

## 백금 코팅된 티타니아 나노튜브의 확산반사 특성분석 및 레이저 매개 항균효과

문경숙, 배지명, 오승한\*

원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실 및 생체재료매식연구소

### Diffuse reflection characterization and visible light mediated antibacterial effect of Pt-TiO<sub>2</sub> nanotubes

*Kyung-Suk Moon, Ji-Myung Bae, Seunghan Oh\**

*Department of Dental Biomaterials and the Institute of Biomaterials and Implant,  
Wonkwang University College of Dentistry, Iksan, Republic of Korea*

The purpose of this study was to fabricate platinum (Pt), one of the plasmonic nanoparticles that induces localized surface plasmon resonance (LSPR) effects caused by the pairing of plasmon with the electric field of visible-near infrared light, coated 100 nm titania (Pt-TiO<sub>2</sub>) nanotubes to evaluate the surface properties and laser mediated antibacterial effects. From the analysis of UV-VIS-NIR spectrum, the light absorptions of Pt-TiO<sub>2</sub> nanotubes were detected at wavelengths 399–429 nm, 527–579 nm, and 806–906 nm, respectively, and one of the detected wavelengths was suitable for the laser used in this study (OCLA, Wavelength: 405). From the observation of FE-SEM, as the platinum coating time increased, the inner diameter of the Pt-TiO<sub>2</sub> nanotubes decreased from 68.8 nm to 48.8 nm, and the shape of the platinum nanoparticles coated on the top layer of the titania nanotubes changed from spherical to rod. From the results of contact angle measurement, the contact angle of water increased from 11.94° to 19.84° as the platinum coating time increased from 1 minute to 3 minutes. The *Staphylococcus aureus* antibacterial test resulted that 98% or more bacterial reduction of all Pt-TiO<sub>2</sub> nanotube groups were observed after laser irradiation (P<0.05). Live-dead assay and MTT assay indicated that laser irradiation did not affect cell death. Therefore, Pt-TiO<sub>2</sub> nanotube exhibiting a local surface plasmon resonance effect is expected to have many potentials for semi-permanent antimicrobial implant surface treatment without antibacterial drugs.

**Key words** : Platinum, Titania nanotube, Laser, Antibacterial effect

Kyung-Suk Moon (ORCID: 0000-0001-6534-3045)

Ji-Myung Bae (ORCID: 0000-0002-8607-8604)

\*Correspondence: Seunghan Oh (ORCID: 0000-0002-7250-721X)

460 Iksan-Daero, Iksan, Jeonbuk 54538, Republic of Korea

Department of Dental Biomaterials and the Institute of Biomaterials  
and Implant, Wonkwang University College of Dentistry, Iksan, Republic  
of Korea

Tel: +82-63-850-6982, Fax: +82-63-857-6982

E-mail: shoh@wku.ac.kr

Received: Apr. 10, 2020; Revised: Jun. 05, 2020; Accepted: Jun. 08, 2020

## 서 론

현재 미생물은 강력하고 다양한 항생제에 대한 내성 증가로 인해, 인체에 무해 하면서 병원성 미생물에는 독성이 있는 대체 치료제가 요구되고 있으며, 최근에 미생물에 대한 나노입자 기반 치료제에 초점을 맞춘 백금(Pt), 은(Ag), 금(Au) 등 금속성 나노입자의 항균 작용은 중요한 역할을 한다고 보고되었다(1). 특히, 금속 플라즈몬 나노입자의 국소적 표면 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 효과에 의한 항균작용이 대두되고 있는데, 표면 플라즈몬(SP)은 외부 자극에 의해 금속과 유전체 표면에서 발생하는 전자들의 집단적 적층이 발생한다(2-4). 이러한 성질에 의해 금속 나노입자 표면에 빛이 조사되면 금속 표면의 플라즈몬(SP)이 특정 파장의 빛을 반사하거나 흡수하는 공명 현상이 나타난다. 이를 표면 플라즈몬 공명(SPR)이라고 하고, 표면에서의 전자기장 세기는 증폭하게 되고 표면에 발생하는 전기적 적층에 의하여 부착된 세균은 세포막의 불균형을 초래하고 호흡계와 같은 세포내 시스템 손실로 인해 세균 사멸이 발생하게 된다(5). 또한 금속 나노입자는 재질, 크기, 형태에 따라 파장이 달라지므로 이를 이용해 가시광선 및 근적외선 영역에서 원하는 파장의 국소 표면 플라즈몬 공명이 발생하도록 조절할 수 있다(6).

티타늄 임플란트 표면 위에 항균 약물을 물리적 흡착으로 도핑하는 방법은 초기대량방출의 문제점을 갖고 있고, 표면 처리법과 화학적 결합법으로 제조된 선택적 약물전달 기기는 티타니아( $\text{TiO}_2$ )의 광촉매 특성에 의하여 자외선에서만 가능하다는 단점을 가지고 있다. 최근 광촉매 효율을 높이기 위해 다른 금속 촉매 나노입자를 도핑 하여 자외선 영역뿐만 아니라 가시광선 영역에서도 효율이 우수한 광촉매를 합성하려는 시도들이 이루어지고 있다(7). 그 중 백금(Pt), 팔라듐(Pd)과 같은 나노 입자는 표면적이 넓고, 화학적 특성이 비슷하여 다양한 분야에 적용되고 있다. 특히 백금 나노입자는 자동차, 화학, 약물 전달, 광열 요법 등 나노기술 뿐 아니라 수많은 생의학 분야에서 사용된다(8-10). 금속 나노입자의 증착(deposition)은 이온 주입(ion-implantation), 이온 보조 스퍼터링(ion-assisted sputtering), 플라즈마 조사(plasma irradiation), 화학 기상 증착(Chemical vapor deposition, CVD) 및 졸-겔(sol-gel) 등 많은 방법들이 제안되

고 있다. 그 중 스퍼터링(sputtering)은 환경 친화적이고 매우 안정적으로 알려진 물리적 방법으로 높은 증착률, 대량 생산, 박막 두께 조절, 기관과의 거리, 기관 온도, 스퍼터링(sputtering) 시간에 의해 조절될 수 있는 장점이 있다(11-14).

본 실험에서는 티타니아( $\text{TiO}_2$ ) 나노튜브에 백금 나노입자를 증착하여 국소적 표면 플라즈몬 공명(LSPR) 효과를 발휘할 수 있는 가시광선 영역의 광학적 특성을 평가하고 405 nm 레이저 광 조사를 이용한 항균 효과 및 생체적합성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 백금-티타니아 나노튜브(Pt- $\text{TiO}_2$ Nanotubes)의 시편 제작

두께 250  $\mu\text{m}$ 의 티타늄 판( $5 \times 5 \text{ cm}^2$ , 99.5%; Hyundai Titanium Co., South Korea)을 아세톤, 에탄올 및 증류수의 순서로 세척한 후, 티타늄 판을 0.5 wt% 불산(purity: 48%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 전해질 용액으로 하여 20 V, 30분 동안 양극산화 시켰다. 양극산화 완료 후, 시편을 증류수에 세척하고, 60 $^\circ\text{C}$  오븐에서 24시간 건조한 후, 400 $^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 열처리를 하여 100 nm  $\text{TiO}_2$  나노튜브를 제작하였다(공기 중 열처리, 승온 및 냉각속도 = 1 K/min). 열처리된  $\text{TiO}_2$  나노튜브 표면에 백금 나노입자의 물리적 증착을 위해 ion sputter (E-1045, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하였고, Target은 99.999% 순도를 가지는 백금(Pt) Target (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, sputter의 증착조건은 진공도 6.0 Pa, 전류 10 mA, 시간은 1~3분 동안 Pt- $\text{TiO}_2$  나노튜브 시편을 제작하였다.

### 2. 표면특성분석

백금 나노입자의 흡수 파장을 알기 위하여 확산 반사 자외선-가시광선-근적외선 분광광도계(Diffuse reflectance UV-VIS-NIR spectrophotometer: Solidspec-3700, Shimadze co., Kyoto, Japan)를 사용하였고,  $\text{TiO}_2$  나노튜브 위에 증착

된 백금 나노입자의 미세구조 및 형태는 전계방사 주사전자 현미경(Field emission scanning electron microscope, FE-SEM, JSM-6360, Jeol Ltd., Tokyo, Japan)으로 관찰하였고, 화학 조성은 에너지 분산형 X-선 분광기(Energy dispersive x-ray spectrometer (EDX); oxford instruments analytical 7582, high wycombe, UK)로 분석하였다.

### 3. 친수성 평가

친수성 평가는 각 시편의 접촉각을 Optical Tensiometer (Attension-biolin scientific Co, Stockholm, Sweden)를 이용하여 측정하였고, TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군과 1~3분 증착된 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 실험군을 시편으로 이용하였고, 증류수 (J. T. Baker Chemical Inc, Phillipsburg, NJ, USA)를 시험 용액으로 하였다. 접촉각의 측정범위(Measurement range for contact)는 0~180°, 각 시편당 4개씩 측정하였다.

### 4. 항균능 평가

백금 나노튜브의 항균능을 평가하기 위해 drop test를 사용하였다(15-16). *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 균주는 Trypticase soy broth (TSB, Difco, NJ, USA) 배지에 24시간 배양한 후, *S. aureus* 부유 액의 세균 수를 측정하여 Optical density (OD<sub>600nm</sub>) 값이 0.002로 세균 농도를 희석시킨 뒤, 시간 별 증착된 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 시편 위에 50 μL를 떨어뜨리고 37°C incubator에서 3시간 배양하였다. 배양

후, 950 μL phosphate buffer saline (PBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA)로 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 시편을 수세하였고, 405 nm 파장의 레이저(OCLA, Passive cooled InGaAs diode laser, LVI Technologies Inc. Korea)로 1분간 조사(Pulse mode; output power 120 mW, 1 m/sec, 300 Hz) 후(Figure 1), Phosphate buffer saline (PBS)를 넣은 후 시편 위의 부착된 균액 100 μL 취하여 Trypticase soy agar (TSA) 배지에 도말 하였고 37°C incubator에서 24시간 배양 후, 생성된 콜로니 수(CFU)를 세었다. 광 조사 없는 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군의 생균수 백분율(%)을 기준으로 405 nm 레이저 광 조사의 TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 군, Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 실험군의 상대적인 생균수를 계산하였다.

### 5. LIVE/DEAD 염색

Live-dead Assay는 에스테라제(esterase) 반응과 세포막(membrane) 보전을 기본 원리로 Calcein AM은 살아있는 세포에서 esterase에 의해 분해될 경우, 녹색의 형광을 띠고, EthD-1은 세포막(membrane)이 손상된 죽은 세포에 침투하여 핵산과 결합하면서 붉은색의 형광을 나타내는 원리로 이용하였다. 실험에 사용한 인간 중간엽 줄기세포(Human Mesenchymal Stem Cells; hMSC, Lonza AG, Basel, Switzerland)는 10% FBS (Gibco BRL, Grand island, N.Y, USA)와 1% antibiotics (Gibco, USA)가 첨가된 alpha modified Eagle's minimum essential medium (Gibco, USA)



Figure 1. Passive cooled InGaAs diode laser and Image of 405 nm laser irradiation on Pt-TiO<sub>2</sub> Nanotubes.

배지를 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 시편 위에 인간 중간엽 줄기세포 (hMSC)를 24 well plate에 30,000 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 및 48시간 배양하였다. 배양 후, 405 nm 파장의 레이저(OCLA, Passive cooled inGaAs diode laser, LVI Technologies Inc, Korea)로 1분간 조사(Pulse mode; output power 120 mW, 1 m/sec, 300 Hz) 후, 2 µM Calcein AM (Invitrogen, USA)과 4 µM EthD-1 (Ethidium homodimer-1, Invitrogen, USA)이 포함된 PBS 용액을 500 µL씩 주입하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator 조건하에 30분 동안 반응시킨 후, 형광 현미경(Fluorescent & Inverted Microscope, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 시편에 부착된 세포를 관찰하였다.

