

은 나노 입자가 도핑된 실리카 함유 치과용 레진의 가시광선 조사에 따른 항균성

이민용¹, 윤희원², 김광만¹, 권재성^{1,3,*}

¹연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소

²강남세브란스 치과병원

³연세대학교 치과대학 BK21 FOUR 프로젝트

Antibacterial properties of dental resin incorporated with nano-silver doped silica in accordance with exposure of visible light

Min-Yong Lee¹, Kwang-Mahn Kim¹, Jae-Sung Kwon^{1,2,}*

¹*Department and Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering,
Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea*

²*Gangnam Severance Dental Hospital, Republic of Korea*

³*BK21 FOUR Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea*

This study investigated reduction of the bandgap of silica by applying nano-silver doping technique and possible application of such silica as a filler in dental resin. Due to reduce band gap, newly fabricated nano-silver doped silica was able to release ROS in accordance with exposure of visible light. Nano-silver doped silica was composed of below 20 nm size crystal silver nanoparticle and 100~500 nm size amorphous silica. These two components were chemically attached to each other (Si-O-Ag). The reduced bandgap was 2.10 eV, which the value could be interpreted as occurrence of surface plasmon resonance generating ROS in visible light exposure conditions. When such nano-silver doped silica was used as a filler in dental resin, increased antibacterial property of nano-silver ion was observed which was related to releasing of ROS when exposed in visible light. The antibacterial properties were statistically significant following exposure to visible light when 0.7 to 1.5 wt% of nano-silver doped silica were incorporated into resin. When the contents of nano-silver doped silica were below 0.7 wt%, minimal ROS release resulted in no significant increase in antibacterial properties as there would be less exposed nano-silver doped silica on the resin surface by visible light. Meanwhile, more than 1.5 wt% of nano-silver doped silica also resulted no significant increase in antibacterial properties following exposure to visible light as the antibacterial effects from nano-silver ion itself were greater than effects from released ROS. Hence, it was concluded that dental resin containing 0.7 to 1.5 wt% of nano-silver doped silica would provide antibacterial properties when exposed to visible light, significantly greater than in dark conditions.

Keywords : Silver, Silica, Reactive oxygen species, Visible light, Band gap, Antibacterial

Min-Yong Lee (ORCID: 0000-0002-4508-9817)

Hi-Won Yoon (ORCID: 0000-0001-6946-8419)

Kwang-Mahn Kim (ORCID: 0000-0002-5235-0294)

*Correspondence: Jae-Sung Kwon (ORCID 0000-0001-9803-7730)

50-1 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul 03722, Republic of Korea

Affiliation: Department and Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea

Tel: +82-2-2228-3081, Fax: +82-2-364-9961

E-mail: jkwon@yuhs.ac

Received: Nov. 03, 2022; Revised: Dec. 23, 2022; Accepted: Dec. 26, 2022

서론

은 나노 입자는 항균성이 입증된 대표적인 물질이기에 과거부터 현재까지 치과영역에서 다양하게 사용됐다. 예를 들어 가철성 의치의 의치상, 수복용 복합레진, 치과용 접착재료 등에 항균성을 증진시키고자 첨가되었는데(1), 이처럼 항균성을 보이는 이유는 은 이온이 세포 내에 있는 황(sulfur)과 강한 결합을 하여 세포벽과 세포막에 부착돼 투과도를 증가시켜 박테리아의 파괴를 돕기 때문이다(2, 3). 하지만 나노 범위의 입자(100 nm)는 반 데르 발스 상호작용으로 뭉치는 성질이 있기에 은 나노 입자를 폴리머와 같은 매트릭스에 첨가했을 때 제대로 분산시키는 것이 항균성을 증진시킨다는 측면에서 매우 중요한 과제였다(4). 만일 은 나노 입자가 충분히 폴리머 내에 충분히 분산되지 못한다면 항균성이 뿐만 아니라 기계적인 성질 또한 악화될 수 있기 때문이다(5). 분산성을 증가시키기 위해 고안한 방법 중 하나는 서브마이크로(sub-micro) 단위인 무기 필러 예를 들어 실리카 필러 표면에 은 나노 입자를 도핑하는 것이다(6). 이로써 얻어지는 장점은 크게 두가지인데, 첫째로 상대적으로 분산시키기 쉬운 실리카 필러를 매개체 삼아 표면에 있는 은 나노 입자가 폴리머 내에서 높은 분산성을 가질 수 있다는 점, 둘째로 실리카 필러로 인해 폴리머의 강도가 증가할 수 있다는 점이다(7). 이때 실리카 필러의 표면적이 넓을수록 은 나노 입자가 도핑될 공간이 많아지기 때문에 mesoporous 한 형태의 실리카 필러를 이용하는 것이 유리하다(8, 9)

은 나노 입자는 자외선파장 영역에서 높은 흡광도를 보였다. 이는 표면 플라즈몬공명(surface plasmon resonance) 때문인데, 입사된 빛에 의해 나노 입자의 전자들이 집합진동(collective oscillation)을 이뤄 빛 에너지 흡수율이 높아지는 것이다. 은 나노 입자의 경우에는 4d 밴드에 있는 전자들이 자외선을 흡수하며 에너지가 높아져 가전자대(valence band)에서 전도대(conduction band)로 이동하게 된다. 이때 산소 또는 물 분자들이 높은 에너지를 가지고 있는 전자를 붙잡음으로써 활성산소종(radical oxygen species)이 발생하게 된다(10, 11). 필러로 사용되는 실리카는 반도체 물질로 넓은 밴드갭 에너지(약 9eV)를 갖는다(12). 즉 은 나노 입자와 실리카 필러 각각은 가시광선 영역에서는 표면 플라즈몬

공명 즉 활성산소종을 만들 수 없다. 그러나 반도체인 실리카 입자에 은 나노 입자를 도핑한다면 표면 플라즈몬공명현상을 자외선 영역에서 가시광선 영역으로 변화시킬 수 있다(13). 실리카에 은 나노 입자를 도핑하는 경우, 기존 실리카의 밴드갭에 mid-gap energy state가 생겨 밴드갭이 감소하게 되고 낮은 에너지 즉 가시광선 영역에서도 전자가 전도대로 이동하여 활성산소종을 만들 수 있게 되었다(14).

