		3%	
			CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	CaHPO <sub>4</sub>
ISP	200	200	200	200	200	200	200	200
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3
Starch	562.5	550.01	547.65	563.03	537.65	553.03	517.65	533.03
Fiber	50	50	50	50	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100	100	100	100	100
Min. mix. <sup>1)</sup>	35	35	35	35	35	35	35	35
Vit. mix. <sup>1)</sup>	10	10	10	10	10	10	10	10
Choline chloride	2	2	2	2	2	2	2	2
PEG #4000	20	20	20	20	20	20	20	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.5	17.5	17.5	-	17.5	-	17.5	-
COS <sup>2)</sup>	-	-	-	-	10	10	30	30
CaCO <sub>3</sub> <sup>1)</sup>	-	12.49	-	-	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> <sup>1)</sup>	-	-	14.85	-	14.85	-	14.85	-
CaHPO <sub>4</sub> <sup>1)</sup>	-	-	-	16.97	-	16.97	-	16.97

1) See <Table 1> in details.

2) COS : Chitosan oligosaccharides

### 1) 혈액

경동맥에서 채취한 혈액은 24시간 동안 냉장고(4℃)에 방치한 후 원심분리(850 ×g, 20 min; Sorvall, GLC-2B)하여 혈청을 얻었다. 혈청은 분석할 때까지 -20℃ 이하에서 냉동 보관하였다.

### 2) 대퇴골

양쪽 대퇴골을 적출하여 부착되어 있는 근육, 인대, 지방 등을 전부 제거하고 길이와 무게를 측정하였다. 측정 후, 다른 분석을 할 때까지 냉동 보관하였다.

### 3) 뇨와 분

실험 종료전 4일간 매일 동일한 시간에 24시간 동안 수집된 뇨(urine)를 채취하여 부피를 측정하고, 0.1% HCl을 소량 넣어준 후 냉동 보관하였다.

뇨와 동일한 기간동안 분(feces)을 채취하여 무게를 측정하였다. 수집된 분은 냉동건조(Freeze-dryer 18, Labconco) 시켜 총 건조량을 측정한 뒤 분석할 때까지 냉동 보관하였다.

## 가. 시료 분석

### 1) 혈중 칼슘 및 무기인 농도

혈청은 해동시킨 후 혈액 자동 분석기(Fully Automated Dry Chemistry System; ARKRAY, SP-4410; Kyoto Daiichi Kagaku Co. LTD.)를 이용하여 혈중 칼슘, 무기인 함량을 측정하였다.

### 2) 뼈조직의 강도와 무기질 함량

대퇴골의 강도는 Instron(Instron Universal Testing Instrument, Model 1011)을 이용하여 대퇴골의 일정 부위 즉, 길이의 중간 부위에서 뼈의 파단력(breaking

force)을 측정하였다. Load range를 20 kg로 하여 100 mm/min의 속도로 측정하였다.

대퇴골의 칼슘 함량은 550~600℃ 회화로에서 6~8시간 동안 회화시켜 얻은 회분을 6N HCl 용액으로 용해한 후 0.2%  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액으로 희석하여 원자 흡광 광도계(AA-6401F, SHIMADZU Co.)로 측정하였다.

인의 함량은 시료의 전 처리는 대퇴골 칼슘의 전 처리와 동일하게 하였으며, 탈이온수로 희석하여 Fisk와 Subbarow 방법(1925)을 이용하여 비색정량하였다.

## 2) 뇨와 분의 칼슘 함량

뇨는 원심분리(850×g, 30min)하여 불순물을 제거한 후, 일정량을 취하여 wet ashing하여 전 처리 한 후, 0.2%  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액으로 희석하여 원자 흡광 광도계로 측정하였다.

분은 550~600℃ 회화로에서 6~8시간 동안 회화시켜 얻은 회분을 6N HCl 용액으로 용해한 후 0.2%  $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  용액으로 희석하여 원자 흡광 광도계로 측정하였다.

## 라. 통계분석

모든 결과는 평균±표준 오차(mean±SE)로 제시하였다. 실험식이 각각의 평균값을 비교하였으며, 유의성 검정은  $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## 제 3 장 결과 및 고찰

### 제 1 절 굴껍질 유래의 칼슘염 조제

굴껍질로부터 고온 전기로에서 800~1200℃의 여러 온도로 처리하여 만들어진 산화 칼슘 결정의 모양과 함량을 SEM과 EDS를 사용하여 측정하였다(Fig. 1, 2, 3). 이 중 칼슘 함량에 관한 것만을 Fig. 4에 나타내었다. 먼저 Fig. 1과 Fig. 2의 EDS를 보면 800℃에서 처리한 산화 칼슘은 94%로 다소 낮은 순도를 보인 반면, 고온 처리, 특히 1200℃로 처리한 경우의 산화 칼슘은 98.6%로 가장 높은 순도를 나타내었고, 그 외 불순물로 산화 규소와 산화 마그네슘 등이 각각 0.9%, 0.5%로 극히 낮게 함유되어 있었다. 또한 SEM을 이용하여 산화 칼슘의 표면을 조사하였다. 여기서도 1200℃의 경우가 결정성이 가장 우수한 것으로 판명되었다. 그리하여 이후의 실험에 사용될 굴껍질은 1200℃에서 1시간 회화시킨 것을 사용하여 산화 칼슘을 제조하였다.

굴껍질로부터 800℃와 1200℃로 처리하여 제조한 산화 칼슘을 XRD로 검토한 결과(Fig. 5, 6), SEM 및 EDS에서와 마찬가지로 1200℃에서 제조한 산화 칼슘은 표준 산화 칼슘과 완전히 동일한 피크를 나타내었다.

현재 천연에서 제조되는 칼슘 공급원은 주로 소의 뼈(이 등, 1992; 岡野, 1991), 산호(本田, 1987), 식용 난·패각 및 진주패각으로부터 얻어지며(Rabon 등, 1990) 굴껍질 유래의 칼슘 공급원(Hamilton 등, 1984; Greger 등, 1987; Karen과 David, 1990)도 현재 몇 가지가 알려져 있다. 그러나 이러한 칼슘 공급원은 대부분 원료를 그대로 이용하므로 그 외 다른 용도로의 사용이 어렵다. 그런데 최근에는 화학적으로 처리된 칼슘 공급원의 제조가 활발히 진행되고 있다.菅野(1990)는 가축의 뼈를 산 및 알칼리로 처리하여 단백질이나 다른 불순물을 제거한 후 미세한 입자성과 고순도를 갖는 기능성 소재를 만들어 여러 식품에 대한 첨가 물질

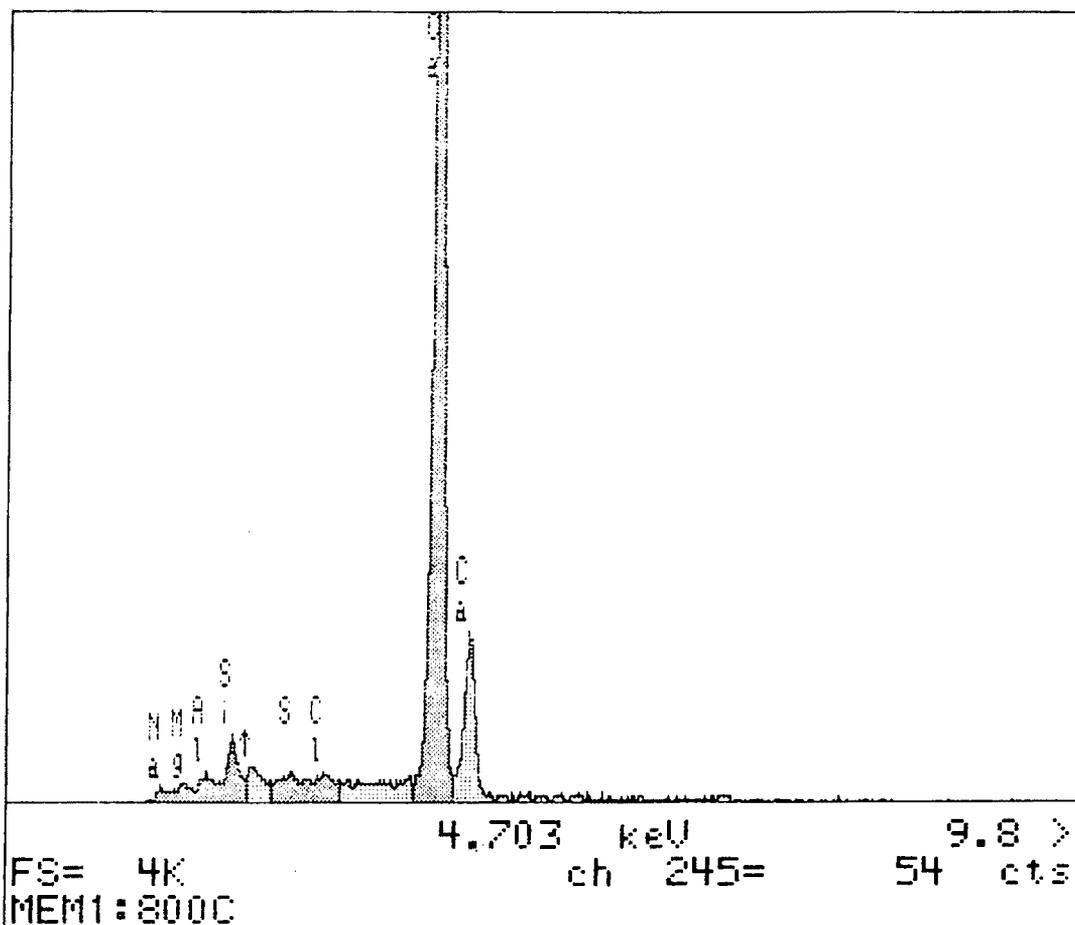


Fig. 1. EDS of calcium oxide from oyster shell by treatme of 800°C.



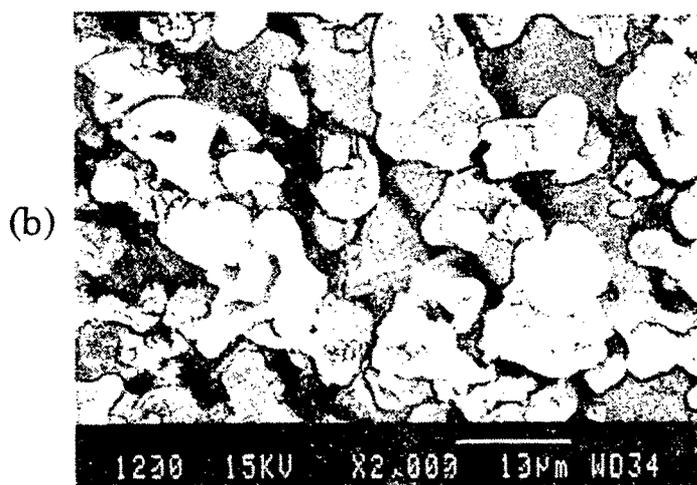
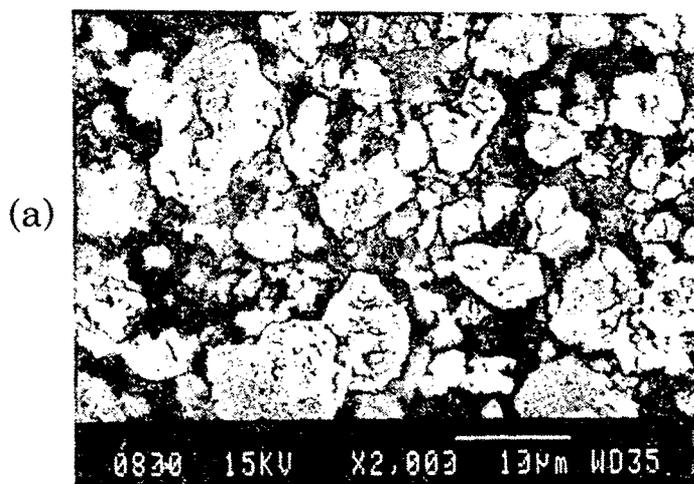


Fig. 3. SEM of Calcium oxide from oyster shell by heat treatment.

(a) 800°C treatment (b) 1200°C treatment

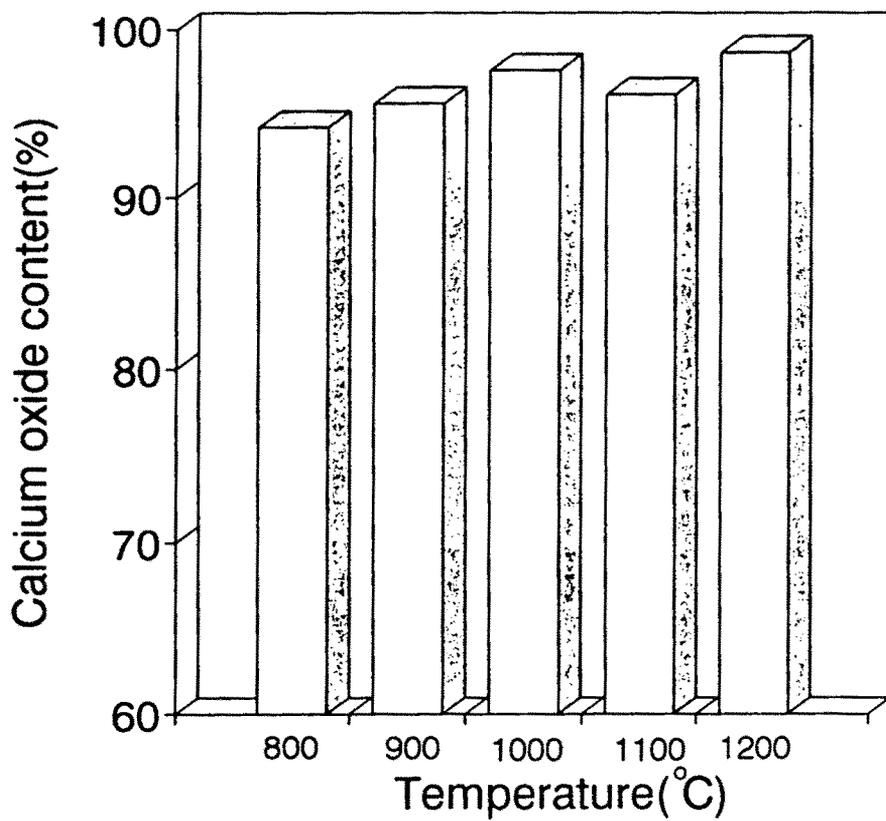


Fig. 4. Content of calcium oxide from oyster shell by heat treatment.

로 사용을 검토하였다. 또 굴껍질을 칼슘 공급원으로 이용할 경우 장내에서 급격한 이온화가 유발되어 소화 장애가 발생하는데, Fujita 등(1993)은 이를 막기 위해 굴껍질과 유기질 매트릭스를 함께 고온에서 전기 분해시켜 굴껍질 전기 분해물(oyster shell electrolysate: OSE)을 제조하여 이것을 쥐에게 섭취시켰을 때, 뼈 무기질의 함량이 증가하였다고 보고하였다.

본 실험의 결과에서 볼 수 있듯이 굴껍질은 칼슘 화합물로서의 제조 방법이 단순하며, 고순도를 가진 여러 가지의 칼슘 화합물을 만들 수 있다는 잇점이 있으므로 앞으로 손쉽게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

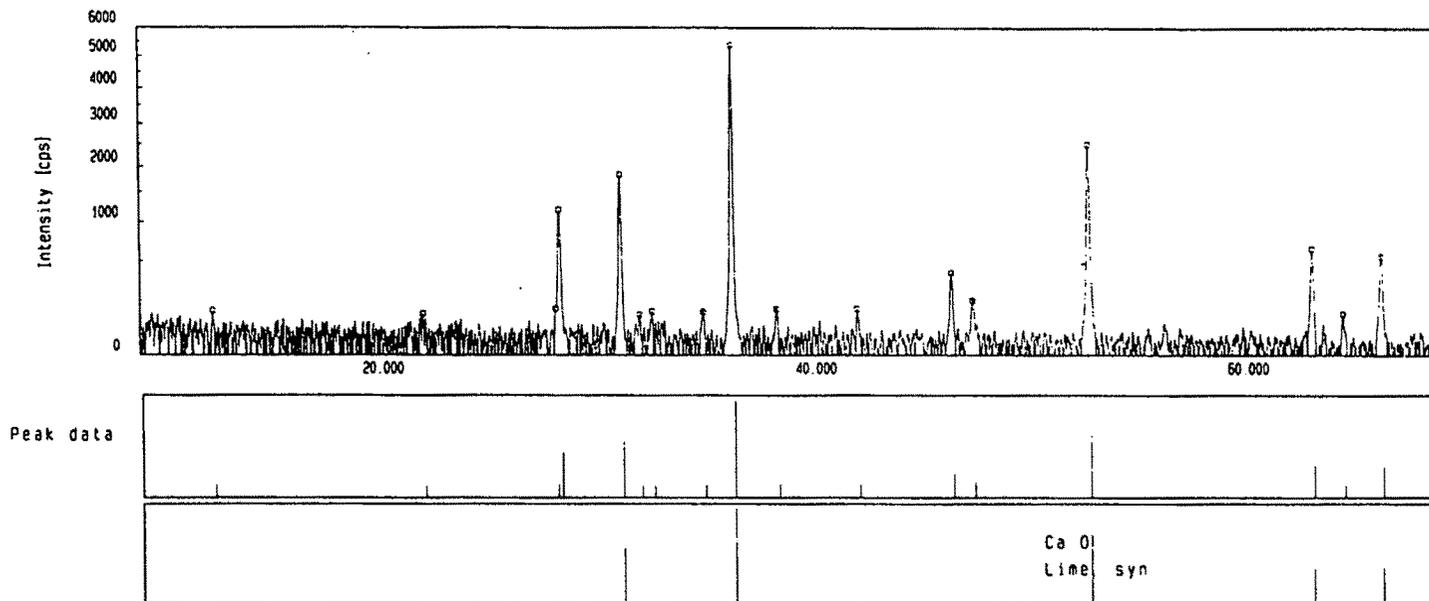


Fig. 5. XRD pattern of calcium oxide and oyster shell by treatment of 800°C.

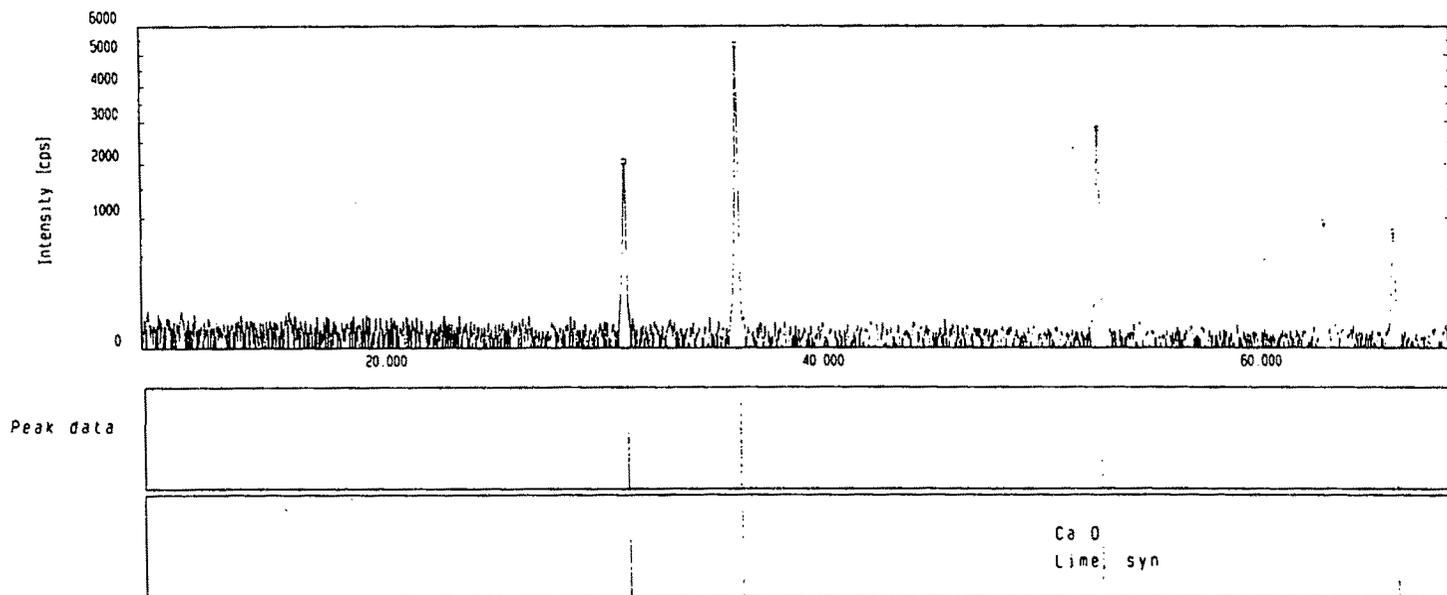


Fig. 6. XRD pattern of calcium oxide and oyster shell by treatment of 1200°C.

## 제 2 절 어피 단백질의 가수분해

### 1. 어피 젤라틴의 가수분해도

참치 유문수 유래의 조효소(TPCCE)와 시판 효소를 사용하여 가자미피 젤라틴을 기질로 사용한 효소적 가수분해에서, 시간의 변화(1, 2, 4, 6, 12, 24시간)에 따른 가수분해도를 비교하였다. Fig. 7에서 나타난 결과와 같이 TPCCE는 반응시간이 2시간까지는 가수분해도가 증가하여 약 38%의 가수분해율을 보였으며, 그 이후 증가 속도가 둔화되어 24시간 분해 후 약 43%에 도달하였다.

시판용 효소의 경우 protease E가 65%로 가장 높은 분해 활성을 보였으며 참치 유문수 유래 조효소보다도 높았다. 그러나 나머지 시판 효소인 Alcalase,  $\alpha$ -chymotrypsin, papain 등은 각각 40%, 24%, 32%로 TPCCE 보다는 활성이 낮은 것으로 나타났다. 여기서 주목할 만한 사실은 참치 유문수에서 직접 추출하여 사용한 TPCCE는 부분 정제된 조효소 상태로 사용되었음에도 불구하고 시판 단백질 분해효소와 비교해도 전혀 손색이 없었다는 것이다. 이러한 결과는 어류에서 유래한 단백질을 가수분해하는 데에는 어류에서 유래한 단백질 분해효소가 보다 효율적이라는 사실을 암시해 주고 있다(Ooshiro, 1971; Ramakrishna 등, 1987).

또한 각각의 효소를 사용하여 1, 2, 4, 6, 12시간 동안 가수분해시켜 얻은 가수분해물들을 인산칼슘 침전 저지실험에 대한 저해제로 사용하기 위해 동결건조하여 보관하였다.

### 2. 어피 젤라틴의 가수분해물의 아미노산 조성

어피 젤라틴 펩티드(FSGP)의 아미노산 조성은 Table 3과 같이 나타났다. Glu, Gly, Ala, Pro, Hyp의 함유량은 각각 9.53, 25.74, 8.76, 9.84, 11.01%으로 전체 아미노산 함량의 64.88%를 차지하였으며, collagen 유래의 Hyp를 많이 함유하고 있

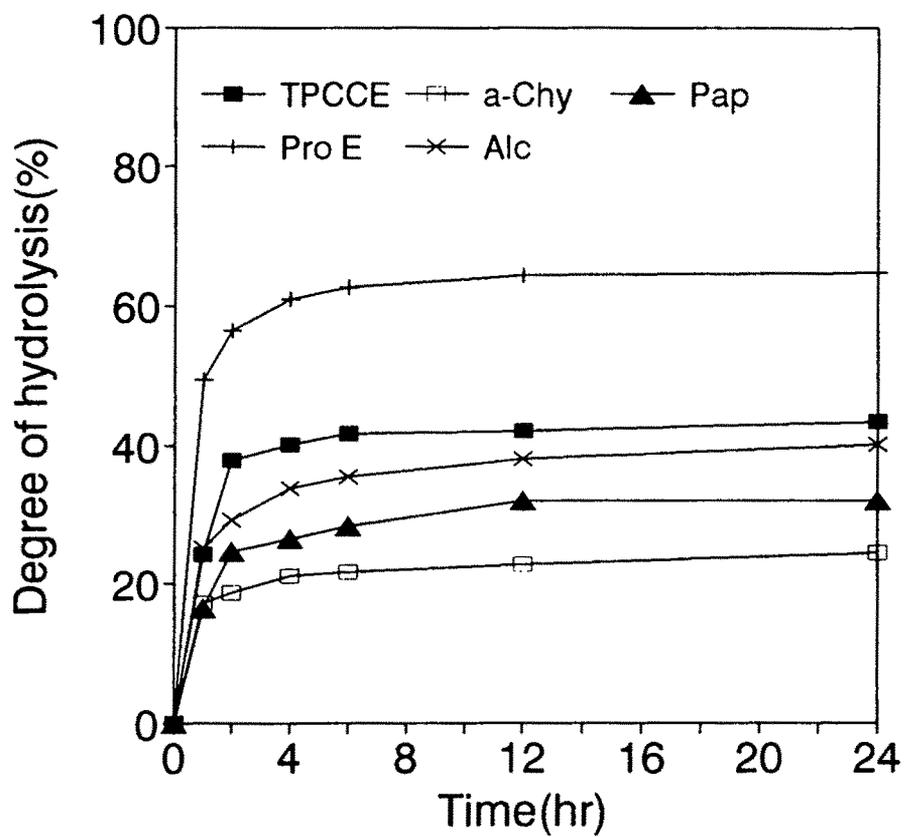


Fig. 7. Degree of enzymatic hydrolysis for fish skin gelatin

Table 3. The amino acid composition of fish skin gelatin peptides(FSGP).  
(g-A.A/100g-protein)

Amino acid	FSGP
Aspartic acid	6.02
Glutamic acid	9.53
Serine	5.61
Glycine	25.74
Histidine	0.00
Arginine	7.41
Threonine	2.26
Alanine	8.76
Proline	9.84
Tyrosine	0.51
Valine	2.01
Tryptophan	0.00
Methionine	1.97
Cysteine	0.00
Isoleucine	1.15
Leucine	2.33
Phenylalanine	2.14
Lysine	3.71
Hydroxyproline	11.01
Total amino acid	100.00

었다. Asp, Glu과 같은 산성 아미노산의 함량은 15.55% 였으며, Arg, Lys과 같은 염기성 아미노산의 함량은 11.12%로 나타났으며, 이는 강 등(1992)이 보고한 가자미피 젤라틴의 아미노산 분석과 유사한 결과를 나타내었다.

아미노산들 중 칼슘의 흡수에 관여하는 아미노산으로는 산성 아미노산과 염기성 아미노산을 들 수 있다. 보통 산성 아미노산은 칼슘과 쉽게 이온결합을 형성하는데, Yamamoto 등(1994)에 의하면 Glu가 여러 개 중합된 oligo- 및 poly-Glu가 *in vitro* 실험에서  $\text{CaHPO}_4$ 의 형성을 저지하는데 뛰어난 효과를 나타낸다고 보고하였다.

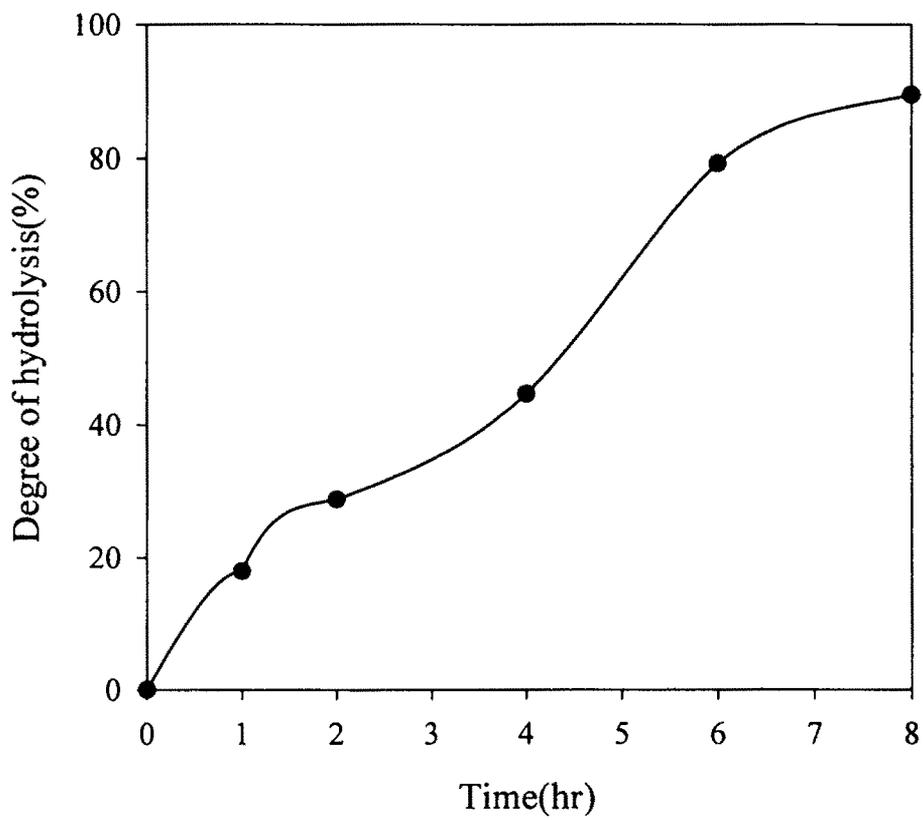
또한 Arg, Lys 같은 염기성 아미노산도 칼슘과 킬레이트 결합하여 칼슘의 흡수를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. Dupuis 등(1981)은 Lys이 소장내 막단백질과 ATP를 사용하여 경쟁적으로 인산화되는데, 만일 Lys의 농도가 경쟁적으로 증가하게 되면 막단백질의 인산화를 저해하여 소장 상피 세포에서의 칼슘 흡수를 증가시킨다고 보고하였다. 한편, Wasserman 등(1956)은 쥐에게 방사선 동위원소인  $^{45}\text{Ca}$ 를 사용하여 각종 아미노산에 대한 흡수 효과를 검토한 결과 L-Lys과 L-Arg이 높은 효과를 나타내었다고 보고하였다.

그러므로 Table 3에서도 잘 나타났듯이 어피 젤라틴 펩티드는 산성 아미노산과 염기성 아미노산을 다량 함유하고 있어, 굴껍질 유래 칼슘 공급원에 대한 칼슘 흡수 촉진제로서의 가능성을 보여주었다.

### 제 3 절 키토산 올리고당의 제조

칼슘의 체내 흡수를 증가시키기 위하여 키토산을 선정하여 이것을 60°C에서 12N HCl로 시간 경과에 따라 산 가수분해를 하여 그 가수분해도를 Fig. 8에 나타내었다. 키토산 올리고당(COS)은 시간에 따라 계속적인 증가를 보였으며 8시간 분해 후에 가수분해도가 약 80%에 도달하였다. 또한 가수분해 시간의 경과에 따라 생성된 키토산의 올리고당 조성을 TSK NH<sub>3</sub>-60 칼럼의 HPLC로 검토한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 대체로 단당류인 글루코사민(COS-1)과 aimer(COS-2), trimer(COS-3) 등은 시간의 경과에 따라 계속적으로 증가함을 나타내었는데, 이는 고분자인 키토산이 시간이 지남에 따라 산에 의해 분해되어 단당류로 바뀌어 가는 것을 나타낸 것이다. Tetramer (COS-4)는 시간에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나, 6시간 분해시 단당류로의 분해 진행과 고분자인 키토산으로부터 pentamer(COS-5), hexamer (COS-6)가 급격히 많아져 그 함유량이 많이 감소되는 것을 보였다. 또한 6시간 분해시 키토산으로부터 가장 많은 양의 hexamer가 생성되어 가장 높은 함유량을 나타내었으며, 6시간이 경과한 후에는 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다.

최근 키토산 올리고당의 생리활성에 많은 관심이 모아지고 있는데, 특히 키토산 올리고당이 hexamer인 것은 높은 항암 활성과 항균활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Suzuki, 1986). 또한 키토산 및 그 올리고당은 중금속에 대한 킬레이트성 흡착 효과가 있는 것으로 보고되고 있어(이 등, 1994) 이들과 칼슘과의 결합 가능성을 시사해 준다.



**Fig. 8. Degree of acid hydrolysis of chitosan.**

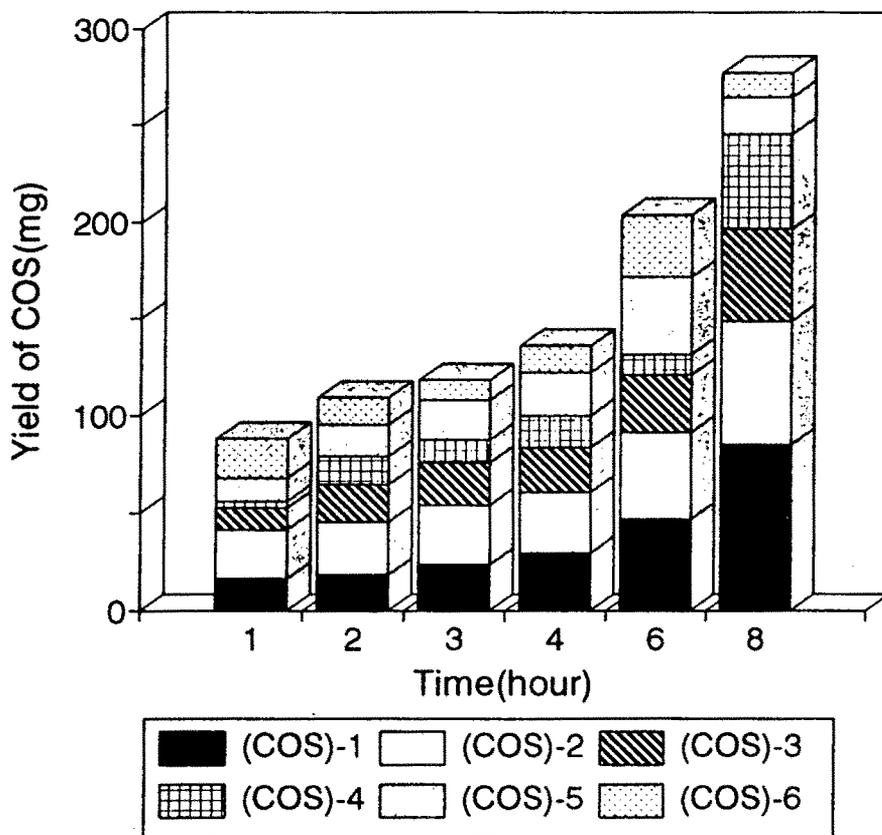


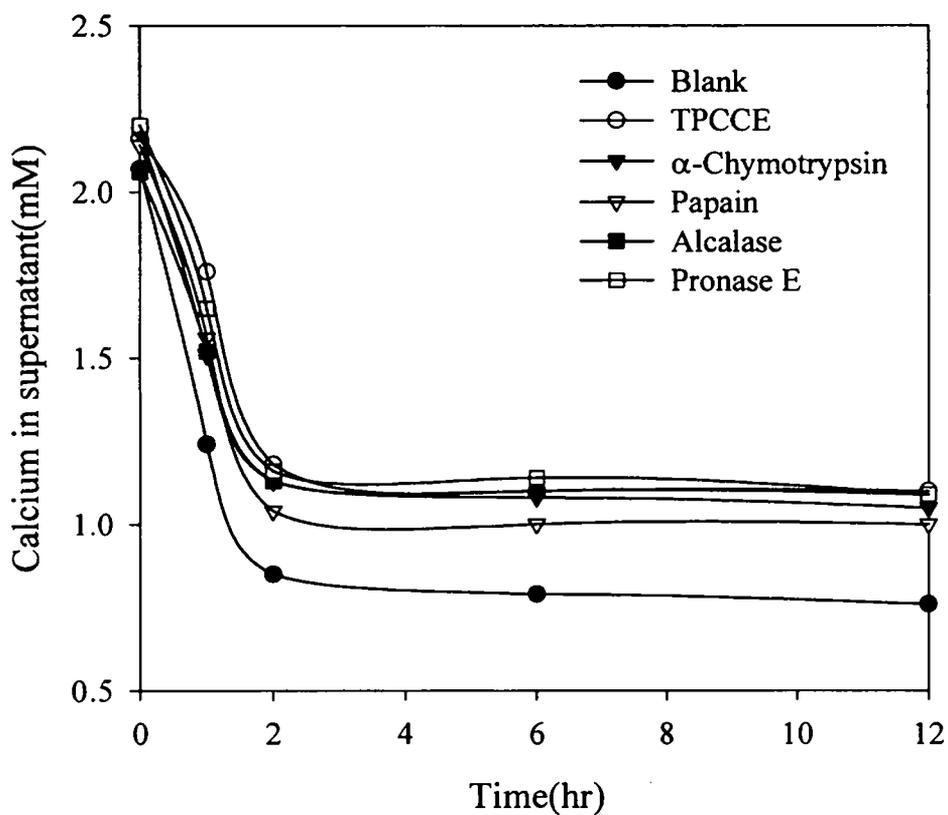
Fig. 9. The yield of COS produced by acid hydrolysis of the chitosan at 60°C.

## 제 4 절 *In vitro*에 의한 칼슘흡수촉진 효과

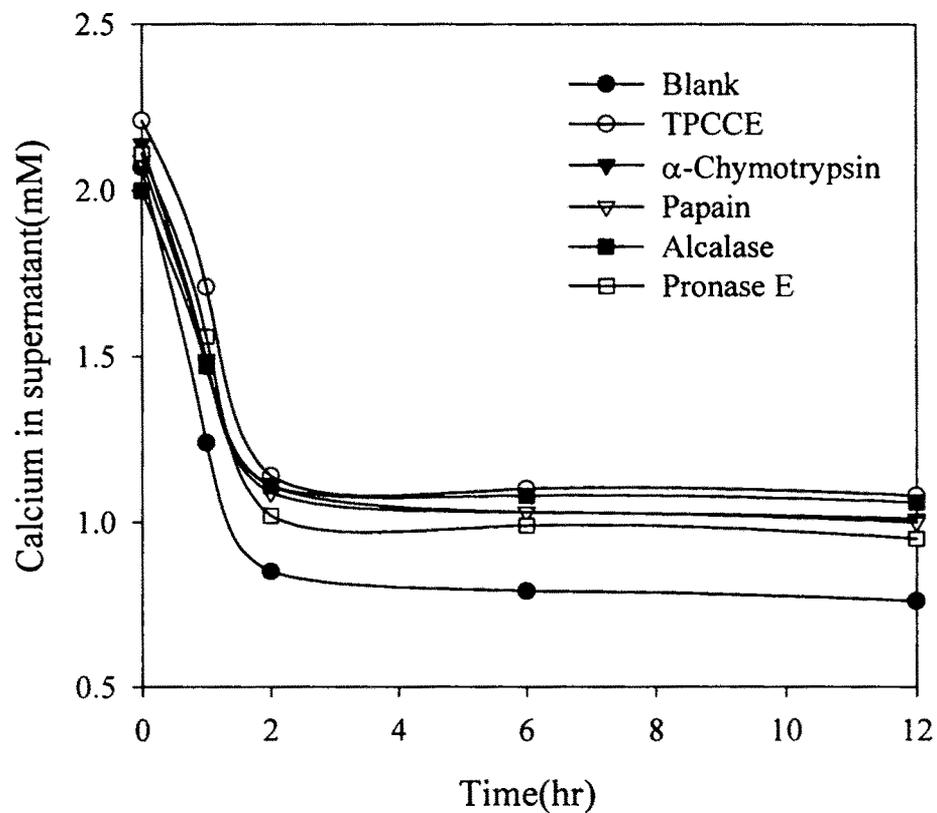
일반적으로 체내에 섭취된 칼슘은 장관에서 흡수되는 단계를 거쳐야 한다. 이렇게 섭취된 칼슘은 위산에 의해 가용화되어 소장 하부로 이동하는데, 이 때 가용성 칼슘은 소장 내부에 존재하는 인산이온과 결합하여 침전을 형성한다(Kitts와 Yuan, 1992). 따라서 칼슘이 소장 부위에서 침전되지 않고 체내로 흡수되기 위해서는 칼슘과 결합할 수 있는 물질이 필요하다. 어피 젤라틴 펩티드의 아미노산 조성을 보면 산성 아미노산과 염기성 아미노산의 조성이 각각 전체의 15.55% 및 11.12%를 차지하고 있어 칼슘 흡수를 촉진시키는 효과가 기대되므로, 이에 대해 *in vitro*에서  $\text{CaHPO}_4$  침전 저지 실험으로 그 효과를 검토하였다. 즉 20 mM의  $\text{CaCl}_2$  0.25ml에 각종 단백질 분해효소로 만든 젤라틴 가수분해물을 첨가한 후 20 mM의  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1ml를 첨가하여 0~12시간 후 원심분리하여 칼슘 농도를 ICP로 분석한 결과를 Fig. 10, 11, 12, 13, 14에 나타내었다.

시간의 경과에 따른 가수분해물의 인산 칼슘 침전 저지능을 살펴보면, 사용된 가수분해물 시료는 모두 2시간까지는 상층액의 칼슘농도가 급격하게 감소한 것으로 보아 인산칼슘 형성에 소요되는 반응시간은 2시간인 것으로 나타났다. 그 이후 12시간 까지 반응시간이 경과하여도 칼슘의 농도는 거의 변화가 없었다.

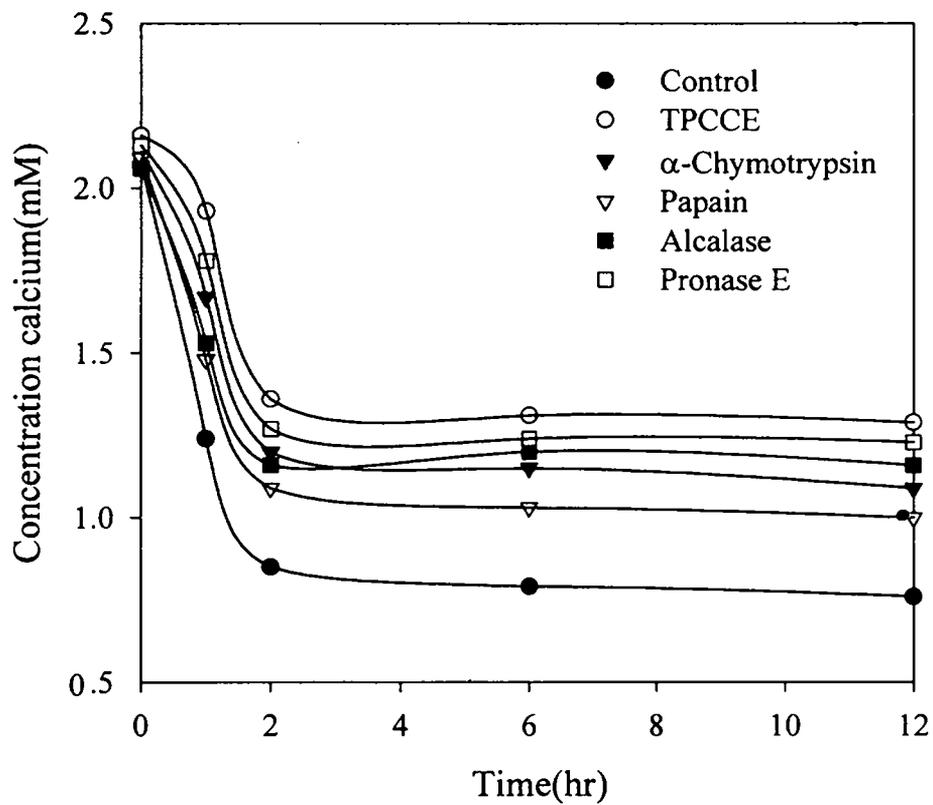
참치 유문수 유래 조효소와 시판 효소를 사용하여 어피 젤라틴을 효소적 가수분해한 것을 보면 대체로 4시간 동안 가수분해시킨 가수분해물이 높은 인산 칼슘 침전 저지 효과를 보였다. 또한 시판 효소보다는 참치 유문수로부터 추출한 TPCCE를 사용하였을 때가 특히 높은 효과를 보였는데, 이것은 무첨가시보다 약 70%의 증가 효과를 보였다. 이는 가수분해물을 첨가한 것이 무첨가 보다 뛰어난 인산 칼슘 침전 저지 효과를 나타내고 있음을 보여주었다. 따라서 이러한 결과로 볼 때 어피 젤라틴은 적당한 크기로 분해되었을 때 칼슘 흡수 효과가 높은 것으로 보인다.



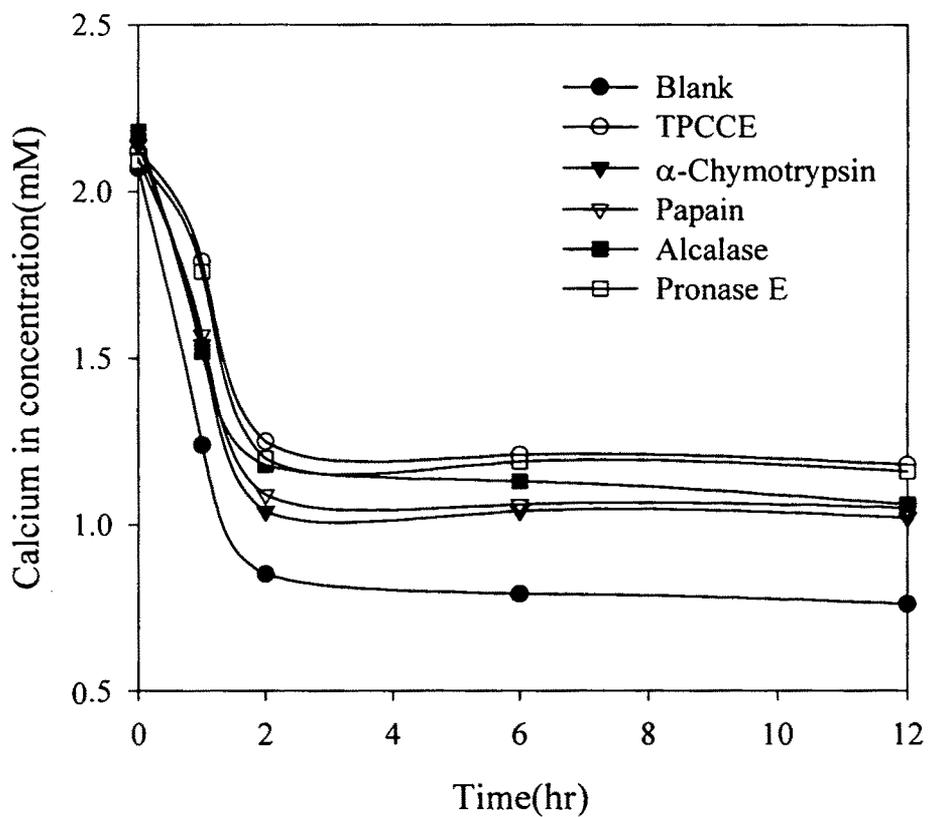
**Fig. 10. Calcium absorption effect of FGH-1h, hydrolysis of fish gelatin for 1hr, on various times.**



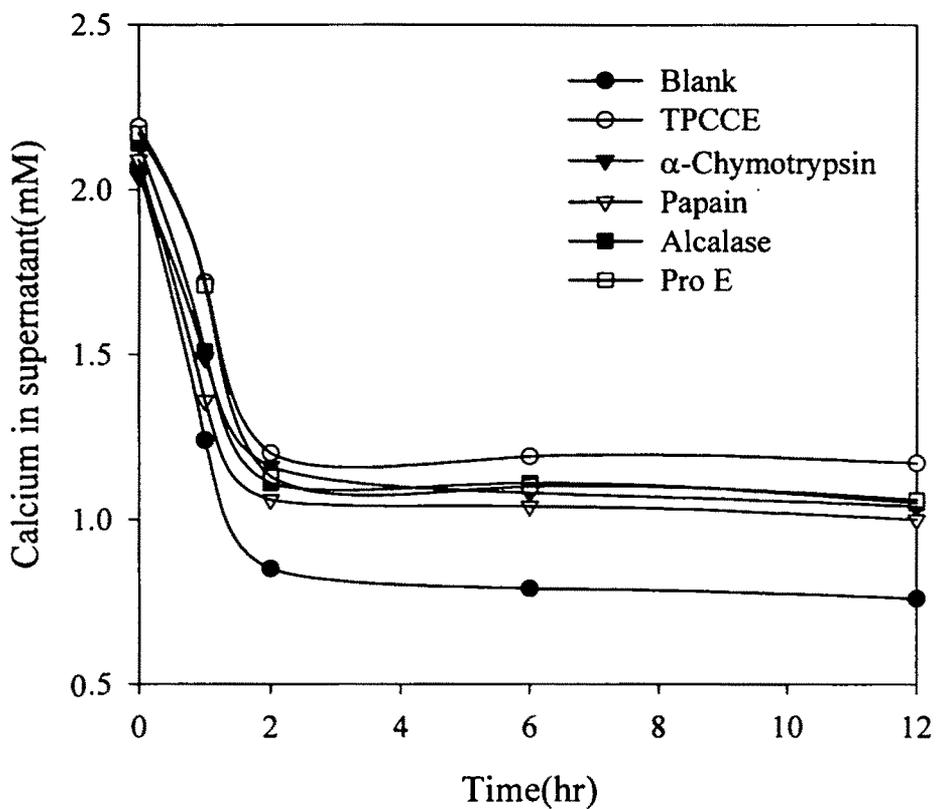
**Fig. 11. Calcium absorption effect of FGH-2h, hydrolysis of fish frame gelatin for 2hr, on various times.**



**Fig. 12. Calcium absorption effects of FGH-4h, hydrolysis of the fish gelatin for 4 hr, on various enzymes.**



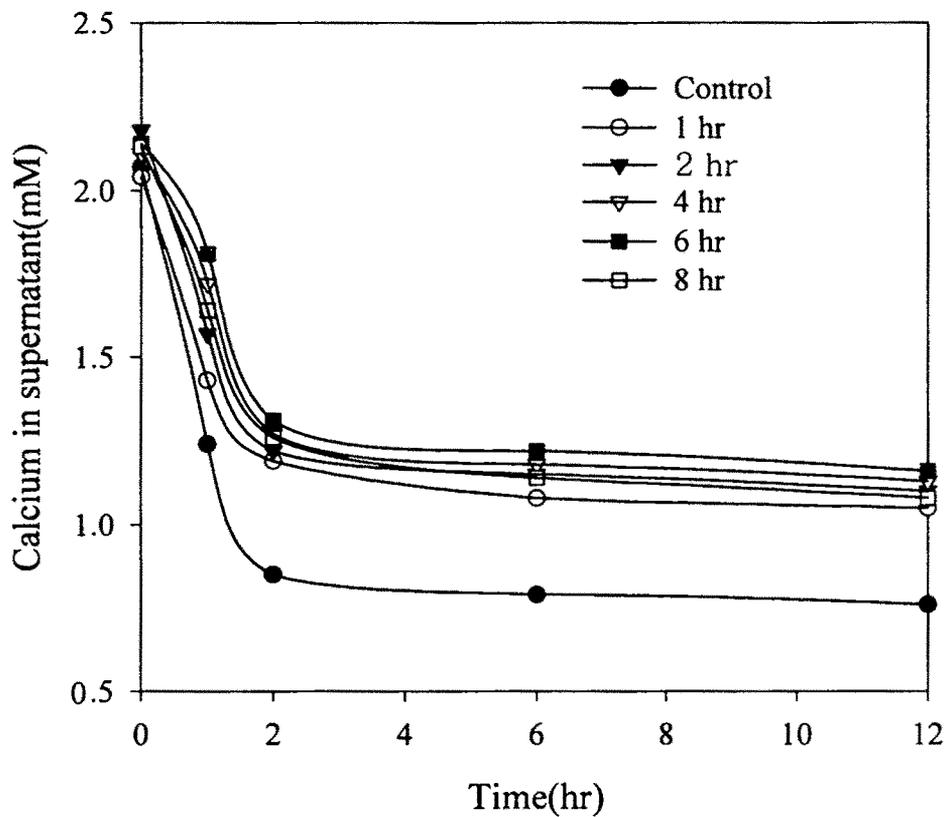
**Fig. 13. Calcium absorption effects of FGH-6h, hydrolysis of fish gelatin for 6hr, on various times.**



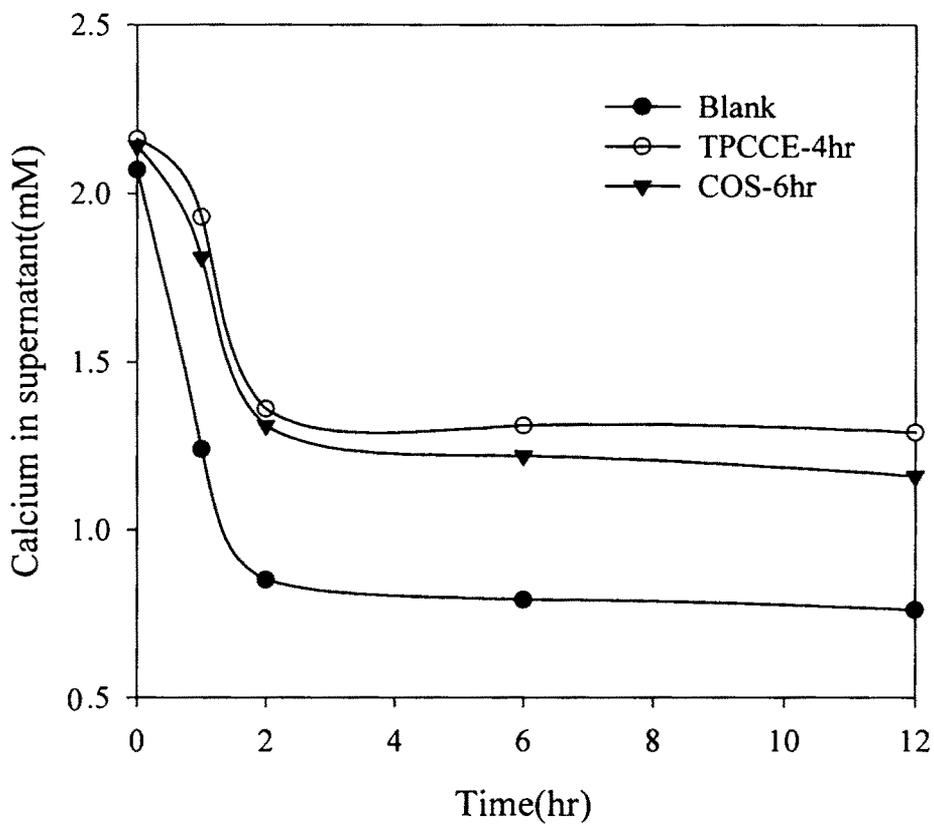
**Fig. 14. Calcium absorption effects of FGH-12h, hydrolysis of fish gelatin for 12hr, on various times.**

키토산을 이용하여 올리고당의 칼슘 흡수 효과를 위와 같이 인산화 칼슘 형성 저지 실험으로 검토한 결과(Fig. 15), 키토산 올리고당의 첨가시 무첨가보다 약 30~50% 높은 효과를 보였으며 그 중 키토산은 6시간 분해하였을 경우가 가장 우수하였다. 伊藤(1995)에 의하면 키토산은 전체가 양으로 하전되어 있으므로 소장내 칼슘 불용화를 유발하는 인산(phosphate), 수산(oxalate), 피틴산(phytate)과 같이 음으로 하전된 것들과 결합하여 체외로 배출시킨다고 하였다. 또 키토산은 칼슘과 배위결합할 수 있는 아미노기를 분자 내에 포함하고 있으므로 체내 흡수가 잘 되는 올리고당의 상태로 존재하게 된다면 체내 칼슘의 흡수량을 증가시킬 수 있다.

어피 젤라틴 가수분해물을 TPCCE로 4시간 분해하였을 경우와 키토산을 12N HCl로 6시간 분해한 것과 비교하였을 때(Fig. 16), TPCCE로 분해한 어피 젤라틴 가수분해물이 20% 더 높은 효과를 보였다. 이러한 결과는 젤라틴에 포함되어 있는 산성 아미노산인 Glu와 Asp의 함량이 키토산 올리고당 내에 포함된 칼슘과 배위결합할 수 있는 비공유 전자쌍을 가지는 아민기(-NH<sub>2</sub>)의 함량 보다 많기 때문인 것으로 판단되었다.



**Fig. 15. Calcium absorption effects of COS on various times**



**Fig. 16. Calcium absorption effects of FGH and COS on various times.**

## 제 5 절 *In vivo*에 의한 칼슘흡수촉진 효과

굴껍질로부터 제조한 칼슘 화합물에 대한 명확한 생체내 흡수 효과를 검증하기 위하여 흰쥐를 칼슘 결핍 식이로 3주간 결핍시킨 다음, 굴껍질 유래 칼슘 화합물들( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ )을 어피 젤라틴 가수분해물과 키토산 올리고당과 같은 칼슘흡수촉진 물질과 함께 급여시킴으로써 체내 칼슘 대사 및 생물학적 이용성에 대하여 검토하였다.

### 1. 성장, 식이 섭취량 및 식이 효율

각각의 실험식이에 따른 실험 개시와 종료 시의 체중, 1일 식이 섭취량 및 증체량 그리고 식이 효율을 Table 4, Table 5에 나타내었다. 3주간의 결핍 식이를 제공한 후 실험을 개시했을 때, 전체 군에 대한 최초 무게는 유의적인 차가 없었으나 종료 시에는 각 실험 군별로 유의적인 차가 있었다. 실험 I의 경우 종료 시의 체중은 대체로 염화 칼슘을 섭취한 군들에서 낮게 나타났다. 또 식이 효율 (FER)에 있어 1% 가수분해물을 섭취한 군이 유의적으로 낮게 나타났는데, 이는 적은 양의 식이 섭취 때문이었다. 또한 올리고당을 대상으로 한 실험 II에서도 동일한 결과로 나타났다. 여기서도 섭취량이 낮은 군에 대해서만 전체적으로 유의성이 나타남을 알 수 있었다. Stauffer 등(1973)에 의하면 숫쥐에게 0.01%와 0.6%의 칼슘을 공급하였을 때 식이 섭취량과 체중이 감소한다고 하였다. 그러므로 식이 섭취량의 변화는 체중과 식이 효율에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

小林 등(1987)과 Tsugawa 등(1995)도 탄산칼슘, 인산 칼슘 등의 여러 가지 칼슘 화합물을 쥐에게 섭취시켰을 때 체중에는 별 영향을 주지 않았다고 보고하였다. 그러나 岡野 등(1991)은 칼슘 공급원으로 소뼈 분말을 섭취시켰을 때 높은 체중의 증가가 발생했다고 보고하였다.

Table 4. Effect of the addition of fish skin gelatin peptides(FSGP) on body weight, food intake, and food efficiency ratio in calcium deficient induced rats.

	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Daily food intake(g)	Daily weight gain(g)	FER <sup>4)</sup> (WG/FI)
Ca-Deficient	119.3 ± 6.63 <sup>1)</sup>	195.0 ± 6.25	15.78 ± 0.25	3.79 ± 0.20	0.24 ± 0.15
Control	192.3 ± 4.8 <sup>NS2)</sup>	333.1 ± 7.55 <sup>a3)</sup>	18.14 ± 0.65 <sup>bc</sup>	7.05 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub>	197.6 ± 4.3	323.6 ± 4.84 <sup>ab</sup>	19.34 ± 0.52 <sup>ab</sup>	6.30 ± 0.27 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>ab</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	199.1 ± 3.1	336.1 ± 8.68 <sup>a</sup>	18.79 ± 0.30 <sup>bc</sup>	6.85 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub> + FGH(1%)	194.4 ± 4.3	292.9 ± 9.92 <sup>bc</sup>	17.83 ± 0.41 <sup>cd</sup>	4.93 ± 0.43 <sup>bc</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(1%)	194.7 ± 3.9	287.5 ± 12.59 <sup>c</sup>	16.56 ± 0.45 <sup>d</sup>	4.64 ± 0.69 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>b</sup>
CaCl <sub>2</sub> + FGH(3%)	196.7 ± 4.2	323.4 ± 8.19 <sup>ab</sup>	18.69 ± 0.54 <sup>bc</sup>	6.34 ± 0.43 <sup>ab</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>ab</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(3%)	198.8 ± 7.5	348.2 ± 18.47 <sup>a</sup>	20.40 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.47 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a</sup>

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

4) Food efficiency ratio(FER) : weight gain(g)/food intake(g)

Table 5. Effect of the addition of chitosan oligosaccharides(COS) on body weight, food intake, and food efficiency ratio in calcium deficient induced rats.

	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Daily food intake(g)	Daily weight gain(g)	FER <sup>4)</sup> (WG/FI)
Ca-Deficient	119.3 ± 6.63 <sup>1)</sup>	195.0 ± 6.25	15.78 ± 0.25	3.79 ± 0.20	0.24 ± 0.15
Control	192.3 ± 4.8 <sup>NS2)</sup>	333.12 ± 7.55 <sup>ab3)</sup>	18.14 ± 0.65 <sup>bc</sup>	7.05 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>NS</sup>
CaCl <sub>2</sub>	197.6 ± 4.3	323.57 ± 4.84 <sup>ab</sup>	19.34 ± 0.52 <sup>a</sup>	6.30 ± 0.27 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.01
CaHPO <sub>4</sub>	199.1 ± 3.1	336.05 ± 8.68 <sup>a</sup>	18.79 ± 0.30 <sup>ab</sup>	6.85 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.02
CaCl <sub>2</sub> + COS(1%)	193.3 ± 8.3	313.12 ± 10.79 <sup>ab</sup>	16.84 ± 0.23 <sup>d</sup>	5.99 ± 0.54 <sup>ab</sup>	0.36 ± 0.03
CaHPO <sub>4</sub> + COS(1%)	192.6 ± 7.6	327.48 ± 10.37 <sup>ab</sup>	17.36 ± 0.15 <sup>cd</sup>	6.87 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.02
CaCl <sub>2</sub> + CSO(3%)	196.3 ± 5.9	298.10 ± 12.93 <sup>b</sup>	15.35 ± 0.18 <sup>e</sup>	5.09 ± 0.42 <sup>b</sup>	0.33 ± 0.03
CaHPO <sub>4</sub> + COS(3%)	198.8 ± 5.8	319.80 ± 18.94 <sup>ab</sup>	15.57 ± 0.16 <sup>e</sup>	6.01 ± 0.66 <sup>ab</sup>	0.39 ± 0.04

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

4) Food efficiency ratio(FER) : weight gain(g)/food intake(g)

## 2. 혈중 칼슘 및 무기인의 농도

Table 6과 Table 7에는 혈중 칼슘과 무기인의 농도를 나타내었다. 어피 젤라틴 가수분해물을 칼슘 흡수 촉진제로 첨가한 실험 I에서 혈중 칼슘의 농도는 전부 정상 수준(9~11 mg/ml)을 나타내었으며, 크게 유의성을 나타내지는 않았지만, 굴껍질 유래의 칼슘 화합물을 섭취한 군이 대조군보다 높은 값을 나타내었다. 또 혈중 무기인의 농도는 가수분해물을 첨가하지 않은 군이 높게 나타났다. 반대로 키토산 올리고당을 칼슘 흡수 촉진제로 첨가한 실험 II에서는 올리고당을 섭취시킨 군에서 칼슘의 농도가 낮은 것으로 나타났고 무기인의 농도도 역시 같은 경향을 나타내었다. Stauffer 등(1973)은 칼슘을 결핍시킨 숫쥐에서 혈청의 칼슘 농도가 감소하였다고 보고하였고, Ezawa 등(1993)은 난소를 절제하여 골다공증이 유발된 암컷 쥐를 대상으로 한 실험에서 혈액 중의 칼슘 농도는 저하했지만, 다시 정상 식이를 공급하면 모두 정상 수준의 칼슘 농도를 나타낸다고 보고하였다. 이같은 결과로 보아 올리고당보다는 가수분해물이 혈중 칼슘 농도를 높이는 데 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

松本(1984)은 혈액 중에 과잉으로 존재하는 무기인이 혈중 칼슘과 결합하여 인산 칼슘의 형태로 배출되는데, 이때 혈중 칼슘의 농도가 낮으면 뼈에서 칼슘의 재흡수가 일어나 체내 항상성을 유지한다고 하여 혈중 칼슘 농도에는 무기인이 크게 관여하고 있음을 보고하였다. 또 혈중 칼슘과 무기인의 농도의 항상성에 관련된 중요한 인자로는 calcitonin이 있는데, 이는 32개의 펩티드로 이루어진 펩티드 호르몬으로 혈중 칼슘과 인을 뼈로 석회화하는 것을 촉진하며 혈중 농도를 적절하게 유지시키는 역할을 한다(Hirsch 등, 1995).

## 3. 대퇴골의 무게, 길이 및 강도

대퇴골(Femur)의 무게 및 길이 및 강도는 Table 8과 Table 9에 나타난 바와 같다. 어피 젤라틴 가수분해물을 칼슘 흡수 촉진제로 첨가한 실험 I에서는 모든

Table 6. Effect of fish skin gelatin peptides(FSGP) on serum Ca and P levels in different diet induced rats.

	Ca (mg/100ml)	P (mg/100ml)
Ca-Deficient	9.62 ± 0.17 <sup>1)</sup>	9.78 ± 0.13
Control	10.57 ± 0.19 <sup>abz)</sup>	7.50 ± 0.29 <sup>bc</sup>
CaCl <sub>2</sub>	10.78 ± 0.19 <sup>ab</sup>	8.85 ± 0.44 <sup>a</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	10.72 ± 0.05 <sup>ab</sup>	8.41 ± 0.25 <sup>abc</sup>
CaCl <sub>2</sub> + FGH(1%)	11.02 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.31 ± 0.53 <sup>abc</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(1%)	10.45 ± 0.19 <sup>b</sup>	8.64 ± 0.39 <sup>ab</sup>
CaCl <sub>2</sub> + FGH(3%)	10.73 ± 0.24 <sup>ab</sup>	7.47 ± 0.52 <sup>bc</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(3%)	10.63 ± 0.10 <sup>ab</sup>	7.27 ± 0.33 <sup>c</sup>

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

Table 7. Effect of chitosan oligosaccharides(COS) on serum Ca and P levels in different diet induced rats.

	Ca (mg/100ml)	P (mg/100ml)
Ca-Deficient	9.62 ± 0.17 <sup>1)</sup>	9.78 ± 0.13
Control	10.57 ± 0.19 <sup>a,2)</sup>	7.50 ± 0.29 <sup>b</sup>
CaCl <sub>2</sub>	10.78 ± 0.19 <sup>a</sup>	8.85 ± 0.44 <sup>a</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	10.72 ± 0.05 <sup>a</sup>	8.41 ± 0.25 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub> + COS(1%)	9.77 ± 0.17 <sup>bc</sup>	6.50 ± 0.25 <sup>c</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + COS(1%)	9.86 ± 0.34 <sup>b</sup>	6.46 ± 0.31 <sup>c</sup>
CaCl <sub>2</sub> + COS(3%)	9.27 ± 0.15 <sup>c</sup>	5.60 ± 0.20 <sup>c</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + COS(3%)	9.74 ± 0.13 <sup>bc</sup>	5.76 ± 0.19 <sup>c</sup>

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

군들이 대퇴골 무게에 있어서는 대조군에 비해 유의성을 나타내지 못했다. 그러나 1% 가수분해물을 첨가한 군들을 제외한 나머지 굴껍질 유래의 칼슘을 섭취시킨 군들은 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었다. 특히, 무첨가군의 경우 염화 칼슘과 인산 칼슘을 섭취시킨 군은 대조군에 비해 각각 7.6%와 10.4%의 높은 대퇴골 무게 증가율을 나타내었다. 또한 대퇴골의 강도에 있어서는 유의적인 차가 없었지만 대체로 대조군보다도 약간 높은 경향을 나타내었으며, 칼슘 공급원으로서 염화 칼슘보다는 인산 칼슘 형태의 칼슘 화합물에서 더 높게 나타났다. 일반적으로 뼈의 주성분은 인산 칼슘염(hydroxyapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$ )의 형태이므로(Armstrong 등, 1965), 뼈에 침착될 때 염화 칼슘 형태보다는 인산 칼슘 형태가 더 유리할 것이라 생각된다.

키토산 올리고당을 칼슘 흡수 촉진제로 첨가한 실험 II에서는 무게, 길이 모두 서로 유의적인 차가 없는 것으로 나타났다. 그러나 전반적으로 모든 군들이 대조군보다 높은 경향을 나타내었다. 대퇴골의 강도에 있어서도 대조군에 비해 높은 값을 나타내었는데, 3% 올리고당 첨가군보다는 1% 올리고당 첨가군이 더 높았다. 또한 인산 칼슘보다는 염화 칼슘 형태의 칼슘 공급원이 훨씬 높은 대퇴골 강도 증가율을 나타내어 1%와 3% 올리고당 첨가군에서 각각 19.7%와 7.9%로 나타났다.

실험 I 과 실험 II를 종합해 보면 실험 I에서는  $\text{CaHPO}_4$ 를 섭취시킨 군들이 대퇴골 무게와 강도가 좋은 결과를 보인 반면에 실험 II에서는 오히려 염화 칼슘을 섭취시킨 군들이 좋은 결과를 나타내어 서로 상반되는 결과를 보였다. 그렇지만 전체적으로 볼 때 올리고당이 가수분해물보다는 대퇴골 무게와 강도에서 좋은 결과를 나타내어 칼슘 흡수율이 뛰어난 것으로 나타났다.

五十嵐 등(1990)은 골다공증 모델 쥐를 대상으로 한 실험에서 유청 단백질 유래의 칼슘을 섭취시킨 쥐들의 골밀도가 대조군인 탄산칼슘 군들에 비해 유의적으로 증가하였다고 보고하였다. 오 등(1993)도 동일 모델을 이용한 실험에서 난소 절제와 저칼슘 섭취로 유발된 골다공증의 경우 칼슘 섭취량을 높임으로서 뼈

Table 8. Effect of the addition of fish skin gelatin peptides(FSGP) on wet weight, length, and breaking force of femur deficient induced rats.

	Weight (g)	Length (mm)	Breaking force (kg)
Ca-Deficient	0.90 ± 0.03 <sup>1)</sup>	29.75 ± 0.39	2.58 ± 0.60
Control	1.43 ± 0.08 <sup>ab3)</sup>	34.56 ± 0.39 <sup>NS2)</sup>	8.48 ± 0.48 <sup>NS</sup>
CaCl <sub>2</sub>	1.58 ± 0.03 <sup>a</sup>	35.04 ± 0.26	8.80 ± 0.54
CaHPO <sub>4</sub>	1.54 ± 0.06 <sup>a</sup>	34.66 ± 0.51	9.25 ± 0.49
CaCl <sub>2</sub> + FGH(1%)	1.37 ± 0.03 <sup>b</sup>	34.39 ± 0.36	8.78 ± 0.70
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(1%)	1.35 ± 0.04 <sup>b</sup>	34.21 ± 0.41	9.41 ± 0.79
CaCl <sub>2</sub> + FGH(3%)	1.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	34.72 ± 0.30	8.60 ± 0.55
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(3%)	1.58 ± 0.05 <sup>a</sup>	35.00 ± 0.20	9.53 ± 0.64

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

Table 9. Effect of the addition of chitosan oligosaccharides(COS) on wet weight, length, and breaking force of femur deficient induced rats.

	Weight (g)	Length (mm)	Breaking force (kg)
Ca-Deficient	0.90 ± 0.03 <sup>1)</sup>	29.75 ± 0.39	2.58 ± 0.60
Control	1.43 ± 0.08 <sup>NS2)</sup>	34.56 ± 0.39 <sup>NS</sup>	8.48 ± 0.48 <sup>ab3)</sup>
CaCl <sub>2</sub>	1.58 ± 0.03	35.04 ± 0.26	8.80 ± 0.54 <sup>ab</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	1.54 ± 0.06	34.66 ± 0.51	9.25 ± 0.49 <sup>ab</sup>
CaCl <sub>2</sub> + COS(1%)	1.56 ± 0.06	34.72 ± 0.50	10.15 ± 0.53 <sup>a</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + COS(1%)	1.44 ± 0.06	34.44 ± 0.31	8.60 ± 0.66 <sup>ab</sup>
CaCl <sub>2</sub> + COS(3%)	1.47 ± 0.05	34.63 ± 0.14	9.15 ± 0.73 <sup>ab</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + COS(3%)	1.61 ± 0.05	35.02 ± 0.25	8.12 ± 0.43 <sup>b</sup>

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

의 손실 및 강도가 억제된다고 보고하였다. 그러나 **李 등(1992)**은 성장기의 쥐에게 CPP(casein phosphopeptide)와 같은 펩티드를 섭취시켰을 경우 대퇴골 무게와 칼슘 함량은 증가시켰지만 대퇴골 강도는 증가시키지 못했다고 보고하였다.

또한 위의 결과에 나타난 것처럼 굴겉질 유래의 칼슘 화합물들을 공급한 쥐들은 모두 대조군보다 높은 측정값을 나타내어 대퇴골에 대한 높은 이용성을 보여 주었다.

#### 4. 대퇴골의 무기질 함량

대퇴골의 회분, 칼슘 및 무기인의 양은 Table 10과 Table 11에 나타내었다. 대퇴골의 무기질 함량에 있어 대조군에 비해 굴겉질 유래 칼슘 화합물만을 섭취시킨 군들은 유의적인 차이를 나타내지 않고 거의 동일한 값을 나타내었다. 그렇지만 이들 군은 대체로 대조군보다는 다소 나은 효과를 나타내었다.

가수분해물을 칼슘 흡수 촉진제로 사용한 실험 I에서는 대퇴골의 회분량, 칼슘과 무기인의 비율 등에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 대퇴골 칼슘과 무기인의 양 및 무기질 성분 중 칼슘이 차지하는 비율 등은 유의적인 차이를 나타내었다. 여기서도 앞서 예서와 마찬가지로 1% 가수분해물 첨가군의 경우가 전체적으로 낮은 경향을 나타내었다. 또 3% 가수분해물 첨가군에서는 전체적으로 대조군보다 약간 높은 경향을 나타내었는데, 특히 3% 가수분해물을 칼슘 흡수 촉진제로 사용하고 칼슘 공급원으로 염화 칼슘과 인산 칼슘을 섭취시켰을 때에는 대조군에 비해 대퇴골내 칼슘량이 각각 9.1%와 7.1% 증가하였다.

올리고당을 칼슘 흡수 촉진제로 사용한 실험 II에서는 대퇴골 무게 및 강도의 경우와 마찬가지로 올리고당과 함께 염화 칼슘을 섭취시킨 군들이 회분 함량과 칼슘 함량이 높은 것으로 나타났다. 1%와 3% 올리고당을 섭취시켰을 때의 회분 함량은 대조군과 비교하여 각각 11.5%와 21.4% 증가하였으며, 칼슘 함량은 각각 16.0%와 11.4% 증가하여 높은 효과가 나타내었다.

실험 I 과 실험 II를 전체적으로 비교해 보면 가수분해물을 섭취시킨 군들은

Table 10. Effect of fish skin gelatin peptides on the Ca and P contents of femur in calcium deficient diet induced rats.

	Ash (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Ca : P	Ca % Ca/Ash × 100
Ca-Deficient	102.50 ± 2.61	29.03 ± 1.07	17.44 ± 0.79	1.67 ± 0.07	28.27 ± 0.34
Control	268.75 ± 10.24 <sup>NS</sup>	92.93 ± 4.45 <sup>abc</sup>	46.60 ± 2.13 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.08 <sup>NS</sup>	34.52 ± 0.50 <sup>bc</sup>
CaCl <sub>2</sub>	255.33 ± 4.73	89.41 ± 2.35 <sup>bc</sup>	43.65 ± 1.27 <sup>ab</sup>	2.06 ± 0.09	35.07 ± 1.05 <sup>bc</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	267.97 ± 6.25	92.29 ± 1.85 <sup>abc</sup>	45.94 ± 1.42 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.04	34.46 ± 0.26 <sup>bc</sup>
CaCl <sub>2</sub> + FGH(1%)	253.95 ± 9.05	84.48 ± 3.37 <sup>c</sup>	40.05 ± 1.49 <sup>b</sup>	2.11 ± 0.06	33.28 ± 1.04 <sup>c</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(1%)	256.58 ± 8.93	86.85 ± 2.90 <sup>c</sup>	42.50 ± 1.89 <sup>ab</sup>	2.05 ± 0.04	33.87 ± 0.44 <sup>c</sup>
CaCl <sub>2</sub> + FGH(3%)	270.50 ± 11.70	101.39 ± 5.25 <sup>a</sup>	46.64 ± 2.23 <sup>a</sup>	2.18 ± 0.04	37.44 ± 0.69 <sup>a</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(3%)	272.22 ± 10.91	99.54 ± 4.32 <sup>ab</sup>	46.05 ± 2.30 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.05	36.57 ± 0.71 <sup>ab</sup>

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

Table 11. Effect of chitosan oligosaccharides on the Ca and P contents of femur in calcium deficient diet induced rats.

	Ash (mg)	Ca (mg)	P (mg)	Ca : P	Ca % Ca/Ash × 100
Ca-Deficient	102.50 ± 2.61	29.03 ± 1.07	17.44 ± 0.79	1.67 ± 0.07	28.27 ± 0.34
Control	268.75 ± 10.24 <sup>bc,j</sup>	92.93 ± 4.45 <sup>bc</sup>	46.60 ± 2.13 <sup>ab</sup>	2.00 ± 0.08 <sup>c</sup>	34.52 ± 0.50 <sup>b</sup>
CaCl <sub>2</sub>	255.33 ± 4.73 <sup>c</sup>	89.41 ± 2.35 <sup>c</sup>	43.65 ± 1.27 <sup>ab</sup>	2.06 ± 0.09 <sup>bc</sup>	35.07 ± 1.05 <sup>b</sup>
CaHPO <sub>4</sub>	267.97 ± 6.25 <sup>bc</sup>	92.29 ± 1.85 <sup>bc</sup>	45.94 ± 1.42 <sup>ab</sup>	2.02 ± 0.04 <sup>c</sup>	34.46 ± 0.26 <sup>b</sup>
CaCl <sub>2</sub> + COS(1%)	299.65 ± 16.03 <sup>ab</sup>	107.76 ± 5.79 <sup>a</sup>	48.90 ± 2.90 <sup>a</sup>	2.21 ± 0.04 <sup>ab</sup>	35.98 ± 0.42 <sup>ab</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + COS(1%)	272.34 ± 10.55 <sup>bc</sup>	95.31 ± 2.84 <sup>bc</sup>	41.98 ± 1.55 <sup>b</sup>	2.27 ± 0.03 <sup>a</sup>	35.06 ± 0.55 <sup>b</sup>
CaCl <sub>2</sub> + COS(3%)	326.25 ± 10.30 <sup>a</sup>	103.55 ± 3.11 <sup>ab</sup>	45.22 ± 1.47 <sup>ab</sup>	2.29 ± 0.06 <sup>a</sup>	31.77 ± 0.49 <sup>c</sup>
CaHPO <sub>4</sub> + COS(3%)	257.68 ± 10.95 <sup>c</sup>	97.47 ± 5.54 <sup>abc</sup>	41.07 ± 2.90 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.06 <sup>a</sup>	37.79 ± 0.99 <sup>a</sup>

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

대조군에 비해 10% 미만의 증가율을 보인 반면, 올리고당을 섭취시킨 군들은 약 10~15%의 증가율을 나타내어 높은 이용성을 나타냈음을 알 수 있었다.

麻見 등(1992)은 골다공증 쥐에 글로빈 분말과 탄산칼슘을 각각 섭취시켰을 때 대퇴골의 칼슘 함량과 회분량, 경골의 골밀도가 글로빈 분말 쪽이 유의적으로 높게 증가하였다고 보고하여, 아미노산이나 펩티드 또는 단백질 등의 성분이 뼈의 무기질 성분이나 강도의 증가에 상승 작용을 나타낸다고 하였다.

岡野 등(1991)은 탄산칼슘과 소뼈 분말을 칼슘공급원으로 사용했을 때, 소뼈 분말은 대퇴골내 칼슘 농도와 무기인 농도를 유의적으로 증가시켰다고 보고하였다. 또 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 나타내어 굴껍질 유래의 칼슘 화합물이 칼슘 공급원으로 유용하게 이용될 수 있음을 시사하였다.

## 5. 뇨와 분 중의 칼슘 배설량

대사 실험 기간동안 뇨와 분을 통한 1일 칼슘 배설량을 측정된 결과는 Table 12, Table 13과 같았다. 실험 I 과 실험 II에서 보면 칼슘을 결핍시킨 군에서는 분과 뇨중 배출량이 매우 크게 감소되어 있는 것을 알 수 있다. 분 중 칼슘의 감소는 식이중 칼슘의 부족으로 인한 것이고, 뇨중 칼슘의 감소는 식이중 칼슘 부족으로 인한 칼슘 결핍을 최소화하기 위해 재흡수가 촉진되었기 때문이다. 전체적인 실험에서는 뇨를 통한 1일 배출량은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 오 등(1993)과 이 등(1995)은 골다공증 모델을 대상으로 여러 가지 칼슘원을 섭취시켰을 때 단백질원은 뇨중 칼슘 배설량에 영향을 미치지만, 칼슘 공급원은 뇨중 배설량에 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. 일반적으로 체내로 흡수된 칼슘의 배출에 영향을 미치는 것은 신장(kidney)인데, 신장은 하루에 약 10,000 mg의 칼슘을 사구체를 통해 여과시키고 이중 약 2%인 200 mg 만을 체내로 배설한다(Kumar, 1995). 그러므로 칼슘 공급원에 따른 칼슘 배설량의 차이는 그리 크지 않을 것이다.

그러나 실험 I 과 실험 II에서 볼 때 분을 통한 배출은 굴껍질 유래 칼슘 화합

Table 12. Daily fecal and urinary Ca excretion in calcium deficient model rats fed fish skin gelatin hydrolysates(FSGH) diets.

	Fecal excretion (mg/d)	Urinary excretion (mg/d)
Ca-Deficient	14.16 ± 1.75 <sup>1)</sup>	0.13 ± 0.01
Control	64.10 ± 2.12 <sup>3)</sup>	0.89 ± 0.65 <sup>NS2)</sup>
CaCl <sub>2</sub>	30.41 ± 3.31 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.66
CaHPO <sub>4</sub>	32.13 ± 5.84 <sup>b</sup>	1.53 ± 1.18
CaCl <sub>2</sub> + FGH(1%)	29.44 ± 6.07 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.11
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(1%)	35.87 ± 6.90 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.04
CaCl <sub>2</sub> + FGH(3%)	29.89 ± 3.08 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.70
CaHPO <sub>4</sub> + FGH(3%)	38.78 ± 2.39 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.30

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

Table 13. Daily fecal and urinary Ca excretion in calcium deficient model rats fed chitosan oligosaccharides(COS) diets.

	Fecal excretion (mg/d)	Urinary excretion (mg/d)
Ca-Deficient	14.16 ± 1.75 <sup>1)</sup>	0.13 ± 0.01
Control	64.10 ± 2.12 <sup>a,2)</sup>	0.89 ± 0.65 <sup>NS,2)</sup>
CaCl <sub>2</sub>	30.41 ± 3.31 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.66
CaHPO <sub>4</sub>	32.13 ± 5.84 <sup>b</sup>	1.53 ± 1.18
CaCl <sub>2</sub> + COS(1%)	14.41 ± 2.20 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.21
CaHPO <sub>4</sub> + COS(1%)	21.10 ± 4.41 <sup>bc</sup>	0.30 ± 0.02
CaCl <sub>2</sub> + COS(3%)	29.97 ± 3.66 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.36
CaHPO <sub>4</sub> + COS(3%)	30.36 ± 4.11 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.21

1) Values are mean ± SE of 6 rats per group

2) Not significantly different at the 0.05 level

3) Superscripts with different alphabets in columns are significantly different at the 0.05 level by Duncan's multiple range test

물 전체에 있어 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 먼저 무침가군을 살펴보면, 염화 칼슘과 인산 칼슘은 대조군에 비해 각각 47.3%와 50.1% 만을 나타내어 배출량이 절반 정도밖에 되지 않았다. 이것으로 볼 때 소장에서 많은 흡수가 일어났으며, 굴껍질 유래의 칼슘 화합물이 체내에서 유용하게 이용되고 있음을 알 수 있었다. 또한 대조군과 비교했을 때 전체적으로 염화 칼슘을 섭취시킨 군들이 인산 칼슘을 섭취시킨 군들에 비하여 적은 양의 칼슘을 배출하였는데, 이는 장내에서 해리되는 정도가 염화 칼슘에 비하여 매우 높기 때문이다. 그러나 염화 칼슘은 높은 해리도로 인해 위장(胃腸)장애를 일으킬 수도 있다고 보고되어 있다(岡野, 1996).

李 등(1992)에 의하면 CPP 첨가군이 분 중 칼슘 배출량이 감소하였다고 하였다. 이렇게 분 중 칼슘 배설량이 칼슘 공급원에 따라 차이가 나는 것은 장내에서의 칼슘 흡수가 촉진되어 장내 불용성 칼슘염의 형성이 감소했기 때문일 것이다(Allen과 Wood, 1994).

## 제 4 장 요약

매년 굴껍질은 대량으로 폐기되어 환경오염을 유발시키고 있다. 이러한 굴껍질에 다량 함유되어 있는 칼슘 성분을 체내 칼슘 공급원으로 이용하기 위하여 굴껍질을 고온으로 회화시켜 산화 칼슘을 만든 후 이로부터 염화 칼슘( $\text{CaCl}_2$ )과 인산 칼슘( $\text{CaHPO}_4$ )과 같은 칼슘 화합물을 제조하였고, 이것을 흰쥐를 대상으로 *in vivo*에서 그 효과를 비교 검토해 보았다. 또 칼슘 화합물의 흡수를 촉진시키기 위한 첨가 물질로 어피 젤라틴 가수분해물(FSGP)과 키토산 올리고당(COS)을 사용하였다.

1. 굴껍질을 여러 온도에서 회화시켜 만든 산화 칼슘의 미세구조와 순도를 X-선과 SEM 및 EDS를 사용하여 관측한 결과  $1200^\circ\text{C}$ 가 가장 좋은 것으로 판명되었다. 그리하여  $1200^\circ\text{C}$ 에서 회화시킨 물질로부터 염화 칼슘과 인산화 칼슘을 제조하였다.
2. 어피 젤라틴 가수분해물과 키토산 올리고당을 굴껍질 유래 칼슘 화합물들에 대한 칼슘 흡수 촉진제로 사용하였는데, *in vitro* 실험 결과 효소인 TPCCE를 사용하여 4시간 가수분해시킨 젤라틴 가수분해물과 진한 염산으로 6시간 산분해시킨 올리고당이 가장 높은 인산 칼슘 침전 효과를 나타내었는데, 무첨가한 것과 비교했을 때 각각 70% 및 50%의 상승 효과를 나타내었다.
3. 이상의 결과들을 바탕으로 *in vivo*에서 칼슘 흡수 촉진 실험을 실시한 결과, 칼슘 흡수 촉진제를 첨가하지 않고 굴껍질 유래의 칼슘 화합물만을 섭취시킨 군들은 대조군인 탄산칼슘( $\text{CaCO}_3$ ) 섭취군과 비교했을 때 거의 동일한 효과를 나타내었으며, 대퇴골 무게와 강도에서는 높은 경향을 보였으며, 분로의 배출에서는 대조군의 약 50% 정도밖에 되지 않는 것으로 보아 소장내 불용화 칼슘의 형성을 어느 정도 방지하는 것으로 나타났다.
4. 칼슘 흡수 촉진제로 어피 가수분해물이 첨가된 굴껍질 유래 칼슘 화합물을

섭취시킨 군들은 대조군에 비해 유의적으로 높은 칼슘 및 회분량을 나타내었으며, 1% 보다는 3%의 가수분해물을 섭취시킨 군들이 좋은 것으로 나타났다. 또한 염화 칼슘 섭취군 보다는 인산 칼슘 섭취군들에게서 더 뛰어난 촉진 효과를 볼 수 있었다.

5. 칼슘 흡수 촉진제로 키토산 올리고당이 첨가된 굴껍질 유래 칼슘 화합물을 섭취시킨 군들은 대조군에 비해 대체적으로 약간 낮은 체중 증가와 식이 효율을 나타내었지만 그 외 뼈강도, 회분량 및 칼슘량에 있어서는 좋은 효과를 나타내었다. 가수분해물 섭취군과는 달리 1% 올리고당 첨가군이 더 뛰어난 것으로 나타났으며, 인산 칼슘 섭취군 보다는 염화 칼슘 섭취군들에게서 더 뛰어난 촉진 효과를 보였다.

위의 사실에서 볼 때 굴껍질 유래의 칼슘 화합물들( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ )은 대조군인 탄산칼슘, 탄산칼슘의 대체원으로 손색이 없음을 나타내었다. 또한 칼슘흡수 촉진 물질로 어피 젤라틴 가수분해물이나 키토산 올리고당을 소량 첨가했을 때 그 효과가 크게 상승되는 것도 알 수 있었다.

## 제 5 장 참고문헌

- Alder-Nissen, J. (1986) : Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, Elsevier Applied  
Alder-Nissen, J. (1986) : Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier  
Applied Science Publishers, London.
- Allen, L.H. (1982) : Calcium bioavailability and absorption-A review. *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 783~808.
- Allen, L.H. and Wood, R.J. (1994) : Calcium and Phosphorus. In : Shils ME, Olson JA, Shike M. eds. : Modern Nutrition in Health and Disease. 8th. ed., 144~163, Lea & Febiger.
- Armstrong, W.D., Singer, L. (1965) : Composition and constitution of the mineral phase of bone. *Clin. Orth. Rel. Res.*, **38**, 179~190.
- Avioli, L.V. (1988) : Calcium and Phosphorus. In : Goodhart, RS ME, eds. : Modern Nutrition in Health and Disease. 7th. ed, 142~158, Lea & Febiger.
- Blix, G. (1948), *Acta Chem. Scand.*, **2**, 467.
- Dupuis, Y., Crouzoulon, G., and Fournier, P. (1981) : Does the inhibition of microvillus protein phosphorylation by lysine explain the activity of the latter on calcium transfer?. *International. J. of Biochem.*, **13**, 1163~1170.
- Edwards, C.A., and O'Brien W.D. Jr. (1980) : Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolysate. *Clin. Chim. Acta*, **104**(2), 161~167.
- Einhorn, T.A., Levine, B., and Michel, P. (1990) : Nutrition and bone. *Ortho. Clin. Nor. Am.*, **21**, 43~50.
- Ezawa, I. and Fusako, A. (1983) : The effect of cow-bone-power on osteopenia of rat model of postmenpausal osteoporosis. *Jap. J. Home Econo.*, **34**, 555~559.
- Fiske, C.H. and Subarow, Y. (1925) : The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375~400.

- Fujita, T., Fujii, Y., Kitagawa, R., and Fukase, M. (1993) : Calcium supplementation in Osteoporosis. *Osteoporosis International*, **Suppl.1**, S159~162.
- Fujita, T., Ohue, T., Fujii, Y., Miyauchi, A., and Takagi, Y. (1995) : Effect of calcium supplementation of bone density and parathyroid function in elderly subjects. *Miner Electrolyte Metab.*, **21**, 229~231.
- Greger, J.L., Krzykowsky, C.E., and Khazen, R.R., and Krashoc, C.L. (1987) : Mineral utilization by rats fed various commercially available calcium supplements or milk. *J. Nutr.*, **117**, 717~724.
- Hamilton, R.M.G., Fairfull, R.W., and Gowe, R.S. (1985) : Use of particulate limestone or oyster shell in the dietary regimen of white leghorn hens. *Poultry Science*, **64**, 1750~1762.
- Heaney, R.H., Weaver, C.M., and Fitzsimmons, M.L. (1991) : Soybean phytate content : Effect on calcium absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 745~747.
- Hirotsuka, M., Taniguchi, H., Narita, H., and Kito, M. (1984) : Functionality and digestibility of a highly phosphorylated soybean protein. *Agric. Biol. Chem.*, **48**(1), 93~100.
- Hirsch, P.F. and Anderson, J.J.B. (1995) : Calcitonin. In : Anderson, J.J.B. and Garner, S.C. : Calcium and phosphorus in health and disease. CRC Press Inc., 197~206.
- Karen, J.W. and Baker, D.H. (1990) : Manganese utilization in chicks as affected by excess calcium and phosphorus ingestion. *Poultry Science*, **69**, 977~984.
- Kim, S.K., Jeon, Y.J., Byeun, H.G., Kim, Y.T. and Lee, C.K. (1997) : Enzymatic recovery of cod frame proteinase from tuna pyloric caeca. *Fisheries Science*, **63**(3), 421~427.
- Kitts, D.D. and Yuan, Y.V. (1992) : Caseinphosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends in food Sci. & Technol.*, **3**(2), 31~35.
- Kumar, R. (1995) : Calcium transport in epithelial cells of the intestine and kidney. *J. Cell. Biochem.*, **57**, 392~398.

- Lee, Y.S., Noguchi, T. and Naito, H. (1980) : Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br. J. Nutr.*, **43**, 457~467.
- Lee, Y.S., Noguchi, T. and Naito, H. (1983) : Intestinal absorption of calcium in rats given diet containing casein or amino acid compounds mixture: the role of casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.*, **49**, 67~76.
- McCarren, D.A. (1997) : Role of adequate dietary calcium intake in the prevention and management of salt-selective hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**(suppl), 712s~716s.
- Montecalvo, J. Jr. (1981) : Protein isolates and enzymatically modified proteins from the frame portion of solid fish waste, UMI. 79~81.
- Ooshiro, Z. (1971) : Studies on proteinase in the pyloric caeca of fishes ; I. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, **37**, 145~152.
- Rabon, H. W., Roland, D. A., Bryant, m., Barnes, D. G., and Laurent, S. M. (1990) : Influence of sodium zeolite a with and without pullet-sized limestone or oyster shell on eggshell quality. *Poultry Science*, **70**, 1943~1947.
- Ramakrishna, M., Hultin, H.O., and Atallah, M.T. (1987) : A comparison of dogfish and bovine chymotrypsin in relation to protein hydrolysis. *J. Food Sci.*, **52**, 1198~1204.
- Scalmati, A., Lipkin, M., and Newmark, H. (1992) : Calcium, Vitamin D, and Colon cancer. In : Chernoff, R, Heaney, RP ed. : Clinics in Applied Nutrition, Andover Med., 67~74.
- Seguro, K. and Motoki, M. (1990) : Functional properties of enzymatically phosphorylated soybean proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1271~1276.
- Stauffer, M., Baylink, D., Wergedal, J., and Rich, C. (1973) : Decreased bone formation, mineralization and enhanced resorption in calcium-deficient rats. *Am. J. Physiol.*, **225**, 269~276.
- Sung, H.Y., Chen, H.J., Liu, T.Y., Su, J.D. (1983) : Improvement of functionalities

- of soy protein isolate through chemical phosphorylation. *J. Food Sci.*, **48**, 588.
- Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S., Suzuki, M. (1986) : Effects of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, **30**(8), 777~787.
- Tsugawa, N., Okano, T., Higashino, R., Kimura, T., Oshio, Y., Teraoka, Y., Igarashi, C., Ezawa, I., and Kobayashi, T. (1995) : Bioavailability of calcium from calcium carbonate, dl-calcium lactate, l-calcium lactate and powdered oyster shell calcium in vitamin d-deficient or -replete rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(5), 677~682.
- Wasserman, R.H., Comar, C.L., and Nold, M.M. (1956) : The influence of amino acids and other organic compounds on the gastrointestinal absorption of calcium and strontium in the rat. *J. Nutr.*, **59**, 371~383.
- Williams, S.R. (1985) : Minerals In. : Nutrition and Diet Therapy. 163~211, Times Mirror/Mosby St. Louis.
- Yamamoto, K., Kumagai, H., Suzaki, A. and Arai, S. (1994) : Physicochemical study of calcium-binding properties of chemical substances as inhibitors against calcium phosphate insolubilization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 2207~2211.
- 岡野 登志夫 (1996) : 食品カルシウムとその利用効率. 月刊フodケミカル, **(1)**, 43~48.
- 岡野 登志夫, 律川尚子, 東野雷太, 小林 正, 五十嵐 千恵, 江澤郁子 (1991) : ラットにおける牛骨粉と炭酸カルシウムのカルシウム營養効果の比較. *日本栄養・食糧學會誌*, **44**, 479~485.
- 강태중, 전유진, 김세권, 송대진 (1992) : 가자미피 젤라틴 제조를 위한 전처리 방법의 검토. *한국수산학회지*, **25**(2), 93~102.
- 菅野三郎 (1990) : 骨の食化利用, 月刊フodケミカル. **(7)**, 69~73.
- 内藤 博 (1986) : カゼインの消化時生成するホスホペプチドのカルシウム吸収促進

- 機構. *日本栄養・食糧學會誌*, **39**, 433~439.
- 麻見直美, 森川尚美, 星名 綾, 江澤郁子 (1992) : 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨密度に對するグロビンの效果. *日本栄養・食糧學會誌*, **45**(3), 271~276.
- 本田眞樹 (1987) : 新しい天然CaとCa吸収促進劑の開発. *食品と開發*, **24**(8), 46~51.
- 小林 正, 岡野 登志夫, 増田園子, 竹内敦子, 律川尚子 (1987) : カルシウム化合物のカルシウム源としての利用效果の比較. *日本栄養・食糧學會誌*, **40**, 293~298.
- 松本武佳 (1984) : ミネラルの重要性と健康食品への利用. *ジャパフードサイエンス*, **(1)**, 49~54.
- 五十嵐 千恵, 江澤郁子, 尾形悦郎 (1990) : 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨塩減少に對する乳清カルシウムの抑制效果. *日本栄養・食糧學會誌*, **43**, 437~443.
- 오주환, 이연숙 (1993) : 난소절제 골다공증 모델 흰쥐의 체내 칼슘 이용성 저하에 대한 칼슘 섭취 수준의 효과, *한국영양학회지*, **26**(3), 277~285.
- 伊藤 不二夫 (1995) : 骨粗鬆症に對する補助食品キトサンの役割. *月刊フodケミカル*, **(2)**, 39~44.
- 이연숙, 박정희, 오주환, 최창원 (1992) : 칼슘급원으로서 소뼈회분 및 소뼈분말의 체내이용성 연구. *한국농촌과학회지*, **3**, 27~26.
- 李連淑, 朴眞我, 內藤 博 (1992) : 成長期にするラットのカルシウム出納に及ぼすカゼインホスホペプチド(CPP)の效果. *日本栄養・食糧學會誌*, **45**(4), 333~338.
- 이연숙, 오주환 (1995) : 골다공증 실험모델 흰쥐의 칼슘대사에 대한 소뼈회분과 인산칼슘의 섭취 효과. *한국영양학회지*, **28**(5), 434~441.
- 이종순, 홍성일, 전동원 (1994) : 인산화 가교 키토산의 합성 및 금속이온 흡착 특성(II). *한국섬유공학회지*, **31**(12), 976~982.

제 2 세부과제

**어뼈 유래의 천연 수산화아파타이트를 이용한 바이오  
세라믹스 소재 개발**

**Development of Bioceramics Material Using  
Hydroxyapatite from Fish Bone**

# 제 1 장 참치뼈로부터 추출한 천연 Hydroxyapatite의 특성

## 제 1절 서론

최근 수산식품의 기호증대에 기인하여 수산물 혹은 수산가공식품의 수요가 급속한 증가 경향을 보이고 있다. 이에 비례하여 수산가공 공장에서 원료어를 처리할 때 어육 채취 후 부산물로 얻어지는 어체의 두부, 어피, 뼈 등의 잔사 역시 증가 경향을 보이고 있다. 이들 잔사는 간단한 분쇄과정을 거쳐 저급 사료로 제한적으로 이용되어 왔으나, 처리되지 못한 부산물들은 박테리아 등의 세균번식에 의한 악취와 침출수 등으로 1, 2차 환경오염을 야기시키고 있는 실정이다. 그러나 현재 국내에서 수산식품 폐기물의 처리와 활용방향 제시에 관한 연구는 전무한 실정에 있다.

이에 반해 최근 赤澤 等 (1992)은 가축도살 후 대량으로 얻어지는 소뼈 등으로부터 아파타이트(apatite)를 추출하였다. 또한 高野 (1989)는 대구뼈에 포함된 단백질, 세균, 대장균 등의 유기물을 고온으로 회화(calcination)시킨 후 잔존하는 주요 무기성분인 아파타이트를 이용하여 정형외과용 생체재료로 임상적용 가능성을 보고하고 있다.

이러한 아파타이트 물질군의 주요 산업 이용처로서는 인산염 광물을 근간으로 하는 비료산업, baking 산업, 형광체, 녹제거제, 가소제, friction matches, 치아연마제, 치과, 제약 등과 같은 산업과 의료용에 사용되고 있다 (Machlin, 1973).

이들 재료 중 의료용에 사용되는 아파타이트는 column chromatography로 아밀(protein)과 핵산(nucleic acids) 및 알콜의 수화와 탈수소화(dehydrogenation)과정에서 이질촉매를 이용하여 제조한다 (Young, 1982). 이렇게 제조된 hydroxyapatite는 인간의 치아와 뼈의

상과 유사하며, 또한 구성분자 역시 동일해 생체재료로서 이용 가능성이 높다는 것이다.

생체재료(biomaterials)는 현대의학의 급속한 발전으로 장수에 따른 신체기관의 노후화, 질병, 교통사고 등으로 손상을 입은 신체기관의 기능을 대신하거나, 원래의 기능으로 수복할 수 있는 물질들을 총칭 (Hench, 1984; Hench, 1991; Hench and Wilson, 1993)하는 것으로서 실제로 치과와 정형외과의 수술용도로서 40여 가지의 재료를 이용한 50여 가지의 이식재료가 소개되고 있다. 이들 중에서 불소수지, 고밀도 폴리에틸렌 등과 같은 폴리머 물질을 중심으로 한 고분자 유기계 (Lee and Neville, 1971)와 티타늄(Ti), 코발트 합금(Co-alloy), 귀금속 등의 금속 재료 (Harris and Bunsel, 1977), 그리고 결정상을 제어한  $Al_2O_3$ , carbon 및 아파타이트계의 세라믹 (Jarcho, 1981)과 탄소계 복합체물질 (Kotlensky, 1965) 등이 신체의 골격구조를 대체하는 보철(prosthetics)혹은 이식(implant)재료로서 관심의 대상이 되고 있다.

이들 생체재료 중에서 CaO- $P_2O_5$  system으로 구성된 아파타이트계 세라믹만이 생세포와의 활성 및 친화성 등을 보여 벌크재료(bulk materials)로서 생물학적 반응성을 갖는 바이오세라믹스(bioceramics)에 대한 연구에는 일반적으로 화학시약이 이용되고 있다.

화학시약으로 합성한 아파타이트 역시 Ca와 P 원소비율에 의해서 구조와 상(phase)이 결정되는 것으로 알려져 있다. 이는 생물체 역시 마찬가지로 주요 무기성분 역시 Ca와 P가 가장 많은 비중을 차지하고, 이 무기성분의 구성비율에 의해서 물리화학적 특성이 결정지워져 아파타이트계 세라믹의 합성 출발물질로 적용 가능성을 시사하고 있다. 즉, 생물체에서 추출한 무기성분은 아파타이트 세라믹 합성 출발물질에 이용되는 CaO와  $P_2O_5$ 의 화학시약을 대체할 가능성을 시사하고 있으나 이에 관한 보고는 아직 알려진 바 없다.

이런 관점에서 우리나라 수산가공 공장에서 대량 폐기되는 어뼈를 보다 부가

가치가 높은 소재로 활용하고자 제 1장에서는 기초연구로서 참치뼈로부터 hydroxyapatite를 추출하여 850~1350℃의 회화온도에 따른 고유물성을 조사하고 합성아파타이트의 대체 가능성을 고찰하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 재료

원료인 참치뼈는 (주) 동원산업의 수산가공 공장에서 참치의 어육가공 처리 후 남은 어뼈를 구입하여 실험재료로 사용하였다.

### 2. 방법

#### 가. 참치뼈에 포함된 유기물 분리

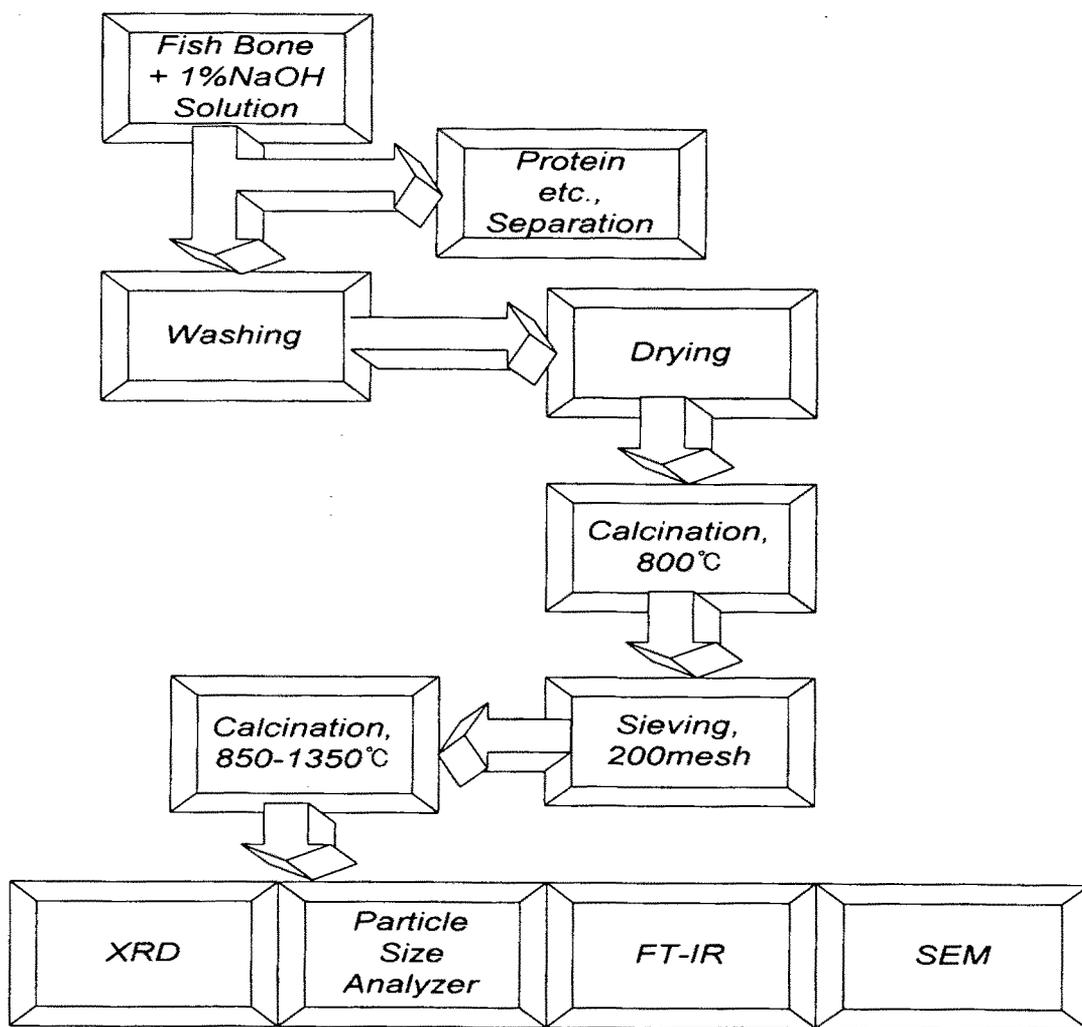
어류 가공 후 폐기되는 참치뼈와 같은 생물학적인 재료의 유기물과 무기물을 분리 정제하는 과정을 Fig. 1-1에 나타내었다.

먼저 채집한 참치뼈는 80℃로 가열된 1%의 NaOH 수용액에 투입후 7시간 교반하여 참치뼈에 포함되어 있는 유기물 등을 제거하였다. 유기물이 제거된 어뼈는 흐르는 물에 2시간 이상 수세하여 어뼈에 부착 가능한 Na이온 등을 제거하였다.

#### 나. 회화 및 분쇄

수세된 어뼈는 건조기내 에서 25℃로 건조하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 어뼈를 전기로에 넣고 어뼈내에 잔류하는 단백질을 태우기 위하여 3~5시간 800℃에서 1차 회화하였는데, 이때의 회화시간은 육안으로 살펴보았을 때 단백질의 탄화 제거속도에 의존하였다.

회화 후 얻어진 물질을 건식방법으로 24시간 분쇄하여 표준망체 200 mesh(75 μm)로 체가름을 하였다. 체가름된 시료들을 850~1350℃의 온도에서 3시간 회화시켜 회화온도에 따른 참치뼈의 고유물성을 고찰하고자 하였다.



**Fig. 1-1. Experimental procedure.**

#### 다. TG/DTA 측정

참치뼈로부터 추출한 재료의 온도에 따른 상변화 과정을 TG/DTA (thermogravimetry/differential thermal analysis, Netzsch Simultaneous Thermal Analyzer STA 409)로 승온속도를 5 °C/min로 설정하여 상온에서 1200°C까지 온도의 함수로 추적하였다.

#### 라. 회화된 무기물의 XRD 회절분석

X-ray diffractometer(Rigaku D/Max-2400)를 이용하여 여러 회화온도로 얻어진 시료의 상과 구조변화를 관찰하기 위하여 아래의 조건으로 분석하였다.

Target ; CuK  $\alpha$  (60 kV, 80 mA), 2 theta range ; 10~70°

#### 마. FT-IR 분석

시료와 KBr을 1:100으로 혼합 후 성형하여 시료의 분자구조와 정성분석을 FT-IR (Perkin Elmer, Spectrum 200)을 이용하여 4,000~400cm<sup>-1</sup>사이의 분광범위로 측정하였다.

#### 바. 입자크기 분포 분석

NaCl 등과 같은 전해용액에 회화한 시료를 분산시켜 미립자가 orifice를 통과할 때 생기는 전기저항치의 변화량을 검출해, 미립자의 수, 체적 등의 분포를 입자크기분석기(Elzone Particle Size Analyzer 280PC)를 이용하여 측정하였다.

#### 사. 회화온도에 따른 입자형상 거동 관찰

회화온도에 따른 시료의 미세구조 조직과 입자의 형상거동은 샘플홀더에 부착된 카본테이프(carbon tape)에 시료를 도핑한 후 진공증착기로 금 코팅을 하여 주사전자현미경(Scanning electron microscopy, Hitachi S-4200)으로 관찰하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. Hydroxyapatite 구조

Albee(1920)에 의해서 calcium phosphate계 물질이 손상된 뼈를 수복할 수 있다는 것이 최초로 보고되면서 관심의 대상이 되고 있는 아파타이트는 특정한 조성 과 물질을 의미하는 것이 아니라,  $A_{10}(MO_4)_6X_2$ 의 화학식과 결정 단위포(unit cell)가 hexagonal lattice를 가지는 상의 그룹을 의미한다. 여기서 A 이온자리는 2개의 금속 양이온,  $MO_4$ 와  $X_2$ 자리는 각각 3가와 1가 음이온으로 점유 가능한 원자군들이고, 아파타이트의 고용(solid solution)범위는  $A^{2+}$ ,  $MO_4^{3-}$ 와 X자리에 치환되는 이온에 의해서 결정되는 것으로 알려져 있다.

Fig. 1-2는 hydroxyapatite의 단위포를 구성하는  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $OH^-$  군의 이온분포를 c-축 basal plane면을 투영하여 나타낸 구조이다 (Paschalis, 1993).

$P6_3/m$ 의 공간군을 가지는 hydroxyapatite는 Fig. 1-2에서 보이듯 basal plane의 모서리에 분포하는 hydroxyl 이온은 수직 c축을 따라 단위포의 중심인  $1/2(3.44 \text{ \AA})$  거리에  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $OH^-$  이온들이 반복적으로 존재함을 보이고 있다. 즉, mirror면 (\*)을 중심으로  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $OH^-$  등의 원소가 c-축을 따라서  $1/2$ 자리씩 반복적으로 배열된 형태의 구조를 가짐을 알 수 있다.

따라서 아파타이트의 화학식  $A_{10}(MO_4)_6X_2$ 로부터 Fig. 1-2의 구조 내에 분포하는 원자들을 정리하면 다음과 같다.

- (i) 10개의 Ca원자 : 단위포를 중심한 8배위를 가지는 6개의 Ca원자 및 독립적으로 공간군 내에 존재하는 4개 Ca원자.
- (ii) 6개의 P원자 : 중심에 위치한 2개의 P이온과 이웃한 단위포의 원자에 의해 8배위된 4개의 P원자.
- (iii) 2개의 hydroxy군 : 전체  $8(1/2 \times 8=4)$ 개의 단위포와 공유되는 4개의 모서리에

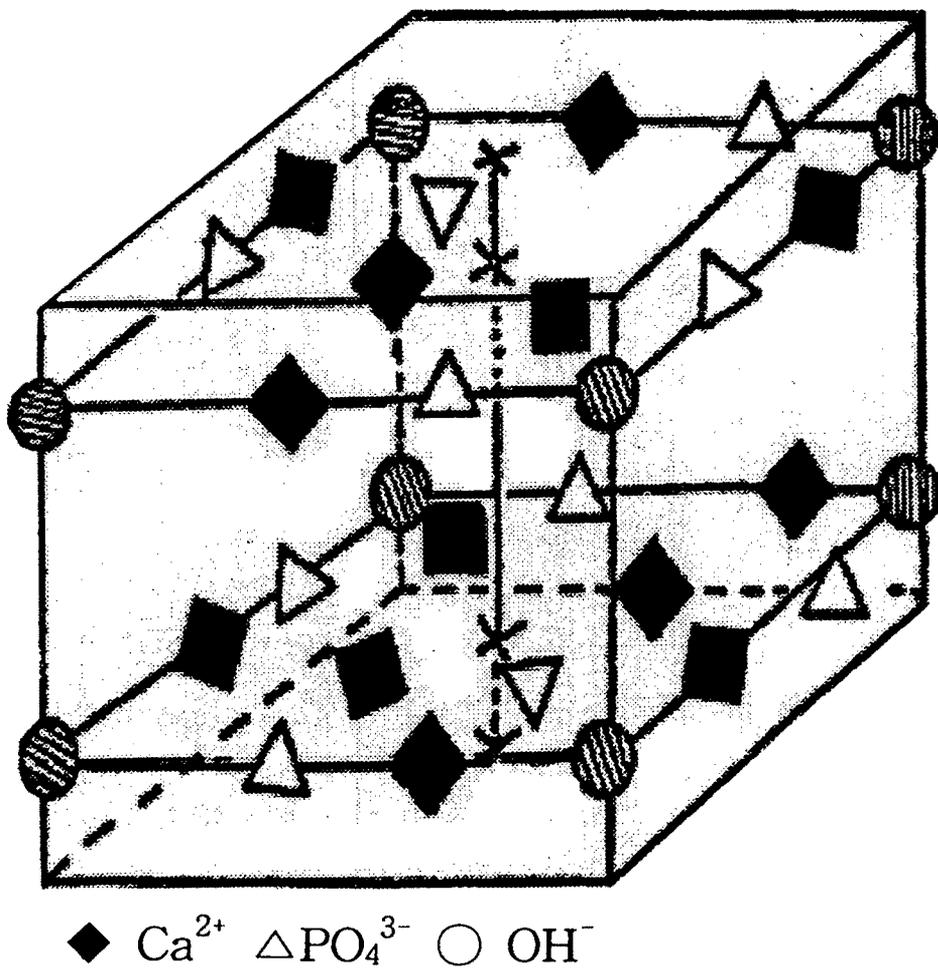


Fig. 1-2. General arrangement of the atoms constituting the unit cell of hydroxyapatite.

분포하는 8개의 hydroxyl 그룹 등이 각각 분포한다(Paschalis, 1993).

한편 이들 격자가 연속적으로 유지되기 위해서는 반드시 Ca:P:OH=5:3:1의 몰비(molar ratio)를 만족시켜야 한다. 또한 아파타이트의 결정구조와 결정화 거동은 이온종의 성질과 치환정도에 의해서 결정되는 것으로 알려져 있는데, 고용(solid solution)범위인 경우  $A^{2+}$ ,  $MO_4^{3-}$ 와  $X^-$  자리의 이온치환에 의해서 결정된다. 여기서  $A^{2+}$ 과  $X^-$  이온이 차지하는 몰분율은 각각 10 mol, 2 mol 이하이며,  $MO_4^{3-}$ 는 정확히 6 mol을 가져야 한다.  $A^{2+}$  이온자리에 치환가능한 원소들은  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  등과 같은 2가의 금속 양이온이며,  $MO_4^{3-}$ 의 자리에는  $AsO_4^{3-}$ ,  $VO_4^{3-}$ ,  $CrO_4^{3-}$ ,  $MnO_4^{3-}$  등과 같은 3가 음이온들이며,  $X^-$ 이온자리에는 F, OH, Br,  $CO_3^{2-}$  등의 음이온들이다.

아파타이트 물질의 경도(hardness)와 밀도는 각각 3과  $3.16 \text{ g/cm}^3$ 이며, 생체친화성을 보이는 아파타이트 물질의 이상적인 화학식과 무게비율은  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ 와 39.9% Ca, 18.5% P와 3.38% OH이며, Ca/P의 원자비율(10:6)은 1.67 그리고 밀도는  $3.219 \text{ g/cm}^3$  (Grenoble et al., 1972)인 것으로 알려져 있는데, Ca/P 비율과 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>계의 성분들을 함유하는 대표적인 상을 Table 1-1에 나타내었다.

## 2. 회화한 참치뼈의 XRD 회절분석

어류 가공 후 폐기되는 참치뼈와 같은 생물학적인 재료를 1% NaOH 수용액으로 유기물을 분리시켜 800°C의 온도에서 단백질을 탄화시킨 후 체가름(200 mesh)하여 850~1350°C의 회화온도에 따른 상의 변화 등과 같은 고유물성을 고찰하고자 하였는데, 회화온도에 따른 상의 변화를 X-ray회절로 동정하여 Fig. 1-3(a), (b)에 나타내었다.

회화 후에 관찰된 참치뼈의 주요 피크(●)는  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ 의 조성을 가지는 hydroxyapatite상이었으며, 이들 주피크의 위치는 설정된 회화온도에 관계없이 동일한  $2\theta$  위치를 나타내고 있음을 Fig. 1-3(a), (b)에서 나타냈다.

Table 1-1. Calcium phosphate phases as a function of Ca/P ratio

Empirical Formula	Ca/P ratio	Name
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}^*$	0.50	Monocalcium Phosphate Monohydrate(MCPH)
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.50	Monocalcium Phosphate(MCP)
$\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$	1.00	Dicalcium Phosphate Dihydrate(DCPD)
$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}^*$	1.33	Octacalcium Phosphate(OCP)
$\alpha$ -and $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	Tricalcium Phosphate(TCP)
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	Hydroxyapatite(HAP)
$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	2.00	Tetracalcium Phosphate

\*Denotes the included of water molecules in the crystal lattice.

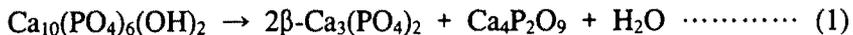
한편 LeGeros (1990)에 따르면 생물체 아파타이트의 고유특성으로서는 생물학적인 hydroxyapatite 경우 950°C 이상의 온도로 가열하면 hydroxyapatite + CaO가 생성되며 hydroxyapatite가 잔존한다고 알려져 있다.

참치뼈를 회화하여 X-ray로 동정한 Fig. 1-3(a), (b)의 경우 hydroxyapatite상이 주상의 피크로 관찰될 뿐 CaO와 같은 피크는 관찰되지 않았다. CaO는 hydroxyapatite의 성분 중에서 OH기의 분해 반응에 의해서 나타나는 현상으로 파악되나, 유리기물 분리를 위해 이용된 80°C로 가열된 1%의 NaOH 수용액에 Ca이온의 일부가 단백질과 함께 용출되기 때문에 본 연구의 결과에서는 이러한 현상은 관찰되지 않는 것으로 판단되었다.

Table 1-2와 1-3은 인간 (Zipkin, 1966)과 어뼈 (高野, 1989)의 주요 무기성분을 나타낸 것으로서 가장 많은 비중을 차지하는 원소들은 Ca와 P임을 보인다. 또한 생물체의 Ca/P 무게비는 2.19과 2.16로서 상호 유사한 것으로 나타났다.

따라서 회화 후 잔존하는 주요 무기성분들에 의해서 물리화학적인 특성이 규정지어질 것으로 생각되며, Table 1-2와 1-3에서 나타난 주요 무기성분 (Zipkin, 1966; 高野, 1989)과 참치뼈에 추출한 물질의 X-ray 상의 동정결과와 비교하였을 때 회화 후 관찰된 주요 무기성분은 Ca와 P가 주요 성분이었으며, 이들이 이루는 주상은 hydroxyapatite임을 확인할 수 있었다.

이에 반해 Raemdock et al. (1984)에 따르면 화학시약으로 합성한 아파타이트는 1050°C 이상의 온도에서는 β-TCP와 tetracalcium phosphate상으로 식 (1)과 같은 재분해 과정이 일어나는 것으로 보았다.



그러나 참치뼈와 같은 생물체로부터 얻어진 시료를 X-ray회절로 상을 동정한 Fig. 1-3에서는 1350°C까지는 합성 아파타이트 경우와 같은 열 재분해반응에 의한 α- 혹은 β-TCP상들이 관찰되지는 않았다.

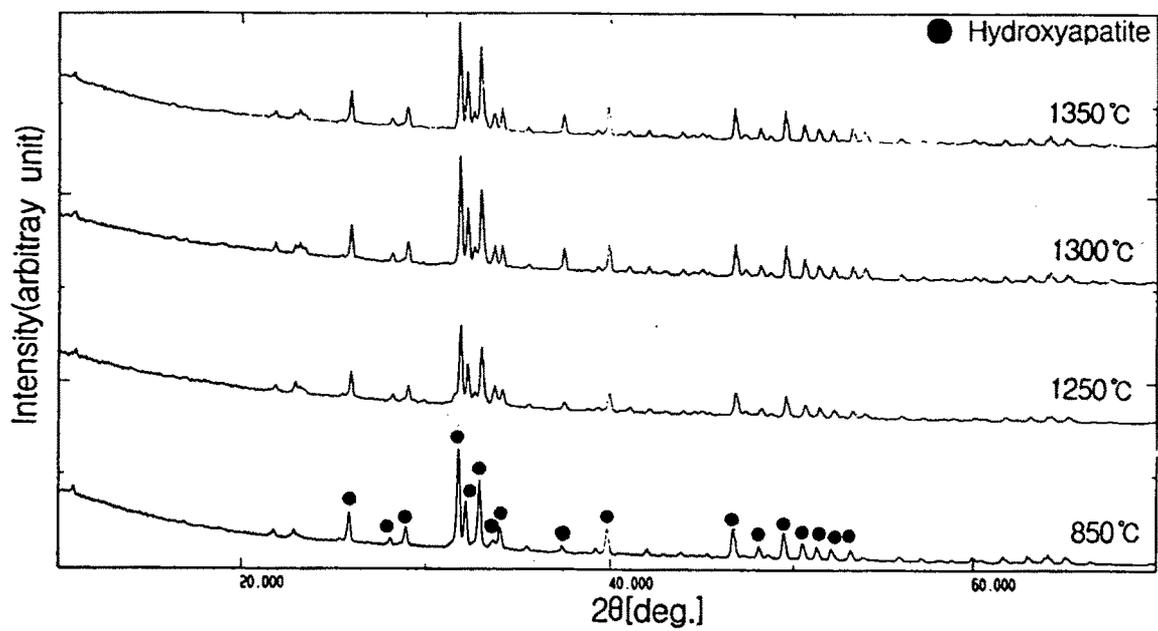


Fig. 1-3(a). X-ray diffraction patterns of calcined tuna bone at various temperatures.

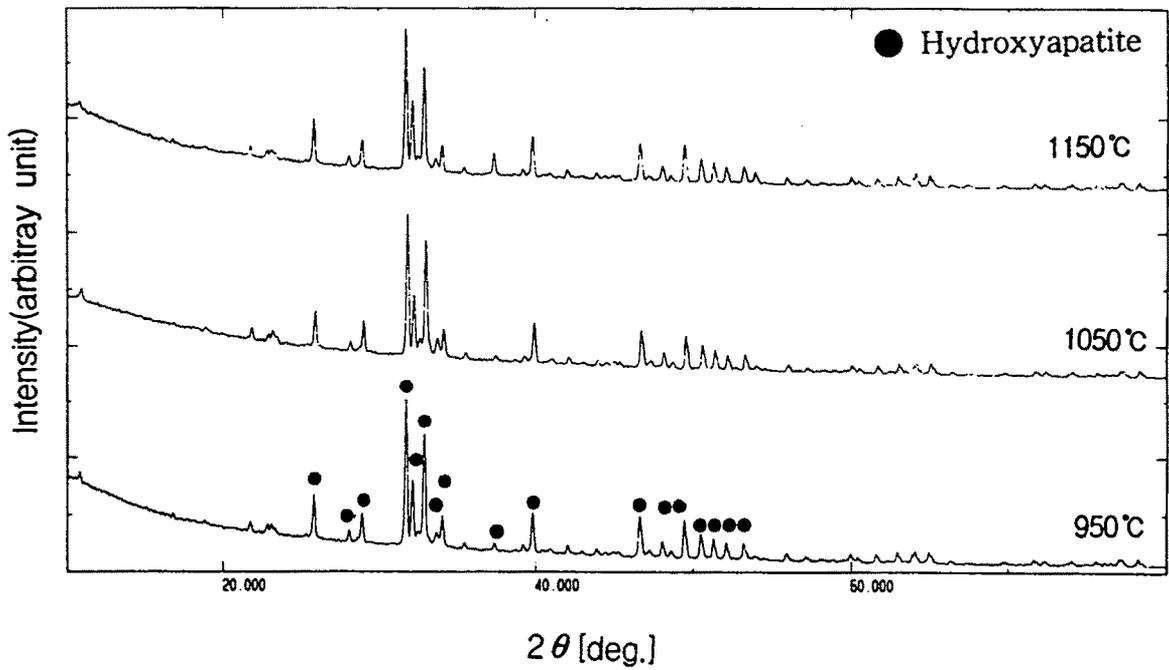


Fig. 1-3(b). X-ray diffraction patterns of calcined tuna bone at various temperatures.

Table 1-2. The major inorganic compositions of human bone(Zipkin, 1966)

Element	Amount
Ca	39.4%
P	18.0%
Ca/P(weight ratio)	2.19
Mg	0.46%
Na	0.16%
F	0.095%
CO <sub>2</sub>	6.0%
Cl	0.2%

Table 1-3. The major inorganic compositions of cod fish bone(高野, 1989)

Element	Amount
Ca	39.9%
P	18.5%
Ca/P(weight ratio)	2.16
Mg	0.40%
Na	0.92%
K	0.02%
Fe	0.005%

비록 생물체 아파타이트와 합성 아파타이트가 같은 결정상을 가짐에도 불구하고 생물체 아파타이트는 고온에서  $\alpha$ - 혹은  $\beta$ -TCP상 (Raemdock et al., 1984)들과 LeGeros (1990)이 제안한 hydroxyapatite + CaO의 생성과 hydroxyapatite가 잔존하는 생물체의 특성과는 차이가 있는 것으로 나타났다.

이는 참치뼈와 같은 어뼈재료의 열간 분해반응상은 화학시약을 합성한 hydroxyapatite와는 상이한 것으로 나타남을 알 수 있었다. 즉, 참치뼈에서 추출한 아파타이트의 Ca/P 무게비가 대구뼈에서의 비(Ca/P=2.16) (高野, 1989)와 함께 화학양론적인 hydroxyapatite의 비(Ca/P=2.16)와 비슷한 화학조성을 갖기 때문으로 사료된다.

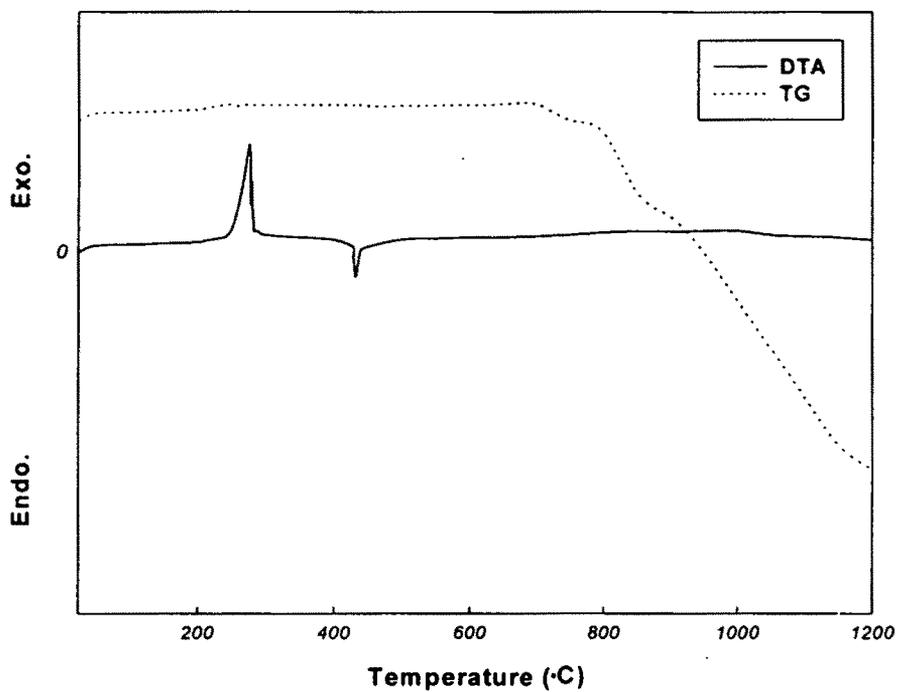
### 3. TG/DTA 분석

참치뼈로부터 추출한 hydroxyapatite를 온도에 따른 상변화 과정을 TG/DTA로 분석한 결과를 Fig. 1-4에 나타내었다.

DTA 경우 280°C 부근에서 흡착수분 등의 방출에 의한 발열피크와 430°C에서 흡열피크가 나타났다. 430°C 부근에서 나타난 피크는 유기물 분리에 사용된 NaOH 수용액중 Na이온의 일부가 어뼈내에 잔존하여 Na<sub>2</sub>O와 Na의 분해로 인한 피크 혹은 수분(mechanical water loss)의 방출에 의한 피크로 추정되나, X-ray를 분석한 Fig. 1-3(a), (b)에서 Na성분에 연관된 피크가 관찰되지 않는 것으로 미루어 볼 때 후자의 경우가 더 타당한 것으로 생각된다.

한편 TG는 700°C를 전후로 급격한 무게감량이 발생하였는데, 이는 Fig. 1-5의 FT-IR에서도 나타나듯이 1450cm<sup>-1</sup> 부근의 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>에 기인한 피크가 가열온도의 상승에 따라 감소하는 것으로 보여지며, 생물학적인 hydroxyapatite에 일부 존재하는 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-hydroxyapatite의 분해에 따른 중량 감소로 추정되었으며 이 열분해 반응에 의한 중량은 측정온도의 범위까지 지속적으로 감소하는 경향을 보였다.

### 4. FT-IR 분석



**Fig. 1-4. TG and DTA curves of hydroxyapatite isolated from tuna bone.**

참치로부터 추출한 시료를 여러 온도로 회화한 것과 이와 대비하기 위한 tricalcium phosphate(TCP, Sigma Co.)의 FT-IR 측정 결과를 Fig. 1-5(a), (b)에 나타내었다.

Fig. 1-5(a), (b)에서 볼 수 있는 바와 같이 950°C 이상부터는 회화온도에 관계 없이 피크거동은 상호 유사하였다. 여기에서 나타난 주요 파수대를 살펴보면, 1087, 1046, 957, 599, 569, 472, 432cm<sup>-1</sup> 파수대는 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 진동에 의한 피크에 기인하며 2379와 2340cm<sup>-1</sup>파수대의 피크는 CO<sub>2</sub> gas의 피크로 각각 나타나 명태, 대구 뼈, 소뼈 등의 생물체를 회화하여 측정한 (高野, 1989; 赤澤 等, 1992) 경우와 유사함을 보였다.

또한 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>에 기인한 1450cm<sup>-1</sup>부근의 피크 강도는 열처리온도가 상승함에 따라 점차 감소됨을 확인할 수 있었는데, 이는 인체뼈의 성분분석 결과인 Table 1-2 (Zipkin, 1966)에서 알 수 있듯이 천연뼈 내에 상당량의 CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>- hydroxyapatite가 존재한다고 판단된다. 한편 850°C 시료와 TCP 피크는 1100cm<sup>-1</sup> 파수대 사이에 편편한(broad) 피크가 걸쳐있는데(Fig. 1-5(b)), 이는 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 진동에 의한 피크로 파악되었다.

## 5. 입자크기 분포 분석

입자크기와 입자의 기하학적인 형태는 소결, 밀도, 대자율(magnetic susceptibility) 외에 여러 물성에 중요한 영향을 미치기 때문에 동일한 입자 크기의 분포와 기하학적인 형상의 유도는 중요한 인자이다.

입자의 크기측정은 입자크기 측정법(particle-size measurement)과 통계적인 방법(statistical method)이 있다. 이 두 방법간의 차이는 표현의 방식에 차이가 있기 때문에 측정방법에 따라 적용되는 식은 상이하나 도출되는 결과는 동일한 것으로 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 식 (2)와 같이 입자형태의 식별비율(discrimination ratio)로 입자분포(particle distribution)를 고려한 통계적인 방법을 이용하였다 (Dal and Berden, 1968).

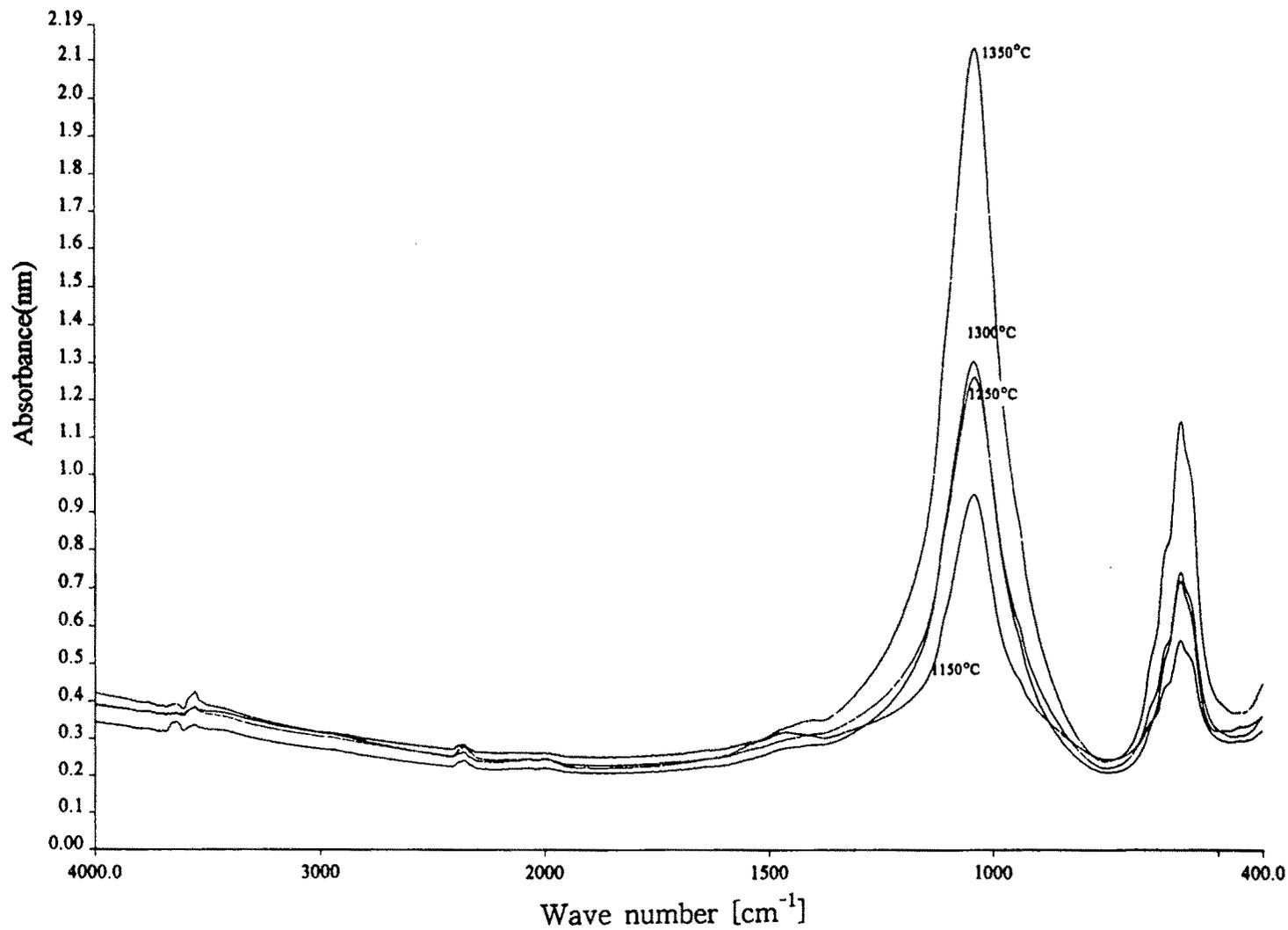
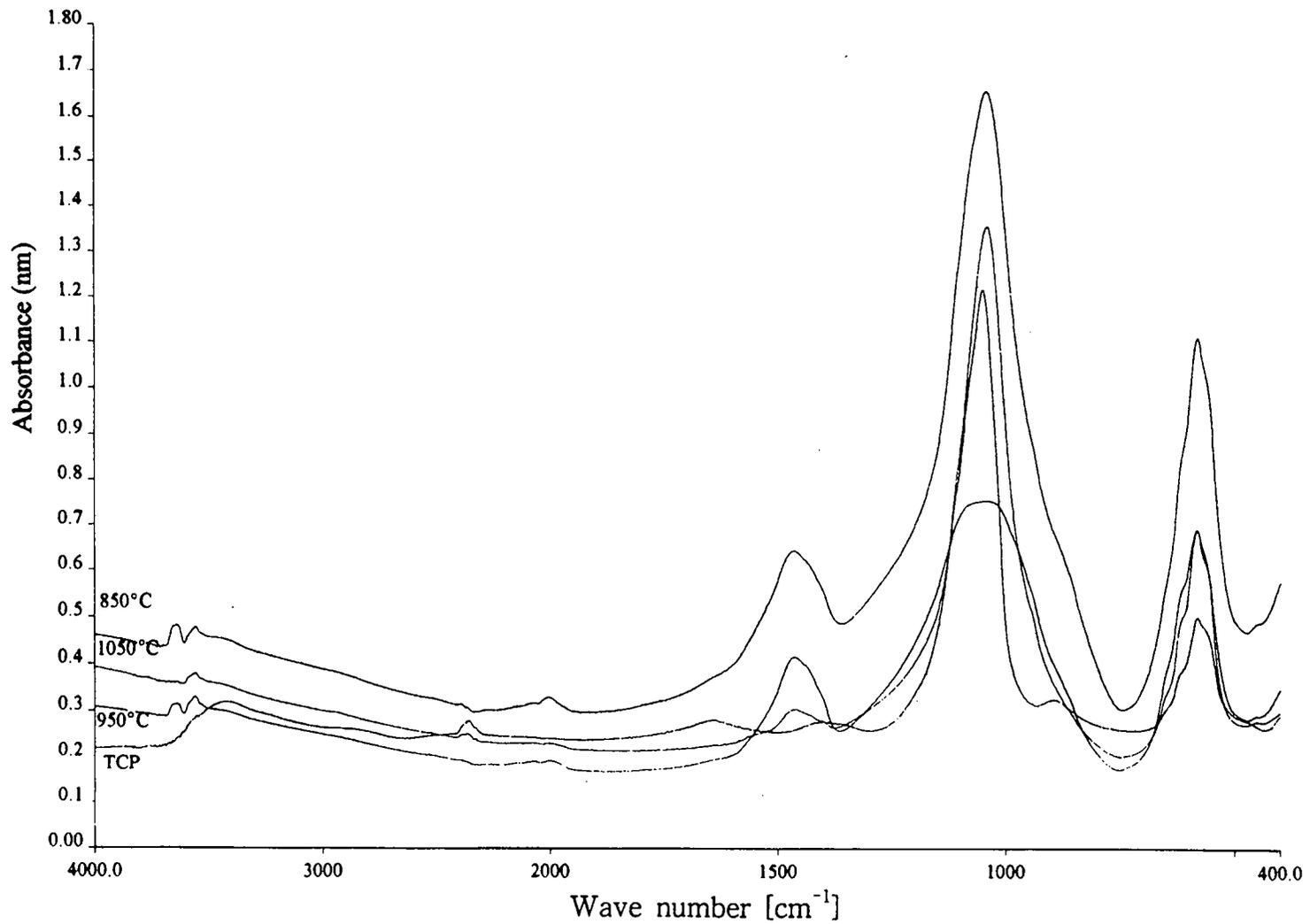


Fig. 1-5(a). FT-IR spectra of calcined tuna bone at various temperatures.



**Fig. 1-5(b). FT-IR spectra of calcined tuna bone and tricalcium phosphate (TCP) at various temperatures.**

$$DR = \left\{ \left[ \frac{2\sigma(\text{total})^2}{\sigma^2(\text{testing})} \right] - 1 \right\}^{0.5} \dots\dots\dots(2)$$

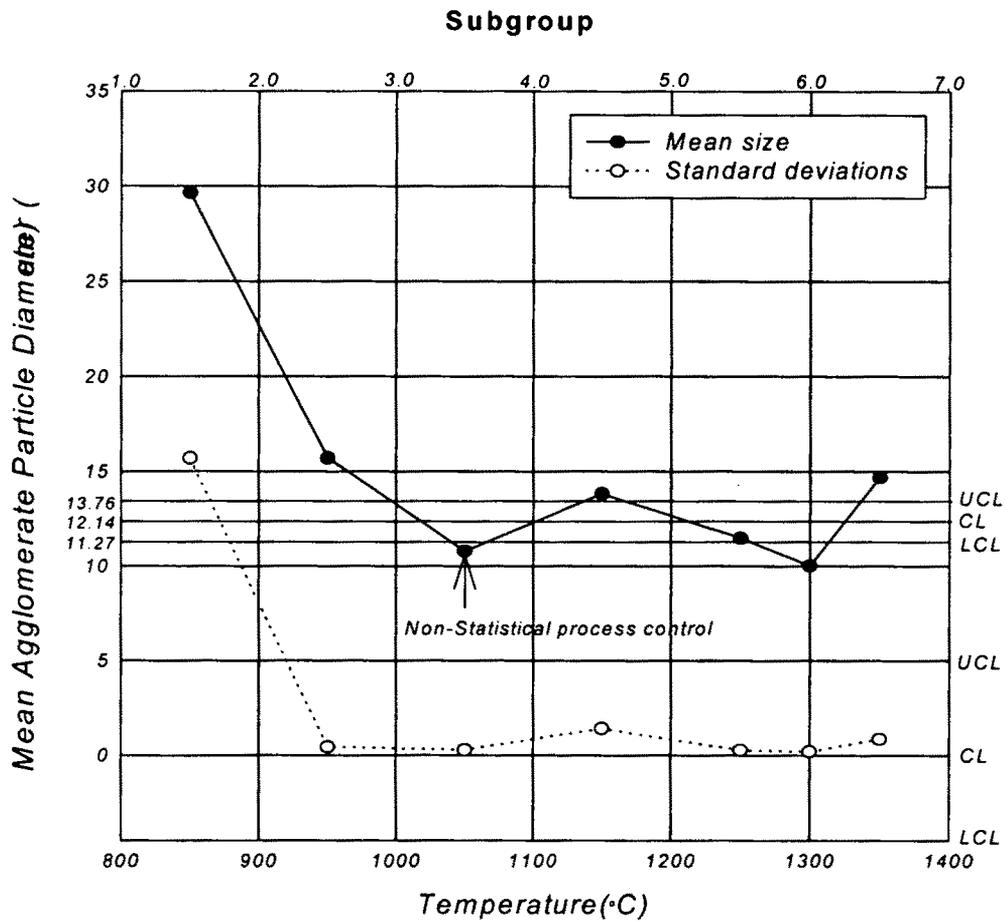
여기서 DR은 입자형태의 식별비율(Dal and Berden, 1968)이며,  $\sigma$ 는 입자분포를 나타낸다. total은 통계의 입도분포에 해당하는 입자의 수이며, testing은 측정시 투입되는 시료의 양을 각각 나타낸다.

850℃에서 1350℃까지 여러 온도로 회화한 참치뼈의 입자크기 분포를 측정후 통계적인 방법으로 입자크기의 분포를 Fig. 1-6에 나타내었다. Fig. 1-6에서 입자 크기분포만을 고려할 때 850℃에서 평균 입자크기는 29.65  $\mu\text{m}$ 이며, 950℃에서는 12.18  $\mu\text{m}$ , 1050℃에서는 10.80  $\mu\text{m}$ , 1150℃에서는 13.73  $\mu\text{m}$ , 1250℃에서는 11.47  $\mu\text{m}$ 로서 회화온도가 증가할수록 입자크기는 점차 감소하는 경향을 보였고, 1350℃에서는 14.65  $\mu\text{m}$ 로 증가하였으나 이들 입자크기의 분포는 유사한 것으로 나타났다.

또한 Fig. 1-6에서 subgroup은 시료에서 제어될 입자의 크기 범위를 나타내는 것이며, ULC는 입자제어 상한선, CL은 입자제어 한계선, LCL은 최저제어 한계선, 그리고 Non-SPC는 비통계 제어영역을 각각 의미한다.

Fig. 1-6에서 입자의 분포의 통계치에 영향을 미치지 않는 Non-SPC의 값은 1050℃에서 나타났으며, 인식비율(DR)은 3.5로 나타났다. DR값이 4인 경우 입자간의 크기분포가 심한 경우에 해당하는 상수값이며, 8은 동일한 입자의 분포가 유도될 때 적용되는 값(Dal and Berden, 1968)으로 알려져 있는데 생물체 재료를 회화한 경우 DR은 4에 해당하는 값을 가져 입자간의 크기분포가 심한 경우에 해당하는 것으로 나타났다.

이와 같은 입자크기의 변화는 입자 내에 포함된 수분 등과 같은 휘발성분의 비산 뿐만 아니라 입자간의 분해 반응이 온도의 함수로 가속화되기 때문에 입자의 크



**Fig. 1-6. The variation of mean agglomerate particle diameter versus the calcination temperatures.**

기분포가 변화하는 경향을 보는 것으로 생각된다. 따라서 생물체인 참치뼈의 회화 온도는 1050℃의 온도가 최적의 회화 조건인 것으로 나타났다.

입자의 표면적과 연관지어 볼 때 동일한 조성의 물질이 온도에 따라 입자크기가 변화한다는 것은 입자 형태와 크기가 감소하여 표면적의 감소가 유도됨을 의미한다. 이러한 경향은 온도에 따른 대구뼈의 비표면적 변화거동의 양상을 관찰한 高野 (1992)의 연구결과와 상응하는 것으로 나타났다.

## 6. 미세구조 관찰

회화온도가 고온으로 갈수록 입자의 크기분포가 변화함을 Fig. 1-6에서 나타냈다. 따라서 온도에 따른 입자들의 양상변화를 관찰하기 위하여 850, 1050, 1250, 1350℃의 시료를 주사전자현미경으로 관찰하여 Fig. 1-7(a), (b), (c), (d)에 나타내었다.

850℃에서 회화한 시료분말을 관찰한 Fig. 1-7(a)에서 조대한 입자 크기는 대략 50 μm이내이며 기하학적으로는 불규칙한 큰 입자들 사이에 작은 입자들이 분포하고 있었는데, 이는 850℃의 입자 크기분포에서 입자제어 상한선(UCL) 이상의 입자 분포를 보이는 Fig. 1-6의 결과와 상호 일치하는 것으로 나타났다.

1050℃와 1250℃의 온도에서 회화된 시료를 관찰한 Fig. 1-7(b)와 (c)에서는 입자 크기의 감소 경향은 뚜렷하나, 850℃의 경우와 마찬가지로 특정한 기하학적인 형태를 가지고 있지는 않았다.

일반적으로 광물(miner mineral)을 분쇄 후 회화할 경우 온도의 함수로서 입자의 표면적이 증가하는 구형에 가까운 형태를 나타내는 것으로 알려져 있으나, 참치뼈를 회화한 경우에는 기하학적으로 특징적인 형상을 보이고 있지는 않았다. 이는 생물학적인 뼈의 구조 때문으로 생각되는데 즉, 생물뼈의 외부 밀도와 내부 밀도 차이에 기인하여 물리적으로 열분해 반응이 일어날 때 뼈의 내부는 상대적으로 밀도가 낮아서 쉽게 분해 반응이 일어나나, 외부의 경우 내부와의

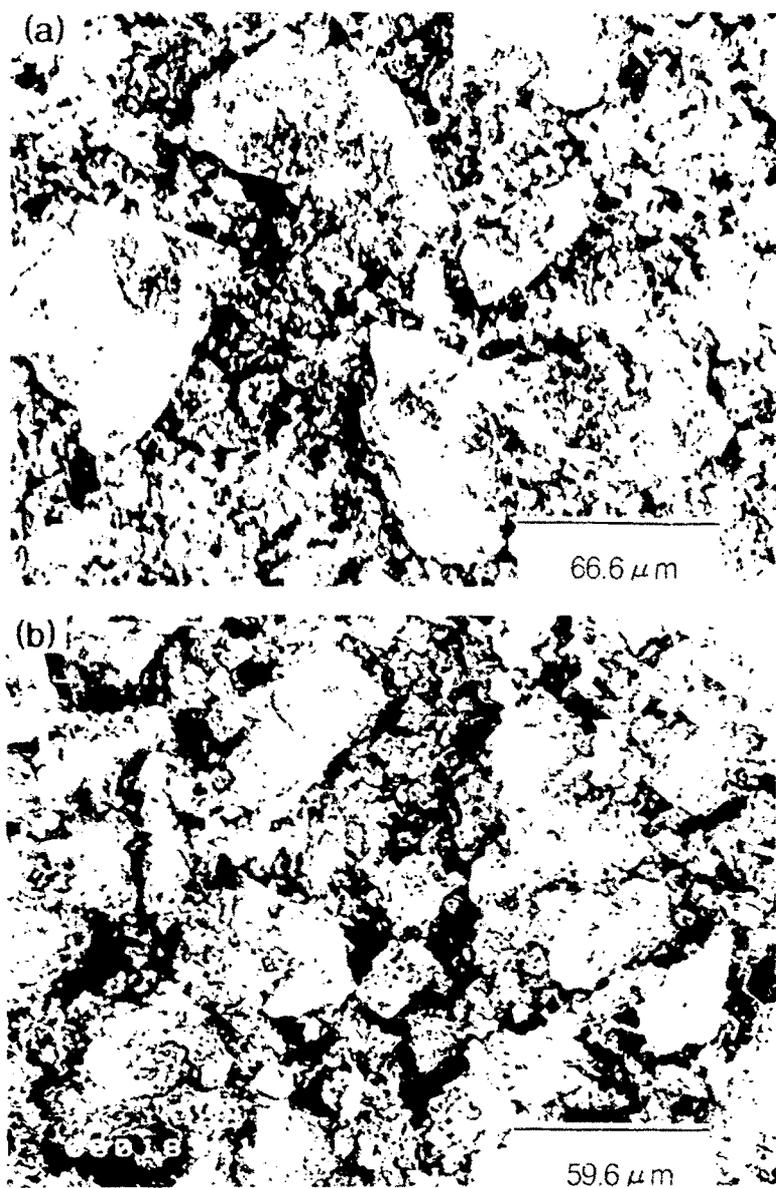


Fig. 1-7. Scanning electron micrographs of calcined tuna bone  
(a) 850°C, (b) 1050°C, (c) 1250°C and (d) 1350°C.

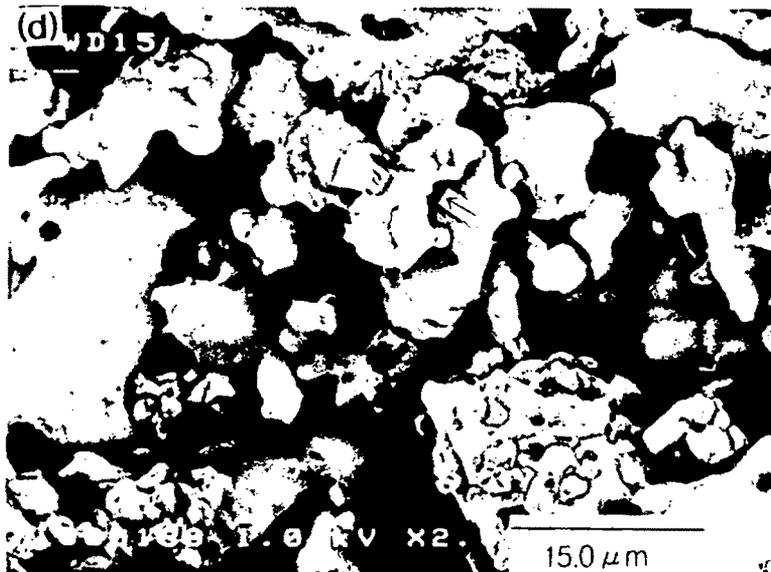
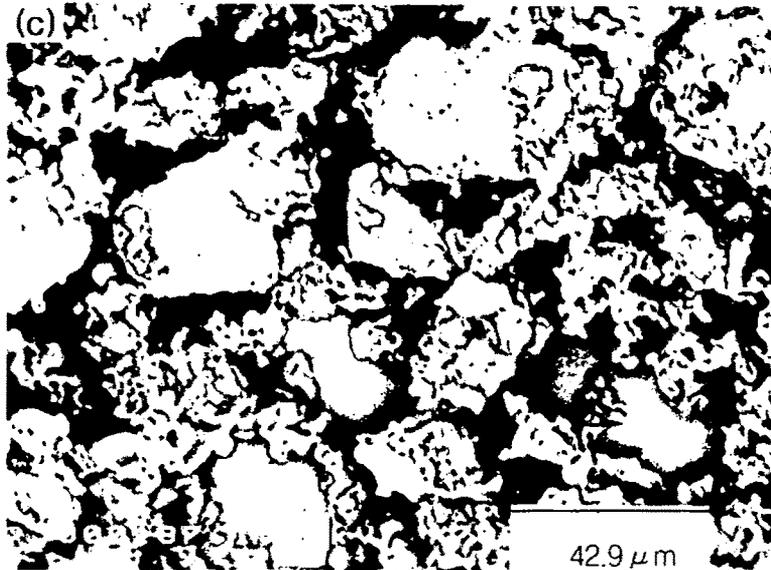


Fig. 1-7. (continued).

밀도 차이로 인해서 상대적으로 분해 반응이 낮다고 여겨진다. 또한 가해진 열 에너지는 입자의 분해에만 이용될 뿐 입자의 형상을 변형시키는 구동력에는 관여하지 못하기 때문에 특정한 형태를 나타내지 않는 것으로 추정된다.

그러나 1350°C를 관찰한 Fig. 1-7(d)의 경우, 입자크기는 대략 14  $\mu\text{m}$ 이며 기하학적인 외형을 보이고 있지는 않다. 그러나 입자들은 재용집 또는 부분소결(←)이 일어나는 경향을 보이고 있는데, 이의 형태는 입자들이 고상소결의 진행과정과 같은 치밀화의 형상을 나타내는 것과 같은 입자간의 neck가 형성된 형태를 나타내고 있다. 이러한 거동의 미세구조로 인해서 회화온도가 1350°C에서는 입자크기 분포 역시 다소 증가하는 것으로 판단되며 이는 입자크기 분포를 나타낸 Fig. 1-6에서 나타난 현상과 일치함을 보이고 있다.

## 7. 배치(batch)계산

참치뼈로부터 추출한 물질은 조성이  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 인 hydroxyapatite로 구성되어 있음이 확인되었기 때문에, 참치뼈를 회화하여 추출한 아파타이트 자체는 생체재료로서 이용 가능할 것으로 판단된다.

그러나 여러가지 상을 가지는 바이오 세라믹스의 조성들 중에서 화학시약의 일부를 대신하는 glass-ceramics 등과 같은 조성으로 수식하기 위하여 Kokubo and Yamamura(1985)가 제시한 아파타이트 성분이 포함된 glass-ceramics의 배치조성 예를 Table 1-4에 나타내었다. 생체친화성과 기계가공이 가능한 Table 1-4의 glass-ceramics 배치조성에서 CaO와  $\text{P}_2\text{O}_5$  등의 출발물질은 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite에서 공급된다고 설정하여 glass-ceramics의 배치 조성을 계산하고자 하였다.

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 화학식에서 1 mol을 기준으로 하였을 때 CaO는 10 mol이  $\text{P}_2\text{O}_5$ 는 3 mol이 공급된다. 그러므로  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 로부터 CaO가 0.447 mol이 공급된다고 가정하면 CaO는 44.7 mol%로서 위 식을 만족시킬 수 있으나,  $\text{P}_2\text{O}_5$ 의

Table 1-4. The example batch suggested by Kokubo and Yamamura(1985)

Element	Mol%
MgO	4.6
CaO	44.7
SiO <sub>2</sub>	34.0
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	16.2
CaF <sub>2</sub>	0.5
Total	100

Table 1-5. The modified batch composition of calcined tuna bone

Composition (Formula)	Mol%	Chemical (Formula+Loss+Gain)	Amount(g)
MgO	4.60	MgO	1.31
SiO <sub>2</sub>	34.00	SiO <sub>2</sub>	14.42
CaF <sub>2</sub>	0.50	CaF <sub>2</sub>	0.28
CaO · P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>*</sup>	58.01	10CaO · 3P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> · H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O	41.10
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2.89	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> -1.5H <sub>2</sub> O	70.64
Total	100.00	Batch Total	127.75
Final Product :	100.00	Weight Change -27.75 i.e.	-27.75
<sup>*</sup> From calcined tuna bone.			

경우  $0.1331 \text{ mol}(0.447 \times 0.3=0.1331)$ 인  $13.31 \text{ mol\%}$ 만이 공급될 수 있기 때문에  $\text{P}_2\text{O}_5$ 는 참치뼈의 성분만을 고려할 때는 Table 1-4의 조성식을 만족시킬 수 없다. 이때 부족한  $\text{P}_2\text{O}_5$ 는  $16.2-13.31=2.89 \text{ mol\%}$ 이므로,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  등을 도입하여 세라믹 조성 계산방법(Andrews, 1957)에 따라 수식을 하여 Table 1-5에 나타내었다.

참치뼈를 회화한 성분만으로는 제시된 조성식의  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ 를 완전히 치환할 수는 없었으나, 배치식의 조성영역에 따라 일부 또는 전체의 치환 범위가 결정지워질 것으로 사료된다.

## 제 4절 결론

수산가공 공장에서 대량 폐기되는 어뼈를 보다 부가가치가 높은 소재로 활용하기 위하여 참치뼈를 대상으로 850~1350℃로 회화시켜 추출한 hydroxyapatite의 고유물성을 조사하고, 바이오세라믹 합성의 출발물질에 일반적으로 사용되는 화학시약 대체 가능성을 고찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 회화 후 추출한 물질의 회화온도에 따른 X-ray 분석결과 결정상은 온도변화에 관계없이 1350℃까지는  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 조성을 가지는 hydroxyapatite상으로 나타났으며, 화학시약으로 합성한 아파타이트와는 상이한 열분해 반응기구를 보였다.
2. 회화한 참치뼈의 입자 크기분포는 온도의 증가에 따라 점진적으로 감소하는 거동을 보였고, 입자 크기분포는 1050℃에서 최저치를 나타내 생물체의 회화 온도는 1050℃이하가 적정할것으로 판단되었다.
3. 온도변화에 따른 입자의 변화양상을 SEM으로 추적한 결과, 온도에 따른 입자 형상의 변화는 나타나지 않았다. 그러나 회화온도가 높아질 수록 입자간의 재응집과 소결의 진행과정에서 나타나는 입자간의 neck에 인해서 입자 크기 분포 역시 증가하는 경향을 나타내었다.
4. 참치뼈로부터 추출된 아파타이트 자체는 생체재료로서 이용가능한 것으로 나타났다. 그리고 glass-ceramics 등과 같은 바이오 세라믹 조성식에서 생물체에서 추출한 아파타이트로 화학시약의 치환 역시 가능한 것으로 나타났다. 따라서 참치뼈에서 추출한 아파타이트는 바이오세라믹스의 출발 물질로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

## 제 5절 참고문헌

- Albee, F. H. (1920), "Studies in Bone Growth. Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis", *Ann. Surg.*, 71, 32 ~ 36.
- Andrews, A. I. (1957), in, "Ceramic Glazes, Bodies, and Enamels, Chapter VI. and The Compounding of Raw Glazes and the Calculation of Formula to Recipe and Recipe to Formula, Chapter VII", *In Ceramic Test and Calculations*. John Wiley & Sons. Inc. NY. pp. 51 ~ 71.
- Dal, P. H. and W. H. H. Berden. (1968), "The Capillary Action of Plaster Molds in science of ceramics", *The British Cera. Soc.* 4, 113 ~ 131.
- Grenoble, D. E., Katz, J. L., Dunn, K. L., Gilmore, R. S. and Murty, K. L. (1972), "The Elastic Properties of Hard Tissues and Apatites", *J. Biomed. Mater. Res.*, 6. 221 ~ 233.
- Harris, K. L., Bunsell, A. R. (1975), "Structure and Properties of Engineering Materials", Chap. 9, Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Hench, L. L. (1984), "Bioactive Ceramics, Bioceramics", *In Materials Characteristics versus in vivo Behavior*, Eds., P. Ducheyne and J. Lemons, *Annals of NY Academy of Science*. Vol. 523, pp. 54.
- Hench, L. L. (1991), "Bioceramics from Concept to Clinic", *J. Am. Ceram. Soc.*, 74(7), 1487 ~ 1510.
- Hench, L. L. and J. Wilson. (1993), "An Introduction to Bioceramics", *In Advanced Series in Ceramics*. Vol. 1. ed. by L. L. Hench & J. Wilson. World Scientific, pp. 7 ~ 8.
- Jarcho, A. L. (1981), "Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics", *Clin. Ortop.* 157,

259 ~ 278.

Kokubo, T., Yamamuro, T. (1985), "Mechanical Properties of a New Type of Apatite-Containing Glass-ceramic for Prosthetic Application", *J. Materials Sci.*, 20, 2001 ~ 2004.

Kotlensky, L. (1965), "Deformation in Polytic Graphite", *Trans. Met. Soc., AIME*, 223, 830 ~ 832.

Lee, J. F., Neville, K., (1971), "Handbook of Biomaterials Plastics", *Chap 4 and 13, Pasadena Technology Press, Pasadena.*

LeGross, R. Z., Strunz, V. (1977), "Surface Staining of Sawed Sections of Undecalcified Bone Containing Alloplastic Implants," *Stain Technol.*, 52, 217 ~ 219.

LeGeros, R. Z. (1990), "Materials for Bone Repair, Augmentation and Implant Coatings", *In Proceeding of the International Seminar of Orthopedic Res., Nagoya*, Ed. by. S. Niwa, (Spring-Verlag).

Machlin, J. C. (1973), "The Environmental Phosphorous Handbook", *Eds., E. J. Griffith et al;* pp. 20 ~ 23. Wiley, New York, USA.

Paschalis, R. H. (1993), "Physicochemical Studies of Biologically Important Calcium Phosphates", *Ph.D. State University of New York at Buffalo.*

Raemdock, W. V., Ducheyne, P., De Meester, P. (1984), in, "Metal and Ceramic Biomaterials", Vol. II-Strength and Surface : Ducheyne. P. Hastings, C. W. (Eds.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp.143 ~ 166.

Zipkin, I. (1966), "The Science of Nutrition and its Application in Clinical Dentistry", 2nd Ed. Saunders, Philadelphia, USA.

赤澤梅之・長野坤泰北・勝世敬一・工昌史・西陰研治. (1992). 北海道立工業試験場報告 : No. 291, 21.

高野直久 (1989). 天然アパタイト(HAP-B) : 魚骨からのバイオセラミックスについて."マリンバイオ海洋バイオ新素材・新物質" 監修 松永 是. シ-エムシ-. pp. 214~229.

## 제 2 장 건식법으로 분쇄한 Hydroxyapatite 및 Wollastonite가 첨가된 소결체의 특성

### 제 1절 서론

손상된 신체의 일부 혹은 골조직의 기능을 대신하거나 수복하기 위한 생체재료(biomaterials)로서 유기, 금속, 세라믹 등을 이용한 연구가 전세계적으로 활발하게 진행되고 있다(Nery 등, 1975; LeGross and Strunz, 1977; Grenoble 등, 1972; Kotlensky, 1965).

이들 재료 중 금속재료는 주위의 뼈보다 강도가 높고, 가공성이나 복잡한 형상을 부여할 수 있는 장점을 가지고 있으나 이를 고정시키기 위해 사용되는 시멘트와 금속이 생체에서 세포 손상을 야기시키는 독성반응을 일으킬 가능성이 있는 것으로 알려져 있다(Hench, 1991). 이러한 문제를 해결하기 위해 생체활성이 우수한 물질을 금속재료 표면에 코팅시켜 뼈의 조직과 보철(prosthetic)이 직접 결합할 수 있는 재료를 추구하게 되었다(LeGross, 1990; Jarco, 1981).

한편 기계적인 강도가 높기 때문에 뼈 또는 결합부분(joint replacement)의 대용물질로 폭넓게 사용되는 zirconia 혹은 alumina ceramics는 뼈와의 화학적 결합능력이 약하여 기계적으로 맞물리는 부분의 사용 제한성과 사용시간에 따라 계면이 노화되는 문제가 있다(Grenoble, 1972). 이에 반해 fluoroapatite [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ]와 tricalcium phosphate [TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ]와 같은 아파타이트계의 물질들은 손상된 인체 뼈를 수복시킬 수 있고, 이식재료와 생체세포간의 친화성이 좋아 뼈와 강한 화학적 결합을 할 수 있다는 사실이 밝혀지면서 아파타이트계의 물질들을 벌크 재료(bulk materials)로서 사용하기 위하여 생물학적인 친화성과 인체 뼈의 강도와 유사한 인조 대응물로서 활용이 가능한 세라믹에 대한 연구가 집중되고 있다

[LeGross, 1990; Paschlis, 1993; Hench and Wilson, 1993).

기존의 연구에서  $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ 계의 Bioglass<sup>®</sup>는 생체 친화성은 우수하였으나 강도가 낮다(Kokubo and Yamamuro, 1985). 이에 반해  $\text{Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 계의 Ceravital<sup>®</sup>은 친화성과 기계적인 강도가 우수한 것으로 알려져 있다(Kokubo, 1987). 그러나 Kokubo 등(1985)은 Na이온이 함유된 아파타이트 세라믹 소결체는 생체조직내에서 Na이온의 석출로 인하여 수복기간이 지연되고 기계적인 강도가 저하되는 것으로 보았다. 따라서 강도를 증진시키고 생체활성을 개선하기 위해 Na이온이 함유되지 않은  $\text{MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 계와  $\text{CaO-MgO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2$ 계의 glass와 glass-ceramics 등의 피로(fatigue)를 관찰한 결과, wollastonite와 아파타이트의 결정상을 함유한 경우는 wollastonite 결정상의 석출물이 파괴표면 에너지를 증가시켜 기계적인 강도를 증가시키는 것으로 보았다.

이러한 기존의 glass, glass-ceramics 등의 아파타이트계 세라믹 합성 연구에 사용되는 출발물질은 일반적으로 화학약품이 이용되고 있다. 그러나 생물체에서 추출한 주요 무기물이 hydroxyapatite임에도 불구하고(高野 등, 1989), 이를 이용한 세라믹 소결체의 특성에 관해서 알려진 바 없다. 그러나 최근 본 연구자들은 참치 뼈로부터 추출한 주요 무기물의 고유물성의 고찰에서 1350℃의 하소(calcination)온도까지는  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 의 화학식을 가지는 hydroxyapatite임을 밝혀 아파타이트계 세라믹 합성에 일반적으로 사용되는 화학시약에 대체하여 보철 혹은 이식(implant) 재료의 출발물질로서의 가능성을 보고하였다(이 등, 1997).

따라서 제 1장에서는 화학약품을 대신하여 참치 뼈에서 추출한 hydroxyapatite와 여기에 소결성 등의 물성 개선을 위해 wollastonite를 첨가하여 고상반응시킨 세라믹 소결체의 결정상, 미세구조와 격입강도 등의 특성을 고찰하였다.

## 제 2절 실험

### 1. 출발물질

참치 뼈를 850°C에서 3시간 하소하여 추출한 hydroxyapatite를 표준망체로 체가름(200 mesh)하여 알루미나 볼로 2일 이상 건식 밀링(dry milling)한 것을 hydroxyapatite의 출발물질로 하였다. 첨가제인 wollastonite(덕유세라믹통상 주식회사, 품명 0711) 역시 850°C로 하소하여 안정화된 것을 출발물질로 이용하였는데, 그 조성은 Table 1과 같다.

### 2. 소결방법 및 분석

유발에서 혼합된 Table 2-1의 시료 5g씩을 1×5cm 크기의 바(bar) 몰드에 투입하여 600 MPa 압력으로 성형하였다.

성형된 시편들을 전기로에 넣어 Table 2-1의 온도조건으로 세라믹 소결체를 제조하였다. 이때 전기로의 승온속도는 5°C/min이며, 배치조성에 따른 시편의 이름 역시 Table 2-1에 나타내었다.

소결된 시편들의 결정상은 X-ray diffractometer(Rigaku D/Max-2400)로 분석하였는데, 기기의 조건은 CuK $\alpha$  (60 kV, 80 mA)이며,  $2\theta$ 의 범위는 10~70°이다. 여러 온도와 조성으로 소결된 시편의 미세조직은 주사전자현미경(Hitachi S-4200)으로 관찰하였다. 꺾임강도 측정은 예비실험에서 소결성이 가장 양호하게 나타난 조성인 HW1을 선정하여 연마지 #100, 200, 400으로 일차 연마한 후, SiC 파우더 #1000으로 미세 연마한 것을 꺾임강도 측정용 시편으로 하였다. Crosshead speed는 0.05 mm/min이었으며, 사용된 기기는 Push Full Scale(Imada, Japan, FB30)였으며, 식 (1)과 같이 적용되는 4-점법(4-point bending)으로 5개의 시편을 측정하여 평균치를 구하였다.

Table 2-1. Batch Compositions and Treatment Conditions

Weight ratio (HAp:Wolla.**)	Weight(g)	Heating rate	Sintering temp. and time	Sample name
HAp	10	217°C/hr	1300°C, 1350°C, 1400°C, 3hr at air	HYD
1:1	10.00:10.00	217°C/hr	1250°C, 1300°C, 1350°C, 3hr at air	HW1
2:1	13.33:6.66	217°C/hr	1250°C, 1300°C, 1350°C, 3hr at air	HW2
3:1	15.00:5.00	217°C/hr	1250°C, 1300°C, 1350°C, 3hr at air	HW3
4:1	16.00:4.00	217°C/hr	1250°C, 1300°C, 1350°C, 3hr at air	HW4
5:1	16.66:3.34	217°C/hr	1250°C, 1300°C, 1350°C, 3hr at air	HW5

\*HAp.; Hydroxyapatite, \*\*Wolla.; Wollastonite

$$M = \frac{3F(l-l_0)}{3wT^2} \dots\dots\dots (1)$$

여기서  $M$ 은 bending strength(MPa),  $F$ 는 applied load(N),  $l$ 은 down span length,  $l_0$ 은 upper span length,  $w$ 는 specimen width(mm),  $T$ 는 specimen thickness(mm)의 항들을 각각 나타내며, 단위는  $\text{MPa} = \text{N/m}^2 = \text{force/area}$ 로 환산하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 입자크기와 소결성

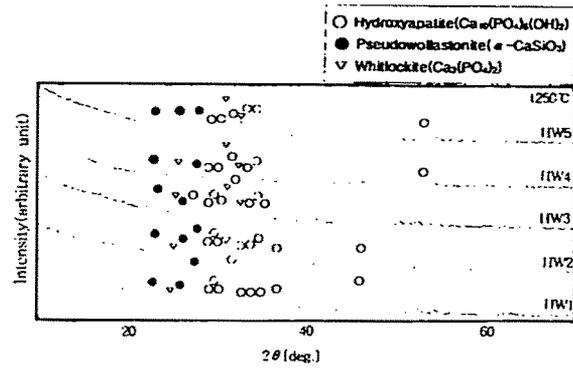
일반적으로 성형체(green body)의 각 입자들 사이에 25~60%로 존재하는 기공율은 소결온도에 따라 입자상호간에 물질 이동이 일어나기 때문에 기공율이 감소하여 치밀한 소결체가 얻어진다. 이 치밀화를 유도하는 반응 중에서 성형체의 체적변화없이 치밀화가 완료되는 반응을 고상반응이라 한다. 그러나 참치 뼈에서 추출한 천연 hydroxyapatite 자체인 Table 2-1의 배치조성에서 HYD시료는 소결온도에 관계없이 매우 취약한 치밀화가 일어나 성형체의 치밀화 과정이 진행되지 못함을 나타내었다.

하소온도에 따른 입자크기의 변화과정을 고찰한 경우, 1350℃에서 일부의 입자들은 고상소결의 진행과정에서 나타나는 입자간의 neck 형성과 이로 인해서 입자 크기분포는 하소온도에 따라 변화하는 양상(高野, 1989)을 보였으나, 건식방법으로 분쇄한 경우 볼 주위로 분쇄될 입자가 검(gum)처럼 달라붙어 분쇄효율을 저해하였다. 이로 인한 분쇄효율의 한계성이 소결성에 강한 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 따라서 입자크기에 따른 소결성의 고찰은 습식법(wet milling)으로 출발물질을 처리한 제 2장에서 고찰되어질 예정이다.

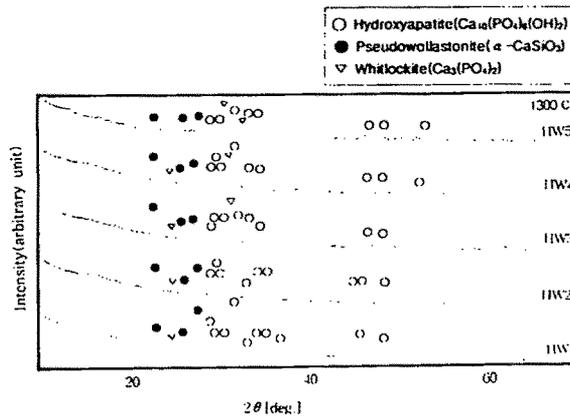
한편 알칼리 유리의 일종인 wollastonite( $\text{CaSiO}_3$ )가 첨가된 조성물의 시편은 wollastonite에 의해 생성된 액상 때문에 입자크기와 온도에 관계없이 소결이 가능하였다.

### 2. XRD 회절분석

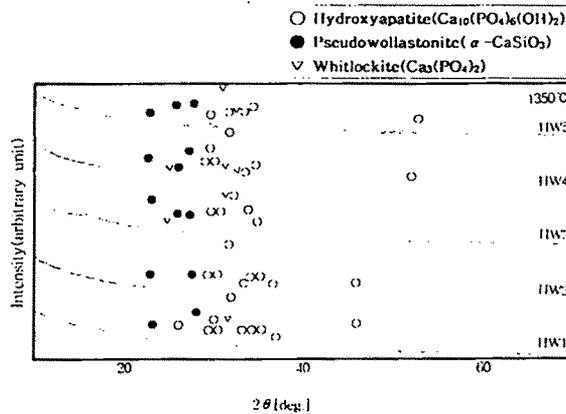
소결온도에 따른 결정상의 변화를 X-ray로 관찰하여 Fig. 2-1(a), (b), (c)에 나타내었다.



(a)



(b)



(c)

**Fig. 2-1. X-ray diffraction patterns of hydroxyapatite containing wollastonite sintered at (a) 1250 °C, (b) 1300 °C, (c) 1350 °C.**

1250℃의 소결상을 관찰한 Fig. 2-1(a)의 HW1과 HW2시편의 결정상은 hydroxyapatite와 pseudowollastonite로서 생체활성이 있다고 알려진 apatite-wollastonite glass-ceramics(A-W glass-ceramics)의 결정상과 유사하였다(Kokubo, 1987). 한편 hydroxyapatite의 함량이 상대적으로 증가된 조성물인 HW3, HW4와 HW5에서는 hydroxyapatite의 재분해에 의한 고온상인 whitlockite [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] 상의 피크가 결정상으로 나타났다. 이는 수분이 존재하는 900℃이하의 저온영역에서는 hydroxyapatite의 상이 형성되나, 수분이 존재하지 않는 900℃이상의 온도에서는  $\beta$ -whitlockite의 상이 형성된다는 보고와 일치하였다(Grenoble 등, 1972).

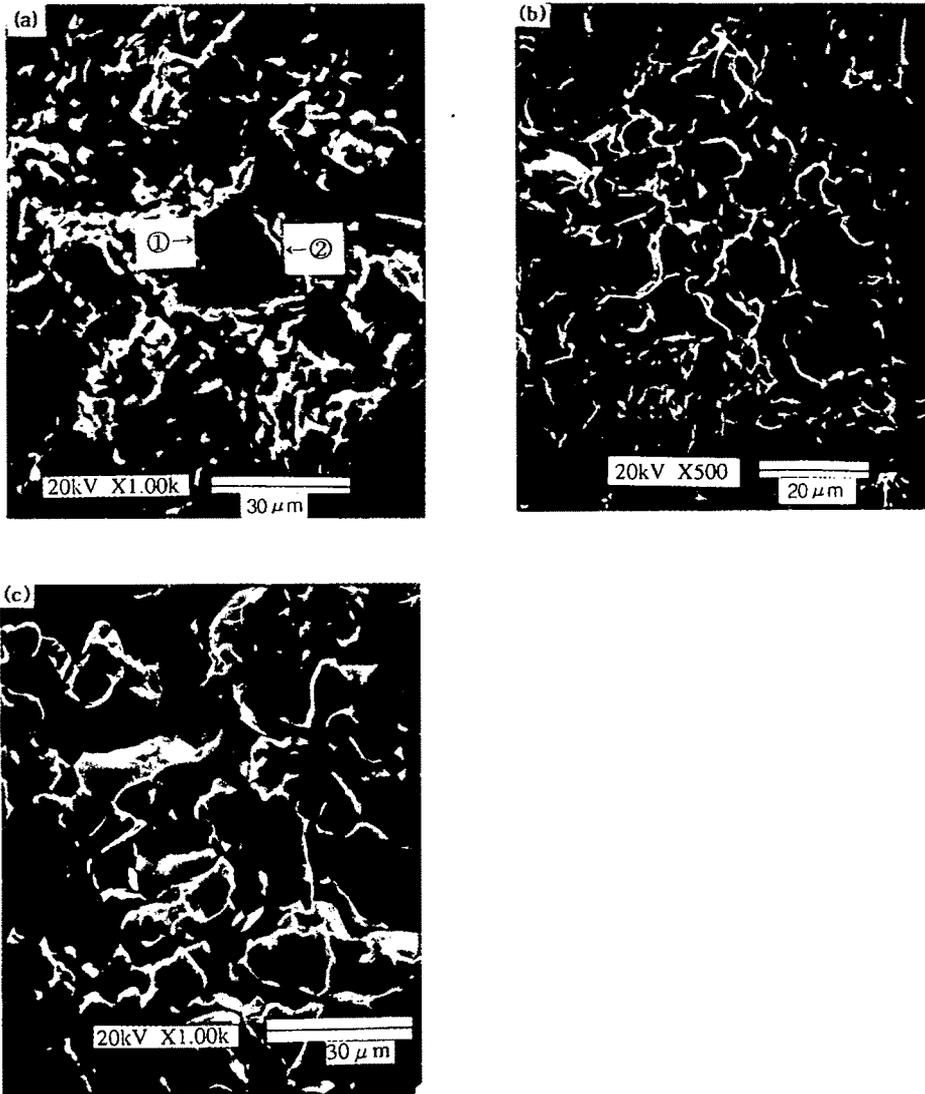
1300℃ 소결상을 관찰한 Fig. 1(b)의 경우, HW1과 HW2 조성물의 경우 hydroxyapatite와 wollastonite가 결정상으로 나타나 1250℃ 소결상과 유사하였다. HW3와 HW5의 결정상은 모두 whitlockite상이었고, HW4의 결정상은 hydroxyapatite와 pseudowollastonite로 각각 나타났다.

1350℃의 소결상을 관찰한 Fig. 2-1(c)의 경우, HW1과 HW2의 결정상 역시 hydroxyapatite와 wollastonite로 관찰되어 hydroxyapatite와 wollastonite의 무게비가 상호 유사하게 근접할 수록 소결온도에 관계없이 동일한 결정상을 가지는 것으로 나타났다.

### 3. 미세구조관찰

1250℃, 1300℃, 1350℃의 온도로 소결한 HW1시편 파단면의 미세구조를 관찰한 SEM사진을 Fig. 2-2(a), (b), (c)에 각각 나타내었다. Fig. 2-2(a), (b), (c)에서와 같이 소결체내에 다량의 기공들이 존재하는 형태를 보이고 있다. 이것은 일반적으로 고상소결에 의해서 제조된 세라믹의 경우와 같이 미세구조는 기공과 입계(grain)가 함께 혼합된 일반적인 형태를 보이고 있다.

HW1시편의 경우, 1250℃에서는 미세한 입자들과 많은 기공들이 관찰되어 소결의 진행정도가 낮았으며, 1300℃에서는 기공은 다소 남아있으나 소결이 상당



**Fig. 2-2. SEM images of the hydroxyapatite-containing wollastonite, HW1, sintered by solid-state reaction: (a) 1250 °C, (b) 1300 °C, (c) 1350 °C**

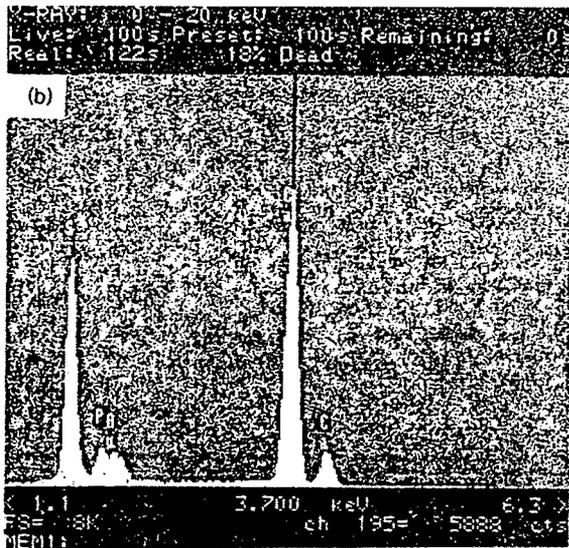
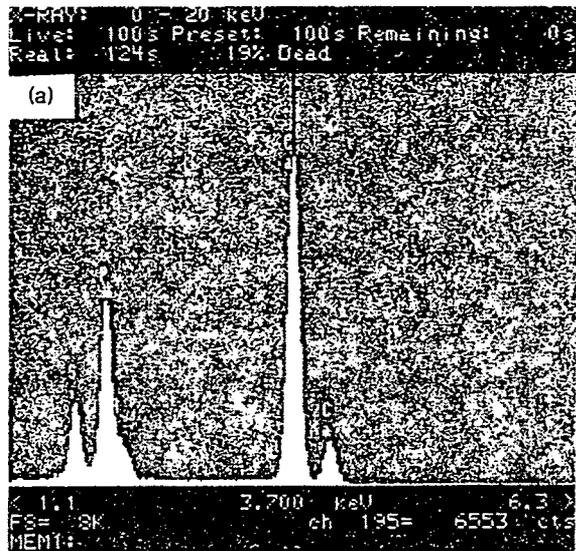
히 진행되었다. 그러나 1350℃에서는 보다 큰 기공이 형성되었는데, Fig. 2-1(c)의 X-ray 분석 결과와 함께 고찰해 볼 때 hydroxyapatite의 일부가 whitlockite로 분해되므로서 발생하는 H<sub>2</sub>O gas에 의해 기공이 커졌을 것으로 사료된다[Grenoble 등, 1972; Paschalis, 1993]. 또한 각 입자들의 경계영역에 있어서는 경계면(grain boundary)이 분명하지 않은 반면에 입자들의 입계가 상호 연결되어 충전이 일어난 형태를 보이고 있다. 결정입자들의 성분을 파악하기 위하여 Fig. 2-2(a)에 표기된 화살표(→①, ←②) 부분들을 EDS로 분석하여 Fig. 2-3(a), (b)에 나타내었다. Fig. 2-2(a)에서 입자의 중앙부분(→①)을 나타낸 Fig. 2-3(a)의 경우 이 성분들은 Ca, P-rich로 나타나 hydroxyapatite상으로 판단되었으며, Fig. 2-2(a)에서 입자의 경계부분(←②)을 나타낸 Fig. 2-3(b)의 경우 이 성분들은 Ca, Si-rich로 나타나 이 부분은 wollastonite인 것으로 파악되었다.

이에 반해서 HW2의 경우 1300℃와 1350℃에서 소결한 시편의 미세구조는 Fig. 2-4와 2-5에서와 같이 뚜렷한 입자간의 경계영역을 보이며, 경계면을 따라 균열(← 표기)이 형성된 미세구조를 볼 수 있었다. 이는 wollastonite에 의해 생성된 액상의 wettability가 낮기 때문으로 생각된다. 고온에서 생성된 액상은 냉각시 부피의 증가가 야기되어 입계간의 응력이 증가하므로서 입자 경계면을 따라 균열이 생성되기 때문에 Fig. 2-2(a), (b), (c)와 같은 미세구조를 가지는 것으로 생각된다.

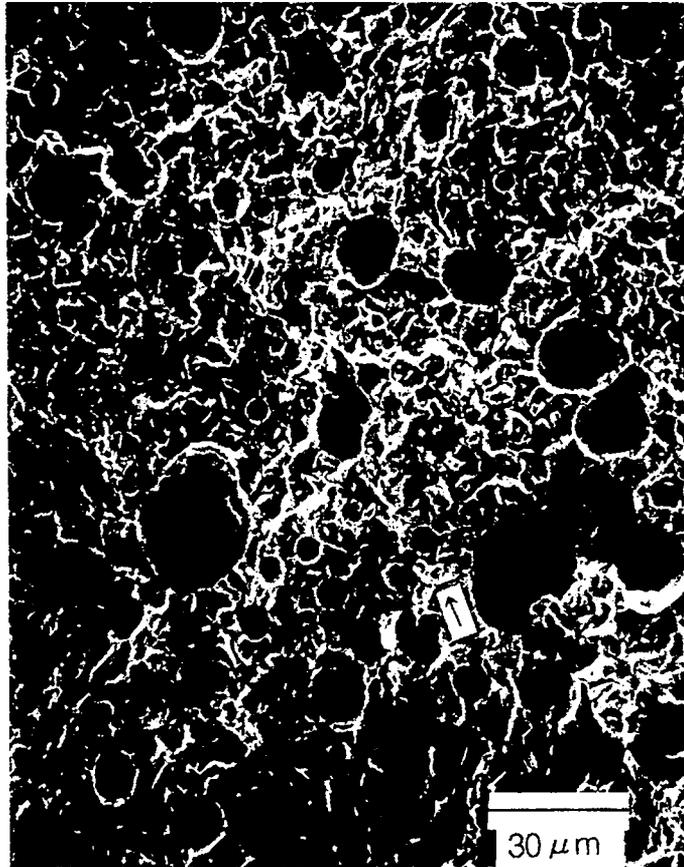
1300℃에서 소결한 HW2의 미세구조 역시 다수의 큰 기공들이 관찰되며(Fig. 2-4), 이들의 미세조직의 구조는 Fig. 2-2(b)와 같은 경향을 보였다. 또한 1350℃에서 소결한 HW3의 미세구조 Fig. 2-5에서 보이듯 소결은 상당히 진행되어 입자크기는 커졌으나 내부기공의 증가와 균열이 생기는 현상은 Fig. 2-4와 같았다.

#### 4. 꺾임강도(Bending strength)

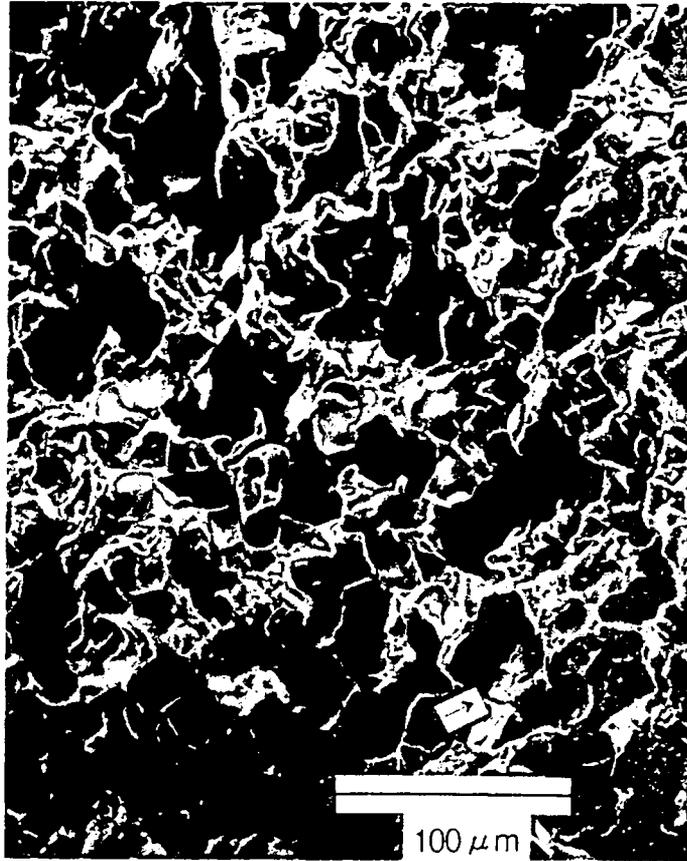
Kokubo와 Yamanura(1985)에 따르면 hydroxyapatite에 wollastonite의 함량이 증가



**Fig. 2-3. The EDS analysis of the HW1 specimen sintered at 1250 °C in air. (a)→① part, (b)←②.**



**Fig. 2-4. SEM photograph of the hydroxyapatite-containing wollastonite, HW2, sintered by solid-state reaction at 1300 °C**

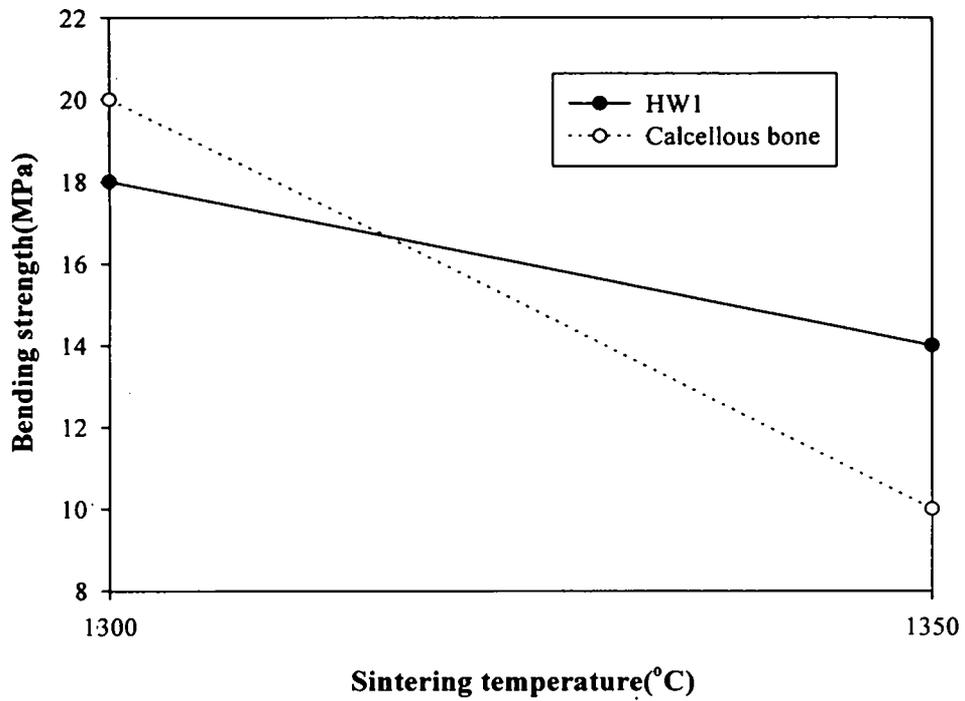


**Fig. 2-5. SEM photograph of the hydroxyapatite-containing wollastonite, HW2, sintered by solid-state reaction at 1350 °C**

할 수록 꺾임강도가 증가한다고 알려져 있어, wollastonite가 가장 많이 함유된 HW1시편들을 꺾임강도 측정용 시편으로 선정하였다. 그러나 1250℃이하의 HW1시편은 소결 진행도가 낮아 꺾임강도의 측정은 어려웠다.

1300℃의 HW1시편을 4-point로 꺾임강도를 측정하여 Fig. 2-6에 나타내었다. 이들의 평균 꺾임강도는 소결온도가 1300℃에서는 18 MPa, 1350℃에서는 14 MPa로 나타나 관절연골(articular cartilage)의 최대강도인 40 MPa(Kempson, 1982) 보다는 못하였지만, 해면골(cancellous bone)의 꺾임강도값인 10~20 MPa(Audeckecke and Martens, 1984)에 근접한 값을 나타내었다.

1300℃ 소결체의 꺾임강도가 가장 높은 값을 나타낸 것은 Fig. 2-2와 같이 상대적으로 치밀한 소결이 일어났기 때문이라 판단되며, 1350℃에서 꺾임강도가 다시 감소하는 것은 입자 경계면을 따라 형성된 균열이 강도에 영향을 미치기 때문이라 사료된다(Fig. 2-4, 2-5 참조).



**Fig. 2-6. The comparison of bending strength between investigated samples and the cancellous bone.**

## 제 4절 결론

참치 뼈로부터 추출한 hydroxyapatite와 여기에 소결성 증진을 위해 wollastonite를 첨가하여 고상반응시킨 세라믹 소결체의 특성은 다음과 같다.

건식법으로 분쇄한 hydroxyapatite의 소결성은 매우 취약하였으나, 여기에 wollastonite 첨가는 소결성과 기계적인 강도 증진의 효과를 나타내었다. X-ray 관찰에서 hydroxyapatite와 wollastonite가 1:1인 경우, 1300°C 이하에서는 hydroxyapatite와 pseudowollastonite가 혼재된 A-W glass-ceramics의 결정상을 나타내었다. 그러나 고온 영역에서는 hydroxyapatite의 분해에 따른 whitlockite 결정상이 관찰되었다.

상대적으로 가장 치밀한 미세구조의 조직은 hydroxyapatite와 wollastonite가 1:1인 조성에서 나타났다. 1300°C와 1350°C 소결체의 꺾임강도는 18 MPa와 14 MPa로 각각 나타나, 이 꺾임강도는 인체의 골강도 중에서 해면골(cancellous bone)의 강도, 10~20 MPa와 유사한 것으로 나타났다.

## 제 5절 참고문헌

- A. L. Jarcho, *Clin. Ortop.* **157**, 259(1981).
- D. E. Grenoble, J. L. Katz, K. L. Dunn, R. S. Gilmore and K. L. Murty, *J. Biomed. Mat. Res.*, **6**, 221(1972).
- E. B. Nery, K. L. Lynch, W. M. Hirthe and K. H. Mueller, *J. Periodont*, **46**, 328(1975).
- E. Kempson, *Annals of the Rheumatic Diseases*, **41**, 508(1982).
- L. Kotlensky. *Trans. Met. Soc., AIME*, **223**, 830(1965).
- L. L. Hench and J. Wilson, "An Introduction to Bioceramics", In Advances Series in Ceramics, Vol. 1, ed. by L. L. Hench & J. Wilson, World Scientific, pp. 7~8(1993).
- L. L. Hench, *J. Amer. Cera. Soc.*, **74**(7), 1487(1991).
- R. H. Paschalis, "Physicochemical Studies of Biologically Important Calcium Phosphates", Ph.D. State University of New York at Buffalo(1993).
- R. V. Audekercke and M. Martens, "Mechanical Properties of Cancellous Bone, in Natural and Living Biomaterials", Eds by G. W. Hastings and P. Ducheyne, pp. 89-98, CRC Press, Boca Raton, Florida(1984).
- R. Z. LeGeros, "Materials for Bone Repair, Augmentation and Implant Coatings", In Proceeding of the International Seminar of Orthopedic Res., Nagoya, Ed. by S. Niwa, (Spring-Verlag)(1990).
- R. Z. LeGross and V. Strunz, *Stain Technol.*, **52**, 217(1977),.
- T. Kokubo and T. Yamamuro, *J. Mat. Sci.*, **20**, 2001(1985).
- T. Kokubo, *J. Cera. Soc., Japan*, **95**(8), 786(1987).

T. Kokubo, S. Ito, M. Shigenmatsu, and T. Yamamura, *J. Mat. Sci.*, **20**, 2001(1985).

高野直久, "天然アパタイト(HAP-B) : 魚骨からのバイオセラミックスについて."マ

リンバイオ海洋バイオ新素材・新物質"監修 松永 是. シ-エムシ-. (1989).

이 창 국·최 진 삼·김 세 권·전 유 진, *한국수산학회*, **30**, 4(1997).

## 제 3 장 습식법에 의한 Hydroxyapatite 소결체의 특성

### 제 1절 서론

아파타이트(apatite)는 특정한 조성과 물질을 의미하는 것은 아니며, hexagonal lattice의 단위포(unit cell)와  $A_{10}(MO_4)_6X_2$ 의 화학식에서 A 이온 자리는 2가 금속 양이온,  $MO_4$ 와  $X_2$  자리는 3가와 1가 음이온으로 점유가능한 것으로 알려진 물질인데, 손상된 신체의 일부 혹은 골조직의 기능을 대신하거나 수복하기 위한 생체재료(biomaterials) 중에서 Ca/P의 원자 비율에 의해서 상이 결정되는 아파타이트계 세라믹만이 유일하게 우수한 생체 친화성 및 이식재료의 주위 세포와 강한 화학적 결합특성을 가지는 것으로 알려져있다(Paschalis, 1993; Albee, 1920; Hench, 1984). 이러한 아파타이트계의 물질들을 벌크재료(bulk materials)로서 사용하기 위하여 생물학적인 친화성과 인체 뼈의 강도와 유사한 인조 대응물로서 활용이 가능한 세라믹에 대한 연구가 집중되고 있다(Hench and Wilson, 1993).

제 2장의 경우(이 등, 1997) 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite를 이용한 세라믹 복합체의 소결특성에서 hydroxyapatite자체만의 소결성은 건식분쇄에 의한 입자 크기 분포의 제한성 때문에 소결온도에 관계없이 매우 취약한 소결성을 나타내었다. 따라서 제 2장에서는 습식법으로 출발물질의 미립자의 분포 유도와 이로 인한 소결 구동력(driving force)을 증가시켜 hydroxyapatite소결성의 향상을 증진하고자 하였다.

또한 기존의 연구에서 Na이온이 함유된 아파타이트 세라믹 소결체는 생체조직 내에서 Na이온의 석출로 인하여 수복기간이 지연되고 기계적인 강도가 저하되는 것으로 보았다(Kokubo 등, 1985). 따라서 Na 이온을 함유하지 않는 순수한 hydroxyapatite를 여러 온도로 고상반응(solid-state reaction)시킨 hydroxyapatite세라

믹 소결체의 밀도, 기공율, 결정상, 미세구조와 인체골격의 강도와 비교 고찰하고자 하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 출발물질 및 소결체 제조

출발물질은 제 2장과 마찬가지로 참치뼈를 850℃에서 3시간 하소(calcination)하여 추출한 hydroxyapatite를 체가름(200 mesh)하여 물과 알루미나 볼(alumina ball)을 투입하여 3일동안 습식밀링(wet milling)하였다.

### 2. 합성 및 분석방법

시편의 초기 성형성을 유지하기 위하여 3wt% PVA 수용액을 결합제(binder)로서 출발물질에 1wt% PVA를 첨가하였다. 이것을 80℃로 유지된 건조기에서 건조한 후 분쇄하여 25×30mm의 사각 몰드에 시료 2.5g 썩을 넣고 3 ton/cm<sup>2</sup>의 압력으로 가압성형하였다. 가압하여 만든 성형체는 전기로에서 600℃로 1시간 동안 유지하여 유기 결합제를 휘발시킨 후, 1,000℃까지는 20℃/min, 이후 설정온도까지는 10℃/min로 승온하여 3시간 동안 소결하였는데, 소결한 온도는 1200~1450℃까지 50℃의 간격으로 고상소결하였다. 이때 소결은 대기 하에서 이루어졌다.

소결시편의 밀도(bulk density)와 기공율(open porosity)은 식 (1)과 (2)로 구하였다(Andrews, 1957).

$$\text{밀도} = \frac{\text{건조무게}}{\text{시편의물함유무게} - \text{물속에서의시편무게}} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{기공률} = \frac{\text{시편무게}}{\text{전체체적(기공포함)}} \dots\dots\dots (2)$$

소결된 시편들의 결정상은 X-ray diffractometer(Rigaku D/Max-2400)로 분석하였

으며, 분석 조건은  $\text{CuK}\alpha$  (60 kV, 80 mA),  $2\theta$ 의 범위는  $10\sim 70^\circ$ 로 하였다. 여러 온도와 조성에 따라 소결된 시편의 미세조직은 주사전자현미경(scanning electron microscopy, Hitachi S-4200)으로 관찰하였다. 강도 측정은 예비실험에서 밀도와 기공율이 가장 낮은  $1300^\circ\text{C}$ ,  $1350^\circ\text{C}$ 의 시편을 선정하여 제 2장의 방법과 동일하게 연마지 #100, 200, 400으로 일차 연마한 후, SiC파우더 #1000으로 미세연마한 것을 강도 측정용 시편으로 하였다. Crosshead speed는  $0.05\text{ mm/min}$ 이었으며, 사용된 기기는 LLOYD instrument(England)이었으며, 식 (3)과 같이 적용되는 4-점법(4-point bending)으로 5개의 시편을 측정하여 평균치를 구하였다.

$$M = \frac{3F(l-l_0)}{3\omega T^2} \dots\dots\dots (3)$$

여기서  $M$ 은 bending strength(MPa),  $F$ 는 applied load(N),  $l$ 은 down span length,  $l_0$ 은 upper span length,  $\omega$ 는 specimen width(mm),  $T$ 는 specimen thickness(mm)의 항들을 각각 나타내며, 단위는  $\text{MPa} = \text{N/m}^2 = \text{force/area}$ 로 환산하였다.

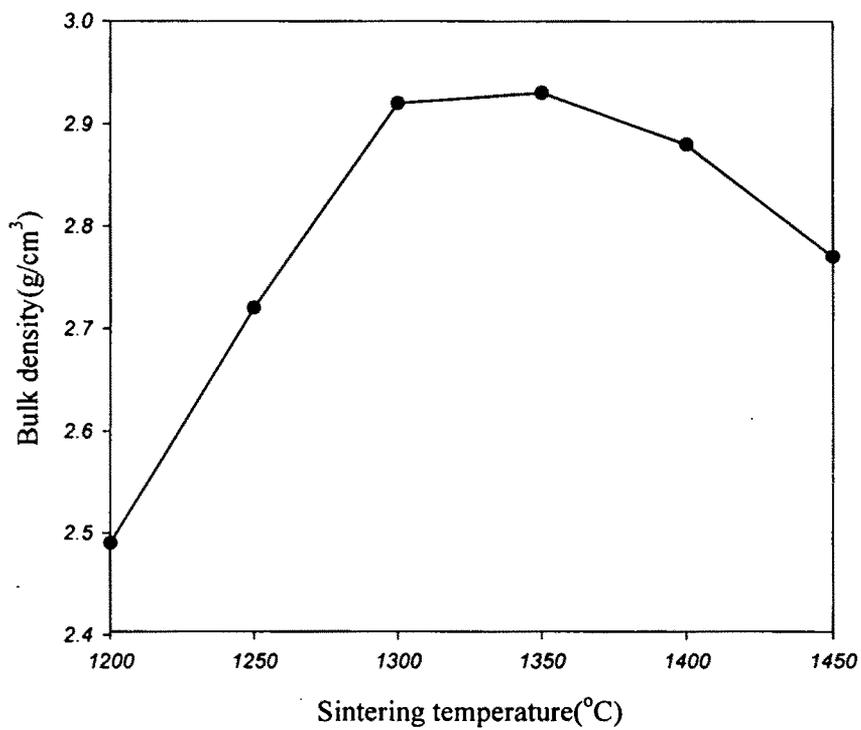
## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 소결체의 밀도 및 기공율

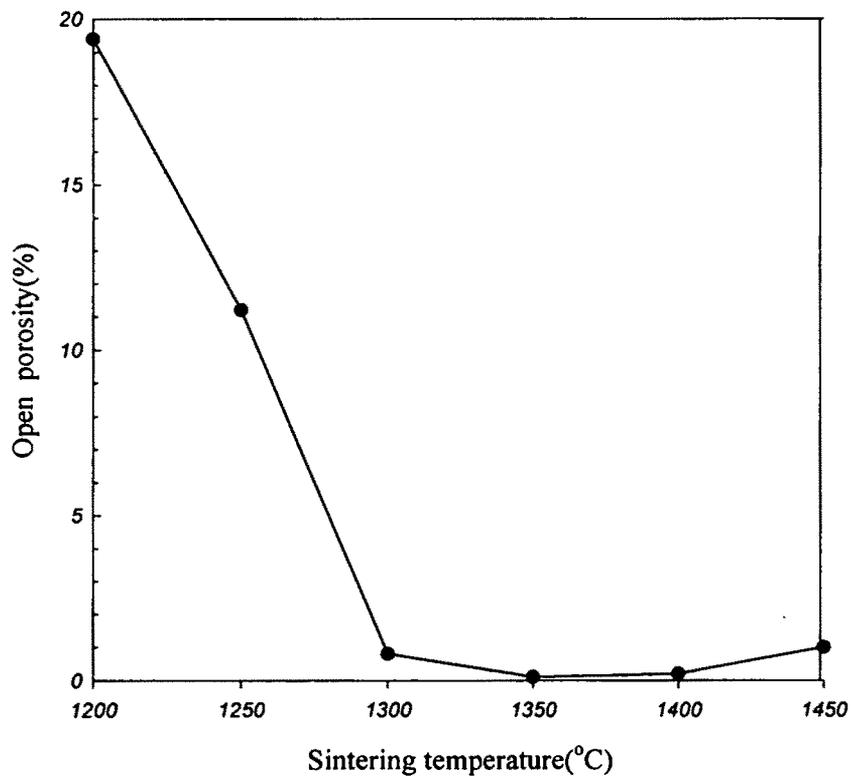
성형체의 밀도(bulk density)를 측정하여 Fig. 3-1에 나타내었다. Fig. 3-1에서 보듯 밀도는 1200°C에서 2.49 g/cm<sup>3</sup>, 1350°C에서는 2.93 g/cm<sup>3</sup>로 소결온도의 증가에 따라 증가하다가 1400°C 부터는 2.85 g/cm<sup>3</sup>로 감소하는 경향을 보이고 있어, 1300°C부근에서 가장 치밀한 소결이 이루어졌음을 나타낸다고 볼 수 있다. 한편 1300°C부근의 밀도, 2.92 g/cm<sup>3</sup>와 1350°C의 밀도, 2.93 g/cm<sup>3</sup>는 Grenble 등(1972)의 계산밀도, 3.21 g/cm<sup>3</sup>에 근접하는 것으로 나타났다.

기공율(open porosity)을 측정한 Fig. 2의 경우, 1350°C까지는 기공율이 감소하다가 고온 영역으로 갈수록 기공율은 다시 증가하는 경향을 보여 밀도와 반대되는 경향을 나타내고 있다. 소결온도에 따른 소결체의 밀도와 기공율의 변화는 소결체의 체적과 미세구조의 변화와 연관이 있다. 실제로 hydroxyapatite와 wollastonite가 1:1인 성형체의 미세구조를 관찰한 제 2장의 경우 1300°C의 소결체 보다 1350°C에서 큰 기공이 형성되었고, 소결상 또한 hydroxyapatite의 재분해에 의한 whitlockite(Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)상의 피크가 X-ray관측에서 나타났다. 또한 소결온도에 따른 소결체의 밀도와 기공율 변화는 hydroxyapatite의 일부가 whitlockite로 분해됨으로써 발생하는 H<sub>2</sub>O gas가 소결체의 기공율을 변화시키는 모델로 설명이 가능함을 의미한다(이 등, 1977).

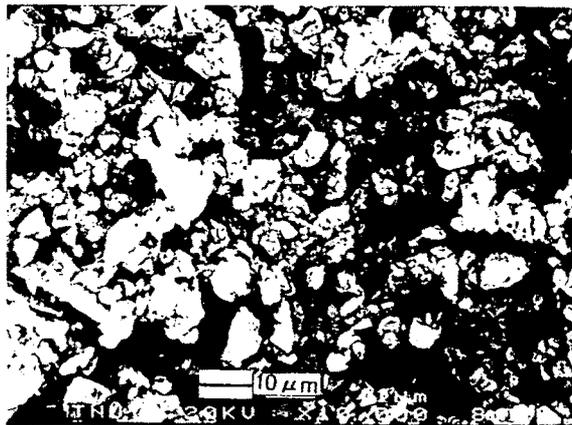
한편 건식법으로 출발물질을 처리한 경우, hydroxyapatite자체는 분쇄효율의 한계성 때문에 소결온도에 관계없이 치밀화 과정이 진행되지 못하였으나, 습식법으로 처리한 경우에는 치밀한 소결체가 얻어졌다. Fig. 3-3은 습식법으로 24시간 분쇄한 입자의 미세구조를 나타내었는데, 입자의 크기는 최대 2μm 이내로서 표면적에 의한 소결구동력이 건식법으로 출발물질을 처리한 경우 보다 상대적으로



**Fig. 3-1. The bulk density variation of hydroxyapatite sintered as fuction of temperature.**



**Fig. 3-2. The open porosity variation of hydroxyapatite sintered as function as functions of temperatures**



**Fig. 3-3. SEM image of the hydroxyapatite powder crushed during 24hrs with wet milling process.**

로 높아 소결 진행도가 높은 것으로 판단되었다.

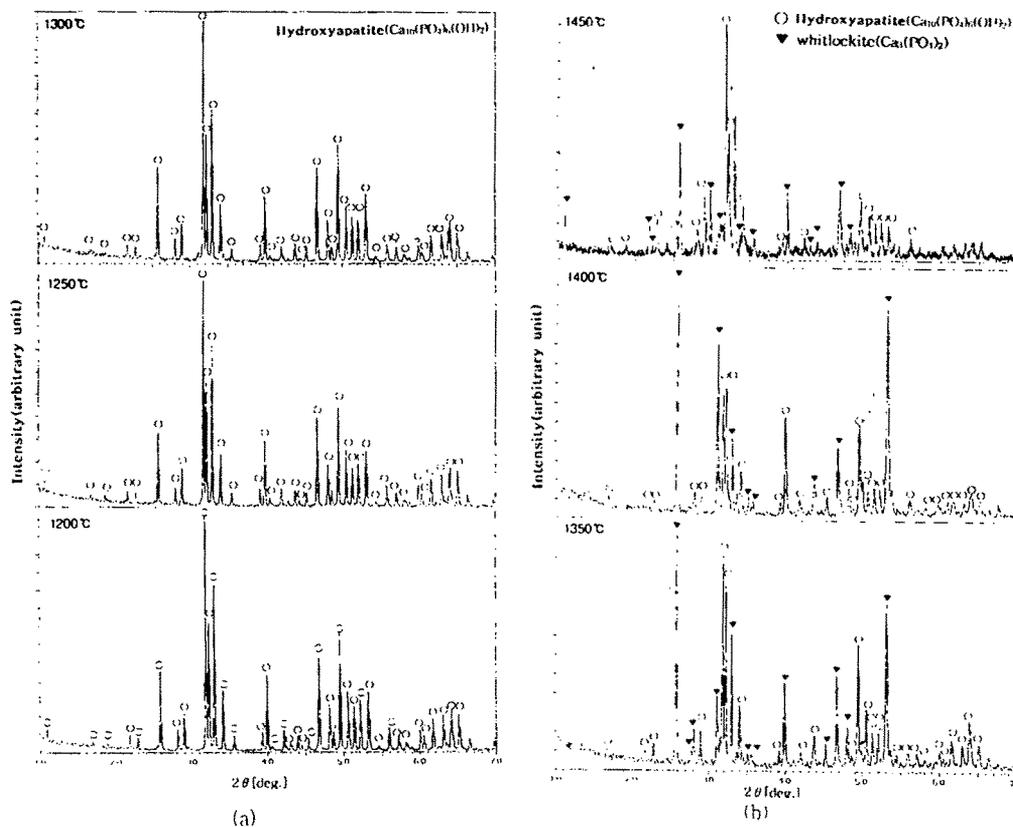
## 2. XRD 회절분석

소결온도에 따른 시편상의 변화를 X-ray로 관찰하여 Fig. 3-4(a), (b)에 나타내었다. 소결온도에 따른 상의 변화는 Fig. 3-4(a)와 같이 1300°C까지의 결정상은 hydroxyapatite( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )였다. 그러나 1350°C 이상의 소결상을 분석한 Fig. 3-4(b)에서는 hydroxyapatite의 고온상인 whitlockite( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )가 결정상으로 나타나기 시작하였고, 1400°C에서는 whitlockite의 결정상의 피크가 상대적으로 증가하는 것으로 나타났다.

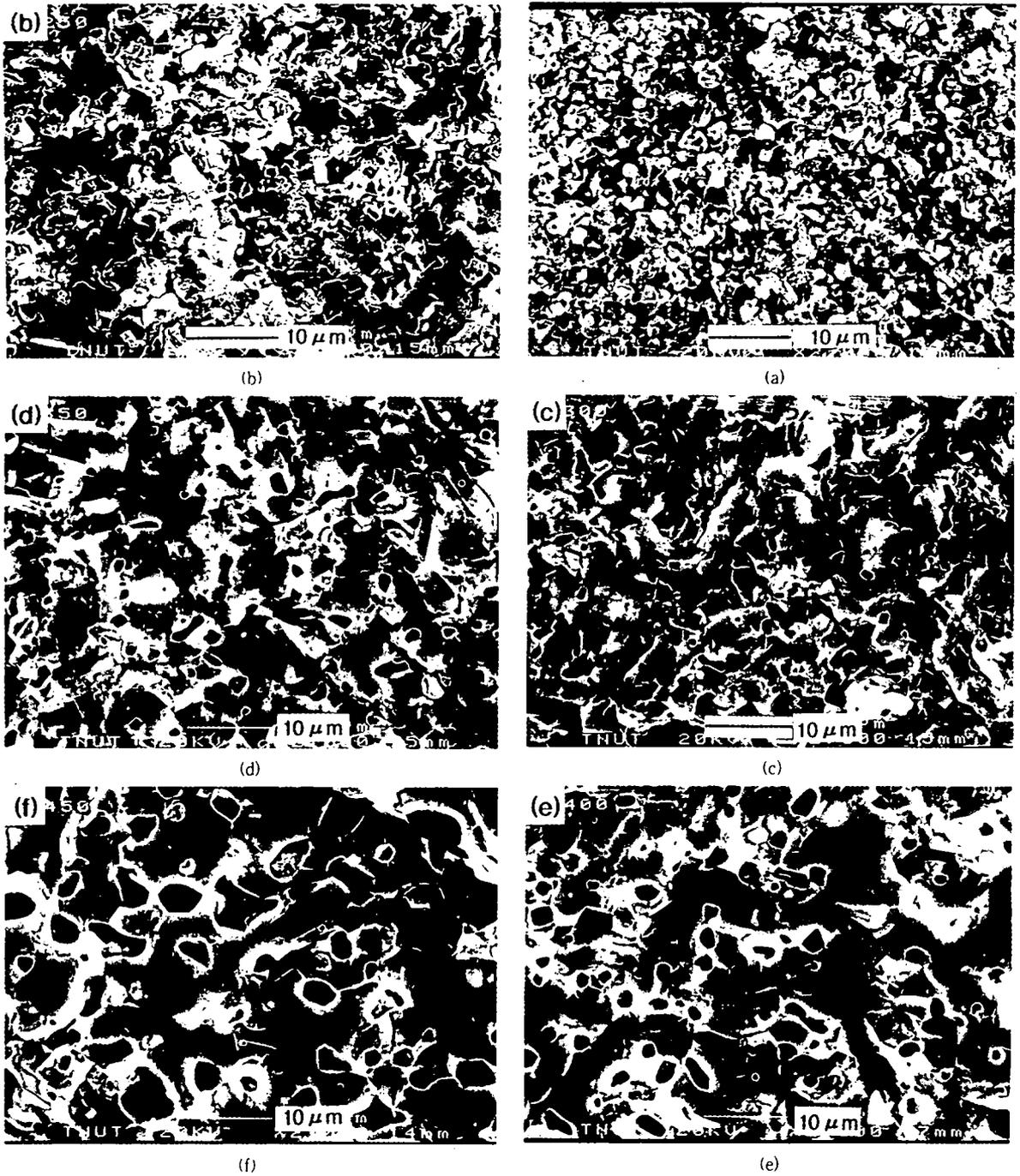
LeGeros 등(1990)에 따르면 생물체로부터 추출한 아파타이트의 고유 특성으로서는 수분이 존재하는 950°C 이상의 온도에서는 hydroxyapatite와 hydroxyapatite + CaO가 잔존한다고 하였다. 그러나 본 연구에서와 같이 1% NaOH 수용액을 이용하여 생물체에서 hydroxyapatite를 추출한 경우는 소결온도에 관계없이 hydroxyapatite와 hydroxyapatite + CaO가 잔존하는 특성을 보이고 있지는 않는데, 이는 hydroxyapatite의 추출방법 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 이와 같은 경향은 대구뼈와 소뼈등에서 hydroxyapatite를 추출한 경우에서도 1300°C 부근의 온도에서 hydroxyapatite의 결정상이 관찰되는 동일한 양상의 결과를 나타내었다(Kempson, 1982; Audekercke and Martens, 1984).

## 3. 미세구조관찰

Fig. 3-5(a)는 1200°C, (b)는 1250°C, (c)는 1300°C, (d)는 1350°C, (e)는 1400°C, (f)는 1450°C의 온도로 각각 소결한 시편의 파단면 미세구조를 관찰하여 나타낸 것이다. Fig. 3-5(a), (b)에 보이듯 고체입자는 입자들간의 접촉면적을 증가하는 방향으로 neck가 형성되기 시작하여 소결의 초기단계와 같은 형태를 보이고 있다. 이후 Fig. 3-5(c)와 3-5(d)에서와 같이 재료내의 기공 감소와 입체들이 상호 강하게 결합되며, 기공율의 감소가 일어나는 형태의 일반적인 소결체의 미세구조를 나



**Fig. 3-4. (a) X-ray diffraction patterns of hydroxyapatite sintered at 1200 °C, 1250 and 1300 °C in air, (b) X-ray diffraction patterns of hydroxyapatite sintered at 1350, 1400 and 1450 °C in air.**



**Fig. 3-5. SEM images of the specimen surfaces sintered by various temperature. (a) 1200 °C, (b) 1250 °C, (c) 1300 °C, (d) 1350 °C, (e) 1400 °C, (a) 1450 °C,**

타내고 있다. 이는 밀도와 기공율을 측정한 Fig. 3-1과 Fig. 3-2에서와 같이 1300°C 부근에서 가장 높은 밀도와 가장 낮은 기공율을 나타낸 경향과 일치하였다.

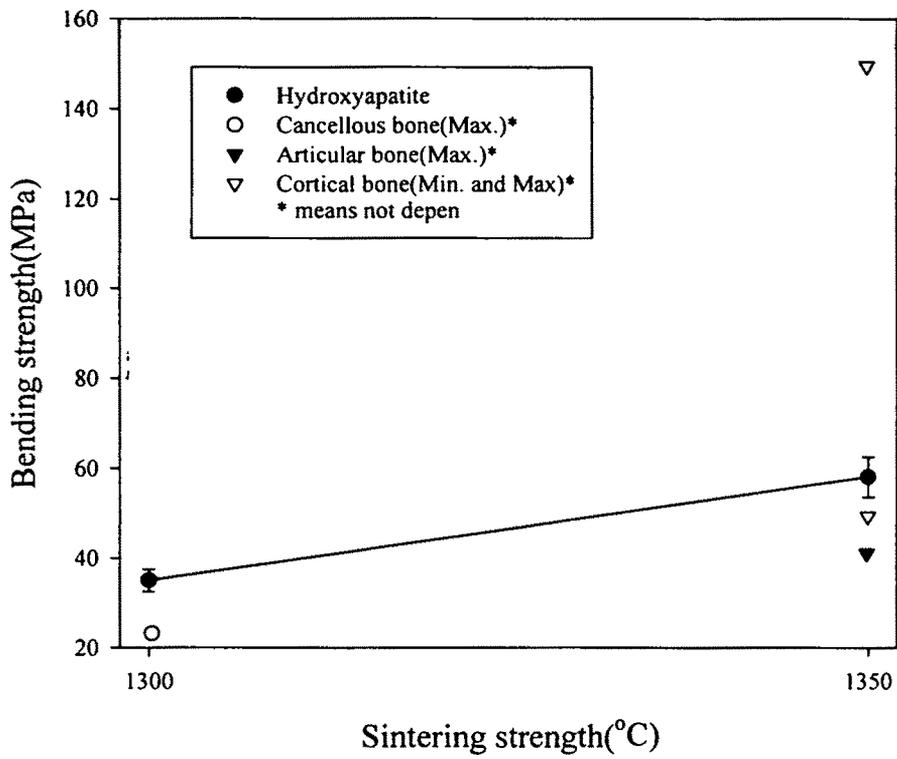
그러나 이 이상의 온도에서는 입계의 성장과 hydroxyapatite의 일부가 whitlockite로 분해됨으로서 발생하는 H<sub>2</sub>O gas로 인한 폐기공의 증가가 일어나기 때문에 Fig. 3-4(e), (f)와 같은 미세구조를 가지는 것으로 판단된다(이 등, 1997).

#### 4. 강도(bending strength) 측정

소결시편 중에서 계산밀도에 근접하고 0%의 기공율을 가지는 1300°C와 1350°C의 소결시편을 선정하여 4-점법으로 강도를 측정하여 Fig. 3-6에 나타내었다. 이들의 평균강도는 소결온도가 1300°C인 경우 35 MPa이었으며, 1350°C인 경우 58 MPa로 각각 나타났다.

습식법으로 출발물질을 처리한 제 3장의 경우(Kokubo 등, 1985) 강도가 가장 우수한 소결시편의 강도는 18 MPa로서 나타났으나, 습식법으로 출발물질을 처리한 1350°C의 강도는 58 MPa로 나타나 이들의 3배 이상의 강도를 발현하였다. 이의 인자들로서는 출발물질의 입자크기가 소결성, 밀도, 기공율 및 강도 등과 같은 물성에 강한 영향을 미치는 일반적인 경향과 일치하였다.

이 강도들을 인체의 뼈와 비교해보면 1300°C소결시편의 강도, 35 Mpa은 관절 연골(articular cartilage)의 최대강도인 40 MPa(Kempson, 1982)에 근접하였으며, 1350°C소결시편의 강도, 58 Mpa은 골격골(Cortical bone)의 강도, 40~90 Mpa(Audekercke and Martens, 1984) 범위에 드는 것으로 나타났다.



**Fig. 3-6. Comparison of bending strength between hydroxyapatite and human bone**

## 제 4절 결론

참치 뼈로부터 추출한 hydroxyapatite( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )를 습식법으로 분쇄하여 고상반응시킨 세라믹 소결체의 밀도, 결정상, 미세구조 및 강도를 고찰 결과는 다음과 같은 결론을 얻었다.

소결체의 밀도(bulk density)는  $1350^\circ\text{C}$ 에서  $2.93 \text{ g/cm}^3$ 로 나타나 이론밀도,  $3.21 \text{ g/cm}^3$ 과 기공율(open porosity)은 0%에 근접하는 것으로 나타났다.

소결온도에 따른 상의 변화에서  $1300^\circ\text{C}$ 까지는 hydroxyapatite( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )였으나, 고온으로 갈수록 hydroxyapatite의 분해에 따른 whitlockite( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )가 결정상으로 나타나기 시작하였다.

소결온도에 따른 미세구조 역시  $1200^\circ\text{C}$ 까지는 입자들간의 접촉면적을 증가하는 방향으로 neck가 형성되는 소결의 초기단계의 형태를 보였고,  $1300^\circ\text{C}$  부근에서는 재료내의 기공 감소와 입계들이 상호 강하게 결합되며, 기공율의 감소가 일어나는 형태의 미세구조를 나타내었다. 그러나 고온으로 갈수록 입계의 성장과 hydroxyapatite의 일부가 whitlockite로 분해되므로서 발생하는  $\text{H}_2\text{O}$  gas로 인한 폐기공의 증가가 나타는 미세구조를 보였다.

소결온도가  $1300^\circ\text{C}$ 인 경우 소결강도는  $35\text{MPa}$  및  $1350^\circ\text{C}$ 에서는  $58\text{MPa}$ 로 각각 나타나 소결강도는 소결온도에 의존함을 보였다. 이는 소결온도에 따른 시편의 강도차이는 밀도와 기공율 측정에서 가장 우수한 소결밀도와 낮은 기공율이 나타나는  $1350^\circ\text{C}$ 의 소결시편이  $1300^\circ\text{C}$ 의 시편보다 우수한 강도를 발현하는 것과 일치하였다.  $1300^\circ\text{C}$ 시편의 강도,  $35 \text{ MPa}$ 는 관절연골(articular cartilage)의 최대강도,  $40 \text{ MPa}$ 에 근접하며,  $1350^\circ\text{C}$ 시편의 강도,  $50 \text{ Mpa}$ 은 골격골(Cortical bone)의 강도,  $40\sim 90 \text{ MPa}$  범위에 드는 것으로 나타났다.

## 제 5절 참고문헌

- R. H. Paschalis, "Physicochemical Studies of Biologically Important Calcium Phosphate", Ph.D. State University of New York at Buffalo(1993).
- F. H. Albee, *Ann, Surg.*, 71, 32~36(1920).
- L. L. Hench, "Bioactive Ceramics, Bioceramics", In *Materials Characteristics versus in vivo Behavior*, Eds., P. Ducheyne and J. Lemons, *Annals of NY Academy of Science*. Vol. 523, pp. 54(1984).
- L. L. Hench and J. Wilson, "An Introduction to Bioceramics", In *Advanced Series in Ceramics*. Vol. 1. ed. by L. L. Hench & J. Wilson. World Scientific, pp. 7~8(1993).
- 이창국 · 최진삼 · 전유진 · 변희국 · 김세권, *한국수산학회지*, 30(4), 652~659(1977).
- T. Kokubo, S. Ito, M. Shigenmatsu and T. Yamamura, *J. Mat. Sci.*, 20, 2001~2004(1985).
- A. I. Andrews, "Ceramic Glazes, Bodies, and Enamels, Chapter VI. and The Compounding of Raw Glazes and the Calculation of Formula to Recipe and Recipe to Formula, Chapter VII", In *Ceramic Test and Calculations*. John Wiley & Sons. Inc. NY. pp. 51~71(1957).
- D. E. Grenble, J. L. Katz, K. L. Dunn, R. S. Gilmore and K. L. Murty, *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 221~233(1972).
- R. Z. LeGeros, (1990), "Materials for Bone Repair, Augmentation and Implant Coatings", In *Proceeding of the International Seminar of Orthopedic Res.*, Nagoya, Ed. by. S. Niwa, (Spring-Verlag).

## 제 4 장 바이오 글래스가 첨가된 Hydroxyapatite 복합체 및 Glass-Ceramics의 특성

### 제 1절 서론

치과와 정형외과 수술용으로 사용될 수 있는 특수한 금속과 세라믹스가 의료용 재료로 관심을 끌게 되었다. 뼈 대용 금속은 주위의 뼈보다 높은 강도를 갖고 있으나 이를 고정시키기 위해 사용되는 시멘트와 금속이 생체와 바람직하지 않는 쪽으로 반응하게 된다. 이 때문에 뼈의 조직과 보철이 직접 결합할 수 있는 바이오 세라믹스와 같은 생체활성이 있는 생체재료를 추구하게 되었다 (Kokubo, 1987, 1985; Hench, 1984; Hayek, 1963; Raemdock and Nowsly, 1984).

의료용에서 주로 뼈를 대용하여 사용되는 바이오 세라믹스는 사용된 제조공정과 미세구조를 바탕으로 8가지로 분류된다. 이들 미세구조에 따른 분류에는 glass, 다결정 세라믹스(cast of rapidly solidified polycrystalline ceramics), 다결정 glass-ceramics(polycrystalline glass-ceramics), 액상소결 세라믹스(liquid-phase sintered ceramics), 고상소결 세라믹스(solid-state sintered ceramics), 열성형 세라믹 혹은 glass-ceramics(hot pressed ceramics or glass-ceramics), 솔-젤 유리 혹은 glass-ceramics(sol-gel glass or glass-ceramics), 다상복합체(multiphase composite) 등이 있다 (Berger et al., 1989; deGroot, 1983; Craig, 1981; Chan et al., 1992; Hulber et al., 1986; Kotlensky, 1965; Kronenthal and Oser, 1975).

이들의 미세구조 차이는 주로 출발원료와 제조과정 중의 열처리 정도에 좌우되며 이들 상의 용도는 요구되는 물성이나 기능에 따라 결정된다. 예를 들어  $Al_2O_3$ 의 단결정인 사파이어(sapphire)는 높은 강도 때문에 치과용 이식재료로 사용된다 (LeGeros, 1974; LeGeros, 1967; LeGeros, 1990; Racqel et al., 1993).

이들 세라믹 물질중에서 glass-ceramics으로 시판되는 Ceravital<sup>®</sup>은 인체뼈에 버금가는 최대 150 MPa의 높은 기계적인 강도를 나타내나 생체활성이 약하다는 단점을 나타낸다 (Bromer et al., 1973; Grenoble et al., 1972).

뼈의 생물학적 상인 아파타이트는 침전법, 가수분해법 또는 수열합성법으로 제조할 수 있으나, 이렇게 제조된 치밀한 아파타이트도 인체뼈보다 강도가 약하다는 문제를 갖고 있어 위에서 언급한 인공재료가 이용되고 있다. 이중 유리는 강도가 약하여 뼈를 직접 대치할 수는 없으며 코팅용이나 시멘트용에만 가능한 것으로 알려져 있어 보철에 직접적으로 적용할 수 있는 것은 glass-ceramics가 주종을 이룬다 (Ramedock et al., 1984).

Glass-ceramics는 적절한 핵형성제를 함유한 적당한 조성의 기본유리를 먼저 제조한 다음 핵 형성과 결정성장의 단계를 수반하는 열처리 과정을 거쳐 얻어진다. Bio glass-ceramics중 Ceravital<sup>®</sup>은 150 MPa정도의 높은 기계적인 강도를 나타내나 생체활성이 약하다. 반면에 A-W glass-ceramics는 Ceravital<sup>®</sup>보다도 높은 기계적 강도와 큰 생체활성을 보여 가장 바람직한 보철용 바이오 세라믹스로 알려져 있다 (Ohtsuki et al., 1991; Beger et al., 1973; Audekercke and Martens, 1984; Kokubo, 1986; Kokubo et al., 1987).

참치뼈로부터 추출한 hydroxyapatite를 출발물질로 이용하여 제조한 고상반응 소결체의 물성을 고찰한 제 2장의 경우 hydroxyapatite 자체만의 소결강도는 매우 취약한 것으로 나타났다. 그러나 강도증진을 위해 wollastonite를 첨가하여 고상반응시킨 소결체는 hydroxyapatite와 wollastonite의 무게비가 1:1인 경우 1350℃에서 가장 양호한 소결성을 나타내는 것으로 파악되었다. 이들의 주 결정상과 부 결정상은 hydroxyapatite상과 wollastonite상으로 나타났으나, 이들 시편의 강도는  $17.91 \pm 0.19$  MPa로서 관절연골(articular cartilage)의 최대강도인 40 MPa 보다는 못하였으나, 해면골(cancellous bone)의 최대강도인 20 MPa에 근접하는 것으로 나타나 골격구조 대체물로서의 강도는 매우 미약한 것으로 파악되었다. 따라서 제 3

장에서는 참치뼈로부터 추출한 천연 hydroxyapatite에 wollastonite와 바이오글래스를 첨가한 복합체 및 glass-ceramics을 제조하여 강도 개선을 시도하고자 하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 재료

Table 4-1의 조성중 BG1의 CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 공급원으로서는 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite였으며 BG2의 경우 CaO, SiO<sub>2</sub>의 공급원으로서는 wollastonite를 사용하였다. BG1의 경우 아파타이트로부터 공급되지 않는 핵형제인 CaF<sub>2</sub>와 MgO 등은 CaF<sub>2</sub>와 MgO 화학시약(Junsei Chem., Co)을 출발물질로 이용하였다.

바이오글래스의 제조에 적용된 배치조성은 Table 4-1과 같다. BG1으로 명명된 바이오 글래스는 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계의 유리이며, 이들의 조성은 CaO 49.9, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 7.14, CaF<sub>2</sub> 0.4, SiO<sub>2</sub> 35.42, MgO 7.14(mol%)이다. BG2는 CaO-SiO<sub>2</sub>계 유리로서 이들의 조성은 33.3 CaO, 66.7 SiO<sub>2</sub>(mol%)이다. BG1은 생체활성이 있다고 알려진 A-W glass-ceramics의 조성에 의하였으며, BG2는 생체내에서 수용액과의 반응에 의해서 아파타이트 상을 형성한다고 알려진 바이오글래스 조성에 근접하여 설정한 것이다 (Kokubo and Yamamura, 1985; Ito, 1986).

### 2. 실험방법

#### 가. 바이오글래스의 제조

바이오 글래스와 복합체 및 glass-ceramics의 제조 방법은 Fig. 4-1과 같다. BG1의 제조는 바이오글래스의 BG1의 조성들을 무게비로 칭량하여 마노유발에서 장시간 혼합하였다. 혼합된 배치를 백금 도가니에 담아서 1450℃에서 3시간 용융한 후 급냉(quenching)시켜 바이오 글래스 BG1을 만들었다.

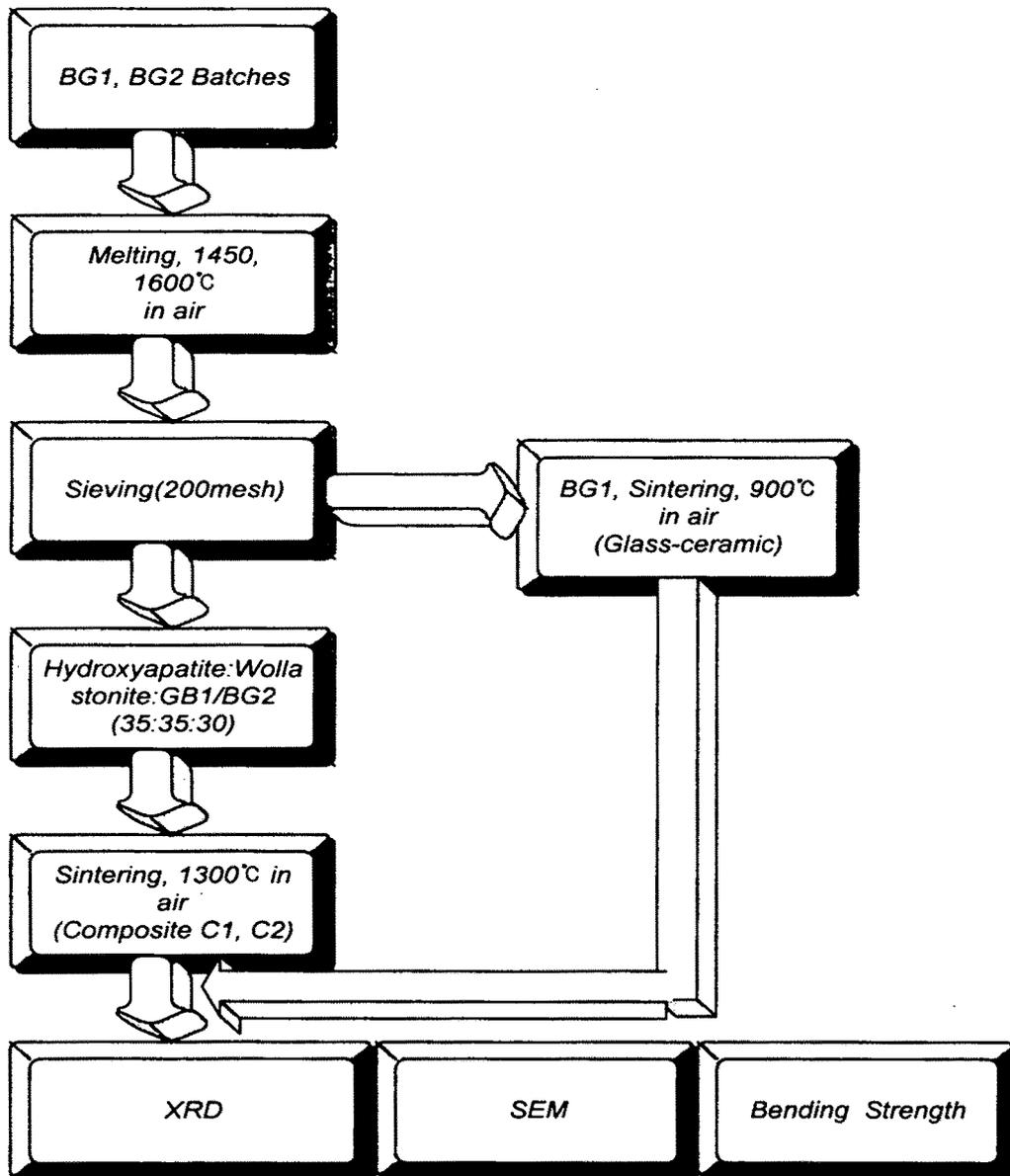
BG2의 경우 마노유발에서 장시간 혼합된 배치를 백금도가니에 담아 1600℃에서 3시간 용융한 후 급냉(quenching)시켜 BG2 glass를 만들었다. 제조된 BG1과 BG2를 각각 분쇄하여 200 mesh(75 μm)이하로 체가름하여 복합체 제조의 출발

Table 4-1. Batch compositions of bioglasses, composites and glass-ceramics

Composition(Formula)	M%	Chemical(Formula-Loss+Gain)	Amount	Sample Name
MgO	7.144	MgO	4.60	BG1
CaO*	49.8698	10CaO · 3P <sub>3</sub> O <sub>5</sub> · H <sub>2</sub> O-H <sub>2</sub> O*	38.16	
SiO <sub>2</sub>	35.4141	SiO <sub>2</sub>	34.00	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> *	7.14	CaF <sub>2</sub>	4.60	
CaF <sub>2</sub>	0.40013	CaCO <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub>	41.74	
Total	100	Total	119	
*From Tuna Bone				

Composition(Formula)	Treatment Conditions	Sample Name
CaO · 2SiO <sub>2</sub> *	melting, 1600°C in air	BG2
MgO-CaO-SiO <sub>2</sub> - P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -CaF <sub>2</sub>	melting, 1450°C in air	BG1
*From Wollastonite		

Composition(Formula)	Treatment Conditions	Sample Name
Hydroxyapatite : Wollastonite : BG1 (35 : 35 : 30)	900, 1200, 1300°C heating rate 217°C/hr	C1
Hydroxyapatite : Wollastonite : BG2 (35 : 35 : 30)	1300°C heating rate 217°C/hr	C2
BG1	900°C heating rate 217°C/hr	G-C



**Fig. 4-1. Experimental procedure.**

물질로 이용하였다.

#### 나. 복합체 제조

Hydroxyapatite : wollastonite : BG1을 35 : 35 : 30의 무게비(wt. ratio)로 혼합한 후 바(bar)형의 성형몰드를 이용하여 600 MPa의 성형압으로 성형하였다. 이들 시편을 대기중에서 1300℃로 3시간 열처리하여 복합체 C1을 제조하였다. 이때로의 승온속도는 217℃/hr이었다.

복합체 C2의 경우 hydroxyapatite : wollastonite : BG2을 35 : 35 : 30의 무게비(wt. ratio)로 혼합하여 바(bar)형의 성형몰드를 이용하여 300 MPa의 성형압으로 성형한 후 복합체 C1과 같은 조건으로 열처리하여 복합체 C2를 제조하였다.

#### 다. Glass-Ceramics 제조

분쇄된 BG1 바이오글래스 분말을 바(bar) 성형몰드를 이용하여 100 MPa의 성형압으로 성형한 후 대기압하에서 900℃로 4시간 열처리하여 glass-ceramics인 G-C를 제조하였다. 이때로의 승온속도는 60℃/hr이었다.

#### 라. XRD 회절분석

X-ray diffractometer(Rigaku D/Max-2400)를 이용하여 배치조성에 따른 소결시편의 상과 구조변화를 분석하였는데, 이때의 조건은 CuK $\alpha$  (60kV, 80mA)이며, 2 $\theta$ 의 범위는 10~80° 이었다.

#### 마. 소결시편의 강도 측정

C1, C2, G-C의 소결시편을 연마지 #100, 200, 400으로 폴리싱한 후 #1000의 SiC 파우더로 미세 연마하여 4-point bending법으로 5개의 시편을 측정하여 평균하여 강도값으로 하였다. 측정에 사용된 기기는 Push Full Scale(Imada, Japan,

FB30)이며, crosshead speed는 0.5 mm/min이었고 강도 측정에 사용된 제 2장의 계산식 (3)과 동일한 방법으로 계산하였다.

#### **바. SEM 관찰**

강도 측정 후의 시편 파단면의 미세조직과 상의 성분을 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscopy, Hitachi S-4200)으로 고찰하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 복합체의 XRD 회절분석

C1과 C2는 아파타이트와 wollastonite에 A-W glass-ceramics의 기본 유리조성에 해당하는 BG1과 유리와 신체내에서 생체조직과 반응하여 자체적으로 표면에 아파타이트를 생성한다고 알려진 BG2를 각각 첨가하여 제조한 복합체의 X-ray 관찰 결과를 Fig. 4-2와 4-3에 각각 나타내었다. 여기서 첨가된 BG1과 BG2 유리의 첨가비는 A-W glass-ceramics에서 존재하는 상들의 무게비에 근접되게 선정하였다.

C1복합체의 경우 주결정상은 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와 tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)이며, hydroxyapatite에 귀속되는 피크는 관찰되지 않았다(Fig. 4-2). 이는 hydroxyapatite가 고온에서 분해되어 TCP를 생성했기 때문이라 사료된다. 또한 C2복합체의 경우도 C1복합체와 비슷한 경향을 나타냈다(Fig. 4-3).

### 2. Glass-Ceramics의 XRD 분석

참치뼈에 CaF<sub>2</sub>, MgO 등과 같은 핵형성제를 포함하는 화학시약을 첨가하여 제조한 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계의 유리로부터 제조된 glass-ceramics인 G-C를 XRD로 동정한 결과를 Fig. 4-4에 나타내었다.

Glass-ceramics의 X-ray 분석 결과에서는 Fig. 4-2 및 Fig. 4-3의 결과와는 다른 다소 상이한 양상을 보이고 있다. 즉, pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와  $\beta$ -TCP외에 fluoroapatite가 생성되었다. 이는 출발 조성에서 CaF<sub>2</sub>가 상당량 첨가되었고, hydroxyapatite를 생성할 수 있는 OH원이 없기 때문에 fluoroapatite가 생성되었을 것으로 판단된다.

### 3. 복합체의 강도측정

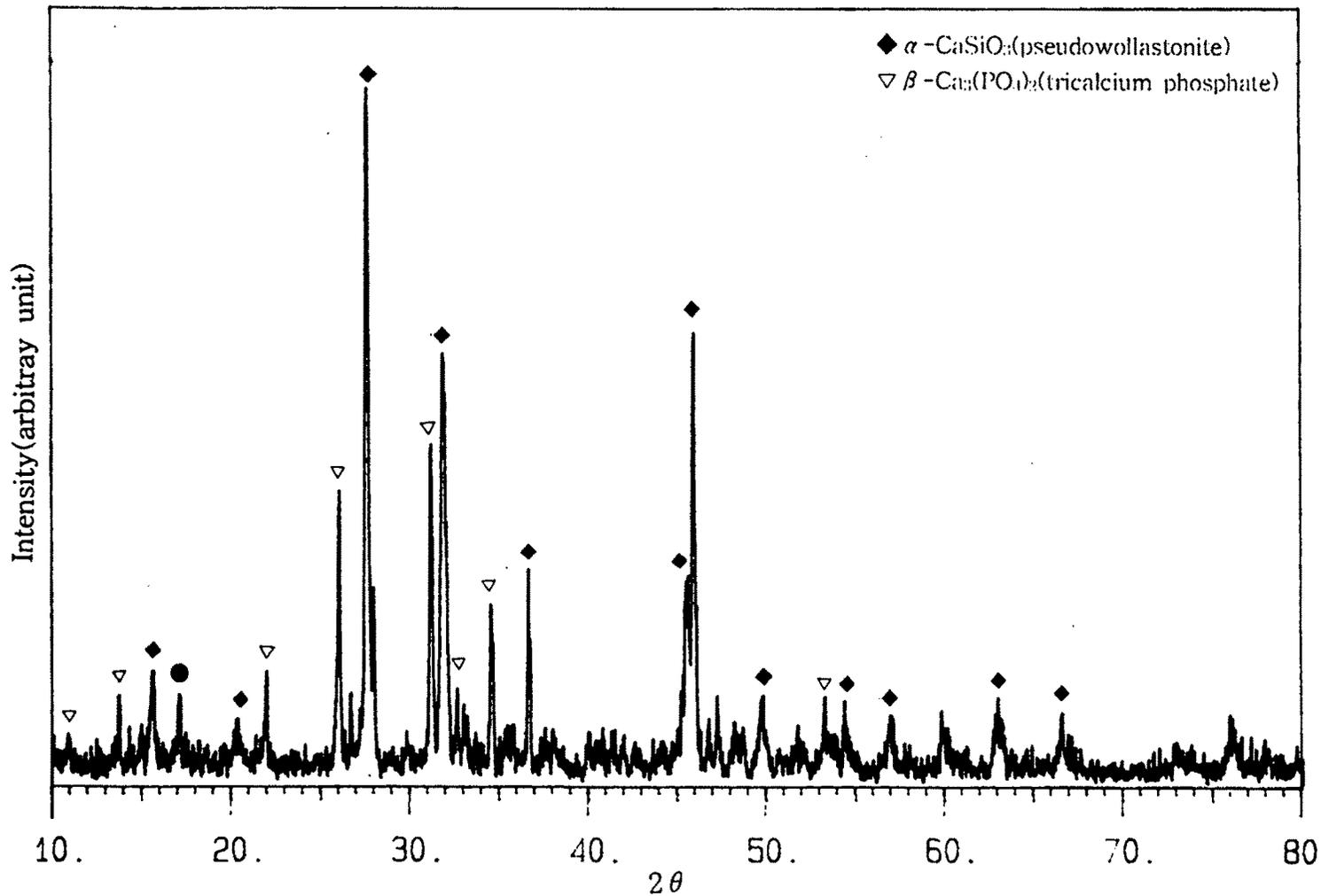


Fig. 4-2. X-ray diffraction pattern of composite C1 sintered at 1300°C for 3hr.

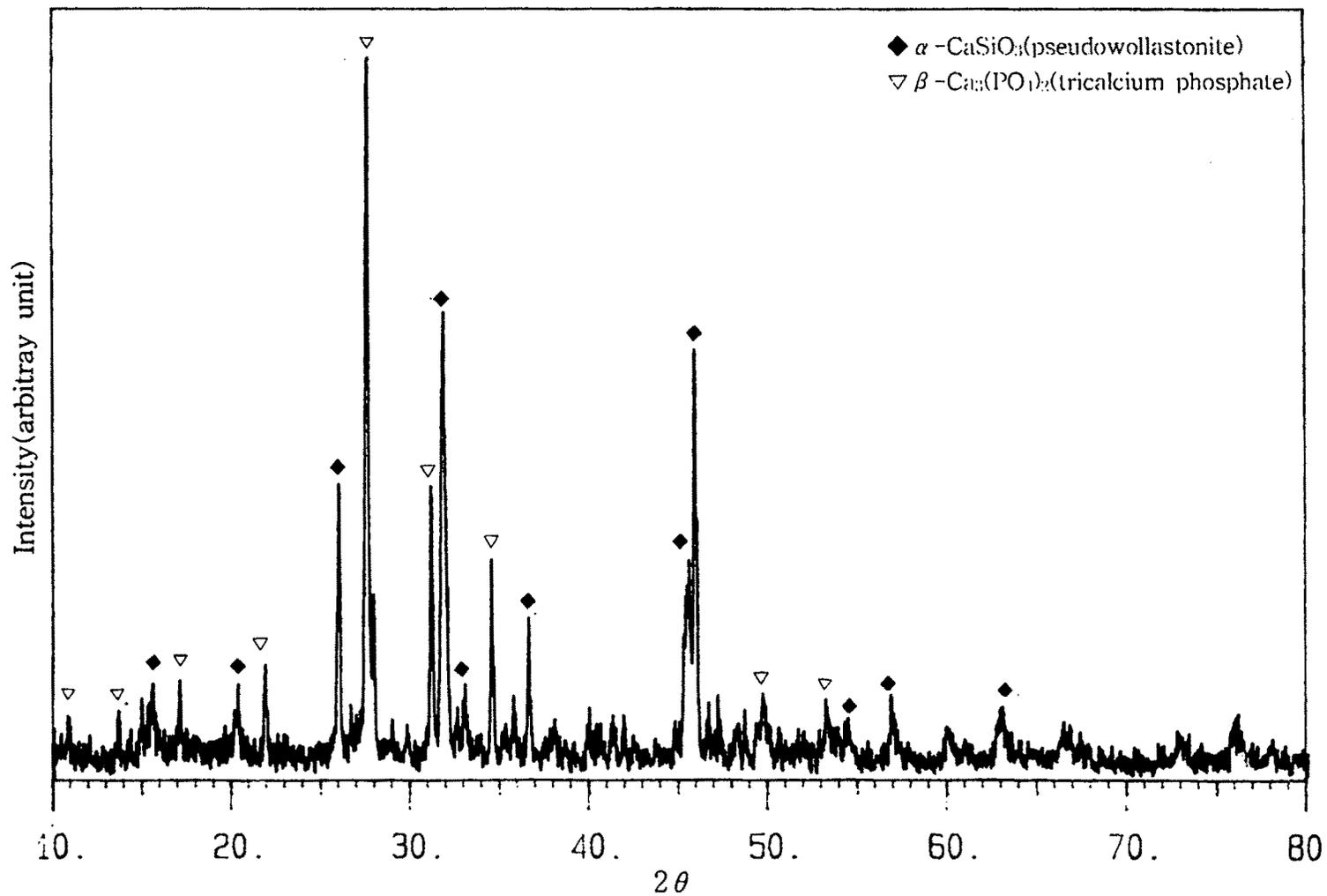


Fig. 4-3. X-ray diffraction pattern of composite C2 sintered at 1300°C for 3hr.

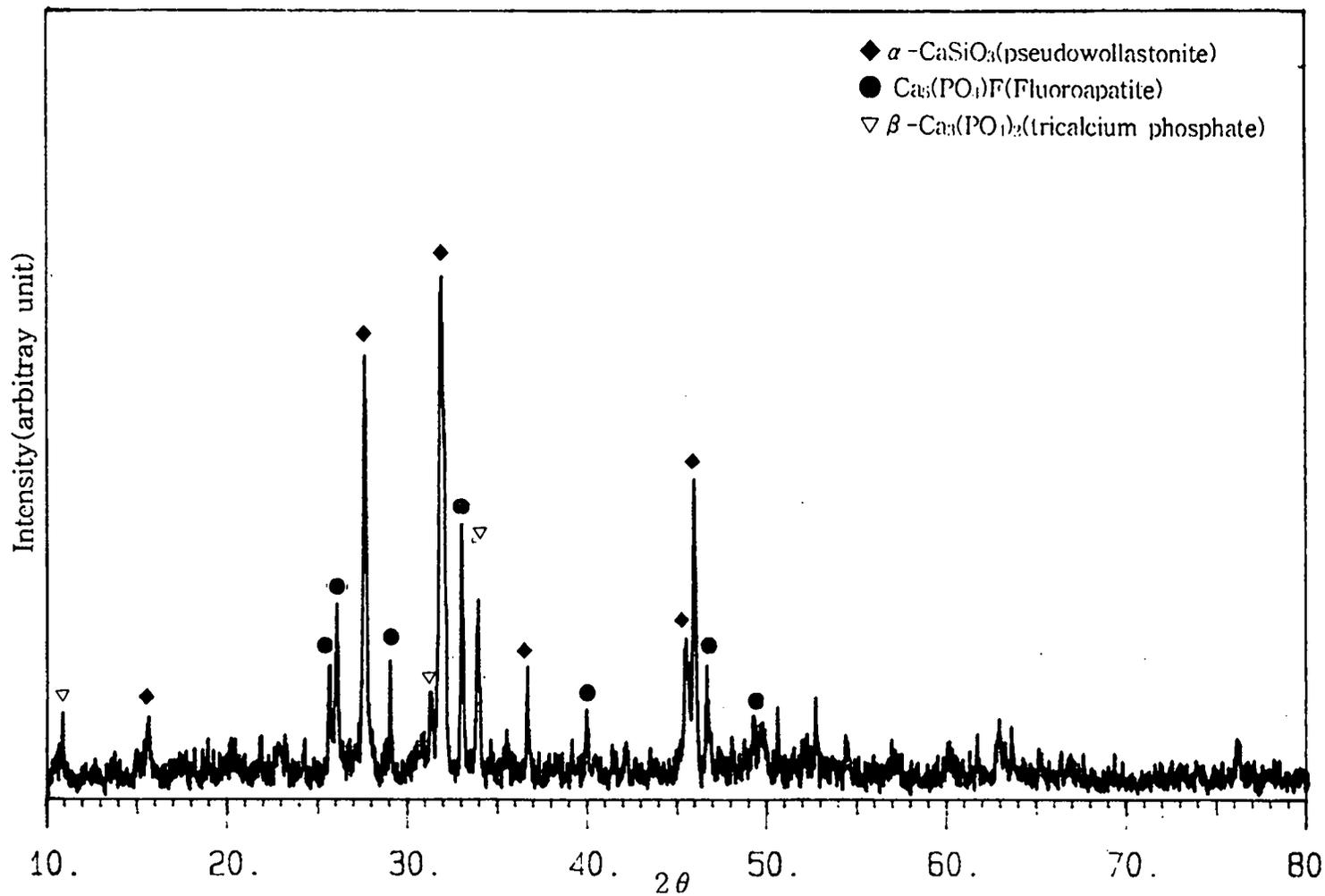


Fig. 4-4. X-ray diffraction pattern of glass-ceramics, G-C sintered at 900°C for 3hr.

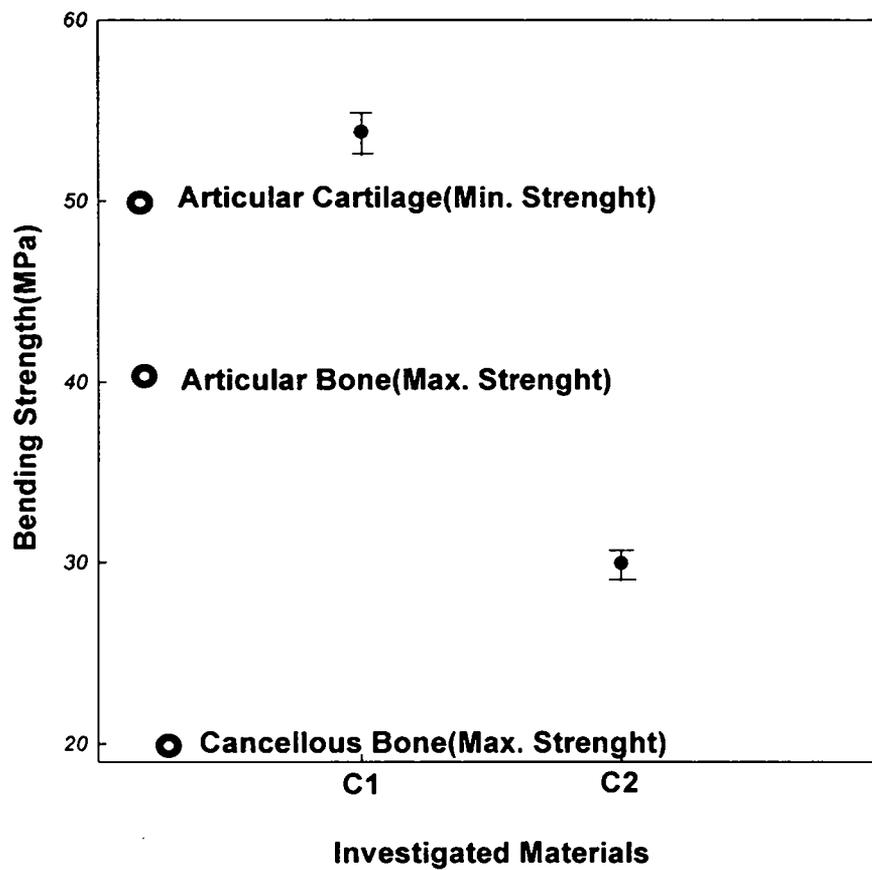
C1과 C2복합체의 강도 측정결과를 Fig. 4-5에 각각 나타내었다. 1300°C에서 제조한 복합체 C1의 강도는  $53.82 \pm 96$  MPa이었으며, C2의 경우  $29.96 \pm 1.49$  MPa로 나타났고, wollastonite만을 첨가한 복합소결체의 강도인 약 18 MPa보다 3~4배의 강도가 증진되는 효과가 있었다. 이는 바이오 세라믹의 결정상 중에서 wollastonite의 함량의 존재가 증가할수록 강도의 증가가 유도된다고 보고한 일반적인 경향의 결과와 상호 잘 일치하는 것으로 보인다. 강도증진면에서 볼 때 C2는 cancellous bone의 최대 강도 20 MPa를 초과하였고 C1은 articular cartilage의 최대 강도인 40 MPa(Kempson, 1982)보다 우수한 강도를 발현하는 것으로 나타났다.

또한 C1은 C2보다 높은 강도를 나타내 C1복합체의 소결온도에 따른 강도 변화를 고찰하여 Fig. 4-6에 나타내었다. 900°C에서는  $63.39 \pm 5.56$  MPa, 1200°C인 경우  $81.21 \pm 2.20$  MPa 그리고 1300°C에서는  $53.82 \pm 6.40$  MPa로 나타나 소결온도의 함수로서 강도가 변화하는 것으로 나타났다.

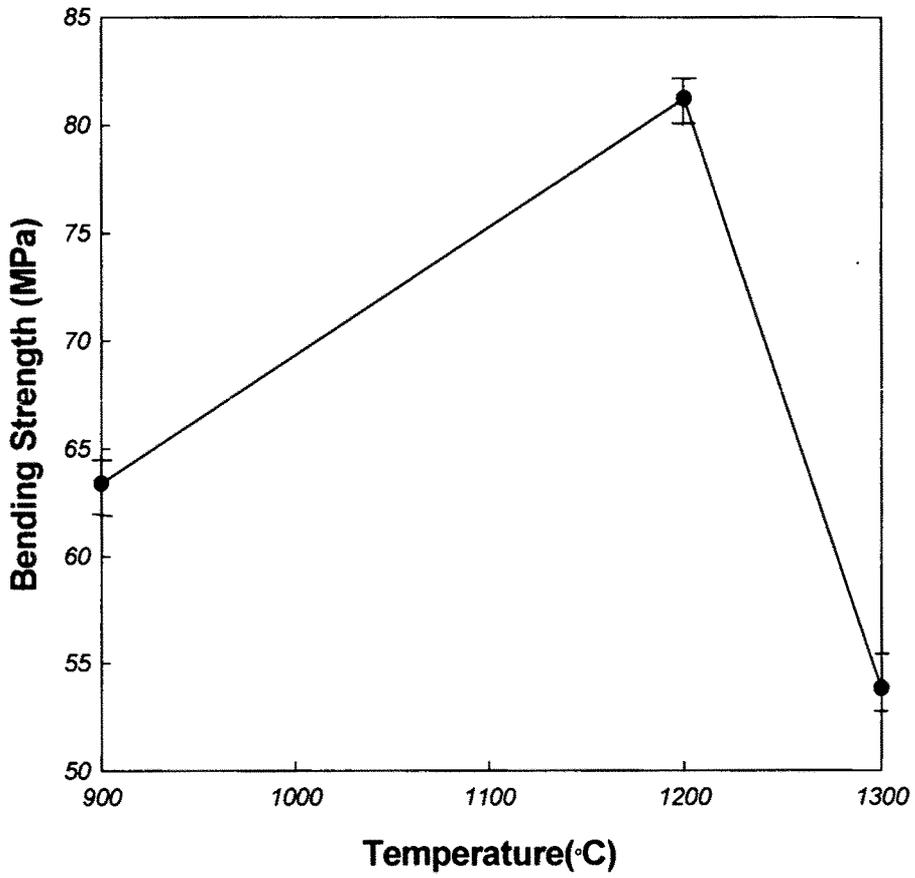
#### 4. Glass-Ceramics의 강도

A-W glass-ceramics조성에 근접하도록 설정한 배치조성에 화학시약의 일부를 참치뼈로 대체하여 용융, 유리화하여 소결한 glass-ceramics인 G-C의 강도 측정결과를 Fig. 4-7에 나타내었다. Fig. 4-7에서 보이듯 G-C의 강도는  $90 \pm 0.5$  MPa로 나타나, 1200°C에서 소결한 복합체인 C1의 강도보다 10 MPa 정도 증가한 것으로 나타나 강도면에서 볼 때 골격 생체대용 재료로서 가장 가능성을 보이는 결과를 보이고 있다. 따라서 강도 증진 면에서 glass-ceramics이 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 또한 이는 소결온도까지의 승온속도와 성형압력 등과 같은 제조 방법에 따른 물성변화의 고찰에 관한 연구가 향후 연구과제로서 남아 있다.

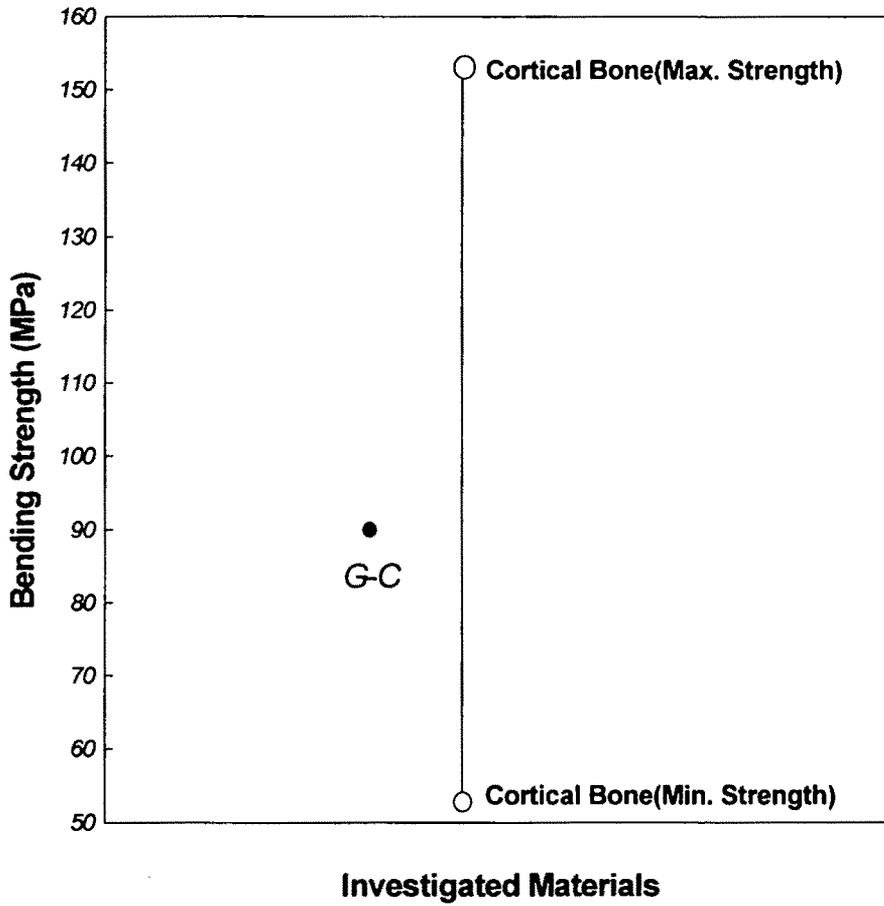
#### 5. 복합체의 미세구조 관찰



**Fig. 4-5. Comparison of bending strength between human bones and composites, C1 and C2.**



**Fig. 4-6. Bending strength as a function of sintering temperature of composite, C1.**



**Fig. 4-7. Comparison of bending strength between glass-ceramics, G-C and cortical bone.**

복합체 C1은 소결온도에 따른 강도변화가 관찰되었기 때문에 이는 동일한 조성에서도 소결온도에 따른 미세조직의 변화에 따라 강도가 변화함을 의미하는 것으로 볼 수 있어 이를 미세구조를 통해 고찰하고자 하였다. 이는 소결온도에 따른 강도의 변화는 미세구조의 조직 의존성이 있는 것으로 판단되었기 때문에 복합체 C1의 강도 측정 후 시편 파단면의 미세구조를 관찰한 것을 Fig. 4-8(a), (b), (c)에 나타내었다.

복합체 C1의 소결온도에 따른 미세구조의 변화 양상을 살펴보면 900℃에서의 미세구조를 관찰한 Fig. 4-8(a)에서는 치밀화의 초기단계가 진행되는 것과 같은 형상과 다소의 기공은 있으나 매우 치밀하며, 작은 결정상이 조대한 입자들 사이에 존재하는 형태의 미세구조 조직을 보이고 있다.

1200℃의 미세구조를 관찰한 Fig. 4-8(b)의 경우 입자의 크기가 약  $1\mu\text{m}$ 인 작은 결정들이 발달해 있으며 이들 결정들이 상호 연결됨으로서 강도를 증가시키는 것으로 파악되었다. 따라서 이 석출 결정상이 가장 많이 존재하는 온도에서 우수한 강도를 보일 것으로 생각되는데, 강도의 측정결과 역시 1200℃의 경우가 가장 높은 강도를 나타내어 이와 잘 부합함을 보였다.

한편 1300℃로 소결한 경우의 Fig. 4-8(c)에서 보이듯 유리질과 같은 모재(matrix) 속에 작은 석출상들이 혼재하는 형태의 미세조직 구조를 나타내고 있다. 일반적으로 과도한 입계성장이 일어난 경우 일반적으로 강도는 감소한다고 알려져 있는데, 1300℃에서 소결한 복합체의 경우 900℃와 1200℃의 강도 보다 감소함을 보였다. 따라서 복합체 C1의 강도증진 원로서는 wollastonite상의 생성과 1200℃에서의 석출물들이 입자상호간을 연결시키는 원인에 의해서 강도가 증가됨을 미세구조 관찰을 통해서 확인할 수 있었다.

Fig. 4-9는 복합체 C2의 미세구조를 관찰한 것으로서, 이들의 미세구조 역시 큰기공을 내포하고 있는데 1300℃로 소결한 경우의 C1의 미세구조를 나타낸 Fig. 4-8(c)의 유리질과 같은 모재(matrix) 속에 작은 석출상들이 혼재하는 형태의

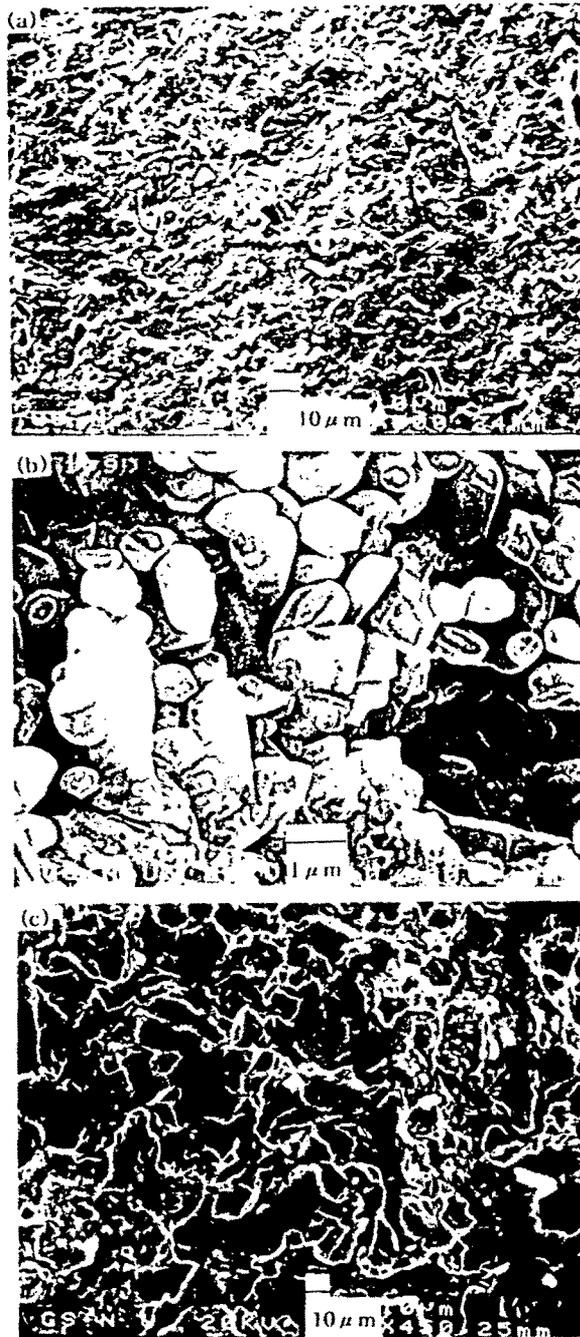
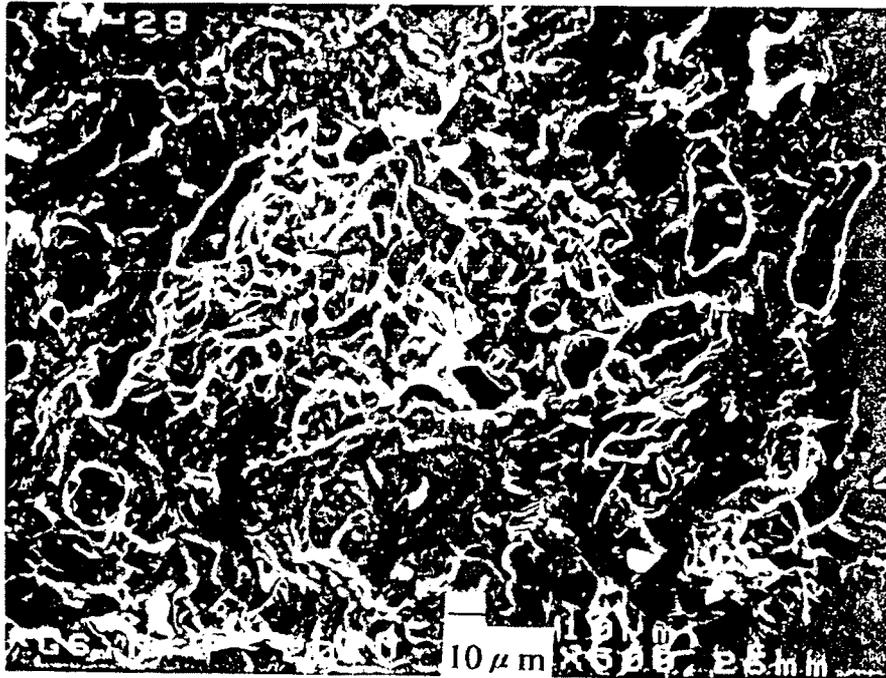


Fig. 4-8. SEM images of the fractured surfaces of C1 samples (a) 900°C, (b) 1200°C and (c) 1300°C.



**Fig. 4-9. SEM images of the fractured surfaces  
of C2 sample at 1300°C for 3hr.**

미세조직 구조와 유사한 것으로 나타났다.

C1과 C2 복합체간에는 결정입자들의 유리화와 조대화 정도에 의하여 강도 차이를 보이는 것으로 판단되어 졌다. 이런 현상은 hydroxyapatite와 wollastonite를 고상소결법으로 반응시켜 미세구조를 관찰한 경우에는 입계간에 유리상의 젖음도가 낮아 입계간에 상당히 큰 균열이 발생하는 현상과 무관하지 않을 것으로 판단된다.

## 제 4절 결론

참치뼈로부터 추출한 hydroxyapatite에 wollastonite와 A-W glass- ceramics의 기본 유리조성에 해당하는 CaO-SiO<sub>2</sub>계의 유리 및 생체조직과 반응하여 표면에 아파타이트를 생성한다고 알려진 CaO-SiO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO- CaF<sub>2</sub>계의 유리를 첨가하여 합성한 복합체와 glass-ceramics를 XRD 회절분석, 강도측정과 미세구조를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. X-ray 분석 결과 복합체들의 결정상들은 첨가되는 바이오 글래스의 종류에 관계 없이 주상은 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와 tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)로 나타났다. 그러나 hydroxyapatite의 분해에 따른 TCP 생성으로 hydroxy-apatite피크는 관찰되지 않았다.
2. Glass-ceramics의 X-ray 분석에서는 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와  $\beta$ -TCP 외에 출발물질에 포함된 CaF<sub>2</sub>에 의한 fluoroapatite상이 관찰되었다.
3. Hydroxyapatite에 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계 유리 및 wollastonite가 첨가된 복합체의 미세구조 변화 양상은 900℃에서 매우 치밀하며, 유리질과 같은 모재(matrix)에 석출된 결정상이 혼재하는 형태로 나타났다. 반면에 1200℃에서는 바 형태의 결정상들이 발달된 형태를 보였다. 그러나 소결온도가 1300℃로 증가하면 모재의 입자크기가 증가하고 미세조직 구조로 전이되는 형태의 조직을 보였다. 한편 CaO-SiO<sub>2</sub>계 유리가 첨가된 복합체의 미세구조는 유리질과 같은 모재(matrix)에 석출된 결정상이 혼재하는 형태를 나타내었다. 이는 미세한 결정 입자가 석출할 수 있는 소결조건을 조절함으로써 강도 발현이

가능함을 알 수 있었다.

4. CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계 유리가 첨가된 소결체의 강도는 소결온도 가 120 0℃에서  $81.21 \pm 2.20$  MPa이었으며, CaO-SiO<sub>2</sub>계의 유리가 첨가된 복합체는  $29.96 \pm 1.49$  MPa로 나타나 강도 증진면에서 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> - MgO계의 유리첨가가 CaO-SiO<sub>2</sub>계 유리 첨가가 보다 효과적이었다.
5. 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite를 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계 유리의 출발물질로 적용하여 제조한 glass-ceramics의 강도는  $90 \pm 0.5$  MPa로 나타나 골격대용 생체재료로서 가장 가능성을 보였다.

## 제 5절 참고문헌

- Audekercke, R. V., Martens, M. (1984), "Mechanical Properties of Cancellous Bone, in Natural and Living Biomaterials", Eds., Hastings, G. W. and Ducheyne, P., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 89~98.
- Berger, R., Sauer, G., Steinborn, F. G., Wihsmann, V. T., Kohler, H. and Dressel, H. (1989), "Proceedings of XV International Congress on Glass", Ed. by Mazurin, O. V., Nauka, Leningrad. Vol. 3a, 120-126.
- Bromer, E. P., Kos, H. H. (1973), in German Patent No. 2, 326, 100.
- Cahn, R. W., Haasen, P. and Kramer, E. L. (1992), "Materials Science and Technology : A Comprehensive Treatment : Medical and Dental Materials", Eds., Williams, D. F. Vol. 14, pp. 66-69.
- Craig, R. (1981), "Chemistry, Composition, and Properties of Composite Resins", ed. Horn, H. Dental Clinics of North America, W. B. Saunders, Co., Philadelphia.
- de Groot, K. (1983), "Ceramic of Calcium Phosphates : Preparation and Properties", In Bioceramics of Calcium Phosphate. Eds, deGroot, K. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp. 100~114.
- Grenoble, D. E., Katz, J. L., Dunn, K. L., Gilmore, R. S. and Murty, K. L. (1972), "The Elastic Properties of Hard Tissues and Apatites", J. Biomed. Mater. Res., 6, 221~233.
- Hayek, M., Newsely, H. (1963), "Pentacalcium Monohydroxyorthophosphate", Inorg. Syn., 7. 121~128.
- Hulbert, J. C., Hench, L. L., Wilson, J. and Heimke, G. (1986), "Ceramics in Clinical Applications, Past, Present and Future", in High Tech Ceramics, Eds., Vincenzini, P. (Proceedings of the World Congress on High Tech Ceramics, 6th CIMTEC, Milan, Italy, pp. 189~213.
- Ito, S., Sakka, S. (1986), "Formation of a High-strength Bioactive Glass-ceramic in the

- System MgO-CaO-SiO<sub>2</sub>", *J. Materials, Science*. 21. 536~540.
- Kokubo, T., Ito, S., Shigenmatsu, M. and Yamamura, T. (1985),"Mechanical Properties of a New Type of Apatite-containing Glass-ceramic for Prosthetic Application", *J. Mat. Sci.* 20. 2001~2004.
- Kokubo, T. (1987),"Bonding between Bioactive Glasses, Glass-Ceramic or Ceramics in a Simulated Body Fluid", *J. Cer. Soc. Japan*. 95(8). 786~791.
- Kokubo, T., Yamamuro, T. (1985),"Mechanical Properties of a New Type of Apatite-Containing Glass-Ceramic for Prosthetic Application", *J. Materials Sci.*, 20(13). 2001-2004.
- Kokubo, T., Ito, S. and Sakka, S. (1986)," Formation of a High-strength Bioactive Glass-ceramic in the System MgO-CaO-SiO<sub>2</sub>", *J. Mat., Science*. 21. 536-540.
- Kempson, E. (1982),"Relationship Between the Tensile Properties of Articular Cartilage from the Human Knee and Age", *Annals of the Rheumatic Diseases*, 41, pp. 508-511.
- Kotlensky, L. (1965),"Deformation in Polyitic Graphite," *Trans. Met. Soc. AIME*, 223. 830-832.
- Kronenthal, R. L. (1975),"Polymers in Medicine and Surgery", *Eds., Oser, Z. Plenum Press, New York*.
- LeGeros, R. Z (1974),"The Unit-cell Dimensions of Human Enamel Apatite : Effect of Chloride Incorporation", *Arch. Oral. Biol.*, 20. 63-71.
- LeGeros, R. Z (1967),"Crystallographic Studies of the Carbonate Substitution on the Apatite Structure", *Ph D. Thesis, New York University*.
- LeGeros, R. Z. (1990),"Materials for Bone Repair, Augmentation and Implant Coatings", in *Proceeding of the International Seminar of Orthopedic Res., Nagoya, Ed. by S. Niwa, (Spring-Verlag)*.

- Peelen, J. G. C., Rejda, B. V. and deGroot, K. (1980), "Preparation and Properties of Sintered Hydroxyapatite", *Ceramurgia Int.* 4. 71~73.
- Racquel, Z., LeGeros, R. Z. and LeGeros, J. P. (1993), in "Advanced Series in Ceramics-Vol. 1 : An Introduction to Bioceramics," Eds., Hench, L. L. & Wilson, J. World Scientific, pp. 1548~1553.
- Raemdock, V., Ducheyne, P., Meester, P. D. (1984), "Metal and Ceramic Biomaterials," In *Vol. II-Strength and Surface*, Eds., Ducheyne, P. Hastings, C. W. Boca Raton, FL : CRC Press, Chap. 14, pp. 143~166.

## 제 5 장 인공체액에서의 Hydroxyapatite 세라믹 복합체 간의 결합

### 제 1절 서론

1990년대에 Hench 등(1991, 1993)이 개발하여 Bioglass<sup>®</sup>로 명명한 Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>계 유리는 우수한 생체 친화성을 갖는 생체유리로서 주목을 끌었다. 이후 지금까지 몇 가지 개량형 bioglass 및 glass-ceramics, ceramics 등에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다(Kokubo, 1996). Hench 등(1991, 1993)이 개발한 Bioglass<sup>®</sup>는 높은 생체활성을 보이나, 기계적 강도가 그다지 높지 않다는 것이 문제점으로 지적되고 있다.

따라서 생체친화성이 우수하며 강도를 증진시키기 위하여 glass-ceramics 또는 ceramics의 제조방법 혹은 복합화를 시도하고 있으며, 제조된 ceramics, glass-ceramics, glass 등의 인공체액 중에서 소결체 상호간의 접합(bonding)실험에 관해서는 다수의 보고가 있다(고 등, 1990; 이 등, 1991; Kokubo 등, 1987).

생체 이식재료(Bio-implant materials)로 사용되기 위해서는 우수한 생체 친화성과 장기간의 기능성 유지와 같은 조건이 요구된다. 여기서 전자의 경우 독성이 없고, 생세포와의 친화성이 좋은 것을 의미하며, 후자의 경우 체내에서 목적에 따라 기능을 장기간 유지하는 것으로 이식에 의해 생체 내에서 용해, 흡수 또는 혈액응고 등 기능을 저해시키는 현상을 일으키지 않아야 한다는 것을 의미한다(Hench, 1991; Kokubo, 1996).

Bioceramics, bioglass 등은 이식재료로서의 응용범위가 매우 광범위하다고 볼 수 있으나 현재 일부 임상응용이 이루어지고 있고, 개발이 진행중에 있다. 그러나 아직까지 이상적인 생체재료로서 모든 조건을 만족할 만한 것은 존재하지 않

고 있다. 최근에는 가공성과 강도를 겸비한 금속의 표면에 생체활성이 있다고 알려진 hydroxyapatite나 glass-ceramics 등을 코팅하는 등 사용목적에 맞는 소재의 복합체화의 시도가 연구(Inadome 등, 1995; Berger 등, 1989; Cahn, 1992; Hulbert, 1986; Kokubo, 1985)되고 있으나, 생물체인 참치뼈를 출발물질로 제조한 세라믹 복합체의 화학적 안정성과 같은 화학적 결합성 및 벌크(bulk) 재료로서의 생체 친화성에 관한 연구는 아직 알려진 바 없다.

따라서 이런 관점에서 참치뼈로부터 추출한 hydroxyapatite를 출발물질로 제조한 세라믹 복합체를 인공체액(simulated body fluid) 중에 함침시켜 소결체간에 화학 결합(chemical bonding)의 형성 유무와 이들의 결합 반응기구를 고찰하고자 하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 출발물질

생체 친화성에 관한 실험에 사용된 재료들은 참치 뼈를 850℃에서 3시간 하소(calcination)하여 추출한 hydroxyapatite를 3일 이상 습식밀링(wet milling)한 것을 출발물질로 하였다. Wollastonite의 처리방법은 제 2장과 동일하다. 한편 복합체(composites)에 사용된 bio-glass의 조성들에서 C1은 33.33CaO · 66.67SiO<sub>2</sub> mol%의 조성을 가지는 배치(batch)를 1600℃에서, C2는 7.14MgO-49.86CaO-35.41SiO<sub>2</sub>-7.14P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-0.4CaF<sub>2</sub> mol%의 조성을 1450℃에서 각각 용융 및 고화시켜 유리를 제조한 후 분쇄하여 glass-ceramics, 복합체 BG1과 BG2의 출발물질로 하였는데, 이들의 제조 조건은 Table 5-1에 나타내었다.

### 2. 소결 복합체의 제조

Table 5-1의 시료분말을 평량한 후 시편의 초기 성형성을 부여하기 위해 3wt% PVA 수용액의 결합제를 분말시료에 1wt% PVA를 첨가하여 혼합하였다. 이것을 80℃에서 건조한 후, 분쇄하여 5mm×25mm의 사각 몰드에 시료 1g 썩을 넣고 1.5ton/cm<sup>2</sup>의 압력으로 가압 성형하였다. 가압하여 만든 성형체는 전기로에서 600℃로 1시간 동안 유지하여 결합제를 휘발시킨 후, G-C을 제외한 모든 시편은 1,000℃까지는 20℃/min, 이후 설정온도까지는 10℃/min로 승온하여 3시간 동안 소결하였다. 소결온도는 HW5 및 HW6 시편들은 1,250℃, C1과 C2 시편들은 1,200℃에서 소결하였다. G-C는 600℃에서 1시간 동안 유기용제를 휘발시킨 후, 900℃까지 1℃/min의 승온속도로 가열한 후 4시간 소결하여 소결체를 제조하였다.

Table 5-1. Batch compositions of bioglasses, composites and glass-ceramics

Composition (Weight Ratio)	Heat Treatment Condition	Sample Name
Hydroxyapatite <sup>*</sup> : Wollastonite <sup>**</sup> (16.66 : 3.40)	1250°C, 3hr	HW5
Hydroxyapatite <sup>*</sup> : Wollastonite <sup>**</sup> (17.14 : 2.85)	1300°C, 3hr	HW6
<sup>*</sup> From Tuna Bona <sup>**</sup> From Wollastonite		

Composition (Mole %)	Melting Conditions	Sample Name
7.14MgO-40.87CaO <sup>*</sup> -35.41SiO <sub>2</sub> 7.14P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -0.40CaF <sub>2</sub>	1450°C in air	BG1
33.33MgO · 66.67P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> <sup>**</sup>	1600°C in air	BG2
<sup>*</sup> From Tuna Bona <sup>**</sup> From Wollastonite		

Composition (Weight Ratio)	Heat Treatment Conditions	Sample Name
Hydroxyapatite : Wollastonite : BG1 (35 : 35 : 30)	1200°C, 3hr	C1
Hydroxyapatite : Wollastonite : BG2 (35 : 35 : 30)	1200°C, 3hr	C2
BG1	1200°C, 4hr Heating Rate : 1°C/min	G-C

### 3. 인공 체액의 제조

인공체액(simulated body fluid)은 Kokubo(1987)가 제시한 Table 5-2의 조성으로 제조하였다. 즉, 50mM trishydroxyaminomethane  $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2]$ 와 45mM HCl을 이온교환수에 첨가하여 pH 7.25로 조정한 완충 용액에 NaCl,  $\text{NaHCO}_3$ , KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  및  $\text{CaCl}_2$ 들의 시약을 녹여 제조하였다.

### 4. 인공체액 중에서의 bonding test

소결체의 한쪽 표면을 연마하여 초음파 세척한 후 건조된 두 개의 시편 표면을 접촉시켜 나일론( nylon ) 끈으로 양끝과 중앙을 단단히 묶은 다음 180ml의 인공체액이 채워진 폴리에틸렌 병(polyethylene bottle) 내에 매달아 침지시켜 밀봉하였다. 이것을 37℃의 항온조 내에서 4주 동안 방치한 다음 꺼내어 접합 여부를 확인한 후 접합 표면의 미세조직을 SEM(JEOL JSM-6300)으로 관찰하였다.

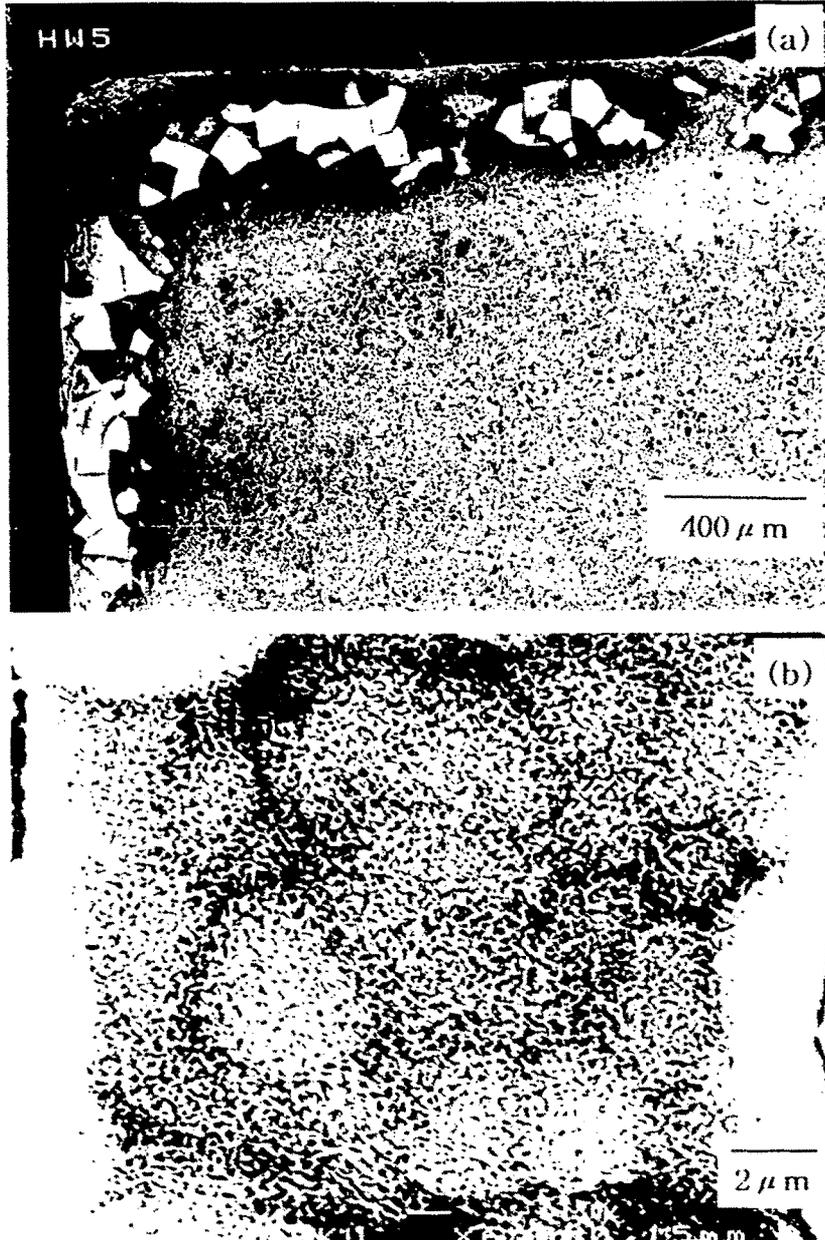
Table 5-2. Ion concentration (mM) of the simulated body fluid and Human blood plasma

	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Simulated fluid	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0
Human plasma	142.0	5.0	2.5	2.5	103.0	13.5	1.0

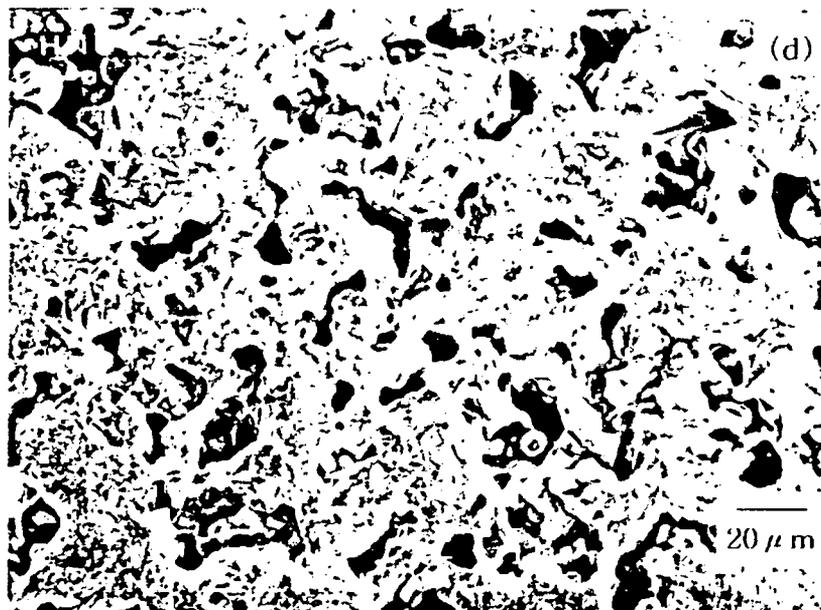
### 제 3절 결과 및 고찰

Fig. 5-1(a)는 HW5 시편의 상호 접합 면의 SEM사진을 나타낸 것으로서 시편의 가장자리 부분에 몰려있는 갈라진 파편들(바깥부분의 흰조각모양)은 인공체액 내에서 두 시편들이 상호접합에 의해 형성된 ridge 부분을 분리하는 과정에서 발생한 균열로서 ridge 중앙부분과 외각부분과는 전혀 다른 미세조직을 보이고 있다. 또한 Fig. 5-1(a)에서 ridge 부분의 폭은 약  $200\mu\text{m}$  정도로 시편 계면의 가장자리를 둘러싸고 있는 형태의 조직구조를 보이고 있다. Fig. 5-1(b)는 ridge 바로 안쪽의 폭이 약  $200\mu\text{m}$ 이며, Fig. 5-1(a)의 ridge와 시편 내부 사이의 경계면에 해당되는 다소 밝은 부분의 미세조직 사진으로 앞모양의 submicron 크기의 입자들이 모인 다공성의 구조를 이루어 HW5 소결체 중의 결정립 표면을 싸고 있다. 접합 부분의 ridge의 미세조직은 Fig. 5-1(c)에 나타난 것처럼 구형에 가까운 미세한 입자들이 모여 보다 치밀한 조직을 이루고 있었다. 이에 반해 Fig. 5-1(d)는 ridge에서 많이 떨어진 시편의 중앙 부분에는 어떠한 새로운 입자들도 나타나지 않았다. 즉 이 시편의 경우 ridge의 안쪽 끝에서  $200\mu\text{m}$  이상 떨어진 안쪽으로 새롭게 형성된 입자들은 거의 관찰되지 않았다. 이것은 Kokubo 등(1987), 이 등(1991)의 결합 실험에서 얻은 결과와 일치하는 것으로, 시편의 가장자리를 따라 ridge가 형성되어 결합되는 현상과 일치하였다.

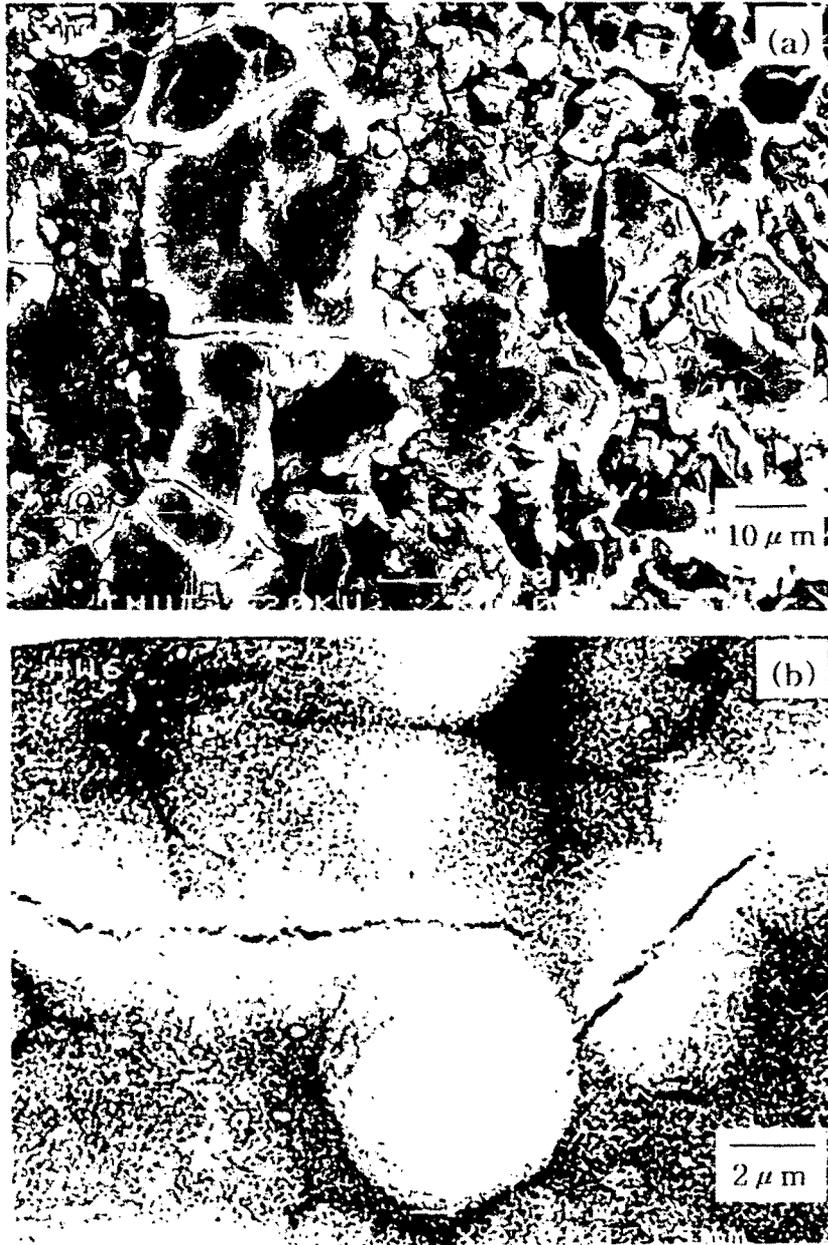
Fig. 5-2(a), (b)와 (c)는 HW6시편의 상호 접합면의 SEM사진을 나타낸 것으로, HW5 시편의 미세구조와 유사한 결과가 얻어졌다. Fig. 5-2(a)는 시편들의 상호 접합 부위 근처의 조직 사진으로 사진의 왼쪽 부분이 ridge이며, Fig. 5-1(a)의 HW5 시편처럼 인공체액 내에서 두 시편들이 상호접합에 의해 형성된 ridge 부분을 분리하는 과정에서 균열이 발생하였으며, 다른 부분에 비해 두꺼운 층을 이루고 있었다. 시편의 바깥쪽과 ridge의 경계부분은 submicron 크기의 미세한 응



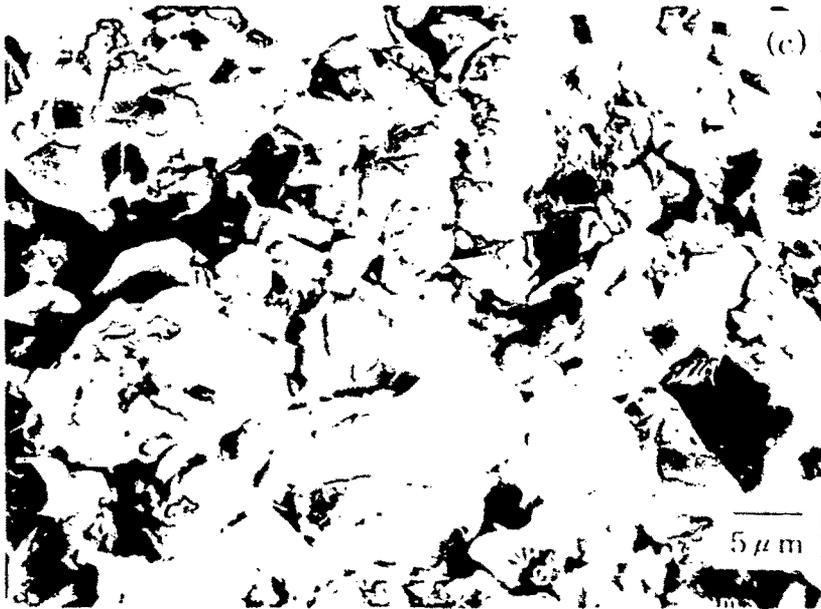
**Fig. 5-1. SEM photographs of an interface of HW5 mutually bonded by 4 weeks soaking :**  
**(a) interface, (b) inside, (c) just on the ridge and (d) central portion of the specimen.**



**Fig. 5-1. (Continued)**



**Fig. 5-2. SEM photographs of an interface of HW6 mutually bonded by 4 weeks soaking : (a) around, (b) inside and (c) outside the ridge.**

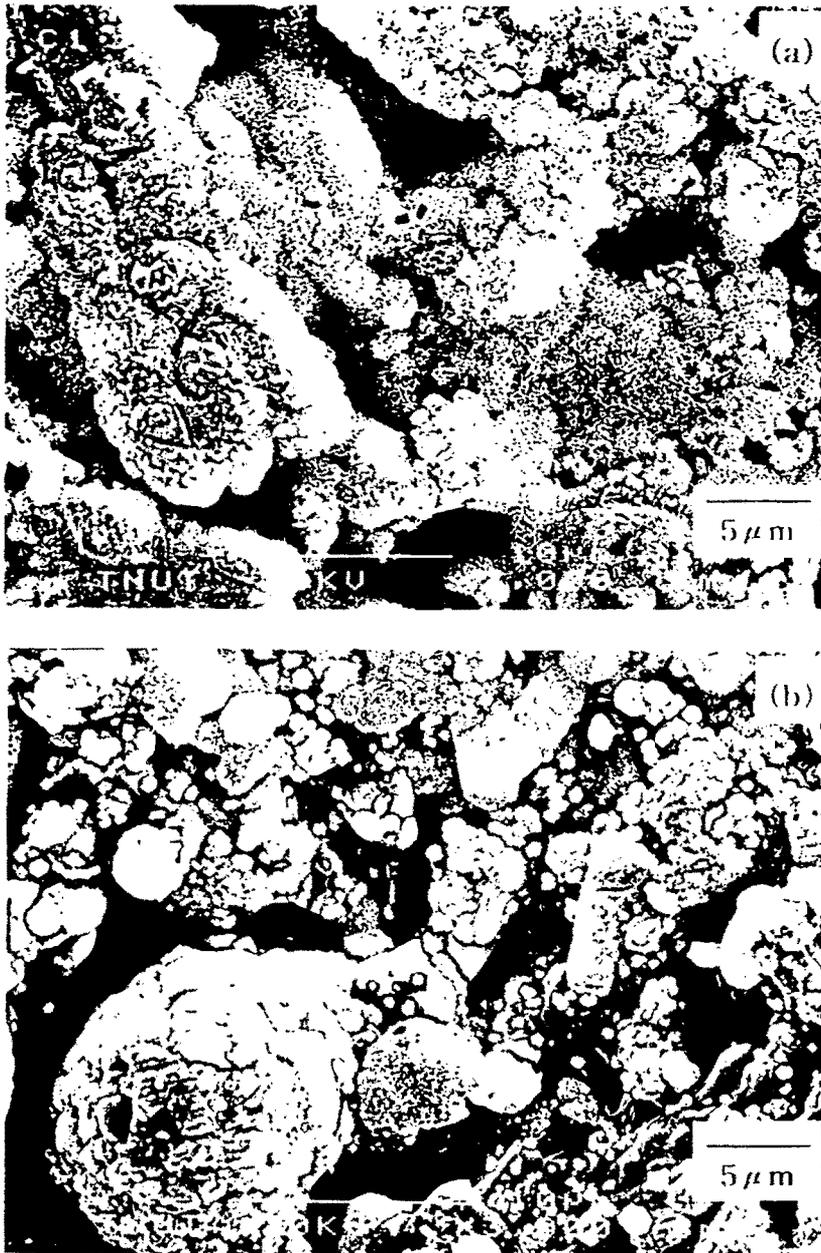


**Fig. 5-2. (Continued)**

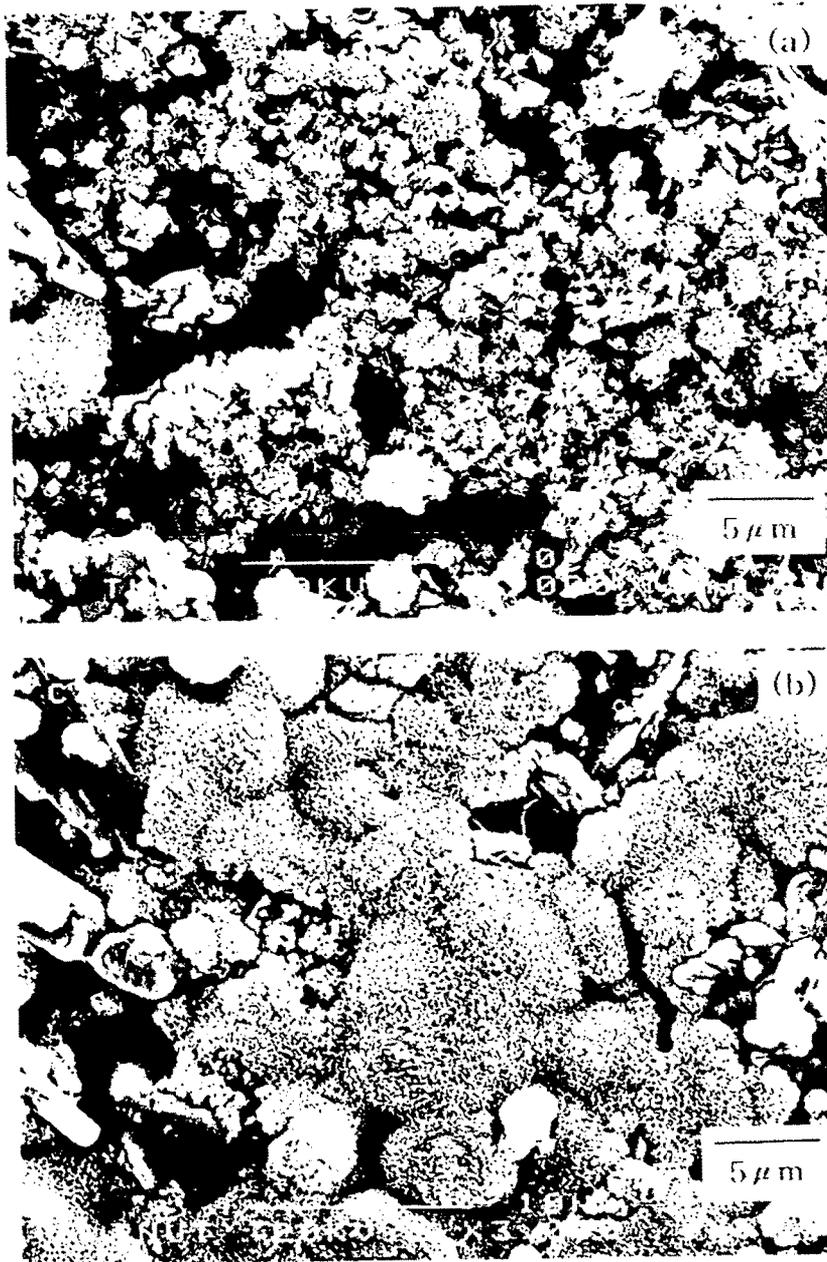
집체로 형성된 수  $\mu\text{m}$ 의 구형 입자들이 형성되어 있는데, 이들 구형 입자들이 성장하여 ridge를 형성하였으리라 생각된다. Fig. 5-2(b)는 ridge의 내부 부분으로서 앞모양의 submicron 크기 입자들이 모인 다공성의 구조를 이루며 기지 소결체의 결정립 표면을 싸고 성장하고 있다. 그러나 ridge 바깥부분은 Fig. 5-2(c)에서 보이듯 어떠한 새로운 입자들도 관찰되지 않았다. HW6의 결합 실험 결과는 HW5의 경우와 아주 유사한 미세조직을 보이고 있는데, 이는 원료 조성이 비슷하기 때문이라 사료된다.

Fig. 5-3(a), (b)는 C1 복합체의 결합부위의 미세조직 사진을 나타낸 것이다. C1의 경우는 인공체액 내에서 4주 동안 형성된 결합이 C2와 더불어 상당히 약하고, 미세구조에서도 경계가 불분명하여 확연하게 구분할 수 있는 ridge 부분을 찾을 수 없는 것으로 나타났다. Fig. 5-3(a)는 결합 부분이라 생각되는 곳으로 방추형의 미세한 입자들로 덮여 있으며, 이 시편의 경우는 접합 계면에서의 새로운 상 입자들의 핵생성 속도와 성장속도가 상대적으로 낮아 아직 치밀한 ridge가 형성되지 않았고, 이로 인해 접합강도가 약하게 나타났다고 사료된다. Fig. 5-3(b)는 ridge(사진의 위쪽)와 바깥부분(사진의 아래쪽)의 경계부분으로 ridge에서 바깥쪽으로 갈수록 소결체 표면에 형성된 새로운 입자 상들의 양이 줄어들고 있으며, 입자의 형상도 구형에 가깝게 변해간다. 한편 시편 결합부분에서 안쪽으로 들어갈 수록 방추형의 입자로 변한다. 즉, 두 시편의 접합 면의 안쪽에서 바깥쪽으로 향할수록 새로이 형성된 입자들의 축비율(aspect ratio(= $L/D$ , L: length; D: diameter))이 작아지고 있음을 나타내고 있다.

Fig. 5-4는 C2복합체 결합부위 근처의 미세조직 사진을 나타낸 것으로서 C2의 경우는 C1 보다 경계가 더욱 불확실하였다. Fig. 5-4(a)는 결합 부분의 내부면으로서 축비율이 보다 큰 방추형의 입자들로 형성되어 있었다. Fig. 5-4(b)는 ridge 부분으로 인공체액으로부터 새로운 입자들의 형성이 충분치 않아 결합력이 약해졌을 것이라 사료되며, Fig. 5-4(c)는 바깥(outside) 부분으로 새롭게 형성된 입자



**Fig. 5-3. SEM photographs of a portion (a) on and (b) outside the ridge of C1 mutually bonded by 4 weeks soaking.**



**Fig. 5-4. SEM photographs of a portion (a) inside, (b) just on and (c) outside the ridge of C2 mutually bonded by 4 weeks soaking.**



Fig. 5-4. (Continued)

들을 거의 관찰할 수 없었다. 이 시편의 경우도 C1과 마찬가지로 바깥쪽으로 향할수록 새로운 입자들의 축비율이 작아지고 있음을 나타내었다.

Table 5-1에서와 같이  $7.14\text{MgO}-49.87\text{CaO}-35.41\text{SiO}_2-7.14\text{P}_2\text{O}_5-0.400\text{CaF}_2$  bioglass 조성의 유리 분말을 소결하여 얻은 glass-ceramics, G-C시편의 접합실험 결과 얻어진 SEM사진을 Fig. 5-5에 나타내었다. Fig. 5-5(a)는 접합 표면을 저 배율로 관찰한 것으로 ridge부분과 ridge의 내부 및 외부의 경계가 확실하게 나타났다. 약  $1150\mu\text{m}$ 의 폭을 갖는 ridge 부분(파편과 많은 균열이 보이는 곳)은 Fig. 5-1(c)와 같이 매우 치밀한 조직을 관찰할 수 있었다. Fig. 5-5(b)는 ridge의 안쪽 부분으로 장방형의 입자들의 집합체를 형성하였으며, HW5(Fig. 5-1(b))와 HW6(Fig. 5-2(b)) 같은 잎모양의 입자들은 관찰할 수 없었다. 즉 시편의 조성에 따라 다소 다른 결정 성장 양상을 보였다. Fig. 5-5(d)는 ridge의 바깥 부분으로 새로운 입자 형성은 관찰되지 않았다. Fig. 5-5(c)는 Fig. 5-5(a)에서 균열이 있는 ridge와 ridge의 바깥의 경계부분으로 구형의 submicron 크기의 입자들이 집합체를 이루고 있으며, 이들이 성장하여 ridge가 형성되어 두 시편을 접합시킬 것이라 사료된다.

이상의 결과들로 부터 인공체액 중에서의 소결체의 결합반응기구(bonding mechanism)를 살펴보면, 먼저 소결체 표면의 결정립 표면에서 불균일 핵생성(heterogeneous nucleation)이 일어난다. 이후 인공체액 중의  $\text{Ca}^{2+}$ 와  $\text{PO}_4^{3-}$  이온들이 형성된 핵들의 표면으로 이동하여 석출하여 입자들이 성장하고, 이들의 계속적인 성장에 따라 치밀한 ridge가 형성된다. 여기서 상대적으로 치밀한 ridge 안쪽은 인공체액 성분중에서  $\text{Ca}^{2+}$ 와  $\text{PO}_4^{3-}$  이온들의 이동이 불충분하다고 볼 수 있다. 이때문에 ridge의 안쪽부분은 바깥부분보다 다소 성장이 느린반면에 ridge의 크기는 ridge의 바깥보다는 다소 큰 입자들을 형성했을 것으로 사료된다.

한편 ridge의 형성 모양은 시편들의 기본 조성의 차이에 의해 ridge 내부 부분과 새로운 입자들의 양상이 잎모양 혹은 방추형의 두 가지 형상을 갖게 된다고 생각된다.

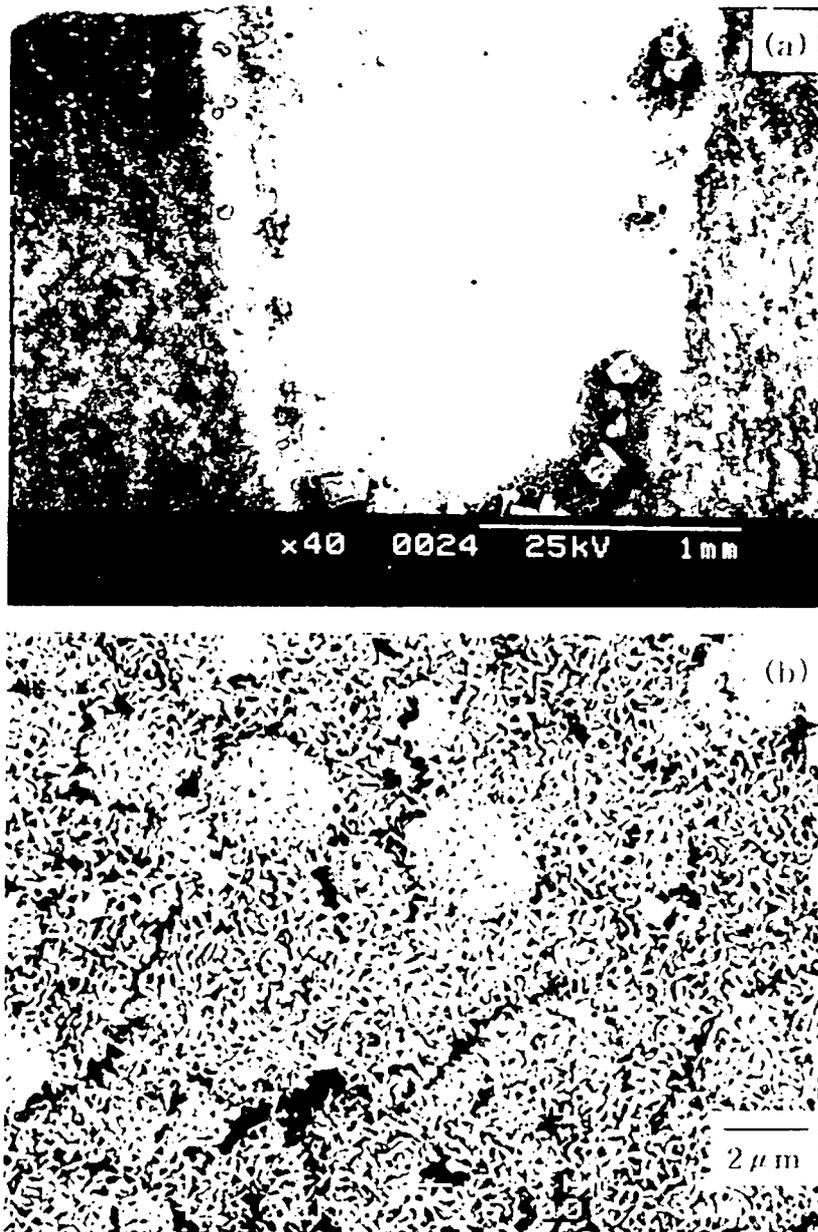


Fig. 5-5. SEM photographs of (a) an interface, a portion (b) inside, (c) around on and (d) outside the ridge of G-C mutually bonded by 4 weeks soaking.

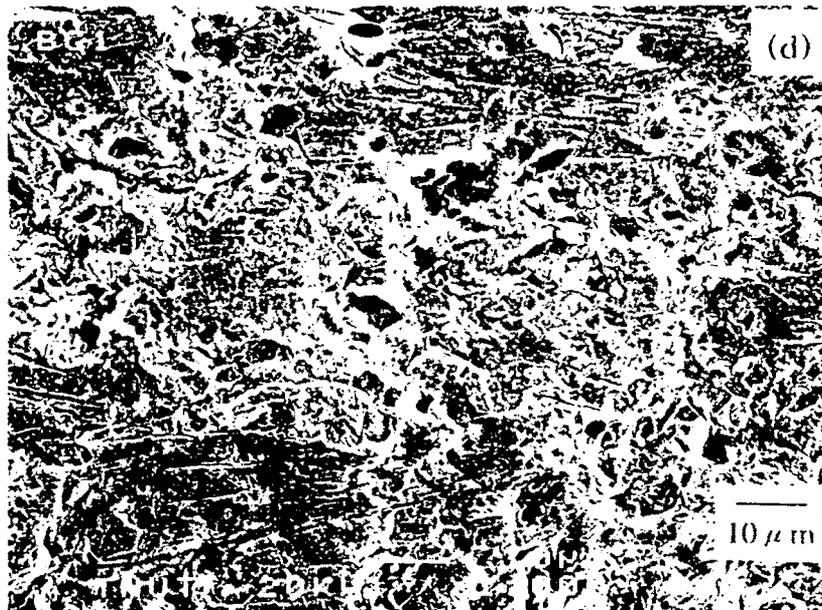


Fig. 5-5. (Continued)

## 제 4절 결론

Hydroxyapatite에 wollastonite와 생체 유리조성에 해당하는 CaO-SiO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-CaF<sub>2</sub>계와 CaO · 2SiO<sub>2</sub>계 유리를 첨가하여 제조한 복합체와 glass-ceramic을 인공체액 중에서의 서로간의 결합 실험을 통해 시편 계면에서의 미세조직을 관찰한 결과는 다음과 같다.

인공체액 중에서 결합형성의 반응기구는 소결체의 결정립 표면에서 이질핵생성이 일어나고 인공체액 중의 Ca<sup>2+</sup>와 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 이온들이 형성된 핵들의 표면으로 이동하여 석출하면서 입자들이 성장하므로써 치밀한 ridge가 형성되었다.

Ridge 안쪽은 상대적으로 치밀한 ridge에 의해 인공체액에서의 Ca<sup>2+</sup>와 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 이온들의 확산이 불충분하여 입자들의 수가 작아 소수의 입자들이 ridge 부분보다는 더 성장하여 보다 큰 입자들이 형성되었다.

시편의 기본 조성의 차이에 의해 특히 ridge의 내부 부분의 새로운 입자들의 양상이 잎모양 혹은 방추형의 두 가지 형상을 나타내었다. 즉, hydroxyapatite 함량이 많은 HW5 및 HW6는 전형적인 잎모양의 조직을 나타내며, hydroxyapatite 함량이 상대적으로 적은 C1, C2, G-C 시편들은 방추형의 입자들로 이루어짐을 알 수 있었다.

## 제 5절 참고문헌

- L. L. Hench, J. Am. Ceram. Soc., **74(7)**, 1487~1510(1991).
- L. L. Hench and J. Wilson, "An Introduction to Bioceramics", In Advanced Series in Ceramics. Vol. 1. ed. by L. L. Hench & J. Wilson. World Scientific, pp. 7~8(1993).
- T. Kokubo, Inorganic Materials, **3**, 365-371(1996).
- 고형열, 김양수, 송종택, 최상훈, 한국요업학회지, **27(3)**, 311~320 (1990).
- 이종필, 최현국, 송종택, 최상훈, 한국요업학회지, **28(4)**, 289~296 (1991).
- T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, J. Ceram. Soc. Jpn., **95(8)**, 785~791(1987).
- T. Inadome, K. Hayashi, Y. Nakashima, H. Tsumura and Y. Sugioka, J. Biomed. Mater. Res., **29**, 19~24(1995).
- R. Berger, G. Sauer, F. G. Steinborn, V. T. Whismann, H. Kohler and H. Dressel, "Proceedings of XV International Congress on Glass," Vol. 3a, Ed., Mazurin, O.V., Leningrad, pp.120~126(1989).
- R. W. Cahn, P. Haasen and E. L. Kramer, "A Comprehensive Treatment : Medical and Dental Materials," in Materials Science and Technology, Ed., D. F. Williams, Vol. 14; pp.66~69(1992).
- J. C. Hulbert, L. L. Hench, J. Wilson and G. Heimke, "Ceramics in Clinical Applications, Past, Present and Future," in High Tech Ceramics, Ed., P. Vincenzini, Proceedings of the World Congress on High Tech Ceramics, 6th CIMTEC, Milan, Italy, pp.189-213(1986).
- T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu and T. Yamamuro, J. Mater. Sci., **20**, 2001~2004(1985).

## 제 6 장 참치뼈로부터 추출한 Hydroxyapatite의 랫드에 대한 급성피하 독성시험

### 제 1절 서론

최근, 치과용의 치아, 정형외과용의 뼈등으로의 사용이 기대되는 인산칼슘계 세라믹스인 hydroxyapatite의 합성 및 생체친화성에 대한 많은 연구결과가 보고되고 있다 (Kokubo et al., 1985; Kokubo et al., 1987; 고 등., 1990; Hulbert et al., 1989).

일반적으로 화학시약으로 합성한 hydroxyapatite는 인간의 치아와 뼈의 상과 유사하나, 어뼈와 같은 생물체로부터 추출한 hydroxyapatite는 P와 Ca의 주요 성분외에도 Mg, K, Zn, Na, Fe 등과 같은 미량의 미네랄을 함유하고 있어 화학시약으로 합성한 hydroxyapatite보다는 생체친화성이 우수한 것으로 추측되는 생체친화성의 장점이 보고되고 있다. 그러나 화학약품으로 합성한 hydroxyapatite는 생체내 존재하는 천연 hydroxyapatite에 비하여 생체내 적합성이 낮은 것으로 보고(高野, 1989)되고 있어 보다 생체친화성이 양호한 hydroxyapatite의 개발을 위하여 천연물에서 추출한 원료쪽으로 관심이 높아지고 있다. 제 1 장의 실험에서 보여준 바와 같이 참치뼈로부터 추출한 천연 hydroxyapatite는 그 화학적 특성으로 보아 hydroxyapatite를 합성하기 위한 화학시약 대체물질로의 사용이 가능할 것으로 판단되어 생체내 이용을 위한 적합성의 검토가 필요하게 되었다.

제 5장에서는 참치로부터 추출한 천연 hydroxyapatite의 생체반응성 및 안전성 여부를 검토하기 위하여 본 시험물질을 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 및 0 g/kg의 용량으로 랫드의 피하에 투여하여 급성피하독성 여부를 관찰하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

시험방법은 식품의약품안전본부의 의약품 등의 독성시험기준 (식품의약품안전본부, 고시 제 96-8호, 1996, 4. 16)에 준하여 실시하였다.

### 1 시험물질

시험물질은 제 1장에서 참치뼈를 80℃로 가열시킨 1% NaOH 수용액에서 7시간 가열하여 유기물 등을 제거하고 수세한 후 건조하여 800℃에서 5시간 회화시켜, 건식방법으로 24시간 분쇄하여 표준망체 200 mesh(75  $\mu$ m)로 체가름하여 분말화한 참치뼈의 천연 hydroxyapatite를 시험물질로 선정하였다. 시험물질은 시험당일 생리식염수 10 ml 당 5g의 농도로 각각 현탁시켜 121℃에서 30분간 멸균한 후에 식혀서 생리식염수로 희석하여 사용하였다. 대조군은 주사용 생리식염수만을 투여하였다.

### 2. 실험동물 및 사육조건

본 시험에는 한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실(대전시 유성구 장동 100)로부터 입수한 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 5~6주령의 암·수 각각 40마리를 입수한 후 1주일간 검역과 순화 사육을 거쳐 건강한 암·수 각각 30마리를 선별해 시험에 사용하였다.

본 실험은 온도  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 5\%$ , 환기 회수 10~12 times/hr, 조명시간 12hr, 조도 150~300 Lux로 설정된 동물실에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고형사료(삼양사료주식회사)를, 물은 상수도수를 자유 섭취시켰다.

### 3. 시험군의 구성

시험군의 구성은 Table 6-1과 같다. 선발된 암·수 각 30마리의 동물을 군간 체

Table 6-1. Experimental design for acute subcutaneous toxicity study

Group	Dose (mg/kg)	No. of Animals Sacrificed	
		Male	Female
Control	-	5	5
HAP	5,000	5	5
	2,500	5	5
	1,250	5	5
	625	5	5
	312.5	5	5

중이 고르게 대조군, hydroxylapatite 분말 5개 용량군 등 6개군으로 군당 암·수 각 5마리씩 분리하였다. 체중범위는 암컷은 평균체중이 130~160g, 수컷은 150~180g 정도였다.

#### 4. 투여방법 및 투여기간

본 물질은 경구내 치아와 정형외과의 인조뼈로서 이식 가능하므로 임상적용 경로와 가까운 피하경로를 택하여 투여하였다. 투여액량은 10ml/kg으로 하였으며, 시험개시 시의 체중측정 결과에 따라 투여액량을 산출하였다. 투여는 등배부의 일정부위에 1회 투여하였다.

#### 5. 검사 항목

일반상태 및 폐사의 관찰: 투여 당일은 12시간까지 매시간마다 일반상태를 관찰하고, 투여 다음날 부터 14일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상, 운동성, 외관, 자율신경 및 사망동물의 유무를 주의깊게 관찰하였다.

체중변화: 투여 직전과, 투여 7일후 및 부검직전인 14일에 3회 체중을 측정하였다.

부검은 시험종료시 생존동물은 에테르 마취로 방혈 치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다.

사망한 동물에 대한 병리조직 소견은 육안적으로 이상장기는 10% 중성포르말린액에 고정후 일반적인 파라핀 절편을 만들어 Hematoxylin과 Eosin 염색을 한 후 그 소견을 관찰하였다.

통계학적 분석은 LD<sub>50</sub>치의 산출을 위하여 Computer program pharmacologic calculation system Version 4.1을 이용하여 Litchfield-Wilcoxon법에 의하여 계산하였다. 체중에 대한 유의성 검정법으로 one-way analysis of variance(ANOVA)에서 유의차가 인정되는 F값이 관찰될 때 대조군과 각 용량군과 비교하기 위하여 Dunnett's t-test를 하였으며, 발생병변의 빈도는  $\chi^2$ (chi-square) 검정을 하였다.

## 제 3절 실험결과

### 1. LD<sub>50</sub>치

시험물질을 랫드에 피하투여시, 암·수 각각에서 투여할 수 있는 최고용량인 체중 kg 당 5,000mg(5,000 mg/kg B.W.)의 용량에서도 사망예는 전혀 관찰되지 않아 LD<sub>50</sub>치의 산정은 Table 6-2에서 보이듯 불가능한 것으로 나타났다.

### 2. 사망률

시험 전기간을 통하여 피하투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서 사망예는 전혀 관찰되지 않았는데, 이의 결과는 Table 6-3과 같다.

### 3. 임상증상

시험 전기간을 통하여 피하투여에 있어 랫드 암·수 모두에서, 본 시험물질에 의한다고 생각되는 특이한 임상증상은 전혀 관찰되지 않았다.

### 4. 체중변화

시험 전기간을 통하여 피하투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서, 각 군간에 유의성 있는 체중 차이를 관찰한것으로서 Table 6-4에서 나타나듯이 체중차이는 관찰되지 않았다.

### 5. 부검소견

생존동물의 부검에서 투여부위인 피하에 있어서 본 시험물질의 투여에 기인된 염증 소견 또는 이상 소견은 전혀 관찰되지 않았으며, 투여 부위에 그대로 잔류하고 있었으며 주위 조직으로의 침식 또는 흡수는 Fig. 6-1에서 보이듯 전혀 관찰되지 않았다.

Table 6-2. Mortality and LD50 values in SD rats administered subcutaneously with hydroxyapatite isolated from tuna bone

Sex	Dose (mg/kg)	Hours after treatment						Days after treatment														Final Mortality					
		1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14				
M	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	Con.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
F	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	312.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	
	Con.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5	

M : Male, F : Female, Con. : Control

Table 6-3. Clinical Findings in SD rats administered subcutaneously with hydroxyapatite isolated from tuna bone

Sex	Dose (mg/kg)	Finding	Hours after treatment								Days after treatment														
			1	2	3	4	5	6	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
M	5,000	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,500	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1,250	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	625	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
312.5	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Con	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	5,000	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2,500	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	1,250	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	625	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
312.5	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Con	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

M : Male, F : Female, Con : Control

N : No. of animals examined

- : No abnormality detected

Table 6-4. Changes of body weights in SD rats administered subcutaneously with hydroxyapatite isolated from tuna bone

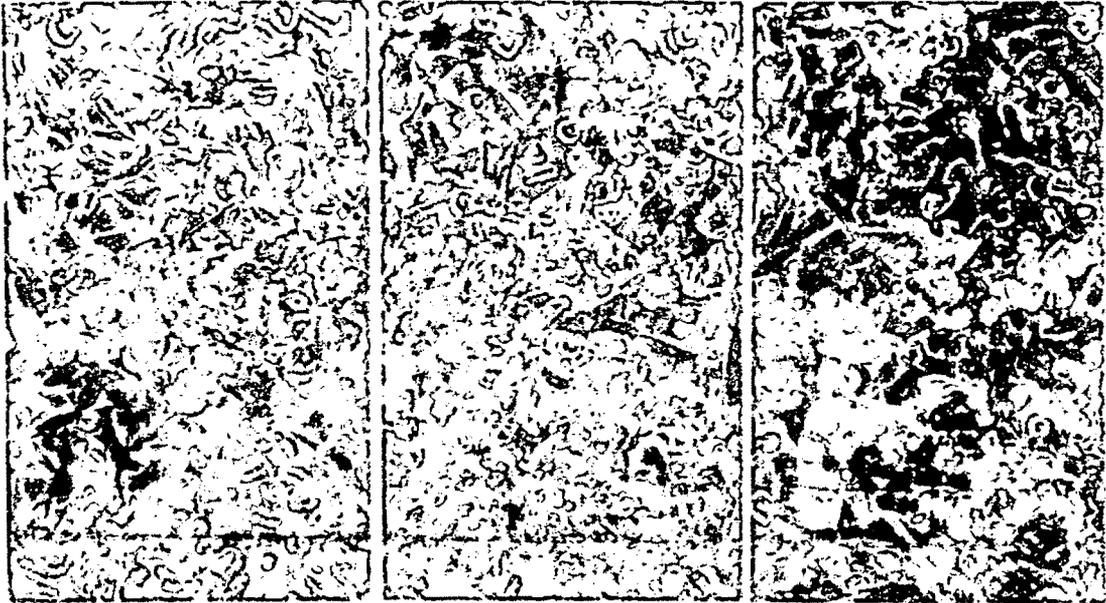
Sex	Days after treatment	GROUPS	I	II	III	IV	V	VI
M	0	MEAN	157.34	158.51	156.78	159.34	158.62	157.83
		S.D.	±3.24	±2.68	±2.37	±2.59	±3.06	±2.88
		N	5	5	5	5	5	5
	7	MEAN	200.78	198.62	201.36	197.57	199.63	198.62
		S.D.	±3.54	±2.86	±2.85	±2.76	±3.25	±2.96
		N	5	5	5	5	5	5
	14	MEAN	247.65	248.37	250.68	247.84	246.59	250.87
		S.D.	±3.89	±2.90	±3.08	±3.49	±3.24	±3.32
		N	5	5	5	5	5	5
F	0	MEAN	138.75	136.45	140.70	139.52	139.81	137.64
		S.D.	±2.54	±2.76	±2.38	±2.67	±2.59	±3.04
		N	5	5	5	5	5	5
	7	MEAN	163.27	162.54	160.39	159.74	161.69	163.16
		S.D.	±3.76	±3.45	±2.98	±3.06	±3.23	±3.65
		N	5	5	5	5	5	5
	14	MEAN	178.56	178.53	175.49	177.23	180.74	179.53
		S.D.	±4.24	±3.88	±3.69	±3.52	±3.43	±3.97
		N	5	5	5	5	5	5

I : 5,000 mg/kg B.W. II : 2,500 mg/kg B.W. III : 1,250 mg/kg B.W.

IV : 625 mg/kg B.W. V : 312.5 mg/kg B.W. VI : Control

M : Male, F : Female, N : No. of animals examined

Values represent Mean ± S.D. for 5 rats.



(a)Control

(b)HAP insert in cell

(c)AP insert in cell

**Fig. 6-1. Passive cutaneous anaphylaxis in rat treated with hydroxyapatite powder isolated from tuna bone.**

## 6. 병리조직학적 소견

생존동물의 부검에서 본 시험물질의 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병리조직학적 소견은 Table 6-5와 Table 6-6에서 관찰되지 않았음을 보였다.

Table 6-5. Gross Findings of necropsy in male SD rats administered subcutaneously with hydroxyapatite isolated from tuna bone

Organ		Dose(mg/kg B.W.)					
		5,000	2,500	1,250	625	312.5	Control
Brain	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Kidney-Left	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Kidney-Right	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Heart	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Lung	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Spleen	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Liver	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Stomach	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Intestine	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5

Table 6-5. (Continued)

Organ		Dose(mg/kg B.W.)					
		5,000	2,500	1,250	625	312.5	Control
Pancreas	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Adrenal gland (left)	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Adrenal gland (right)	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Pituitary gland	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Testis-L	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Testis-R	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Other organs	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5

Table 6-6. Gross Findings of necropsy in female SD rats subcutaneously with hydroxyapatite isolated from tuna bone

Organ		Dose(mg/kg B.W.)					
		5,000	2,500	1,250	625	312.5	Control
Brain	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Kidney-Left	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Kidney-Right	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Heart	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Lung	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Spleen	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Liver	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Stomach	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Intestine	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5

Table 6-6. (Continued).

Organ		Dose(mg/kg B.W.)					
		5,000	2,500	1,250	625	312.5	Control
Pancreas	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Adrenal gland (left)	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Adrenal gland (right)	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Pituitary gland	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Ovary-L	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Ovary-R	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5
Other organs	No. of observations	5	5	5	5	5	5
	No gross findings	5	5	5	5	5	5

## 제 4절 결론

참치로부터 추출한 hydroxyapatite분말의 랫드에 대한급성피하독성을 조사하기 위하여, hydroxyapatite 분말을 생리식염수에 현탁시켜, 암·수 각각 투여할 수 있는 최고용량인 랫드 체중 kg 당 5,000 mg(5,000 mg/kg B.W.)의 용량으로 23G 주사기를 이용하여 피하내 1회 투여 후 14일간 관찰한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 모든 투여용량군의 일반적인 임상증상에서 아무런 이상이 발견되지 않았다.
2. 체중변화는 물론 전 생존 동물의 부검에서도 어떠한 이상도 관찰되지 않았다.
3. LD<sub>50</sub>치는 랫드 암·수 모두에서 체중 kg 당 5,000 mg이상인 것으로 판단되었다.
4. 이상의 결과로 부터 참치로부터 제조된 분말제인 hydroxylapatite는 동물의 피하에 투여시에 랫드에서 어떤 독성도 유발하지 않는 안전한 제제로 사료된다.

## 제 5절 참고문헌

Hulbert, J. C., Hench, L. L., Wilson, J. and Heimke, G. (1986), "Ceramics in Clinical Applications, Past, Present and Future," in *High Tech Ceramics*, Ed., Vincenzini, P., Proceedings of the World Congress on High Tech Ceramics, 6th CIMTEC, Milan, Italy, pp.189-213.

Kokubo, T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T. and Yamamuro, T. (1987), "Bonding between Bioactive Glasses, Glass-Ceramics or Ceramics in a Simulated Body Fluid," *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **95**(8), 785-791.

Kokubo, T., Ito, S., Shigematsu, M. and Yamamuro, T. (1985), "Mechanical Properties of a New Type of Apatite-containing Glass-Ceramic for Prosthetic Application," *J. Mater. Sci.*, **20**, 2001-2004.

식품의약품안전본부 고시 제 96-8호 : 의약품 등의 독성기준(1996. 4. 16.)

고형열 · 김양수 · 송종택 · 최상홀 (1990), "Hydroxyapatite Bioceramics의 생체 친화성에 관한 연구 (I) 인공체액에서의 Hydroxyapatite Bioceramics간의 결합," 한국요업학회지, **27**(3), 311-320.

高野直久 (1989) : マリンバイオ海洋バイオ新素材・新物質 : 天然アパタイト(HAP-B). - 魚骨からの バイオセラミックスについて, シ-エムシ-. pp. 214-229.

## 제 7 장 참치뼈로부터 추출한 Hydroxyapatite의 햄스터에 대한 구강점막자극시험

### 제 1절. 서론

치과재료를 포함하는 각종 의료 용구에 대한 안전성에 관한 시험, 연구, 평가 제도는 인명의 유지, 연장 또는 특정 기능의 활성화 등 인체의 각종 생리현상과 직접 연관됨으로 그 안전성에 문제가 있다면, 기본적인 목적을 달성할 수 없고 생명에 직접적인 영향을 줄 수 있는 중대한 문제이다. 따라서 치과재료 등 신소재의 개발국가들 사이에서는 안전성 확보를 위한 각종 시험, 연구가 활발하고 또한 제도적으로 하나의 조화를 이루기 위한 노력을 경주하고 있다. 이러한 치과재료의 물성에 관하여는 많은 보고가 있으나, 독성에 관한 체계적인 연구로는 1963년 미국 치과의사협회(American National Standard/American Dental Association, ANS/ADA)가 충전재 독성에 관한 연구모임을 만었고, 1973년 치과재료의 생물학적 특성의 평가 방법을 권고한 것이 시초이다. 미국치과의사협회와 국제치과연맹에서 치과재료의 생물학적 평가를 각 단계로 나누어 특성에 맞게 규정하고 있는데 비교적 접근가능한 방법으로는 1차적인 것이 용혈성 시험, Ames test, 경구 독성시험 등이 있고 2차적인 것이 구강점막자극시험, 감작성시험 등이 있다.

의약품, 화장품의 동물을 이용한 구강점막자극시험법은 syrian hamster를 사용하고 마취하여 협낭(cheek pouch)에 시료를 여러 번 접촉시키는 방법이 일반적이다. 치과재료를 사용한 구강점막 자극시험방법은 Piliero et al. (1979)이 합금(alloy)을 2 × 6 mm cylinder형태로 만들어 마취한 뒤 햄스타 협낭에 봉합하여 14일간 삽입시킨 후 육안 및 조직학적 변화를 살펴보았고, Roy et al. (1986)은

합금을 원형 디스크(직경6mm, 두께 1mm)로 만들어 햄스타를 마취한 후 협낭의 바닥에 14일간 이식하여 조직학적 병변을 살펴보았다. 미국치과의사협회에서 권고하는 구강점막자극시험은 시료를 적절한 크기로 만들어 14일간 부착하여 구강점막의 변화를 조직학적 검사로 관찰하도록 되어 있다. 시험방법으로서는 ANS/ADA (1979)의 방법을 근간으로 분말시료의 특성을 충분히 고려하기 위하여 Piliero et al. (1979)과 Roy et al. (1986)의 방법을 수식하였다. 즉, 햄스타 협낭에 시료를 주입한 후 봉합시켜 14일간 유지하여 육안 및 조직학적 변화를 살펴 보았다. 따라서 제 5장에서는 치과용 재료로서 적용이 기대되는 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite에 대한 안전성 평가의 시험방법 일환으로 구강점막자극 시험을 실시하였다.

## 제 2절 재료 및 방법

### 1. 시험재료

참치뼈를 1% NaOH 수용액에서 80℃, 7시간 가열하여 유기물 등을 제거하고 수세한 후 충분히 건조하여 800℃에서 5시간 회화하여 hydroxy-apatite를 추출하였다. 건식방법으로 24시간 분쇄하여 표준망체 200 mesh로 체가름하여 분말화한 시험재료로 사용하였다.

### 2. 시료제작

시료는 분말시료 자체를 직접 주입하는 방법을 택하기 때문에 특이한 제조방법을 택하지 않고 사용하였다.

### 3. 실험동물 및 사육환경

삼육실험동물연구소에서 입수한 7주령의 Syrian hamster를 6주간 순화시킨 후 건강하고 발육양호한 동물을 처치군은 군당 수컷 7마리씩 두고 대조군도 7마리를 두어 총 14마리를 사용하였다. 실험개시시의 체중범위는 110~150g이었다. 실험기간중의 사육환경은 온도  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $50 \pm 20\%$ , 12시간조명(P.M. 7:00~A.M. 7:00)이었으며, 동물은 Polycarbonate로 제작된 케이지에서 4-5 마리씩 사육하였으며, 사료(실험동물용 펠렛사료, 삼양사료)와 물은 자유로이 급여하였다.

### 4. 시험방법

가. 구강점막자극 시험(ANS/ADA, 1979 ; Piliero et al., 1979 ; Roy and Whishe, 1979)

Syrian hamster를 예비실험을 통하여 적정기간 충분히 마취될 수 있는 농도인 90mg/Kg B.W.의 Pentobarbital sodium으로 마취한 후 왼쪽 협낭(cheek pouch)을 조

심스럽게 끌어 당겨 생리식염수로 세정한 뒤 체중 kg 당 5g의 hydroxyapatite 분말시료를 협낭의 맨 밑바닥에 놓이도록 하여 시료가 들어갈 수 있도록 주머니를 만든 뒤 Fehland intestinal forceps으로 고정시켜 멸균된 견제 봉합사(Silk No. 1)를 사용하여 simple continuous suture (Knecht et al., 1987)로 일단 봉합한 후 다시 continuous enerting mattress suture (Knecht et al., 1987)로 이중봉합(double suture)을 실시하였다. 대조군도 7마리의 햄스타를 이용하여 hydroxyapatite분말을 넣지 않고 생리식염수만을 투여한 후 동일한 처치를 실시하였다. 14일간 체중 및 임상증상의 변화를 관찰하고 14일후에 Pentobarbital sodium으로 안락사 시킨후 시료와 접촉된 협낭을 조심스럽게 끌어당겨 육안적으로 병변유무를 확인한 뒤 협낭을 절제하고 협낭을 고르게 편 뒤 10% buffered formalin에 고정시켜 탈수, 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거친 다음 4~5 $\mu$ m 두께의 파라핀 절편을 만들어 Hematoxylin-Eosin(H & E)염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 나. 통계학적 처리

시험결과치는 Student t-test를 이용하여 대조 값과 비교, 분석하였다. 전 항목에 대하여 공히 5%( $p < 0.05$ ), 1%( $p < 0.01$ ), 0.1%( $p < 0.001$ )의 수준에서 유의성을 검증하였다.

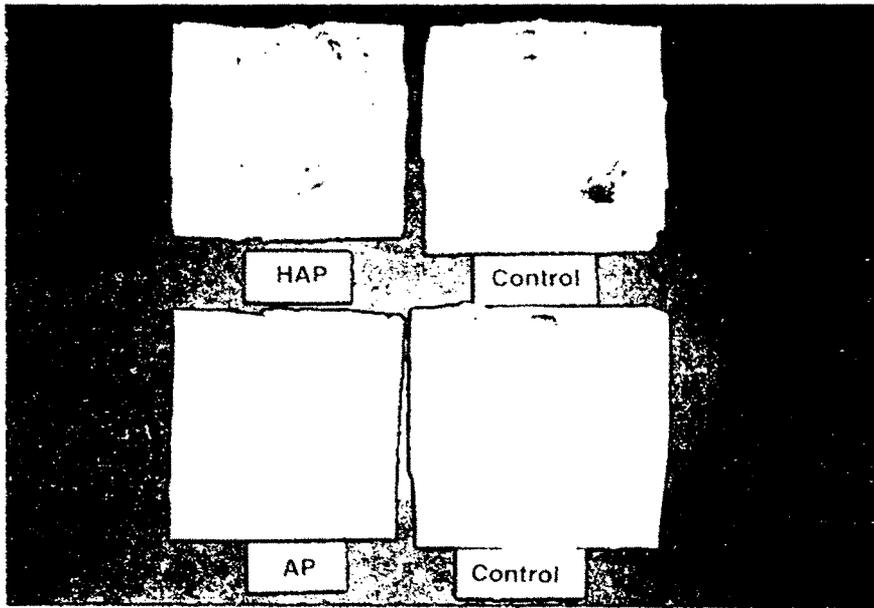
## 제 3절 결과

### 1. 임상증상 및 체중의 변화

Fig. 7-1은 hydroxyapatite 분말처치군 및 대조군에서 실험기간에 걸쳐 봉합에 따른 증상을 관찰한 사진으로서, 시료 투입에 따른 생세포의 거부반응 등과 hydroxyapatite 분말 투여에 의한 임상증상의 특이한 반응의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 hydroxyapatite 분말을 처치한 군의 체중은 대조군에 비해 실험기간 모두에 걸쳐 유의적인 변화가 나타나지 않는 것으로 나타났다.

### 2. 구강점막의 변화

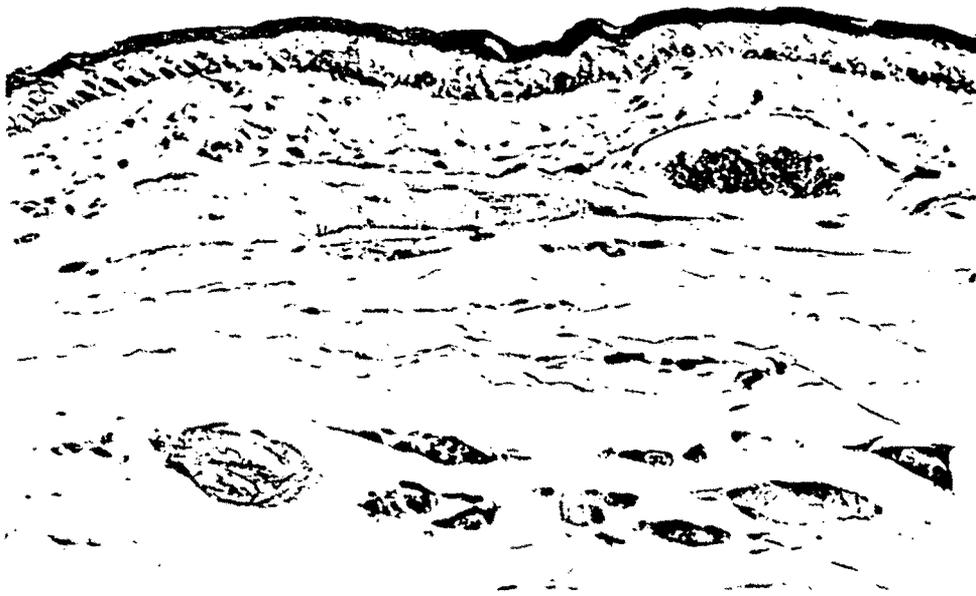
14일 후의 구강점막은 육안적으로 볼 때 발적 및 부종형성 등의 특별한 병변은 관찰할 수 없었다. 병리조직학적 검사에서는 궤양형성(ulceration), acanthosis, hyperkeratosis, hyperkeratonization, 공포형성(vesicle formation), 염증세포 침윤, 출혈, 혈관 확장 등을 살펴보았으나, 대조군 및 hydroxyapatite 분말 처치군 모두에서 병리 조직학적 이상을 관찰할 수 없었다(Fig. 7-2와 Fig. 7-3). 다만 처치군 및 대조군에서 봉합에 의해 점막이 천공된 부위에서는 점막의 손상, 점막밑조직 및 근육층에 걸쳐서 광범위한 염증세포의 침윤이 관찰되었다



**Fig. 7-1. Gross finding of oral mucosa of cheek pouch in hamster which was implanted with hydroxyapatite powder for 14 days shows normal appearance.**



**Fig. 7-2. Histopathological lesion of oral mucosa of cheek pouch in hamster which was implanted with hydroxyapatite powder for 14 days shows normal appearance (H & E stain,  $\times 40$ )**



**Fig. 7-3. Histopathological lesion of oral mucosa of check pouch in hamster which was implanted with salic for 14 days whows normal appearance (H & E stain x 4).**

## 제 4절 고찰

치과생체 재료의 기계적 성질이나 물성에 관해서는 오래전부터 그 중요성이 인식되어 이에 대한 평가방법이 70여년간 시행되어온 반면 생물학적 평가는 최근에 들어서 시작되었다고 한다 (Standfold, 1982). 미국치과의사협회 (1979)에서 권고하는 치과재료의 1차적시험방법으로는 세포독성시험(cytotoxicity), 용혈성시험(hemolysis), Ames test, 급성독성시험(경구, 복강내 투여), 급성흡입독성시험등이 있으며, 이차적 시험방법으로는 구강점막자극시험, 피하이식독성시험(subcutaneous implantation toxicity test), 피부감작성시험(skin sensitization test), 반복노출에 따른 경피독성시험, 골내이식독성시험(implantation test in bone) 등이 있다. 국내에서도 윤 등 (1992)이 수종의 치과용 합금을 이용하여 세포독성시험을 실시하였고 김 등 (1992)이 수종의 결합용레진을 이용하여 소핵시험(mononucleus test) 등을 실시하였다 본 실험은 국내에서 치과재료의 안전성 시험방법 및 평가방법을 개발하기 위하여 미국치과의사협회 (1979)에서 권고하는 방법을 토대로 실시하였다.

구강점막자극시험은 Piliero et al. (1979)이 미국치과의사협회가 정한 type II, Class Iidls 금속합금을 이용하여 햄스타에서의 생물학적 평가방법을 사용하였는데 처치한 합금에 의한 조직의 부작용은 나타나지 않았으나 구강점막에 봉합에 의한 Keratonization과 염증세포의 침윤이 나타났다고 하였다. 따라서 본실험에 한, 두 예에서 나타난 염증세포의 침윤은 그 수가 적으며 봉합부위에서만 나타나고 투여부위에서는 나타나지 않은 것으로 보아 레진 처치에 의한 반응은 아닌 것으로 보고하였다. Roy et al. (1996)은 1979년 미국치과의사협회에서 권고하는 방법을 좀더 개선하기 위해 새로운 double suture technique과 soft collar를 사용하여 14일간의 치과재료 보존율(retention rate)을 높였다고 하였다. 제 5장에서는 치과재료 가공의 편의를 위하여 Piliiero et al. (1979)의 방법에 의해 재료를 2 ×

6 mm cylinder 모양으로 가공하며, 14일간의 보존율을 높이기 위해 Roy et al. (1986)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 그러나 치과용 재료로서 사용이 기대되는 참치뼈로부터 유래된 hydroxyapatite에 대한 안전성 시험방법의 일환으로 구강점막 자극 시험은 국내에서 아직 보고된 바 없었기 때문에 hydroxyapatite 분말의 치과용 재료로서의 안전성 평가를 위하여 구강점막 자극 시험을 실시하였다. Fig. 7-1에서 Fig. 7-3에 보이듯 hydroxyapatite 분말 처치군 및 대조군에서 실험기간에 걸쳐 봉합에 의한 특이한 증상은 관찰되지 않았으며 hydroxyapatite 분말 처치에 의한 임상증상의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 hydroxyapatite 분말을 처치한 군의 체중은 대조군에 비해 실험기간 모두에 걸쳐 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 한편 14일 후의 구강점막은 육안적으로 볼 때 발적 및 부종형성 등의 특별한 병변은 관찰할 수 없었다. 또한 병리조직학적 검사에서도 궤양형성(ulceration), acanthosis, hyperkeratosis, hyperkeratonization, 공포형성(vesicle formation), 염증세포 침윤, 출혈, 혈관 확장 등을 살펴보았으나, 대조군 및 hydroxyapatite 분말 처치군 모두에서 특별한 조직학적 이상을 관찰할 수 없었다. 다만 처치군 및 대조군에서 봉합에 의해 점막이 천공된 부위에서는 점막의 손상, 점막밑조직 및 근육층에 걸쳐서 광범위한 염증세포의 침윤이 관찰되었을 뿐이다.

이상의 결과로부터 참치로부터 유래된 hydroxyapatite는 햄스터의 구강점막을 이용하여 시료를 14일간 자극이 가해지도록 봉합하여 대조군과 비교한 결과, 시료 처치군 및 대조군 모두 봉합 및 처치에 의한 일반증상의 변화가 없었으며 구강점막에서도 시료투여로 인한 특이한 변화는 없어서 hydroxyapatite는 생체내에서 부작용이 없는 안전한 제제로 인체에 부작용이 없는 것으로 사료된다. 또한 Table 7-1은 분말시료의 이식후 햄스터의 체중변화를 측정된 것으로서 전 시험기간에 걸쳐 급격한 체중변화는 일어나지 않는 것으로 나타났다.

Table 7-1. The changes of mean body weights in syrian hamster treated with hydroxyapatite powder.

Group	Dose (g/kg)	Days				
		0	3	6	9	14
Hydroxyapatite	5	124.3 ± 8.67	123.8 ± 10.5	124.1 ± 11.5	125.2 ± 12.8	126.3 ± 12.9
Control	5	125.1 ± 9.75	124.9 ± 10.4	125.2 ± 11.4	126.2 ± 12.8	127.9 ± 13.1

## 제 5절 결론

참치뼈로부터 추출한 hydroxyapatite분말의 치과용 재료로서의 안전성 평가를 위하여 구강점막자극 시험을 실시하였다. 구강점막자극시험은 Syrian햄스타를 이용하여 시료를 14일간 자극이 가해지도록 봉합하여 대조군과 비교한 결과 시료 처치군 및 대조군 모두 봉합 및 처치에 의한 일반증상의 변화가 없었으며 구강 점막에서도 시료투여로 인한 특이한 변화는 없었다. 따라서 참치로부터 유래된 hydroxyapatite는 생체내에서 부작용이 없는 안전한 제제로 인체에 부작용이 없는 것으로 나타났다.

## 제 6절 참고문헌

- American National Standard/American Dental Association Document No. 41 for Recommended Practices for Biological Evaluation of Dental Materials(1979).
- American National Standard/American Dental Association Specification No. 5 for Dental Casting Alloys(1979).
- Bruce, N. Amese, Joyce McCann & Edith Yamasaki. (1975),"Methods for Detecting Carcinogens & Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test", *Mutation research*, 31, 347~364,
- Council on dental materials and device. (1992),"Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials," *JADA*, 84, 382~387.
- Hellen, H. and Arnem H. P. (1978),"Evaluation of Periodontal Dressings by Hemolysis an Oral LD<sub>50</sub> Tests", *J. Dent. Res.*, 58(9), 1912~1913.
- Knecht, C. D., Allen, A. R., Williams, D. J. and Johnson, J. H. (1987)," Suture Pattern", *In Fundamental Technique in Veterinary Surgery. 3rd edit.*, Sauders, pp. 36~71.
- Maron, D. M. and Ames B. M. (1983),"Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test", *Mutation Res.*, 113, 173~215.
- Piliero, S. J., Licalzi, M., Pental, L., Piliero, J. A., Kaufman, E. G., Schulman, A. and Willigan, D. A. (1979),"Biocompatibility Evaluation of Casting Alloy in Hamsters," *J. Prosthetic Dentistry*, 41(2), 220~223.
- Robert, G. C., William, J. O. and John, M. P. (1979),"Plastics in Prothetics", *In Dental Materials Properties and Manippulation. 2nd. ed. by Mosdy*, pp.

215~237.

Roy, M. and Whishe, H. I. (1986), "Establishment of and Improved Implantation Technique for Hamster Mucous Membrane Irritation Testing", *J. Dent. Res.*, 65(11), 1365~1370.

Stanford. J. W. (1982), "Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials", *Int. Dent. J.* 30(2), 140~188.

김철위 · 이용근 · 윤숙진 · 전해림. (1992), "Micronucleus test를 이용한 수중 결합용 레진과 상아질결합제의 돌연변이의 유발에 관한 연구", 대한치과기재학회지, 제 19권 제 1호, 85-94.

윤숙진 · 김철위. (1992), "수중치과용합금의 세포독성 평가에 관한연구", 대한치과기재학회지, 제 19권. 제 2호, 151-165.

## 제 8 장 종합 고찰

현재까지 개발된 의료용 생체재료에서 금속재료는 우수한 성형성 및 용이한 가공성, 그리고 파괴인성치가 높은 장점을 보이거나 취약한 생체친화성과 금속이온의 용출로 인한 재료표면의 변화 및 내화학적 내식성이 취약한 단점을 보이는 것으로 알려져 있고, 고분자재료의 경우 성형성, 내화학적 및 생체친화성이 비교적 좋으나 기계적인 성질 및 내열성이 취약한 단점을 보인다. 한편 세라믹스는 무엇보다도 우수한 생체친화성 및 사용시간에 관계없이 표면의 변화가 없고 내화성, 내열성, 내마모성이 우수하다. 반면에 낮은 파괴인성( $K_{Ic}$ )과 복잡한 형상부여 같은 성형성이 불량하다. 최근 세라믹스의 성형기술 발달로 성형성의 문제는 해결되고 있으나 취성파괴와 같은 기계적인 물성 개선에 대한 연구가 집중되고 있다. 현재까지 개발된 생체용 세라믹스가 사용되는 주요 이용처를 살펴보면 인공뼈, 인공관절, 인공치아, 인공치근, 골충진제, 골치환재, 인공판막, 인공인대, 인공혈관, 인공기관 등에 주로 활용되고 있다. 특히 생체활성을 보이는 아파타이트계 세라믹 물질은 Ca/P의 원자비율에 의해서 상이 결정되는데, 이는 뼈와 같은 생물학적인 재료의 주요 무기성분 역시 Ca와 P가 가장 많은 비중을 차지하며, 본 연구에서 이용된 참치뼈와 같은 생물학적인 재료 역시 회화 후 잔존하는 무기성분중 Ca와 P 등이 가장 많은 비중을 차지하였다. 또한 주결정상은 회화온도에 관계없이 hydroxyapatite로 나타났는데, 화학시약로 합성한 아파타이트는 1050°C 이상의 온도에서는 tetracalcium phosphate상으로 재분해 과정을 수반한다고 지적하였다. 참치뼈와 같은 생물체로부터 얻어진 시료를 X-ray로 상을 동정한 경우에는 합성 아파타이트 경우와 같은 열간 재분해에 의한 TCP상은 관찰되지 않아 생물체의 아파타이트는 화학시약으로 합성한 경우와 상이한 분해 반응을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 1-3(a), (b)).

소결, 밀도, 대자율(magnetic susceptibility) 외에 여러 물성에 중요한 영향을 미치는 입자크기와 기하학적인 형태는 850°C에서 평균 입자크기는 29.65  $\mu\text{m}$ 이며, 950°C에서는 12.18  $\mu\text{m}$ , 1050°C에서는 10.80  $\mu\text{m}$ , 1150°C에서는 13.73  $\mu\text{m}$ , 1250°C에서는 11.47  $\mu\text{m}$ , 그리고 1350°C에서는 14.65  $\mu\text{m}$ 로 각각 나타났다. 또한 입자의 인식비율(DR)은 4에 근접하는 입자 크기의 분포가 불규칙적인 형태에 해당하는 상수값을 보였다(Fig. 1-6).

고온으로 갈수록 입자 크기의 감소 경향은 뚜렷하나, 저온에서와 마찬가지로 특정한 기하학적인 형태를 가지고 있지는 않았다. 일반적으로 광물(mineral)을 분쇄 후 회화할 경우 온도의 함수로서 입자는 구형에 가까운 형태를 나타내는 것으로 알려져 있으나, 참치뼈를 회화한 경우에는 특징적인 형상을 보이고 있지는 않았다. 이는 생물학적인 뼈의 구조 때문으로 생각되는데, 즉, 생물뼈의 외부 밀도와 내부 밀도 차이에 기인하여 물리적으로 열분해 반응이 일어날 때 뼈의 내부는 상대적으로 밀도가 낮아서 쉽게 분해 반응이 일어나기 때문으로 판단되었다. 회화온도가 증가할수록 입자크기가 대략 14  $\mu\text{m}$ 이며 입자들은 재응집 또는 부분소결이 일어나는 경향을 보였다(Fig. 1-7).

참치뼈로부터 추출한 물질은 hydroxyapatite로 나타나 치조골의 재생효과를 유도시키는 시멘트 등과 같은 생체재료로 이용가능한 것으로 나타났다.

Hydroxyapatite를 치밀화시킨 소결체는 생체뼈에 비하여 압축강도는 충분하나 취약한 강도를 나타내고 내충격성이 약한 것으로 알려져 있다. 또한 아파타이트의 소결성은 지극히 불량한 것으로 알려져 있어, 소결성과 열적안정성 등을 개선하기 위하여 wollastonite를 첨가한 고상소결체의 물리화학적 특성을 파악하고자 하였다.

Wollastonite가 첨가된 경우, 80°C 부근에서 흡착수(absorbed water loss) 등의 방출에 의한 흡열피크와 450°C 부근에서는 탈 OH에 의한 흡열피크가 나타났다. 또한 1050°C 부근에 wollastonite가  $\beta$ 상에서  $\alpha$ 상으로 상전리로 인한 발열피크가 나타났

다. 1300°C 이상에서는  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ 의 결정상 생성에 따른 발열피크가 나타났다(Fig. 2-3(a), (b)). 이에 반해 wollastonite 함량이 상대적으로 적고 아파타이트의 함량이 지속적으로 증가하는 조성에서는 발열반응이 측정온도 범위인 1450°C까지 지속적으로 증가하는 경향을 보이고 있는데(Fig. 2-3(b)), 이는 wollastonite 양이 상대적으로 낮아 결정상의 생성이 지연되기 때문에 이러한 현상이 나타나는 것으로 판단되었다. X-ray 분석을 통해서 관찰된 주요 피크들은 hydroxyapatite의 함량이 증가할수록 결정상은 hydroxyapatite( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )이고, pseudo-wollastonite( $\alpha\text{-CaSiO}_3$ )가 부결정상으로 관찰되어 A-W glass-ceramic의 결정상과 동일하였다(Fig. 2-4(a), (b)).

한편 소결온도가 증가하고 hydroxyapatite의 함량이 상대적으로 증가하는 조성에서는 hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )의 재분해에 의한 whitlockite ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )상이 주결정상으로 나타났다. 이는 수분이 존재하는 <900°C의 저온영역에서는 hydroxyapatite의 상이 형성되나, 수분이 존재하지 않고 또한 900°C 이상의 고온영역에서는  $\beta$ -whitlockite의 상이 형성된다고 알려진 현상과 일치하였다. 소결온도가 1300°C인 경우 주결정상은 hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )이고, wollastonite( $\text{CaSiO}_3$ )가 부결정상으로 나타났다(Fig. 2-4(c)).

소결온도에 따른 미세구조(Fig. 2-5(a), (b), (c))는 소결온도에 관계없이 다량의 기공들이 존재하는 형태를 보이고 있어, 고상소결에 의해서 제조된 세라믹의 미세구조는 잔류기공과 입계가 함께 혼합된 형태를 보였다. 또한 소결온도에 따라 hydroxyapatite가 whitlockite로 분해되므로써 발생하는  $\text{H}_2\text{O}$  gas에 의한 closed pore가 생성되었다.

각 입자들의 경계영역은 분명하지 않는 반면에 입자들의 입계가 상호 연결되어 충전이 일어난 형태를 보여, 결정입자들의 성분을 파악하기 위하여 EDS로 분석한 결과 입자의 중앙부분은 Ca, P-rich상으로 나타나 hydroxyapatite상이었으며(Fig. 2-6), 입자의 경계부분은 Ca, Si-rich상으로 나타나 이 부분은 wollastonite가

주결정상으로 판단되었다(Fig. 2-7). 이에 반해서 소결온도가 증가할수록 미세구조는 뚜렷한 입자간의 경계영역을 보이며, wollastonite에 의해서 생성된 액상의 젖음도(wettability)가 낮기 때문에 경계면을 따라 균열이 형성된 미세구조를 나타내었다. 이는 고온에서 생성된 액상은 냉각시 부피의 증가가 야기되어 입계간의 응력이 증가하기 때문에 입자 경계면을 따라 균열이 발생하여, Fig. 2-8와 같은 미세구조를 가지는 것으로 생각된다.

4-point bending법으로 강도(bending strength)를 측정한 경우 최대강도는 소결온도가 1350℃에서  $17.91 \pm 0.19$  MPa로 나타나 관절연골(articular cartilage)의 최대강도인 10-40 MPa(Kempson, 1982)보다는 못하였지만, 해면골(cancellous bone)의 강도 값인 10-20 MPa에 근접하는 값을 나타내었고, wollastonite의 산지에 따른 소결강도의 비교에서 국산의 경우가 중국산보다 좋은 강도를 발현하는 것으로 나타났다(Fig. 2-10).

참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite를 glass-ceramic의 조성으로 치환하여 제조한 glass-ceramic을 첨가하여 제조한 복합체(composite)로 강도 개선을 시도한 경우, 주결정상은 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와 tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)이었으며, hydroxyapatite가 고온에서 분해되어 TCP를 생성했기 때문에 hydroxyapatite에 귀속되는 피크는 관찰되지 않았다. 또한 CaO-SiO<sub>2</sub> glass가 첨가된 경우도 이와 유사한 결정상을 나타내었다(Fig. 4-2와 Fig. 4-3).

참치뼈에 CaF<sub>2</sub>, MgO 등과 같은 핵형성제를 포함하는 화학시약을 첨가하여 제조한 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계의 유리로부터 제조된 glass-ceramic은 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와  $\beta$ -TCP외에 fluoroapatite가 주결정상으로 나타났다. 이는 출발 조성에서 CaF<sub>2</sub>가 상당량 첨가되었고, hydroxyapatite를 생성할 수 있는 OH원이 없기 때문에 fluoroapatite가 생성되었다(Fig. 4-4).

1300℃에서 제조한 복합체 C1의 강도는  $53.82 \pm 96$  MPa이었으며, C2의 경우  $29.96 \pm 1.49$  MPa로 나타나 고상반응에 의한 소결체 강도 약 18 MPa보다 3-4배

정도 강도 증진 효과가 유도되었다(Fig. 4-5). 이는 바이오 세라믹의 결정상 중에서 wollastonite의 함량의 존재가 증가할수록 강도의 증가가 유도된다고 보고한 일반적인 경향의 결과와 상호 잘 일치하는 것으로 보인다. 강도증진면에서 볼 때 cancellous bone의 최대 강도 20 MPa와 articular cartilage의 최대 강도인 40 MPa보다 우수한 강도를 발현하는 것으로 나타났다. 900°C에서는  $63.39 \pm 5.56$  MPa, 1200°C인 경우  $81.21 \pm 2.20$  MPa 그리고 소결온도가 1300°C인 경우 강도는  $53.82 \pm 6.40$  MPa로 나타나 소결온도의 함수로서 강도가 변화하는 것으로 나타났다(Fig. 4-6). Glass-ceramics의 강도는  $90 \pm 0.5$  MPa로 나타나 1200°C에서 소결한 복합체의 강도보다 10 MPa정도 증가한 것으로 나타나 강도면에서 볼 때 골격 생체대용 재료로서 가장 가능성을 보이는 결과를 보이고 있다(Fig. 4-7). 따라서 강도증진 면에서 glass-ceramics이 가장 효과적인 것으로 나타났으며, 또한 이는 소결온도까지의 승온속도와 성형압력 등과 같은 제조방법에 따른 물성변화의 고찰에 관한 연구가 향후 연구과제로서 남아 있다.

복합체들은 소결온도에 따른 강도변화가 관찰되었기 때문에 이는 동일한 조성에서도 소결온도에 따른 미세조직의 변화에 따라 강도가 변화함을 의미하는 것으로 볼 수 있어 이를 미세구조를 통해 고찰하고자 하였다. 이는 소결온도에 따른 강도의 변화는 미세구조의 조직 의존성이 있는 것으로 나타났다.

복합체 제조의 소결온도에 따른 미세구조 변화 양상을 살펴보면 저온에서는 치밀화의 초기단계가 진행되는 것과 같은 형상(Fig. 4-8(a))과 다소의 기공은 있으나 매우 치밀하며, 작은 결정상이 조대한 입체사이에 존재하는 형태의 미세구조 조직을 보이고 있다. 1200°C의 미세구조를 관찰한 경우 입자의 크기가 약  $1 \mu\text{m}$ 인 작은 결정들이 발달한 형태를 보였다(Fig. 4-8(b)). 한편 1300°C의 소결체는 유리질과 같은 모재(matrix) 속에 작은 석출상들이 혼재하는 형태의 미세조직을 나타내고 있다(Fig. 4-8(c)). 일반적으로 과도한 입체성장이 일어난 경우 일반적으로 강도는 감소한다고 알려져 있는데, 1300°C에서 소결한 복합체의 경우 900°C와

1200℃의 강도보다 감소한 것으로 나타났다. 복합체와 glass-ceramics 등의 결과들을 요약하여 Table 8-1에 나타내었다.

일반적으로 화학시약으로 합성한 hydroxyapatite는 인간의 치아와 뼈의 상과 유사하나, 어뼈와 같은 생물체로부터 추출한 hydroxyapatite는 P와 Ca의 주요 성분외에도 Mg, K, Zn, Na, Fe 등과 같은 미량의 미네랄을 함유하고 있어 화학시약으로 합성한 hydroxyapatite보다는 생체친화성이 우수한 것으로 추측되는 생체친화성의 장점이 있다. 그러나 화학약품으로 합성한 hydroxy-apatite는 생체내 존재하는 천연 hydroxyapatite에 비하여 생체내 적합성이 낮은 것으로 보고되고 있어 보다 생체친화성이 양호한 hydroxyapatite의 개발을 위하여 천연물에서 추출한 원료쪽으로 관심이 높아지고 있다. 제 1 장의 실험에서 보여준 바와 같이 참치뼈로부터 추출한 천연 hydroxyapatite는 그 화학적 특성으로 보아 hydroxyapatite를 합성하기 위한 화학시약 대체물질로의 사용이 가능할 것으로 판단되어 생체내 이용을 위한 적합성의 검토가 필요하게 되어, 생체반응성 및 안전성 여부를 검토하기 위하여 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 및 0 g/kg의 용량으로 랫드의 피하에 투여하여 급성피하독성(식품의약품안전본부, 고시 제 96-8호, 1996, 4. 16) 여부를 관찰하였다.

시험물질을 랫드에 피하투여시, 암·수 각각에서 투여할 수 있는 최고용량인 체중 kg 당 5,000mg(5,000 mg/kg B.W.)의 용량에서도 사망예는 전혀 관찰되지 않아 LD<sub>50</sub>치의 산정은 없었다. 사망률의 경우 시험 전기간을 통하여 피하투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서 사망예는 전혀 관찰되지 않았다(Table 6-3). 또한 시험 전기간을 통하여 피하투여에 있어 랫드 암·수 모두에서, 본 시험물질에 의한다고 생각되는 특이한 임상증상은 전혀 관찰되지 않았고, 시험 전기간을 통하여 피하투여에 있어 랫드의 암·수 모두에서, 각 군간에 유의성 있는 체중 차이를 관찰한것으로 체중차이는 관찰(Table 6-4)되지 않았다.

햄스타 협낭에 시료를 주입한 후 봉합시켜 14일간 유지하여 육안 및 조직학적

Table 8-1. The properties and methods of synthesis used to make the bio-materials in this study

Method of Process	Name	Materials	Treatment Conditions	Sintering Temp.	Bending Strength (MPa)	Crystalline Phases
Solid-state Reaction	HW1	Hydroxyapatite+ Wollastonite	Pressure;200Mpa Heating rate;300°C/hr	1250 °C, 1300 °C, 1350 °C/3hr	18MPa	Hydroxyapatite + $\alpha$ -wollastonite
composite	C1	Hydroxyapatite + Wollastonite + Bioglass*	Pressure;200Mpa Heating rate;217°C/hr 35:35:30(wt%),bioglass melting; 1450 °C	900 °C/3hr, 1200 °C/3hr, 1300 °C/3hr.	54MPa 60MPa 54MPa	Hydroxyapatite + $\alpha$ -wollastonite + TCP
composite	C2	Hydroxyapatite+ Wollastonite + Bioglass*	Pressure; 200MPa Heating rate;60°C/hr 35:35:30(wt%),bioglass melting; 1450 °C	1300 °C/3hr.	30MPa	Hydroxyapatite + $\alpha$ -wollastonite + TCP
Glass-ceramic	B-G	CaO-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -CaF <sub>2</sub> - SiO <sub>2</sub> -MgO glass	Pressure; 200MPa	1200 °C/3hr.	91Mpa	$\alpha$ -Wollastonite + $\beta$ -TCP + Fluoroapatite

\* CaO-SiO<sub>2</sub> Glass

변화를 살펴보았다. 따라서 제 7장에서는 치과용 재료로서 적용이 기대되는 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite에 대한 안전성 평가의 시험방법 일환으로 구강 점막자극 시험을 실시하였다.

Hydroxyapatite 분말처치군 및 대조군에서 실험기간에 걸쳐 봉합에 따른 증상을 관찰한 사진(Fig. 7-1)으로서, 시료 투입에따른 생세포의 거부반응 등과 hydroxyapatite 분말 투여에 의한 임상증상의 특이한 반응의 변화는 관찰되지 않았다. 또한 hydroxyapatite 분말을 처치한 군의 체중은 대조군에 비해 실험기간 모두에 걸쳐 유의적인 변화가 나타나지 않는 것으로 나타났다. 14일 후의 구강 점막은 육안적으로 볼 때 발적 및 부종형성 등의 특별한 병변은 관찰할 수 없었다. 병리조직학적 검사에서는 궤양형성(ulceration), acanthosis, hyperkeratosis, hyperkeratonization, 공포형성(vesicle formation), 염증세포 침윤, 출혈, 혈관 확장 등을 살펴보았으나, 대조군 및 hydroxyapatite분말 처치군 모두에서 병리 조직학적 이상을 관찰할 수 없었다(Fig. 7-2와 Fig. 7-3). 다만 처치군 및 대조군에서 봉합에 의해 점막이 천공된 부위에서는 점막의 손상, 점막밑조직 및 근육층에 걸쳐서 광범위한 염증세포의 침윤이 관찰되었다(Fig. 7-4).

참치뼈로부터 추출한 hydroxyapatite는 햄스타의 구강점막을 이용하여 시료를 14일간 자극이 가해지도록 봉합하여 대조군과 비교한 결과, 시료 처치군 및 대조군 모두 봉합 및 처치에 의한 일반증상의 변화가 없었으며 구강점막에서도 시료투여로 인한 특이한 변화는 없어서 hydroxyapatite는 생체내에서 부작용이 없는 안전한 제제로 인체에 부작용이 없는 것으로 사료된다. 또한 분말시료의 이식후 햄스터의 체중변화를 측정했으므로 전 시험구간에 걸쳐 급격한 체중변화는 일어나지 않는 것으로 나타났다(Table 7-1).

향후의 연구과제로서는 참치뼈에서 추출한 물질로 합성한 복합체와 glass-ceramics 등의 강도 개선 및 신체골격 이식재료로 적용하여 생체친화성 등과 같은 안정성 평가의 문제가 해결과제로 남아있어 이에 대한 연구가 진행되어 질 것이다.

## 제 9 장 종합 요약

수산가공 공정에서 어육을 채취한 후 폐기되는 참치뼈와 같은 생물학적인 재료를 고부가가치의 아파타이드계 재료로 만들기 위하여, 이를 회화시킨 후 이들의 고유물성과 고찰과 hydroxyapatite에 wollastonite를 무게비로 변화시킨 조성을 고상반응법으로 소결한 소결체로부터 얻어진 결론 및 hydroxyapatite에 wollastonite와 A-W glass-ceramics의 기본 유리조성에 해당하는 CaO-SiO<sub>2</sub>계의 유리 및 생체조직과 반응하여 표면에 아파타이트를 생성한다고 알려진 CaO-SiO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-CaF<sub>2</sub>계의 유리를 첨가하여 합성한 복합체 및 glass-ceramics의 특성을 고찰하였다.

또한 참치로부터 추출한 hydroxyapatite분말의 랫드에 대한급성피하 독성을 조사하기 위하여, hydroxyapatite 분말을 생리식염수에 현탁시켜, 암·수 각각 투여할 수 있는 최고용량인 랫드 체중 kg 당 5,000 mg(5,000 mg/kg B.W.)의 용량으로 23G 주사기를 이용하여 피하내에 1회 투여한 후 14일간 관찰한 결과 및 hydroxyapatite분말의 치과용 재료로서의 안전성 평가를 위하여 구강점막자극 시험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 회화 후 추출한 물질의 X-ray 분석 결과 결정상은 회화온도에 관계없이 hydroxyapatite(Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>)상이었다.
2. 온도변화에 따른 입자의 변화양상을 SEM으로 추적한 결과, 온도에 따른 입자 형상의 변화는 나타나지 않았다. 그러나 회화온도가 높아 질 수록 입자간의 재응집과 소결의 진행과정에서 나타나는 입자간의 neck에 인해서 입자크기 분포 역시 증가하는 경향을 나타내었다.

3. 참치뼈로부터 추출된 아파타이트는 생체재료로서 이용가능한 것으로 나타났다. 그러나 glass-ceramics 등과 같은 바이오 세라믹 조성식에서 생물체에서 추출한 아파타이트로 화학시약의 치환 역시 가능한 것으로 나타났다.
4. Hydroxyapatite에 wollastonite가 첨가된 경우, X-ray 관찰에서 결정상은 hydroxyapatite이고 wollastonite가 부결정상인 A-W glass-ceramics와 유사한 결정상으로 관찰되었으나, 아파타이트의 함량이 증가하고 고온으로 갈수록 whitlockite상의 피크가 관찰되었다.
5. 소결온도에 따른 소결체의 미세구조는 소결온도에 관계없이 다량의 기공이 존재하는 형태를 보였다. 1250°C인 경우 미세한 입자들과 많은 기공들이 관찰되어 소결의 진행정도가 낮으며, 1300°C에서는 기공은 다소 남아있으나 입자의 크기는 증가하여 소결이 상당히 진행된 미세구조를 나타내었다.
6. 소결성 향상과 기계적인 강도 증진을 위한 wollastonite 첨가는 효과적이었으나, 이의 첨가만으로 인체 골격에 근접하는 강도를 발현할 수 없었다. 소결성이 가장 우수한 1300°C 소결시편의 강도는  $17.91 \pm 0.19$  MPa로 나타나 해면골(cancellous bone)의 강도인 10-20 MPa와 유사한 것으로 나타났다.
7. XRD 관찰에서 나타난 복합체들의 결정상들은 첨가되는 바이오 글래스의 종류에 관계 없이 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와 tricalcium phosphate( $\beta$ -TCP)로 나타났다. 그러나 Glass-ceramics의 경우 pseudowollastonite( $\alpha$ -CaSiO<sub>3</sub>)와  $\beta$ -TCP 외에 출발물질에 포함된 CaF<sub>2</sub>에 의한 fluoroapatite상이 관찰되었다.

8. CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계의 유리와 wollastonite 및 hydroxyapatite가 첨가된 복합체의 미세구조 변화 양상은 900℃에서 매우 치밀하며, 유리질과 같은 모재(matrix)에 석출된 결정상이 혼재하는 형태로 나타났다. 반면에 1200℃에서는 바 형태의 결정상들이 발달된 형태를 보였다. 그러나 소결온도가 1300℃로 증가하면 모재의 입자크기가 증가하는 미세조직 구조로 전이되는 형태의 조직을 보였다. 한편 CaO-SiO<sub>2</sub>계 유리가 첨가된 복합체의 미세구조는 유리질과 같은 모재(matrix)에 석출된 결정상이 혼재하는 형태를 나타내었다.
9. 강도 증진면에서 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계 유리첨가가 CaO-SiO<sub>2</sub> 계 유리 첨가가 보다 효과적인 것으로 나타났다.
10. 참치뼈에서 추출한 hydroxyapatite를 CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaF<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO계 유리의 출발 물질로 적용하여 제조한 glass-ceramics의 강도는 90±0.5 MPa로 나타나 복합체의 최대 강도보다 10 MPa정도 증가하여 강도 증진면에서 가장 효과적인 것으로 나타났다.
11. Hydroxyapatite분말의 랫드에 대한급성피하독성 조사한 결과, 모든 투여용량군의 일반적인 임상증상에서 아무런 이상이 발견되지 않았으며, 체중변화는 물론 전 생존 동물의 부검에서도 어떠한 이상도 관찰되지 않았다. LD<sub>50</sub>치는 랫드 암·수 모두에서 체중 kg 당 5,000mg이상이었다.
12. Hydroxyapatite의 안전성 평가에서 대조군과 비교한 결과 시료 처치군 및 대조군 모두 봉합 및 처치에 의한 일반증상의 변화가 없었으며 구강점막에서도 시료투여로 인한 특이한 변화가 나타나지 않아, 참치로부터 유래된 hydroxyapatite는 생체내에서 부작용이 없는 안전한 제제로 나타났다.