## 6. 세포독성평가

세포의 독성 평가는 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) assay를 이용하여 측정하였다. 즉 시편 위에 인간 중간엽 줄기세포(hMSC)를 24well plate에 각각  $1 \times 10^4$  cell/well을 분주하고 24시간, 48시간 배양하였다. 배양 후, 405 nm 파장의 레이저(OCLA, Passive cooled inGaAs diode laser, LVI Technologies Inc, Korea)로 1분간 조사(Pulse mode; output power 120 mW, 1 m/sec, 300 Hz) 후 MTT (Sigma-Aldrich, USA) 용액 100 µg/ml을 각 well에 첨가하여 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 경과 후 MTT에 의해 형성된 formazan을 DMSO (Sigma-Aldrich, USA)로 녹이고 ELISA reader (Spectra MAX 250; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 광 조사 없는 각각의 TiO<sub>2</sub> 나노튜브(Control), Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군(Pt)과 흡광도에 대한 생존도 백분율(%)을 기준으로 405 nm 레이저 광 조사의 TiO<sub>2</sub> NTs/Laser (Control/L)군과 Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser (Pt/L)실험군의 상대적인 세포 생존도를 계산하였다.

## 7. 통계분석

통계 분석은 SPSS Ver. 23.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 세포독성 평가는 Student t-test, 항균능 평가는

일원 배치 분산 분석(One-way ANOVA)을 시행하였다. 사후검정으로 Duncan test를 시행하였으며, 유의 수준은 0.05로 설정하였다.

## 결 과

### 1. Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 증착 및 표면특성분석

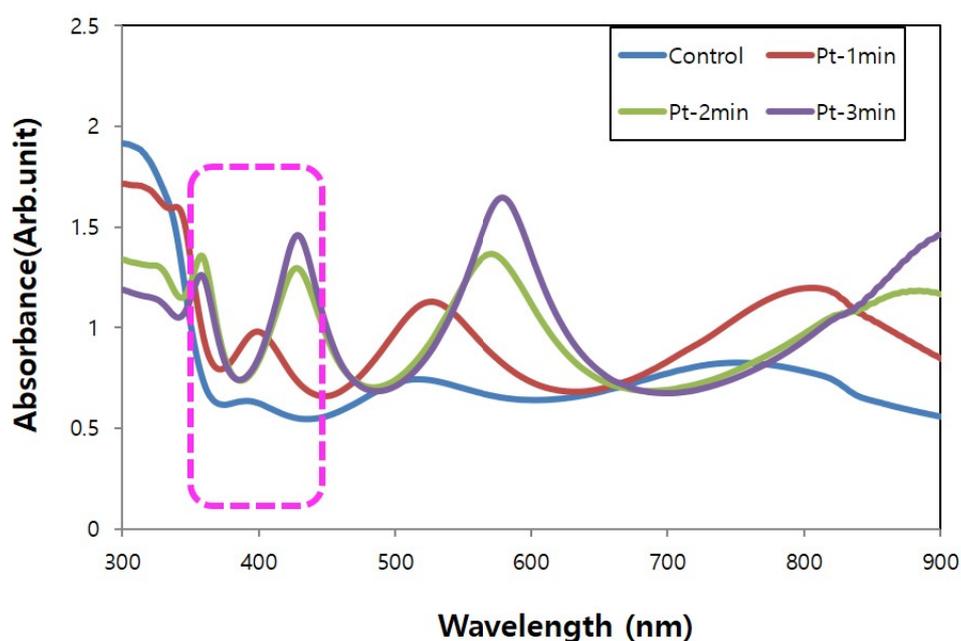
백금 나노입자의 증착 시간에 따른 diffusive UV-Vis-NIR spectra를 측정한 결과, TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 경우, 400 nm 이상 파장의 가시광선 영역에서 흡광 효율은 가장 낮은 것으로 나타났고 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 표면 위에 백금 나노입자의 시간별 증착이 증가할수록 가시광선 영역의 광 흡수 효율도 같이 증가되고 있는 것을 볼 수 있었다. Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 광 흡수는 399~429 nm, 527~579 nm, 806~906 nm로 가시광선 영역에서 적외선 영역까지 흡수 파장을 알 수 있었다(Figure 2). FE-SEM 결과, 백금 나노입자는 대부분 TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 최상층(top surface)에 코팅되었고, 증착 시간이 증가할수록 백금 나노입자의 내경(inner diameter)은 68.8~48.8 nm로 작아지고, 외경은 103.1~110.3 nm로 커졌으며, 구형보다 봉형(rod)으로 두드러지게 관찰되었다(Figure 3). EDX 분석 결과, 2.03~9.36 wt% 백금(Pt)의 함량을 확인할 수 있었다(Table 1).

### 2. 친수성 평가

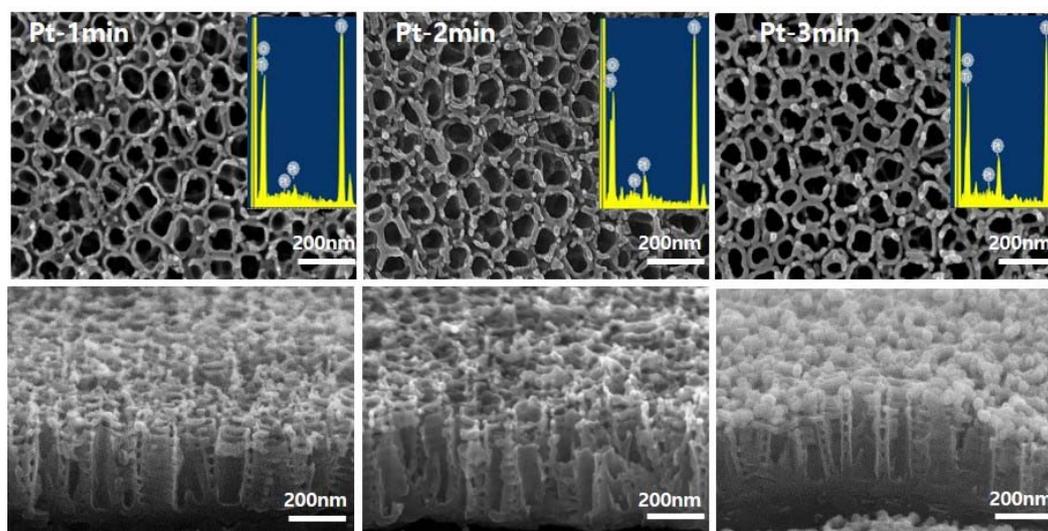
각 시편을 4개씩 측정하여 구한 접촉각은 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군  $6.84 \pm 0.58^\circ$ 이고, 백금 나노입자 1분 증착 시  $11.94 \pm 1.51^\circ$ , 2분 증착시  $16.07 \pm 0.61^\circ$ , 3분 증착시  $19.84 \pm 0.66^\circ$ 이었다. 백금 나노입자의 시간 별 증착이 증가할수록 표면의 접촉각도 유의성 있게 커짐을 알 수 있었다( $P < 0.05$ , Figure 4).

### 3. 항균능 평가

광 조사 유무에 따른 *S. aureus* (ATCC 25923) 배양 24시간 후, 광 조사 없는 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군과 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 실험군의 항균 효과는 백금 나노입자의 1분 증착 시 15.6%,



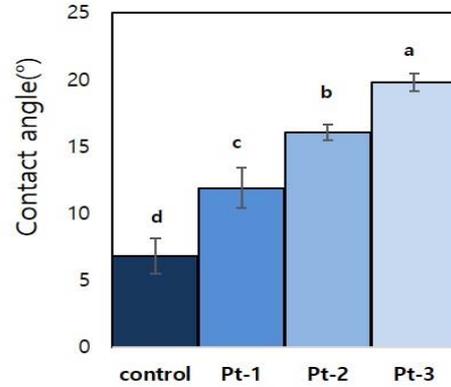
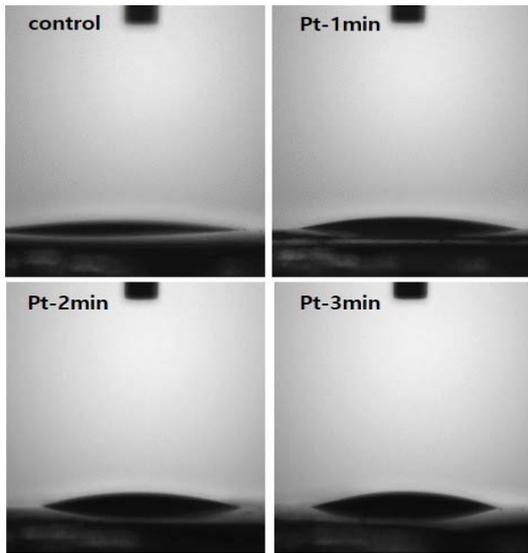
**Figure 2.** UV-vis diffuse reflectance absorption spectra of Pt-TiO<sub>2</sub> NTs; Diffuse reflectance UV-Vis–NIR spectrophotometry dotted line indicated the light absorbance range of 1min coated Pt-TiO<sub>2</sub> NTs was only suitable for 405 nm laser irradiation.



**Figure 3.** FE-SEM micrographs ( $\times 100,000$ ) top view & Cross-sectional view of Pt-TiO<sub>2</sub> NTs; Inserted top right images display the surface elements of Pt-TiO<sub>2</sub> NTs by EDX.

**Table 1.** Chemical composition of Pt-TiO<sub>2</sub> NTs analyzed by EDX

Coating time \ Element (wt%)	Ti	O	Pt
1 min	45.56 $\pm$ 0.23	52.41 $\pm$ 0.22	2.03 $\pm$ 0.33
2 min	42.82 $\pm$ 0.37	50.01 $\pm$ 0.46	7.17 $\pm$ 0.38
3 min	41.11 $\pm$ 0.56	49.53 $\pm$ 0.28	9.36 $\pm$ 0.32



**Figure 4.** Surface contact angles and water drop profiles of the TiO<sub>2</sub> NTs and Pt-TiO<sub>2</sub> NTs; Schematic of the water contact angle for the four groups: TiO<sub>2</sub> (control), 1 min coated Pt-TiO<sub>2</sub> NTs, 2 min coated Pt-TiO<sub>2</sub> NTs, 3 min coated Pt-TiO<sub>2</sub> NTs. Different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

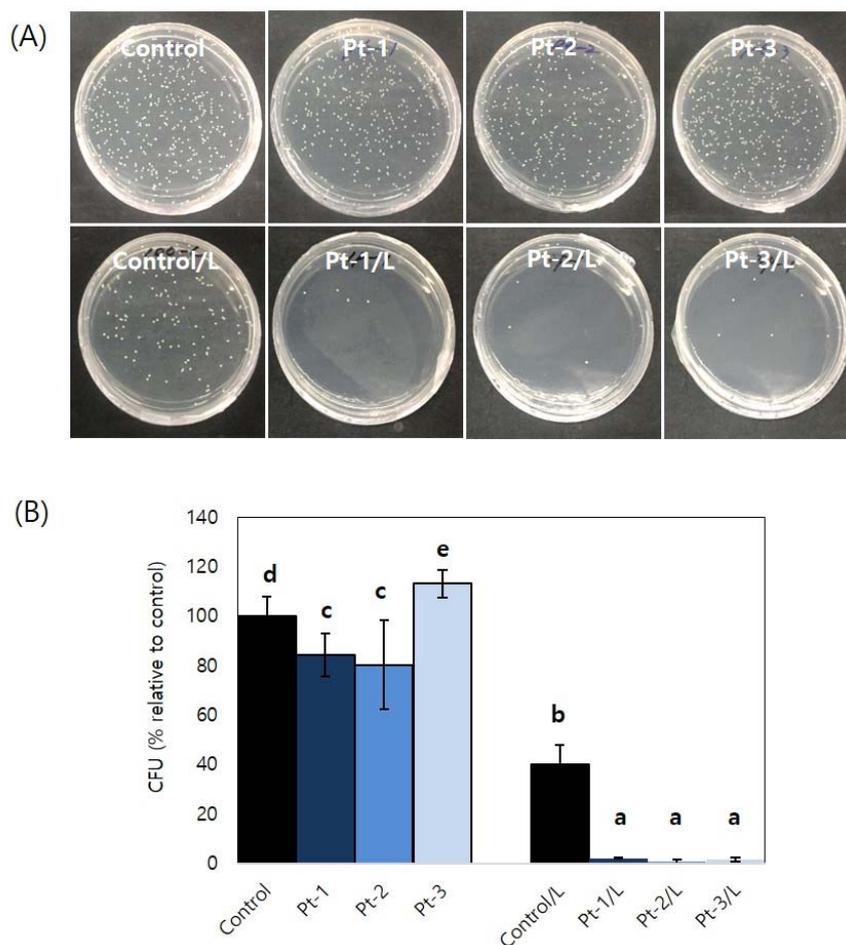
2분 증착 시 19.4% 나타냈고, 3분 증착 시에는 오히려 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군보다 13.3% 증가하는 경향을 나타내었다. Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 증착시간이 짧을수록 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군과 통계적인 유의차를 보였다( $P < 0.05$ ). 405 nm 레이저 광 조사한 TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 군과 Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 실험군은 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군 보다 TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 군은 59.66%, Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 실험군은 모두 98% 이상의 항균효과가 나타남을 알 수 있었다( $P < 0.05$ , Figure 5).

#### 4. 세포독성 평가

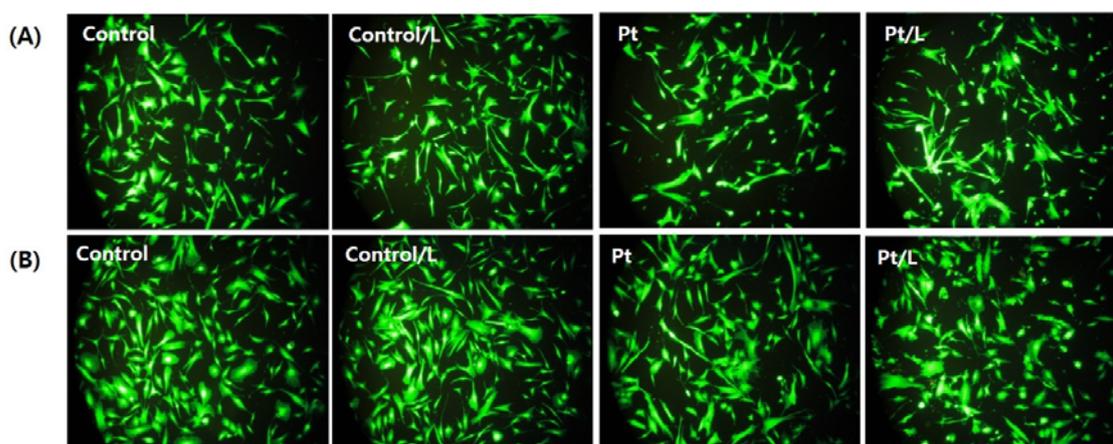
Live-dead Assay를 이용한 광 조사 없는 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군과 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 실험군의 세포 독성 이미지 결과, 24시간 후 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군보다 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 실험군의 부착력이 떨어지는 경향이 있었다. 405 nm 레이저 광 조사한 TiO<sub>2</sub> NTs /Laser군, Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 실험군에서의 24시간 MTT 결과는, Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군보다 Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 실험군에서 세포가 증가하는 경향이 있었지만 통계적인 유의성은 없었고( $P > 0.05$ ), 48시간 MTT 결과 TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 군과 Pt-TiO<sub>2</sub> NTs/Laser 실험군 모두 광조사 없는 각각의 대조군 보다 세포의 증식이 증가하였지만 통계적인 유의성은 없었다( $P > 0.05$ , Figure 6, 7).

#### 고찰

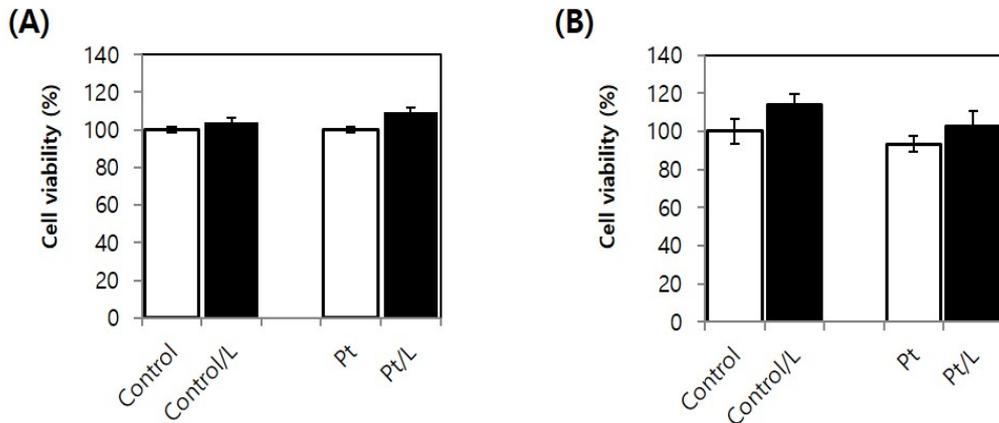
나노미터 크기의 금속 입자를 형성하고 빛을 입사 시키게 되면 국소 표면 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 현상이 가능하며 나노미터 크기의 금속 입자들의 크기와 형태 및 재질에 따라 파장이 달라지므로 이를 이용하여 가시광선 및 근적외선 영역에서 원하는 파장의 국소 표면 플라즈몬 공명(LSPR)이 발생하도록 조절할 수 있다. 국소적 플라즈몬 공명(LSPR) 효과를 이용한 항균성 임플란트 개발은 기존의 물리적, 화학적 흡착으로 도핑한 항균성 임플란트 관련 연구에 대비하여, 항균 약물 없이도 항균능을 나타낼 수 있는 임플란트 표면처리 기술로서 치과 영역에서 반영구적으로 사용할 수 있는 새로운 항균성 임플란트 개발을 가능하게 하고 항균 약물의 부작용 방지 및 안정적인 임플란트를 제공하고자 본 연구에서는 균일한 TiO<sub>2</sub> 나노튜브를 제작한 후 표면에 백금 나노입자를 증착하여 가시광선 영역에서 원하는 국소적 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 효과의 광학적 특성 분석과 항균능 및 생체적합성을 평가하였다. 백금 나노입자는 스퍼터링(sputtering) 공정을 수행하여 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 표면에 증착하였다. 광학적 특성을 알아보기 위하여



**Figure 5.** Effect of irradiation with a 405 nm laser on the growth of bacteria adhered to the surface of TiO<sub>2</sub> NTs/ Pt-TiO<sub>2</sub> NTs (A) analyzed by counting the numbers of colonies formed on trypticase soy agar plates (B); Schematic of the Bacterial survival for the two groups: TiO<sub>2</sub> NT (control) & Pt coated TiO<sub>2</sub> NTs Without laser irradiation; TiO<sub>2</sub> (control/L) & Pt coated TiO<sub>2</sub> NTs (Pt/L) With laser irradiation (different lowercase letters indicate significantly different groups at  $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Fluorescence microscopy images of hMSC stained by Calcein-AM/EthD-1 dyes on Pt-TiO<sub>2</sub> NTs for 24 hours (A) and 48 hours (B); Fluorescence images of live (green) and dead (red) stained hMSC on control (TiO<sub>2</sub> NTs/ Pt-TiO<sub>2</sub> NTs) vs. laser irradiation group [TiO<sub>2</sub> NTs (control/L) & Pt coated TiO<sub>2</sub> NTs (Pt/L)].



**Figure 7.** Cytotoxicity test of control (TiO<sub>2</sub> NTs/ Pt-TiO<sub>2</sub> NTs) vs. laser irradiation group [TiO<sub>2</sub> NTs (control/L) & Pt coated TiO<sub>2</sub> NTs (Pt/L) after 24 hours (A) and 48 hours (B).

UV-Vis-NIR spectrum을 분석한 결과, TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 경우, 400 nm 이상의 가시광선 영역에서 흡광 효율이 가장 낮은 것으로 나타났고 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 표면 위에 백금 나노입자의 시간별 증착이 증가할수록 가시광선 영역의 광 흡수 효율도 같이 증가되고 있는 것을 볼 수 있었다. 나노입자의 길이(length, L)와 폭(width, W)의 비율, 즉 종횡비(aspect ratio, L/W)에 따라 길이가 길어지면 transverse 파장은 약하게 청색편이(blue shifted) 하고, longitudinal 파장은 강하게 적색편이(red shifted) 한다(17-20). 따라서 종횡비(aspect ratio)가 클수록 longitudinal peak이 장파장 영역으로 이동하게 되고 봉우리(peak)의 폭도 넓어지게 된다. 종횡비(aspect ratio)를 제어함으로써 가시광선 영역에서 적외선 영역까지 흡수 파장을 조절 할 수 있다고 보고하였다(21, 22).

백금 나노입자의 직경에 따라 최대 흡수가 280~500 nm 파장에서 나타남을 Bigall 등(23)이 보고하였는데 이번 백금 나노입자의 UV-Vis-NIR spectrum 실험결과도 이와 유사하게 시간 증착에 따라 399~429 nm 부근 파장영역에서 볼 수 있었고, 백금 나노입자 증착 시간이 증가함에 따라 나노입자의 직경이 커져 장파장 영역대로 변화(Shifted)가 나타남을 유추할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 치과에서 사용되는 가시광선 영역에서의 405 nm 레이저(OCLA, Passive cooled InGaAs diode laser, Korea)를 이용하기에 적합한 파장이었다. Zhong 등(24)은 플라즈몬 나노입자간의 간격이 좁을수록 빛의 흡수/산란 파장이 장파장 영역으로 이동한다고 보고하였는데 이번 실험 FE-SEM의 결과에서도, 시간별 백금나노

입자의 증착이 증가함에 따라 나노입자와 입자간의 간격이 줄어드는 경향과 일치하여 UV-Vis-NIR spectrum에서 장파장 영역으로 이동하는 것을 알 수 있었다. 백금 나노입자는 대부분 시간이 증가함에 따라 TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 내부(inner surface) 보다는 최상층(top surface)에 코팅되었고, 증착시간이 증가할수록 TiO<sub>2</sub> 나노튜브의 내경(inner diameter)은 68.8 nm에서 48.8 nm로 작아지고, 외경은 103.1 nm에서 110.3 nm로 커졌다. 또한 나노입자의 증착시간이 증가할수록 구형보다 봉형(rod)이 두드러지게 관찰되었다. TiO<sub>2</sub> 나노튜브 표면에 백금 나노입자의 가시광선 영역에서 강한 플라즈몬 흡수 효율을 높이고자 405 nm 레이저 광 조사를 이용한 항균능의 평가 결과, 광 조사 유무에 따른 *S. aureus* (ATCC 25923) 배양 24시간 후, 광 조사 없는 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군과 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 실험군과의 항균 효과는 Pt-TiO<sub>2</sub> 나노튜브 실험군의 증착시간이 짧을수록 TiO<sub>2</sub> 나노튜브 대조군과의 통계적인 유의차를 나타냈다(P<0.05). Gopal 등(25)의 보고에 의하면 백금 나노입자는 크기가 3 nm 미만인 나노입자에 박테리아 독성을 보인 반면 나노입자의 크기가 3 nm 이상인 나노입자는 독성이 없었다고 보고하였고, Ahmed 등(26)도 유사하게 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 대해 2~5 nm 크기의 백금 나노입자의 항균 활성을 보고하였다. 또한 Konieczny 등(27)은 5.8 nm와 57 nm의 상이한 크기의 백금 나노입자를 사용하여 항균 활성을 평가한 결과 나노입자가 작은 5.8 nm 나노입자에서 박테리아 증식이 억제된다고 보고하였다. 이번 결과, 백금 나노입자의 3분 증착시

오히려  $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군 보다 증가하는 경향을 나타내어 백금 나노입자의 항균 활성은 나노입자의 크기와 밀접한 영향을 미치는 것으로 보였다. 가시광선 영역의 국소적 플라즈몬 공명 효과를 이용한 405 nm 레이저 광 조사한  $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 군과 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군은  $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군 보다  $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 군은 59.66%, Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군은 모두 98% 이상의 항균효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ). 이것은  $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 군은  $\text{TiO}_2$  나노튜브의 광촉매 반응이 405 nm 가시광선 영역에서도 유도될 수 있음을 나타내었고, 더 나아가 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군은 가시광선 영역에서 국소 플라즈몬 흡수 효율을 볼 수 있음을 짐작할 수 있었다.

나노입자의 독성은 나노입자의 크기, 모양, 표면적, 촉매 활성, 전하 및 화학적 조성과 같은 여러 측면에 의해 결정되며(28), 다양한 형태와 세포로 들어가는 방법에 의존한다. 이에 Live-dead Assay를 이용한  $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군과 Pt- $\text{TiO}_2$  나노튜브 실험군의 세포 독성 이미지 결과, 24시간 후  $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군 보다 Pt- $\text{TiO}_2$  나노튜브 실험군의 부착력이 떨어지는 경향이 있었다. 이번 결과는 친수성 결과와 비추어볼 때 Yanagisawa 등(29)은 접촉각이 작으면 세포의 부착 정도가 높고, 접촉각이 크면 세포의 부착 정도가 낮다고 보고하였고, Rupp 등(30)은 표면 친수성은 표면에 에너지에 의존하고 세포와 임플란트 표면 사이의 상호작용을 촉진시켜 초기에 골 유착을 유리하게 한다고 보고 하여, 이와 유사하게 이번 결과, 백금 나노입자의 증착에 의해 접촉각이 커져 세포 초기의 부착에 영향을 미친 것으로 보여지지만 세포의 대사 활성 및 신호 경로 등 추가적인 실험이 필요할 것으로 사료된다. 405 nm 레이저가 세포에 미치는 영향을 보면 405 nm 레이저의 광 조사한 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군에서의 24시간 MTT 결과, Pt- $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군 보다 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군에서 세포가 증가하는 경향이 있어 레이저 광 조사는 세포의 독성보다는 세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 보였지만 통계적인 유의성은 없었다( $P > 0.05$ ).

이상의 결과로 보아, Pt- $\text{TiO}_2$  나노튜브는 인체에 무해한 가시광선 영역의 빛을 이용한 표면 플라즈몬 공명(LSPR)의 효과로 항균 약물이 없는 반영구적 항균성 임플란트 개발에 치과에서 응용할 수 있는 많은 가능성이 있다고 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 균일한 티타니아( $\text{TiO}_2$ ) 나노튜브를 제작한 후 표면에 백금 나노입자를 증착하여 가시광선 영역에서 원하는 국소적 플라즈몬 공명(LSPR) 효과의 광학적 특성 분석과 항균능 및 생체적합성을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1.  $\text{TiO}_2$  나노튜브 위에 백금 나노입자를 증착 후 UV-VIS-NIR spectra 결과,  $\text{TiO}_2$  나노튜브의 경우, 400 nm 이상의 가시광선 영역에서 흡광 효율은 가장 낮은 것으로 나타났고  $\text{TiO}_2$  나노튜브 표면 위에 백금 나노입자의 시간별 증착이 증가할수록 가시광선 영역의 광 흡수 효율도 같이 증가하고 있는 것을 볼 수 있었다.
2.  $\text{TiO}_2$  나노튜브 위에 백금 나노입자를 증착 후 FE-SEM 결과, 백금 나노입자는 시간이 증가함에 따라  $\text{TiO}_2$  나노튜브의 내부(inner surface) 보다는 최상층(top surface)에 코팅 되었고, 증착 시간이 증가할수록  $\text{TiO}_2$  나노튜브의 내경(inner diameter)은 68.8 nm에서 48.8 nm로 작아지고, 외경은 103.1~110.3 nm로 커졌다. 또한 나노입자의 증착 시간이 증가할수록 구형보다는 봉(rod)의 형태가 두드러지게 관찰되었다.
3. 405 nm 레이저 광 조사한  $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 군과 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군은 각각의 광 조사 안한  $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군 보다  $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 군은 59.66%, Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군은 모두 98% 이상의 항균효과를 나타내었다( $P < 0.05$ ).
4. 405 nm 레이저 광 조사한 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군에서의 24시간 MTT 결과, Pt- $\text{TiO}_2$  나노튜브 대조군 보다 Pt- $\text{TiO}_2$  NTs/Laser 실험군에서 세포가 증가하는 경향이 있었지만 통계적인 유의성은 없었다( $P > 0.05$ ).

## 사사

이 논문은 2019학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행됨

## 참고문헌

1. Beyth N, Houri-HY, Domb A, Khan W, Hazan R. Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015;246012:1-16.
2. Cao G. *Nanostructures and Nanomaterials: synthesis, properties and applications*. Imperial College Press. 2004;126(44):14679-80.
3. Sinani VA, Podsiadlo P, Lee J, Kotov NA, Kempa K. Gold nanoparticles with stable yellow-green luminescence. *Int J Nanotechnol*. 2007;4(3):239-51.
4. Chen H, Cheng H, Lee J, Kim JH, Hyun MH, Koh K. Surface plasmon resonance spectroscopic chiral discrimination using self-assembled leucine derivative monolayer. *Talanta*. 2008;76(1):49-53.
5. Henderson MA. A surface science perspective on TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Surf Sci Rep*. 2011;66(6):185-297.
6. Khlebtsov BN, Khlebtsov NG. Multipole plasmons in metal nanorods: Scaling properties and dependence on particle size, shape, orientation, and dielectric environment. *J Phys Chem C*. 2007;111(31):11516-27.
7. Lee BW, Lee JH. Synthesis of WO<sub>3</sub> / TiO<sub>3</sub> catalysts from different tungsten precursors and their catalytic performances in the SCR. *J Korean Cryst Growth Cryst Technol*. 2014;24(5):213-8.
8. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem Rev*. 2016;116(5):3436-86.
9. Wang Z, Chen L, Huang C, Huang Y, Jia N. Albumin-mediated platinum nanocrystals for in vivo enhanced computed tomography imaging. *J Mater Chem B*. 2017;5(19):3498-3510.
10. Doherty RE, Sazanovich IV, McKenzie LK, Stasheuski AS, Coyle R, Baggaley E. Photodynamic killing of cancer cells by a Platinum(II) complex with cyclometalating ligand. *Sci Rep*. 2016;4(6):22668-77.
11. Nie M, Sun K, Meng DD. Formation of metal nanoparticles by short-distance sputter deposition in a reactive ion etching chamber. *J Appl Phys*. 2009;106(5):54314-24.
12. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009;145(1):83-96.
13. Staszek M, Siegel J, Polivkova M, Svorcik V. Influence of temperature on silver nanoparticle size prepared by sputtering into PVP-glycerol system. *Mater Lett*. 2017;186(1):341-4.
14. Lee GD. The effect of sputtering conditions on the electrochromic properties of titanium oxide thin films. *J Korean Sol Energy Soc*. 2006;26(4):55-61.
15. Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*. 2010;4(10):5731-6.
16. Mondal T, Bhowmick AK, Krishnamoorti R. Chlorophenyl pendant decorated graphene sheet as a potential antimicrobial agent: synthesis and characterization. *J Mater Chem*. 2012; 22(42):22481-7.
17. Murphy CJ, Gole AM, Murph SM, Orendorff CJ. One-dimensional colloidal gold and silver nanostructures. *Inorg Chem*. 2006;45(19):7544-54.
18. Zhang K, Xiang Y, Wu X, Feng L, He W, Liu J. Enhanced optical responses of Au@Pd core/shell nanobars. *Langmuir*. 2009;25(2):1162-8.
19. Kim S, Shuford KL, Bok HM, Kim SK, Park S. Intraparticle surface plasmon coupling in quasi-one-dimensional nanostructures. *Nano Lett*. 2008;8(3):800-4.
20. Moon KS, Bae JM, Oh S. Infrared LASER mediated antibacterial activity and biocompatibility of PLA-tetracycline complexes coated gold nanorod-titania nanotubes. *Korean J Dent Mater*. 2015;42(4):307-16.
21. Zuloaga J, Prodan E, Nordlander P. Quantum plasmonics: optical properties and tunability of metallic nanorods. *ACS Nano*. 2010;4(9):5269-76.

22. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Medical Eng & Phy.* 2013;35(10):1406-14.
23. Bigall NC, Hartling T, Klose M, Simon P, Eng LM, Eychmuller A. Monodisperse platinum nanospheres with adjustable diameters from 10 to 100 nm: Synthesis and distinct optical properties. *Nano Lett.* 2008;8(12):4588-92.
24. Zhong Z, Patskovskyy S, Bouvrette P, Luong HT, Gedanken A. The surface chemistry of Au colloids and their interactions with functional amino acids. *J Phys Chem B.* 2004;108(13):4046-52.
25. Gopal J, Hasan N, Manikandan M, Wu HF. Bacterial toxicity/compatibility of platinum nanospheres, nanocuboids and nanoflowers. *Sci Rep.* 2013;3(1):1260-8.
26. Ahmed KBA, Raman T, Anbazhagan V. Platinum nanoparticles inhibit bacteria proliferation and rescue zebrafish from bacterial infection. *RSC Adv.* 2016;6(50):44415-24.
27. Konieczny P, Goralczyk AG, Szmyd R, Skalniak L, Koziel J, Filon FL. Effects triggered by platinum nanoparticles on primary keratinocytes. *Int J Nanomed.* 2013;8(1):3963-75.
28. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Sukhanova IN. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Res Lett.* 2018;13(44):1-21.
29. Yanagisawa I, Sakuma H, Shimura M, Wakamatsu Y, Yanagisawa S, Sairenji E. Effects of "wettability" of biomaterials on culture cells. *J Oral Implantol.* 1989;15(3):168-77.
30. Rupp F, Scheideler L, Rehbein D, Axmann D, Geis-Gerstorfer J. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. *Biomaterials.* 2004;25(7):1429-38.

## 백금 코팅된 티타니아 나노튜브의 확산반사 특성분석 및 레이저 매개 항균효과

문경숙, 배지명, 오승한\*

원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실 및 생체재료매식연구소

본 연구의 목적은 가시광선-근적외선 파장대의 빛이 전기장과 플라즈몬이 짝지어지면서 발생하는 국소적 표면 플라즈몬 공명(Localized surface plasmon resonance, LSPR) 효과를 유발하는 플라즈모닉 나노입자의 하나인 백금(Pt)이 코팅된 100 nm 티타니아( $\text{Pt-TiO}_2$ ) 나노튜브를 제작하여 표면 특성분석 및 레이저 조사에 따른 항균효과를 평가하였다. 확산반사 분광광도계로 측정된 UV-VIS-NIR 스펙트럼 분석 결과,  $\text{Pt-TiO}_2$  나노튜브의 광 흡수는 파장 399~429 nm, 527~579 nm, 806~906 nm에서 관찰되었고, 이들 중 하나의 파장이 본 연구에서 사용된 레이저(OCLA, 파장: 405)에 적합하였다. FE-SEM 관찰 결과에서는 백금 코팅 시간이 증가할수록  $\text{Pt-TiO}_2$  나노튜브의 내경은 68.8 nm에서 48.8 nm로 감소되었고, 티타니아 나노튜브 최상층에 코팅된 백금 나노입자의 형태는 구형에서 봉형(rod)으로 변화되는 것이 관찰되었다. 접촉각 측정 결과, 백금 코팅 시간이 1분에서 3분으로 증가함에 따라 접촉각이  $11.94^\circ$ 에서  $19.84^\circ$ 로 커지는 것을 확인하였다. *Staphylococcus aureus* 항균효과 실험 결과, 모든  $\text{Pt-TiO}_2$  나노튜브 실험군에서는 레이저 조사 후 98% 이상의 세균 감소가 관찰되어 레이저 조사에 의한 항균효과가 우수하다는 것이 확인되었다( $P < 0.05$ ). 인간 중간엽 줄기세포를 이용한 Live-dead assay와 MTT assay 결과, 레이저 조사가 세포사멸에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다( $P > 0.05$ ). 따라서 국소적 표면 플라즈몬 공명 효과를 발현하는  $\text{Pt-TiO}_2$  나노튜브는 항균약물이 필요 없는 반영구적 항균성 임플란트 표면처리에 많은 가능성이 있다고 판단된다.

**색인 단어 :** 백금, 티타니아 나노튜브, 레이저, 항균효과

---