Ag-SiO₂를 사용해서 항균성을 입증한 다양한 연구가 진행되었다(15). 하지만 은 나노 입자가 도핑된 실리카에 가시광선 영역의 빛 에너지를 주었을 때 발생하는 활성산소종이 기존의 항균성을 더욱 증가시킬 것인지에 관한 연구는 아직 부족한 상황이었다. 이에 본 연구는 은 나노를 실리카에 도핑했을 때 밴드갭 에너지가 감소하는지 확인하고, rhodamine B solution의 흡광도 변화를 통해 가시광선 영역에서 활성산소종을 발생시키는지 관찰했다. 마지막으로 가시광선 유무에 따른 *streptococcus mutans*에 대한 항균성을 MTT assay를 통해 비교하고자 했다(16).

재료 및 방법

1. 은 나노 입자가 도핑된 실리카 제작

Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB; Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 0.02 g과 25% ammonia solution 20 mL (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)를 3차 증류수 200 mL와 99.8% ethanol 200 mL (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)이 섞인 용매에 넣고 1 시간동안 60 °C에서 400 rpm으로 섞어줬다. 그 후 500 rpm으로 속도를 올린 후 섞인 용액에 20 mL Tetraethyl orthosilicate 98% (TEOS; Sigma-Aldrich, Dorset, UK)를 0.2 mL/min으로 떨어뜨리고 4시간 동안 섞어준다. 용액을 50 mL conical tube에 담아 원심분리기(Fleta 40, Hanil Science, Daejeon, Korea)로 4000 rpm으로 30 분간 원심 분리하여 상층액을 분리하고 ethyl alcohol 99.9% GR grade (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)로 세척하는 것을 세 번 반복했다. 그 후에 전기로(BF51866C-1, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 450 °C에서 4시간 가열하여 mesoporous한 형태의 실리카 필러를 얻는다.

100 mL ethanol에 열처리가 끝난 실리카 필러와 0.1 mM

3-aminopropyltriethoxysilane (3-APTES; Sigma-Aldrich, Dorset, UK)을 넣고 30분간 400 rpm으로 섞어준 후 silver nitrate (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 1 mM을 넣고 초음파세정기(SH-2100, Saehan Ultrasonic, Seoul, Korea)로 30분 sonication 후 6시간 동안 300 rpm으로 섞어줬다. 반응을 모두 마친 용액은 50 mL conical tube에 담아 4000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 분리하고 ethyl alcohol로 세척하는 것을 세 번 반복한다. 그 후 진기로에서 200 °C 2시간 열처리한다.

2. X-선 회절을 이용한 비결정성 실리카와 은 나노 결정 상 분석

비결정성 실리카의 상과 은 나노가 도핑 된 비결정성 실리카의 상을 분석하기 위해 X-선 회절 분석 장비인 XRD (X-ray Diffraction; XRD, Ultima IV, Rigaku, Tokyo, Japan)를 이용하여 비결정성 실리카와 은 나노 결정의 피크를 분석하기 위해 $K\alpha$ -Cu=1.5418 Å, 2θ =5~70°, 30 kV, 30 mA, 0.02 step size, 1°/min speed, slit size=10 mm 조건으로 측정하였다.

3. 투과전자현미경과 에너지 분산 X선 분광계를 이용한 은 나노 입자가 도핑된 실리카 분석

투과전자현미경(Transmission Electron Microscope; TEM, JEM-ARM200F, JEOL, Tokyo, Japan)과 에너지 분산 X선 분광계(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy; EDS, JED-2300T, JEOL, Tokyo, Japan)를 통해 실리카 표면에 은 나노 입자가 도핑 되었는지 확인했다. 또한 은 나노 입자가 정확하게 형성되었는지 그리고 X선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy; XPS, K-alpha, Thermo, UK)를 이용해 은과 실리카가 어떠한 화학적 결합을 이루고 있는지 확인하였다.

4. 은 나노 입자가 도핑된 실리카의 밴드갭과 광분해능 평가

밴드갭을 측정하기 위해 20 mg의 10 mL 3차 증류수에 섞어 UV-Vis spectrophotometer (V-650, JASCO Corporation, Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하고 Tauc model을 통해

밴드갭을 측정했다. 가시광선영역의 빛 에너지가 밴드갭 에너지 이상인지 확인했다.

은 나노 입자가 도핑된 실리카 0.25 g의 은 나노 입자가 도핑 된 실리카 파우더를 10 mL/L 농도 50 mL rhodamine B (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 용액에 넣었다. 은박지로 감싸 빛을 차단한 뒤 adsorption-desorption equilibrium이 되도록 100 rpm으로 30 분간 쉬었다. 30 분이 지나고 은박지를 제거한 용액이 담긴 비커를 2000 lux 백색광을 쬐 후 30 분간격으로 4개의 200 µL 샘플을 4시간 동안 얻었다. 553 nm 파장에서 얻어진 샘플의 흡광도를 UV-VIS spectrophotometer로 비교하여 활성산소종이 rhodamine B 용액의 흡광도를 낮추었는지 확인했다. 위의 과정을 빛을 가하지 않은 조건에서도 동일하게 진행했다. 마찬가지로 은 나노 입자가 도핑되지 않은 실리카를 넣은 상태에서 빛을 가한 것과 가하지 않은 조건을 위와 동일하게 진행했다.

5. 은 나노 입자가 도핑된 실리카를 필러로 사용한 레진 시편 제작

필러 함유량에 따른 항균성을 확인하기 위해 곱게 같은 은 나노 입자가 도핑된 실리카를 0, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 3, 5, 7 wt%가 되도록 폴리머 물질들과 섞어줬다. 이때 혼합 비율은 Poly(ethylene glycol) diacrylate (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)과 Direthane dimethacrylate (Sigma-Aldrich, Dorset, UK)를 1:1 wt%로 하고 camphorquinone (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 0.8 wt%, Ethyl 4-(dimethylamino) benzoate (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) 0.8 wt%로 했다. 혼합이 끝난 폴리머는 15 mL conical tube에 담고 10 분간 상온에서 방향을 바꿔가며 sonication을 했다. 그리고 볼텍스 믹서(AVM-10, Allforlab, Seoul, Korea)로 1분간 vortexing 진행했다. 혼합된 레진을 10 mm 지름×2 mm 높이 몰드에 부어 광중합기(Elipar S10, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA)로 광중합을 진행했다. 광중합을 마친 시편을 P1000-grit paper를 이용해 각 면을 15 s 동안 폴리싱기계(EcoMet 30, Buehler, Lake Bluff, IL, US)로 폴리싱하고 1분간 초음파 처리하여 잔여물을 제거했다 마지막으로 EO 가스 소독을 하여 시편 준비를 마쳤다.

6. MTT assay를 통한 항균성 평가

소독이 끝난 시편을 필터 함량 조건 마다 3개씩 골라 12 well polystyrene plates (SPL Life Science, Pocheon, Korea)에 바닥과 평행하게 넣어 첫 번째 플레이트 균을 설정했다. 빛의 유무에 따른 결과를 관찰하기 위해 위와 같이 3개씩 플레이트에 넣어 두 번째 플레이트균을 설정했다. 600 nm에서 optical density (OD) 값이 0.4인 *S. mutans* (KCTC3065) 50 μ L를 두 플레이트 균에 있는 시편에 조심스럽게 떨어 뜨린 후 빛을 차단한 상태에서 37 $^{\circ}$ C로 24시간 배양하며 시편과의 부착하도록 한다. 이를 마친 후 시편을 Phosphate-Buffered saline 1X (PBS; Welgene, Gyeongsan, Korea)에 조심스럽게 두 번 담갔다 빼어 부착하지 못한 *S. mutans* 균을 제거했다. 그 후 200 μ L의 Brain Heart Infusion(BHI; BD, Seoul, Korea)를 시편에 조심스럽게 공급하여 부착된 *S. mutans* 균에게 영양을 공급했다. 그 후 첫 번째 배양 플레이트균에는 2000 lux의 빛을 4시간 쬐어주고 두 번째 배양 플레이트균은 은박지로 감싸 빛을 차단했다. 4시간이 지난 후 시편을 조심스럽게 꺼내 6 well polystyrene plate에 담고 2 mL의 PBS에 담겼다. 6 well plate의 뚜껑을 닫고 파라필름으로 감싼 뒤 1분간 sonication 하고 30 초를 쉬는 방식으로 총 10분간 sonication을 하여 시편에 부착된 *S. mutans* 균을 모두 탈락시켰다.

탈락된 *S. mutans* 균이 담긴 PBS 100 μ L를 96 well에 각각 담고 10 μ L의 MTT (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) solution을 넣어줬다. 은박지로 빛을 차단한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 incubation 진행했다. 그 후 100 μ L의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Dorset, UK)를 넣고 기포가 생기지 않도록 조심스럽게 피펫팅 해줬다. 그 후 microplate reader (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, US)를 이용해 600 nm에서 흡광도 변화를 측정했다. 위와 같은 실험을 3번 반복하여 경향성을 판단했다.

7. 통계분석

통계처리는 SPSS (Statistical Package for Social Science 23.0 IBM Korea Inc., Seoul, Korea)를 사용하여 분석하였다. Shapiro-Wilk test를 통해 정규분포가 형성되었다는 것을 보았고, 시간에 따른 광분해능과 필터 함유량에 따른 MTT

assay 흡광도의 평균과 표준편차를 계산하고 one-way ANOVA, t-test를 통해 통계검정하였다. 이때 모든 통계적 유의 수준은 0.05로 설정했다.

결 과

1. XRD를 이용한 은 나노가 도핑된 실리카 합성결과 평가

Figure 1에서 확인할 수 있는 폭이 넓은 22.5 $^{\circ}$ peak은 비결정성 실리카 상을 나타냈다. 은 나노 입자를 도핑 하기 전과 도핑 후 모두 비결정성 실리카 상을 가졌다. 은 나노 입자가 도핑 실리카의 XRD 패턴을 JCPDS 데이터를 기반으로 분석해 본 결과 FCC 구조인 은 나노 입자의 (111), (200), (220) 면에 해당하는 피크가 확인될 뿐, Ag₂O 등과 같은 은 산화물의 피크는 관찰되지 않았다. 이는 비결정성 실리카 표면에 합성된 은 나노 입자가 Ag⁺ 이온 상태에서 Ag⁰ 상태로 완전히 환원되었다고 분석할 수 있다.

2. TEM/EDS를 이용한 은 나노가 도핑된 실리카 합성 결과 평가

Figure 2(a)는 은 나노가 도핑된 실리카를 TEM으로 관찰한 사진이다. Figure 2(b)와 Figure 2(c)는 EDS를 통해 Si와 Ag을 빨간색과 초록색으로 나타냈으며, 이 둘을 병합한 모습이 Figure 2(d)이다. 이를 통해 약 100 nm 크기의 실리카 필터 표면에 10 nm 이하의 은 나노 입자가 도핑 된 모습을 관찰할 수 있다. Figure 2(e)와 Figure 2(f)에서 Map Sum Spectrum을 살펴보면 Si와 Ag의 atomic%가 95:5 인 것으로 관찰된다. 이로서 실리카 표면에 은 나노 입자가 위치하고 있다는 사실을 알 수 있다.

Figure 2와 다른 은 나노가 도핑 된 실리카 입자를 TEM으로 점차 확대하여 관찰한 경우 큰 배율에서 관찰되지 않았던 1 nm 보다 작은 크기의 수 많은 은 나노 입자가 실리카 표면에 있는 것을 확인할 수 있다(Figure 3).

단순히 은 나노 입자가 실리카 표면에 위치한 것이 아니라 Ag와 Si가 어떠한 화학적 결합으로 이뤄졌는지 XPS를 통해 확인할 수 있다. Figure 4(a)는 O1s를 기준으로 XPS 값을

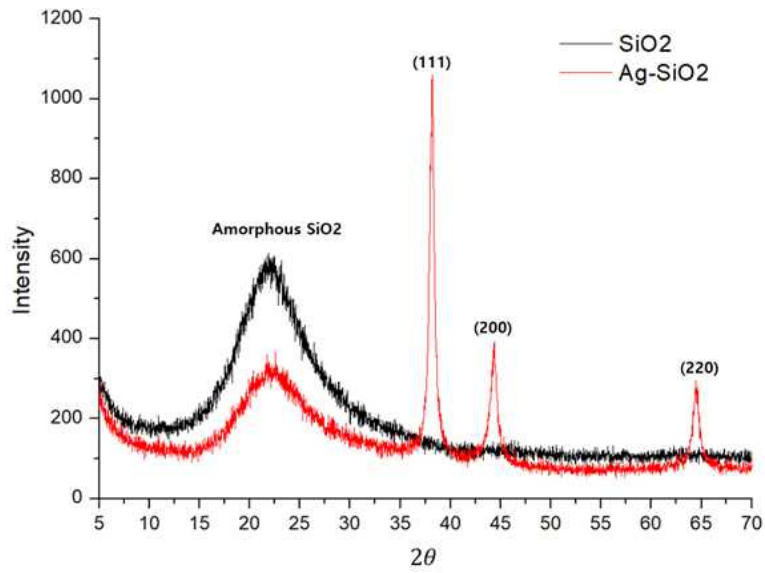


Figure 1. XRD peaks of amorphous silica (SiO_2) and silver nanoparticle doped amorphous silica (Ag-SiO_2)

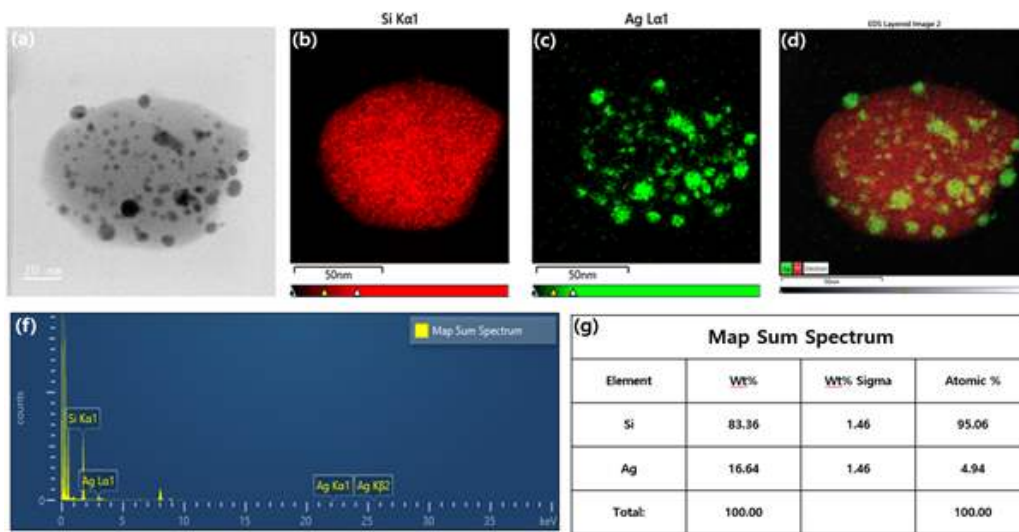


Figure 2. TEM/EDS images and map sum spectrum of Ag doped silica filler.

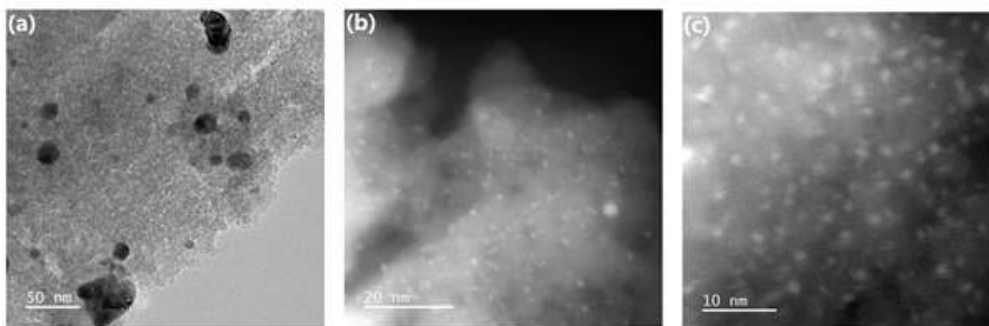


Figure 3. High resolution TEM image of Ag doped Si

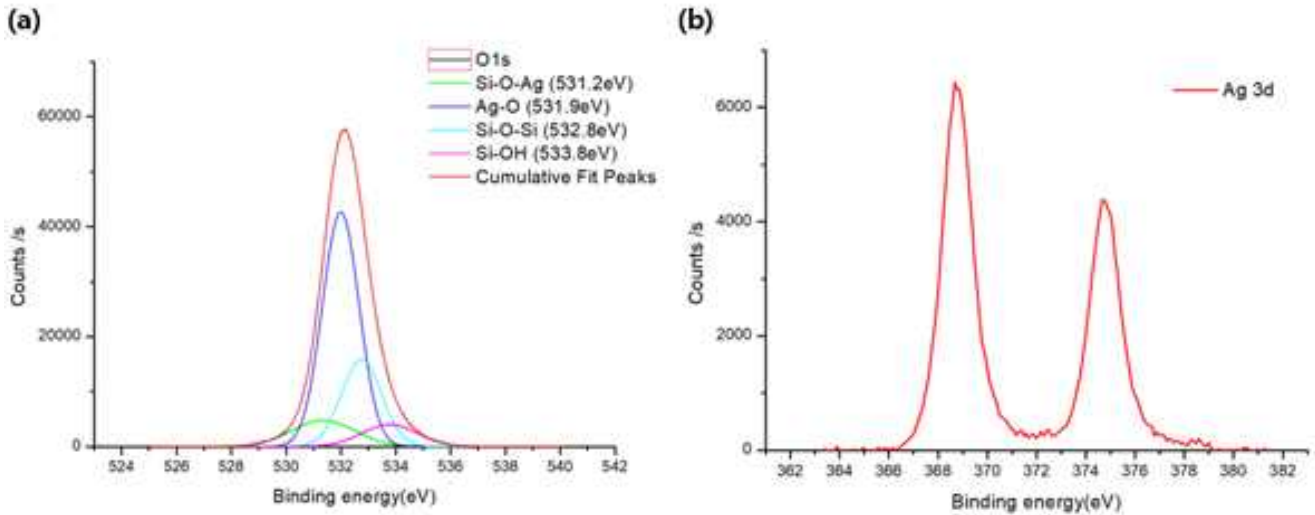


Figure 4. The recorded and deconvoluted O1s (a) and Ag3d (b) XPS spectra of Ag-SiO₂

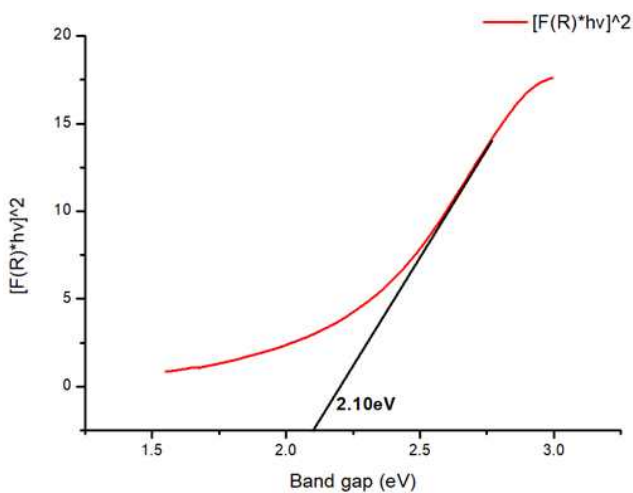


Figure 5. Tauc plots and band gap energy of Ag-SiO₂

살펴본 결과로 O1s peak는 총 네 가지 결합으로 이루어졌는데 이때 관찰할 수 있는 Si-O-Ag 결합이 바로 Si와 Ag의 화학적 결합이다. 이는 은 나노 입자가 도핑된 실리카를 제작할 때 200 °C에서 2시간 마지막 열처리 동안 Ag의 전자가 silica에 전달되어 생긴 결합으로 판단됐다. O1s의 전체 면적 중 Si-O-Ag peak의 면적은 6.7%를 차지하여 전체 O1s 결합 중 6.7%가 Si-O-Ag 결합으로 이뤄졌음을 알 수 있다.

순수한 은의 XPS peak 값은 368 eV, 374 eV이다(17).

Ag 3d를 기준으로 XPS 값 즉 Figure 4(b)를 살펴보았을 때 앞서 언급한 peak들과 같은 값을 보이므로 산화된 상태의 은 나노가 아닌 순수한 은 나노 입자가 실리카 표면에 결합되어 있음을 판단할 수 있다.

3. 밴드갭과 광분해능 평가

Lambert's law를 만족하는 농도에서 Tauc model을 통해 얻어진 은 나노가 도핑된 실리카의 밴드갭은 Figure 5에서 2.10 eV 값을 보였다. 가시광선영역의 빛 에너지가 충분히 밴드갭 이상으로 형성되기에 활성산소종을 만들 수 있다.

빛에 의해 발생한 활성산소종이 rhodamine B와 만났을 때, 553 nm에서의 흡광도가 감소한다는 사실을 기반으로 광분해능 실험을 해본 결과 빛 조건에 있는 은 나노 입자가 도핑된 실리카만이 흡광도가 감소한 것을 알 수 있다. Figure 6(a)에서 볼 수 있듯이 2000 lux의 빛을 가한 지 1시간 동안은 흡광도가 통계적으로 유의미하게 감소했다. 하지만 1시간 30분 이후부터는 흡광도 감소가 나타나지 않았다. 반면에 빛을 차단한 조건 Figure 6(b)는 은 나노 입자가 도핑된 실리카가 rhodamine B 수용액에 있음에도 흡광도가 감소하지 않았다. 또한 Figure 6(c)와 Figure 6(d)에서는 실리카만 추가하여 빛을 가하거나 차단한 후 흡광도 변화를 살펴보았을 때 시간에 따른 흡광도 변화는 나타나지 않았다. 따라서 Figure 6(a)에서 나타난 흡광도 감소는 실리

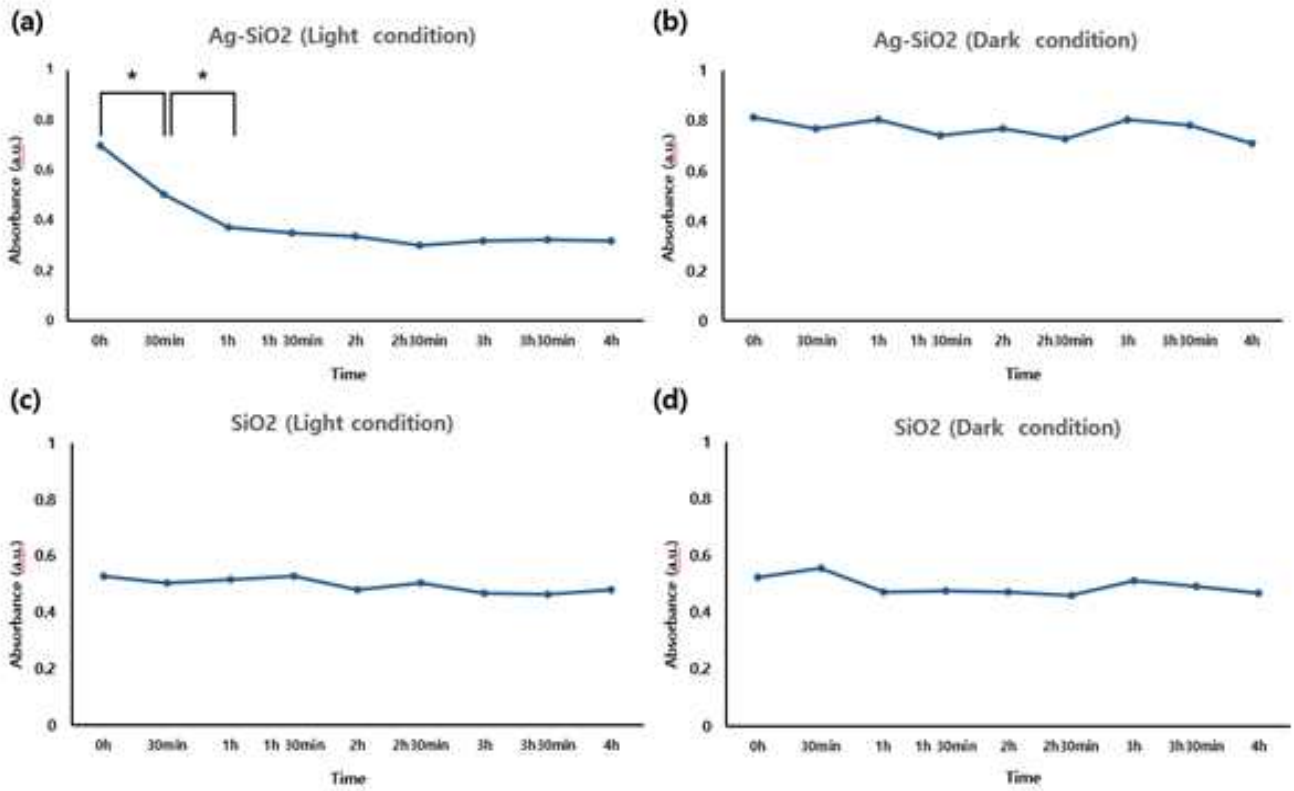


Figure 6. Mean absorbance (a.u.) of rhodamine B solution over time for Ag-SiO₂ in light or dark conditions.

Table 1. Statistical comparison of absorbance value in accordance of filler concentration when light or dark conditions.

필러 함유량	빛 유무	Absorbance (a.u.)	SD	Statistical Difference
0 wt%	O	0,353	0,032	a
	X	0,344	0,044	a
0,3 wt%	O	0,245	0,027	b
	X	0,253	0,018	b, c
0,5 wt%	O	0,236	0,013	b
	X	0,241	0,022	b, c
0,7wt%	O	0,247	0,020	b
	X	0,207	0,022	d
1,0 wt%	O	0,223	0,024	b
	X	0,197	0,021	d
1,5 wt%	O	0,224	0,029	b
	X	0,201	0,016	d
3,0 wt%	O	0,184	0,014	e
	X	0,178	0,011	d, e, f
5,0 wt%	O	0,161	0,020	g
	X	0,149	0,020	f, g, h
7,0 wt%	O	0,126	0,013	i
	X	0,123	0,013	h, i

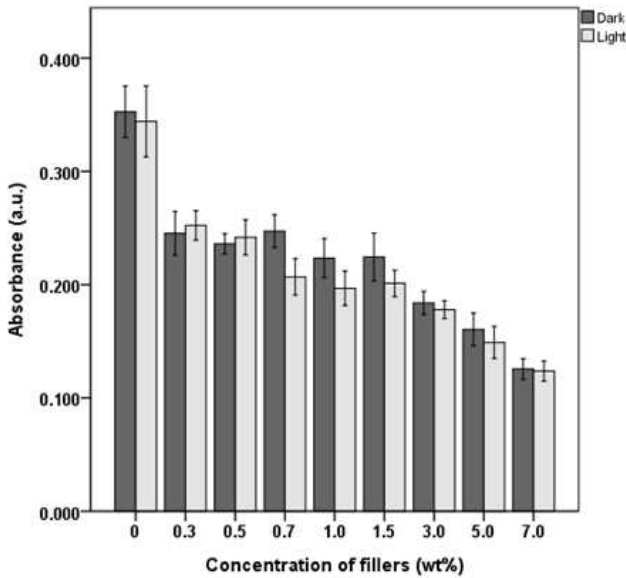


Figure 7. The mean absorbance observed for Ag-SiO₂ resin disc samples with different wt% concentration (0 to 7 wt%) under light or dark conditions.

카의 영향이 아니라는 것을 밝힐 수 있다. 결론적으로 2000 lux의 가시광선 영역의 빛이 은 나노가 도핑된 실리카에 가해졌을 때 활성산소종이 발생하여 rhodamine B 분자구조가 변하게 되고, 553 nm에서 rhodamine B 용액의 흡광도가 감소한다는 것을 사실이 입증되었다.

4. MTT assay를 통한 항균성 비교

Figure 7에서 MTT assay를 통해 빛의 유무에 따른 *S. mutans* 감소를 확인할 수 있었다. MTT assay는 살아있는 *S. mutans* 균과 반응하여 formazan을 만들기 때문에 정확한 CFU와 같이 균의 viability를 확인할 수 있었다. 데이터를 살펴보면 빛을 가한 조건과 차단한 조건 모두 필러 함유량이 높아질수록 흡광도가 감소하는 것 즉 항균성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 은 나노 입자 자체가 가지는 항균성에 의해서 발생한 결과이다. 더욱 주목해야할 점은 은 나노 입자가 도핑된 실리카 필러의 무게 함량이 0.7, 1.0 그리고 1.5 wt% 조건에서 빛을 가한 조건과 차단한 조건 사이 흡광도가 통계적으로 유의미한 차이가 난다는 사실이다. 0.7, 1.0 그리고 1.5 wt%에서 빛을 가했을 때 더욱 낮은 흡광도를 보였는데 특히 1.0 wt% 필러를 함유한

시편에 빛을 가했을 때 3 wt% 필러에 함유한 시편에 빛을 차단했을 때와 같은 효과를 얻을 수 있었다. 따라서 낮은 함량의 은 나노 입자가 도핑된 실리카 필러에 가시광선 영역의 빛을 비추면 높은 필러 함유량이 보이는 항균성 효과를 나타낼 수 있었다.

고 찰

본 연구는 sub-micro 단위 실리카 필러 표면에 은 나노 입자를 화학적으로 결합시켜 밴드갭을 줄이고, 그로 인해 가시광선 영역에서 ROS를 형성할 수 있음을 확인했다. 또한 광촉매성을 이용해 형성된 ROS가 특정 필러 농도에서 항균성을 증진시킨다는 사실 또한 밝혔다. 실제 임상에서 레진 수복 후 잔존하는 micro-leakage에 의해 이차 우식이 발생하는 경우가 많은데, 이를 극복하기 위해 은 나노 입자 도핑 실리카 함유 치과용 레진을 사용할 수 있다. 주기적으로 가시광선 영역의 빛을 수복한 위치에 비추면 치아 우식을 일으키는 *S. mutans* 균에 대한 항균성을 떨 수 있을 것이라 예상했다.

여러 물질들을 doping하는 방식으로 band-gap을 줄여, 가시광선 영역에서 ROS를 방출하게 해서 항균성을 증진시키는 다양한 연구들이 진행되었다(16, 18). 또한 은 나노 파티클에 visible blue light를 비춰 항균성이 증가하는 것을 관찰한 선행 논문도 있다(19, 20). 하지만 본 연구에서는 선행연구에서 다루지 않았던 sub-micro 단위의 실리카에 은 나노 입자를 도핑하여 분산성을 높이려는 시도와(21), tauc model로 밴드갭 감소를 증명했다(22). 또한 rhodamine B를 이용해 은 나노 입자가 도핑된 실리카 필러가 가시광선의 빛을 받았을 때 ROS가 발생하는지 그리고 기존 세포독성을 평가하는 MTT를 이용해 박테리아의 독성 즉 antibacterial property를 정량적으로 평가했다(16, 23).

실리카 필러를 제작할 때 첨가한 CTAB는 450 °C 열처리를 통해 제거할 수 있다(8, 9). 또한 실리카 파티클끼리 450 °C에서는 서로 sintering이 일어나지 않기에 실리카 파티클끼리 서로 붙어 파티클의 사이즈가 커지는 것을 방지할 수 있다(17). 또한 Ag-SiO₂를 200 °C에서 열처리하는 것은 은 나노의 항균성에 영향을 주지 않는 것으로 보고됐다(21, 24).

실리카 제작이 끝나고 은 나노 입자를 도핑 하는 과정에서 은 나노 입자의 성장 원리를 고배율 TEM을 통해 알 수 있다. 실리카 표면에 1 nm 이하의 수 많은 은 나노 입자가 부착해 있는 것을 관찰할 수 있는데, 이는 은 이온이 실리카의 표면에 결합하고 이것이 핵(nucleating)이 되어 은 나노 입자의 성장을 돕는 것을 의미한다. 또한 첨가한 3-APTES는 2가지 역할을 수행하는데 첫째로 실리카 필러를 실란화하여 매트릭스로 사용되는 폴리머 안에서의 분산을 도우며, 둘째로 환원제로 사용되어 은 이온의 환원을 도와 핵 역할을 하는 실리카 표면의 은 입자가 10~20 nm 크기로 성장하는데 도움을 줬다(25). 실리카 필러와 3-APTES의 균일한 혼합을 위해 silver nitrate 첨가 전 실리카 필러와 3-APTES를 먼저 혼합하였다. XRD와 XPS 데이터를 통해 실리카 표면에 형성된 은 나노 입자가 순수한 결정성 은 나노 입자라는 것을 확인할 수 있다.

일반적으로 알려진 은 나노 입자의 밴드갭은 2.51 eV이다. UV-Vis spectrometer를 통해 얻을 수 있는 흡광도계수(α)를 바탕으로 밴드갭을 구할 수 있는 식은 식 [1]과 같다.

$$(\alpha hv)^{\gamma} = A(hv - E_g) \quad [1]$$

A는 상수이고, hv 는 photon 에너지를 의미하며, γ 는 가전자대와 전도대 사이의 electronic transition 상수를 의미하며 2 또는 0.5 라는 고유 값을 가진다. 은 나노 입자의 경우에 $\gamma=2$ 이다(26, 27). 광분해능을 살펴보았을 때 은 나노가 도핑 된 실리카의 초기 흡광도는 0.7~0.8인 반면 실리카의 초기 흡광도는 0.5~0.6으로 측정됐다. 값의 차이가 발생한 이유는 소량의 은 나노가 도핑 된 실리카를 침지시켰을 때 은 나노 입자가 빠져나와 흡광도의 상승을 도왔다고 예상된다. 또한 빛을 가한 조건에서 은 나노 입자가 도핑 된 실리카가 1시간 후부터 일정한 흡광도를 보인 이유는 광촉매로서 역할이 포화가 이뤄져 평형상태에 도달했기 때문이다.

MTT assay를 통해 얻어진 흡광도 변화를 분석했을 때 0.7, 1.0, 1.5 wt% 때에는 빛을 가했을 때 더 낮은 흡광도를 보였지만 0.3, 0.5 wt% 와 3, 5, 7 wt% 이상에서는 통계적으로 유의미한 차이가 발생하지 않았다. 이와 같은 값이 나온 이유는 다음과 같다. 항균성에 영향을 미치는 것은 시편의

표면에 있는 필러의 양과 필러가 빛을 받아 만드는 활성산소종이다. 0.3, 0.5 wt%의 경우는 시편의 표면에 있는 은 나노들이 만드는 활성산소종의 양이 *S. mutans* 균을 감소시키기에는 충분하지 않은 것으로 보였다. 하지만 은 나노 입자 자체가 가지는 항균성에 의해 0 wt%보다 흡광도가 감소하게 됐다. 3 wt% 이상부터 은 나노 입자 자체의 항균성 영향이 크기에 활성산소종의 영향이 가려진 것으로 평가됐다.

본 연구는 세가지 한계점이 존재한다. 첫째로, 실리카 필러의 particle dispersity를 측정하지 못한 것이다. 은 나노 입자의 크기는 10~20 nm로 균일했으나 실리카 필러의 사이즈 역시 균일한 지 scanning electron microscope를 통해 확인해보아야 할 필요성이 있다. 둘째로 수복용 복합레진으로 사용하기에는 본 실험의 필러 첨가 농도는 매우 적다. 이로서 낮은 기계적 강도를 띠 것으로 예상된다. 따라서 은 나노 입자가 도핑된 실리카 필러가 채워지지 못한 남은 mass %를 기존 필러로 채웠을 때 항균성이 지속되는지 확인해볼 필요성이 있다. 셋째로 제작된 시편에 가시광선의 빛을 가했을 때 은 나노 입자가 도핑 된 실리카의 양에 비례하게 활성산소종이 발생하는지에 관한 연구가 필요하다.

결론

은 나노 입자가 도핑 된 실리카는 레진 매트릭스에 사용될 필러로서 생체활성 치과재료로 사용될 높은 가능성을 보여 주었다. 은 나노가 가지는 항균성뿐만 아니라 가시광선의 빛을 받았을 때 특정 농도에서 빛을 가하지 않았을 때 보다 상승된 항균성을 보일 수 있다. 더욱 주목할 점은 가시광선 영역의 빛을 받았을 때 항균성을 보인다는 것이다. 기존 은 나노 입자가 활성산소종을 발생시키는 자외선 영역의 빛을 구강 내에 비출 경우, 환자의 구강 조직에 위험이 가해질 수 있으며 술자에게도 부담이 될 수 밖에 없다. 하지만 은 나노 입자가 도핑 된 실리카는 가시광선 영역에서도 항균성을 보이기에 환자와 술자 모두에게 유리하게 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 결과적으로 은 나노 입자가 도핑 된 실리카가 필러로 사용된 레진을 수복물로 사용하며 정기적으로 가시광선의 빛을 가한다면 이차 우식 등을 성공적으로 예방할 수 있을 것이다.

사 사

이 논문은 2022년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 우수신진연구사업임 (NRF-2022R1C1C1010304).

참고문헌

1. Bapat RA, Chaubal TV, Joshi CP, Bapat PR, Choudhury H, Pandey M, B. Gorain, P. Kesharwani. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;91: 881-98.
2. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:2555-62.
3. Khorrami S, Zarrabi A, Khaleghi M, Danaei M, Mozafari MR. Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:8013-24.
4. Gosens I, Post JA, de la Fonteyne LJ, Jansen EH, Geus JW, Cassee FR, Jong WH. Impact of agglomeration state of nano- and submicron sized gold particles on pulmonary inflammation. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7 (1):37.
5. Ghazali S, Jaafar M, Azizan A. Effects of filler shape and size on the properties of silver filled epoxy composite for electronic applications. *J Mater Sci: Mater Electron.* 2011;22(1):56-63.
6. Rastogi SK, Rutledge VJ, Gibson C, Newcombe DA, Branen JR, Branen AL. Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Nanomedicine.* 2011;7(3):305-14.
7. Dias HB, Bernardi MIB, Marangoni VS, de Abreu Bernardi AC, de Souza Rastelli AN, Hernandez AC. Synthesis, characterization and application of Ag doped ZnO nanoparticles in a composite resin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;96:391-401.
8. Huang R-S, Hou B-F, Li H-T, Fu X-C, Xie C-G. Preparation of silver nanoparticles supported mesoporous silica microspheres with perpendicularly aligned mesopore channels and their antibacterial activities. *RSC Advances.* 2015;5(75):61184-90.
9. Jafarzadeh M, Rahman IA, Sipaut CS. Synthesis of silica nanoparticles by modified sol-gel process: the effect of mixing modes of the reactants and drying techniques. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2009;50(3):328-36.
10. Chen X, Zheng Z, Ke X, Jaatinen E, Xie T, Wang D, Guo C, Zhao J, Zhu H. Supported silver nanoparticles as photocatalysts under ultraviolet and visible light irradiation. *Green Chem.* 2010;12(3): 414-9.
11. Kamat PV. Photophysical, Photochemical and Photocatalytic Aspects of Metal Nanoparticles. *J Phys Chem B.* 2002;106(32):7729-44.
12. Güler E, Uğur G, Uğur Ş, Güler M. A theoretical study for the band gap energies of the most common silica polymorphs. *Chin J Phys.* 2020;65:472-80.
13. Cole JR, Halas N. Optimized plasmonic nanoparticle distributions for solar spectrum harvesting. *Appl Phys Lett.* 2006;89(15):153120.
14. Romolini G, Gambucci M, Ricciarelli D, Tarpani L, Zampini G, Latterini L. Photocatalytic activity of silica and silica-silver nanocolloids based on photo-induced formation of reactive oxygen species. *Photochem Photobiol Sci.* 2021;20(9):1161-72.
15. Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, Kokubo T, Kozuka H, Yamamoto K. Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials.* 2000;21(4):393-8.
16. Ahmad Fauzi NA, Ireland AJ, Sherriff M, Bandara H, Su B. Nitrogen doped titanium dioxide as an aesthetic antimicrobial filler in dental polymers. *Dent Mater.*

- 2022;38(1):147-57.
17. Phatangare A, Dhole S, Dahiwale S, Mathe V, Bhoraskar S, Late D, Bhoraskar V. Surface chemical bonds, surface-enhanced Raman scattering, and dielectric constant of SiO₂ nanospheres in-situ decorated with Ag-nanoparticles by electron-irradiation. *J Appl Phys.* 2016;120(23):234901.
 18. Maddahi P, Shahtahmasebi N, Kompany A, Mashreghi M, Safaei S, Roozban F. Effect of doping on structural and optical properties of ZnO nanoparticles: study of antibacterial properties. *Materials Science-Poland.* 2014;32(2):130-5.
 19. Akram FE, El-Tayeb T, Abou-Aisha K, El-Azizi M. A combination of silver nanoparticles and visible blue light enhances the antibacterial efficacy of ineffective antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15(1):48.
 20. Barone P, Stranges F, Barberio M, Renzelli D, Bonanno A, Xu F. Study of Band Gap of Silver Nanoparticles-Titanium Dioxide Nanocomposites. *J Chem.* 2014;2014: 589707.
 21. Šupová M, Martynková GS, Barabaszová K. Effect of nanofillers dispersion in polymer matrices: a review. *Sci Adv Mater.* 2011;3(1):1-25.
 22. Pryshchepa O, Pomastowski P, Buszewski B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;284:102246.
 23. Malekinejad H, Bazargani-Gilani B, Tukmechi A, Ebrahimi H. A cytotoxicity and comparative antibacterial study on the effect of *Zataria multiflora* Boiss, *Trachyspermum copticum* essential oils, and Enrofloxacin on *Aeromonas hydrophila*. *Avicenna J Phytomed.* 2012;2(4):188-95.
 24. Durucan C, Akkopru B. Effect of calcination on microstructure and antibacterial activity of silver-containing silica coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;93(2):448-58.
 25. Rice D, Mouras R, Gleeson M, Liu N, Tofail SA, Soulimane T, Silien C. APTES duality and nanopore seed regulation in homogeneous and nanoscale-controlled reduction of Ag shell on SiO₂ microparticle for quantifiable single particle SERS. *ACS omega.* 2018;3(10):13028-35.
 26. Aziz A, