

이정원, 김수훈, 김윤지,
조은민, 강소영

적외선
분광 분석과
조직 분석을 통한
출토 인골의
보존 상태 평가

06»

적외선 분광 분석과 조직 분석을 통한 출토 인골의 보존 상태 평가

이정원, 김수훈, 김윤지, 조은민, 강소영*

국립문화재연구소 보존과학연구실



Conservation status assessment of archaeological bone from Fourier Transform Infrared Spectroscopy and histological Analysis

Jeongwon Lee, Sue Hoon Kim, Yun-Ji Kim, Eun Min Cho, Soyeong Kang*

*Conservation Science Division, National Research Institute of Cultural Heritage

*Corresponding Author : soyeong.kang@korea.kr

| 초록 |

뼈의 보존 상태를 화학적으로 평가하기 위하여 조선시대 인골 10점을 대상으로 감쇠전반사법을 활용한 적외선 분광분석(FTIR-ATR)을 실시하였다. FTIR-ATR 스펙트럼을 통해 결정화 지수(crystallinity index; CI), 탄산염간의 비(C/C), 탄산염과 인산염의 비(C/P)를 계산한 결과 CI는 4.25 ± 0.78 , C/C는 0.91 ± 0.04 , C/P는 0.19 ± 0.06 으로 확인되었다. 화학적 평가 결과 조직학 지수가 높을수록 CI와 C/P 값이 증가하며, C/C는 감소하는 것을 확인하였다. 반면 뼈에서 추출한 DNA 분석 가능 여부는 C/C가 낮고 C/P가 높을수록 분석이 가능 하였다. 이를 통해 FTIR을 이용한 화학적 평가와 조직 분석 결과가 출토 인골의 보존 상태를 종합적으로 파악하기 위한 기준으로 적용이 가능할 것으로 판단된다.

주제어 : 속성작용, 결정화 지수, 탄산염간의 비, 탄산염과 인산염의 비

| ABSTRACT |

Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR-ATR) was applied to chemical analysis for conservation status of 10 human bone remains from Joseon Dynasty. The result of crystallinity index (CI) is 4.25 ± 0.78 , carbonate to carbonate ratio (C/C) is 0.91 ± 0.04 and carbonate content (C/P) is 0.19 ± 0.06 . The higher histological index (HI) confirmed CI and C/P value was increased and C/C value was reduced. While C/C or C/P values analysis is possible. While DNA analysis can be extracted from the bone, C/C values are lower or C/P values are higher was found to the analysis is possible. Chemical assessment of FTIR and histological index consequence is expected to be applicable as a basis for comprehensive understanding of the conservation status excavated bones.

Keywords : diagenesis, crystallinity index, C/C, C/P

1. 서론

뼈의 속성작용(diagenesis)은 지역의 지질 및 지하수 등 매장 환경에 의해 뼈와 치아에 일어나는 물리적, 화학적 사후 변화 과정이다(Nielsen-Marsh and Hedges, 2000; Beasley et al., 2014). 뼈 광물질은 생존 시 생체 내 결정성장 저해제(crystal growth inhibitors)에 의해 결정화 정도가 조절되지만, 사후에 저해제가 제거되면 뼈 결정이 재결정화 되면서 크기가 증가한다. 뼈의 재결정화에 영향을 미치는 요인으로 콜라겐 분해, 탄산염 손실 및 불소 치환 등을 들 수 있다(Berna et al., 2004; Surovell and Stiner, 2001; Beasley et al., 2014). 이와 같이 매장 후 물리·화학적 으로 불안정한 뼈 광물질은 매장환경에 따라 화학적 성분 변화를 일으키는 한편 결정화학적 변화를 일으켜 뼈의 보존 상태를 변화시킨다.

뼈의 보존 상태는 미생물에 의한 열화, 온도, 습도, pH 등의 영향을 받는 것으

로 알려져 있다(Tütken and Vennemann, 2011; Beasley et al., 2014). 뼈의 주요 구성성분인 콜라겐과 수산화인회석(hydroxyapatite)의 분자 구조 변화를 통한 속성작용 정도는 보존 상태를 파악하기 위한 중요한 지표로 활용된다(Carden and Morris, 2000; King et al., 2011; Beasley et al., 2014). 뼈의 보존 상태를 평가하는 방법으로는 적외선 분광분석법(Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR)과 X선 회절분석(x-ray diffraction; XRD)을 이용한 결정화 정도 분석, 조직학 지수(histology index, HI)와 공극률(porosity) 분석을 통한 단면의 보존 상태 파악과 단백질 함량(protein content) 분석 등이 있다(Nielsen-Marsh and Hedges, 2000).

뼈는 골원(osteon), 골세포(osteocyte), 하버시안 관(Haversian canal)으로 이루어져있다. 골원은 하버시안 관, 박막층, 골소강으로 이루어진 뼈의 구성단위로 원주상의 형을 이루고 있다(Fig. 1). HI는 뼈 단면 조직의 보존 상태를 파악

하기 위하여 나타내는 지수로 골공동계 상태를 바탕으로 6단계(0~5)로 평가된다. HI 5는 거의 현대 뼈와 가까운 상태이고, 0은 골공동계의 구조가 대부분 무너져서 형태를 알아볼 수 없는 상태이다(Hedges et al., 1995).

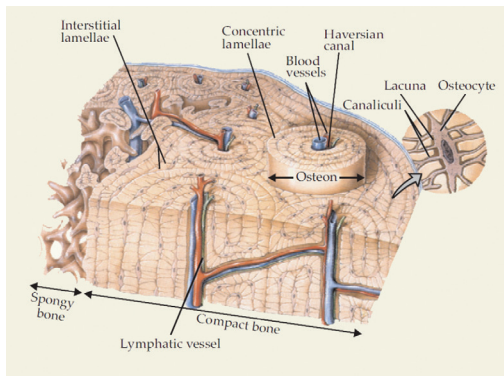


Fig. 1. Cross-sectional structure of the bone (Robert et al., 2009)

FTIR 분석은 분자 내 결합이 진동 시 흡수하는 특정 파장을 측정하는 방법으로 조작성이 쉽고 최소의 파괴 분석을 가능하게 한다(Beasley et al., 2014; Carden and Morris, 2000; Ferraro and Krishnan, 1990; Griffiths, 1983; Thompson et al., 2009). 이를 통해 결정화 지수(crystallinity index; CI), 탄산염(CO_3^{2-})과 탄산염 영역의 비율인 C/C와 탄산염과 인산염(PO_4^{3-})의 비율인 C/P를 분석 가능하다. CI는 분할계수(splitting factor; SF)라고도 불리며 뼈의 결정화 정도를 나타내는 지표로 쓰인다(Surovell and Stiner, 2001; Wright and Schwarcz, 1996; Beasley et al., 2014). CI는 특정 스펙

트럼 밴드의 비율을 측정함으로써 산출되고, 이 비율의 변화는 밴드의 기울기 변화로 표시한다. 즉, CI는 결정화도가 증가함에 따라 점차 분리되고 FTIR 스펙트럼의 지문 영역에서 2개의 밴드가 형성된다(Nielsen-Marsh and Hedges, 2000; Thompson et al., 2009). C/C는 뼈 시료에서 남아있는 탄산염 그룹 간의 높이비로 알 수 있으며, C/P는 뼈 시료에 남아있는 탄산염과 인산염의 높이 비를 통해 계산할 수 있다(Thompson et al., 2011).

본 연구에서는 유적지에서 출토된 인골을 대상으로 적외선 분광분석(FTIR)과 조직학 분석(HI)을 실시하여 뼈의 화학적 상태와 형태학적 상태를 분석하였으며 분석 결과 간 상관관계를 비교하였다. 또한 DNA 분석 결과와 화학적·조직학적 분석 결과와의 비교를 통해 뼈의 보존 상태를 종합적으로 파악하기 위한 기준으로 적용이 가능한지 여부 판단하였다.

2. 재료 및 방법

1) 분석 대상

2012년 6월 18일부터 2013년 2월 28일까지 서경문화재연구원에서 진행한 인천 매소홀로 도로개설공사 구간 발굴조사 과정에서 청동기시대 주거지와 수혈, 조선시대 주거지와 수혈 및 토광묘 등이 확인되었다(Table 1 & Fig. 2). 이 중 2지점과 3지점 내 조선시대 토광묘에서 출토된 인골을 본 연구에 활용하였다(Fig. 3).

Table 1. The information of excavated human skeletal remains

Sample name	Sample no.	Site area	Site name	Element
IM-1	KAB0351	2-2	1 site	Femur
IM-2	KAB0352		3-1 site	Femur
IM-3	KAB0353		3-2 site	Femur
IM-4	KAB0359	2-additional investigation	2 site	Femur
IM-5	KAB0360	2-1	1 site	Femur
IM-6	KAB0365	3-3-1	6 site	Femur
IM-7	KAB0367		12 site	Femur
IM-8	KAB0368		19 site	Piece
IM-9	KAB0369	3-3-2	1 site	Femur
IM-10	KAB0371		3 site	Femur

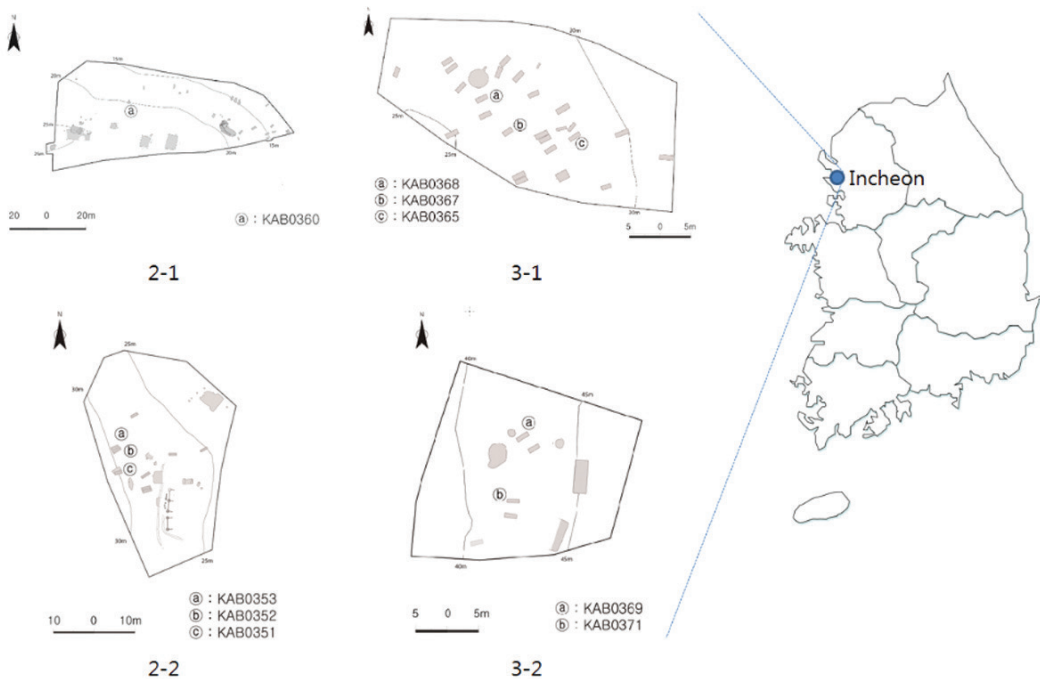


Fig. 2. The map of the site that was located in the middle western part of Korea



Fig. 3. Sample Photos of human skeletal remains from Incheon

2) 전처리 과정

분석을 위한 인골 시료는 치과용 핸드피스를 이용하여 2×5cm 크기로 절단하였다. 표면의 토양과 DNA 오염물질을 제거하기 위해 인골 표면을 1mm 정도 제거하였다. 오염물이 제거된 시편은 극저온동결분쇄기(Freezer Mill 6770, SPEX)를 이용하여 분말 형태로 만든 후 실험 전까지 -20℃에서 보관하였다.

DNA 분석용 시료는 6% sodium hypochlorite(차아염소산나트륨) 처리와 삼차 증류수 세척 및 건조, 자외선 조사를 한 후 극저온동결분쇄기(Freezer Mill 6770, SPEX)를 이용하여 분말 형태로 만들어 보관하였다.

3) 조직학적 분석

뼈 조직의 보존 상태를 파악하기 위하여 분석 시료 중앙의 수직 단면을 부채꼴(약 5-7mm) 모양으로 절단하여 예폭 시수지로 고착시켰으며, 표면을 연마한 후 실체현미경(Axiotech 100HD, Carl Zeiss)을 이용하여 뼈의 단면 조직 관찰

하였다. 뼈 조직의 보존 상태는 Hedges 등(1995)이 제시한 6단계(0~5)의 조직학 지수를 평가 기준으로 적용하였다(Table 2).

4) 적외선 분광분석(FTIR)

뼈의 결정화도 분석을 위하여 감쇠전반사법(attenuated total reflection; ATR)을 이용한 적외선 분광분석을 실시하였다. FTIR-ATR 분석은 적외선 분광분석기(Nicolet iS5, Thermo Fisher Scientific)를 이용하였으며 다이아몬드 크리스탈 조건에서 분석 범위(range)는 4000~520cm⁻¹, 분리능(resolution)은 4cm⁻¹, 스캔 횟수(scans)는 16회이다. 분석은 각 시료별로 2회 반복하였다.

① 결정화 지수(CI)

뼈 광물질의 결정화 정도가 커질수록 605cm⁻¹, 565cm⁻¹의 흡수 밴드가 커지면서 각각의 밴드로 분리된다(Weiner and Bar-Yosef, 1990; Stiner et al., 1995; Thompson et al., 2009). 현대 뼈의 CI는 2.50~3.25 정도로 CI가 낮을

Table 2. Histological Index values assigned to summarize the degree of diagenetic change(Hedges et al., 1995)

Index	Approx. % of intact bone	Description
0	< 5	No original features identifiable, other than Haversian canals
1	< 15	Small areas of well preserved bone present, or some lamellar structure preserved by pattern of destructive foci
2	< 33	Clear lamellate structure preserved between destructive foci
3	> 67	Clear preservation of some osteocyte lacunae
4	> 85	Only minor amounts of destructive foci, otherwise generally well preserved
5	> 95	Very well preserved, virtually indistinguishable from fresh bone

수록 현대 뼈와 비슷한 양상을 가지며 높을수록 보존 상태가 좋지 않다(Beasley et al., 2014). CI는 $495\text{--}750\text{cm}^{-1}$ 사이에 기준선을 그리고 605cm^{-1} 과 565cm^{-1} 의 높이를 측정 한 후 그 사이에 가장 낮은 지점(590cm^{-1})의 값을 측정하여 분리 정도를 확인하였다(Fig. 4) (Weiner and Bar-Yosef, 1990).

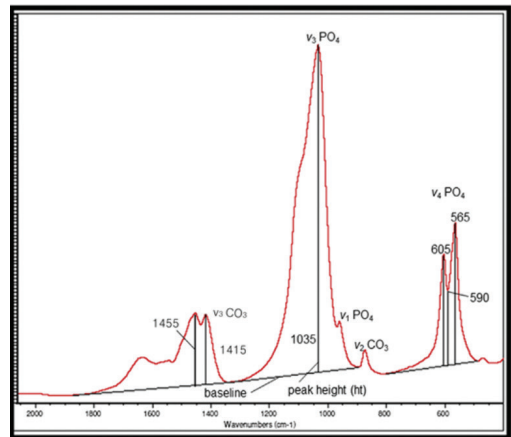
② 탄산염간의 비(C/C)

C/C는 탄산염 그룹간의 비율로 뼈에 존재하는 유기질이 무기질로 바뀌는 비율을 파악할 수 있다. 탄산염 밴드는 콜라겐에 포함된 아미드기(amide group)에 의한 것으로 C/C는 기준선을 중심으로 1455cm^{-1} 과 1415cm^{-1} 의 탄산염 밴드의 높이 비를 통해 계산 할 수 있다 (Thompson et al., 2011).

③ 탄산염과 인산염의 비(C/P)

C/P는 탄산염 그룹과 인산염 그룹의 비율로 전체 탄산염 함량과 밀접한

연관성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Nielsen-Marsh and Hedges, 2000). 현대 뼈의 C/P는 $0.23\text{--}0.34$ 로 알려져 있으며(Beasley et al., 2014), 기준선을 중심으로 탄산염 밴드(1415cm^{-1})와 인산



$$CI \text{ or } SF = \frac{A_{605} + A_{565}}{A_{590}} \quad C/C = \frac{A_{1455}}{A_{1415}} \quad C/P = \frac{A_{1415}}{A_{1035}}$$

Fig. 4. Phosphate and carbonate vibrational modes of bone apatite infrared spectra. Band peak heights and baselines are drawn for calculating CI, C/C and C/P (Beasley et al., 2014).

염 밴드(1035cm^{-1})의 높이 비를 통해 계산할 수 있다(Thompson et al., 2009).

5) DNA 분석

뼈 분말 시료 약 500mg을 15ml 튜브에 넣은 후 lysis buffer(2mg proteinase K, 10% SDS, 0.5M EDTA pH 8.0) 10ml를 첨가하였다. 48시간 동안 상온에서 교반하여 탈칼슘화(decalcification)반응을 유도한 후 상층액을 분리하였으며 5배 부피의 PB buffer를 첨가하였다. 혼합액은 spin column을 통과하여 걸러졌으며, column 내 washing을 위해 500ml PE buffer를 2회 주입하였다. 원심분리를 통해 PB buffer를 제거한 후 삼차중류수를 넣고 최종적으로 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 실험 전까지 -40°C 에서 보관하였다. 미토콘드리아 DNA의 과변이부위(HVR1, HVR2)와 아밀로제닌 유전자의 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)의 조건과 시발자(primer)는 지상현 등(2008)과 동일하게 수행하였다. 증폭

된 DNA 산물은 자동화전기영동장치(HDA-GT12, eGENE)로 증폭 여부를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 조직학적 분석을 통한 보존상태 평가

인골의 보존 상태를 평가하기 위하여 시료의 표면을 연마한 후 실체 현미경으로 관찰하였다(Fig. 5). 조직의 보존 상태 여부는 Table 2에서 제시한 조직학 지수 판별 기준에 근거하여 판단하였다.

IM-1은 부분적으로 손상된 부위가 있지만 전체적인 구조가 잘 보존되어 있으므로 HI 4로 평가하였으며, IM-2와 IM-10은 부분적으로 골원이 손상된 부분이 있으나 골세포는 손상이 거의 없으므로 HI 3으로 평가하였다. IM-3, IM-4, IM-6, IM-9는 전체적으로 손상된 골원이 관찰되었고 골층판은 많은 손상이 보이지 않으므로 HI 2로 평가하였다. IM-7과 IM-8은 전체적으로 손상

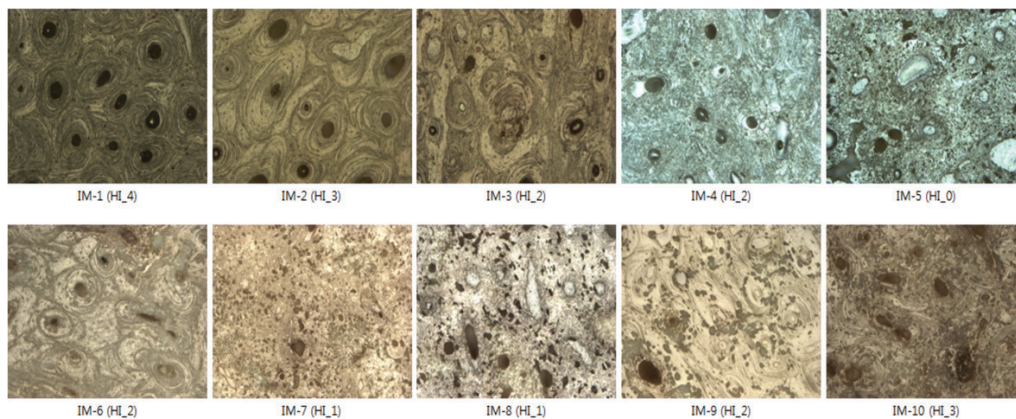


Fig. 5. Histological pictures of archeological bone samples

된 골원이 관찰되었으며 골층판 역시 많은 손상을 보이므로 HI 1로 평가하였으며, IM-5는 하버시안 관을 제외한 나머지 부분은 거의 붕괴된 상태이므로 HI 0으로 평가하였다.

2) 뼈 결정화도 분석을 통한 보존 상태 평가

FTIR-ATR을 이용하여 인골 분말 시료를 분석한 결과는 Fig. 6 과 같다. FTIR-ATR 스펙트라를 바탕으로 인골의 CI를 계산한 결과 HI 4 시료의 CI는 3.45 ± 0.03 (n=1), HI 3 시료는 3.31 ± 0.35 (n=2), HI 2 시료는 4.68 ± 0.60 (n=4), HI 1 시료는 4.25 ± 0.59 (n=2), HI 0 시료의 CI는 5.18 ± 0.10 (n=1)이다(Fig. 7a). 현대 뼈의 CI를 2.50~3.25로 기준하였을 때, IM-3, IM-7 시료를 제외하고는 HI가 낮을수록 CI가 증가하는 양상을 보였다.

C/C의 경우 HI 4 시료에서 0.91 ± 0.00 (n=1), HI 3 시료는 0.87 ± 0.01 (n=2), HI 2 시료는 0.90 ± 0.03 (n=4), HI 1 시료는 0.93 ± 0.02 (n=2), HI 0 시료는 0.99 ± 0.02 (n=1)이며, HI 4인 시료를 제외하고는 HI가 낮아질수록 C/C가 증가하며 1에 가까운 값을 보였다(Fig. 7b).

C/P의 경우 HI 4 시료는 0.26 ± 0.02 (n=1), HI 3 시료는 0.24 ± 0.06 (n=2), HI 2 시료는 0.19 ± 0.06 (n=4), HI 1 시료는 0.13 ± 0.03 (n=2), HI 0 시료는 0.11 ± 0.01 (n=1)이며 HI가 높을수록 C/P 값이 증가하는 양상이 나타났다(Fig. 7c). C/P는 뼈에 포함되어 있는 수산화인회석의 양에 의해 영향을 받으며 C/P 값이 클수록 뼈의 보존 상태가 양호한 것을 확인할 수 있었다.

Table 3. Summary of the evaluation results from FTIR(CI, C/C, C/P), HI and DNA analysis

Sample name	HI	FTIR-ATR analysis			DNA analysis	
		CI	C/C	C/P	mtDNA	Sex
IM-1	4	3.45 ± 0.04	0.91 ± 0.00	0.26 ± 0.02	○	F
IM-2	3	3.07 ± 0.07	0.87 ± 0.00	0.28 ± 0.01	○	×
IM-3	2	5.51 ± 0.20	0.88 ± 0.00	0.25 ± 0.00	○	×
IM-4	2	4.63 ± 0.10	0.91 ± 0.01	0.15 ± 0.00	○	F
IM-5	0	5.18 ± 0.10	0.99 ± 0.02	0.11 ± 0.01	×	×
IM-6	2	4.48 ± 0.13	0.94 ± 0.01	0.12 ± 0.02	×	×
IM-7	1	3.83 ± 0.16	0.92 ± 0.01	0.16 ± 0.02	○	M
IM-8	1	4.67 ± 1.27	0.94 ± 0.02	0.11 ± 0.01	×	×
IM-9	2	4.10 ± 0.30	0.87 ± 0.00	0.23 ± 0.00	○	×
IM-10	3	3.56 ± 0.13	0.86 ± 0.01	0.20 ± 0.00	○	×

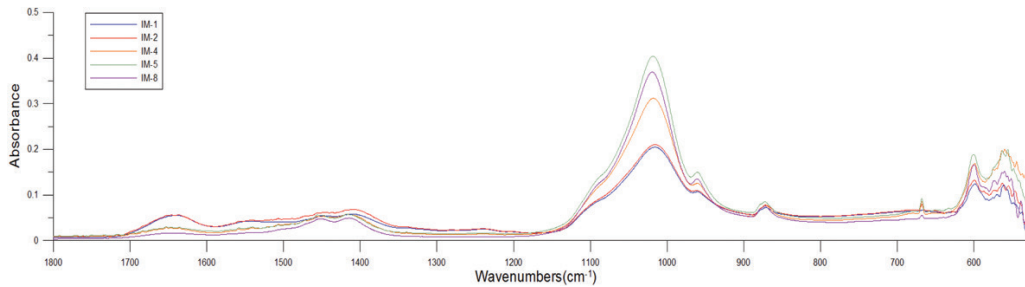


Fig. 6. Comparison of bones spectra produced from FTIR-ATR (1800~520cm⁻¹)

3) DNA 분석을 통한 보존 상태 평가

아밀로제닌 유전자 분석을 통한 성별 판별 여부와 미토콘드리아 DNA 분석 가능 여부를 화학적·조직학적 분석 결과와 비교하였다. 미토콘드리아 DNA 분석 결과, CI 4.0 미만(n=4)의 시료는 모두 분석이 가능했지만 4.0 이상(n=6)인 시료는 부분적으로 분석이 가능했다. C/C는 0.92 이하의 값을 가지는 시료(n=7)의 분석이 가능했고, C/P는 0.15 이상의 값을 가지는 시료(n=7)의 분석이 가

능했다. 이를 바탕으로 미토콘드리아 DNA 분석 가능 여부와 CI, HI의 연관성은 적었지만 C/C, C/P의 연관성이 높음을 알 수 있다. 그러나 아밀로제닌 유전자 분석 여부는 화학적 평가 결과와 비교했을 때 경향성이 나타나지 않았다.

4. 결론

조선시대 인골 10개체를 대상으로 HI와 FTIR-ATR 분석을 통해 보존 상태

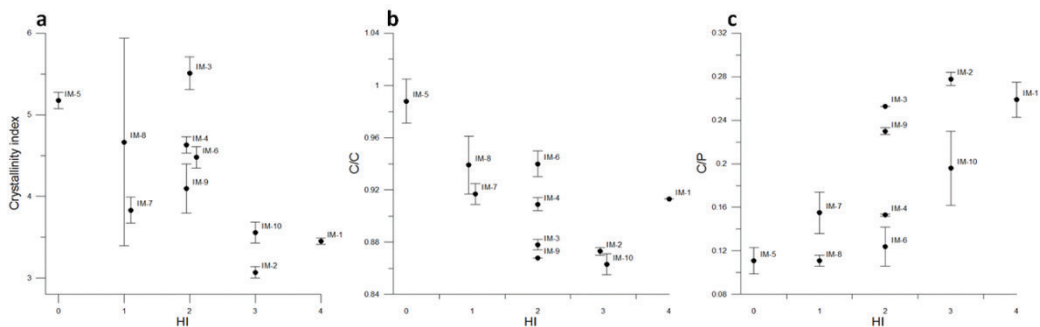


Fig. 7. Degree of crystallization of the sample patterns. (a) The relationship between CI and HI (b) The relationship between C/C ratio and HI (c) The relationship between C/P ratio and HI (Error bars represent on standard deviation)

를 확인한 결과, HI에 따라 뼈 무기질의 CI, C/C, C/P가 변화하는 양상이 나타났다. 또한 C/C, C/P 분석 결과와 미토콘드리아 DNA 분석 여부가 연관성이 있음을 확인하였다. 이는 형태학적 분석과 화학적 분석 방법의 상관관계가 밀접함을 나타내며, 보존 상태 파악을 통해 DNA 분석의 유추가 가능함을 알 수 있다. 이를 바탕으로 유적지에서 출토되는 인골의 보존 상태를 파악하여 후속연구를 진행하는 자료로 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구에 활용된 인골은 서경문화재 연구원에서 제공하였으며, 문화재청 국립문화재연구소 문화유산융복합연구(R&D)의 지원으로 수행되었다.

참고문헌

- 지상현, 김윤지, 정용재, 서민석, 박양진, 2008, 아산 명암리 출토 인골의 고유전학적 연구, 보존과학회지 23, pp.81-93.
- Berna, F., Matthews, A., Weiner, S., 2004, Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallisation window, Journal of archaeological science 31(7), pp.867-882.
- Carden, A. and Morris, M., 2000, Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues(review), Journal of Biomedical Optics 5(3), pp.259-268.
- Ferraro, J. and Krishnan, K.(Eds), 1990, Practical Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Industrial and Laboratory Chemical Analysis, Academic Press, San Diego California.
- Griffithes, P., 1983, Fourier transform infrared spectrometry, Science 222, pp.297-302.
- King, C.L., Tayles, N., Gordon, K., 2011, Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite, Journal of archaeological science 38(9), pp. 2222-2230.
- Nielsen-Marsh, C.M. and Hedges, R.E.M., 2000, Patterns of diagenesis in bone II: effects of acetic acid treatment and the removal of diagenetic CO_3^{2-} . Journal of archaeological science 27(12), pp.1151-1159.
- Hedges, R.E.M., Millard, A.R., Pike, A.W.G., 1995, Measurements and Relationships of Diagenetic Alteration of Bone from Three Archaeological Sites, Journal of archaeological science 22(2), pp.201-209.
- Robert, O.R., Buehler, M.J., Hansma, P., 2009, Plasticity and toughness in bone, Physics Today,

- pp.41-46.
- Stiner, M.C., Kuhn, S.L., Weiner, S., Bar-Yosef, O., 1995, Differential burning, recrystallization, and fragmentation of archaeological bone, *Journal of Archaeological Science* 22(2), pp.223-237.
 - Surovell, T.A. and Stiner, M.C., 2001, Standardizing Infra-red Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach, *Journal of archaeological science* 28(6) pp.633-642.
 - Thompson, T.J.U., Gauthier, M., Islam, M., 2009, The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone, *Journal of archaeological science* 36(3), pp.910-914.
 - Thompson, T.J.U., Islam, M., Piduru, K., Marcel, A., 2011, An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier Transform Infrared Spectroscopy on unaltered and burned bone, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 299, pp.168-174.
 - Tütken, T. and Vennemann, T.W., 2011, Fossil bones and teeth: preservation or alteration of biogenic compositions?, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 310, pp.1-8.
 - Weiner, S. and Bar-Yosef, O., 1990, State of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: a survey, *Journal of archaeological science* 17(2), pp.187-196.
 - Wright, L.E. and Schwarcz, H.P., 1996, Infrared and isotopic evidence for diagenesis of bone apatite at Dos Pilas, Guatemala: palaeodietary implications, *Journal of archaeological science* 23(6), pp.933-944.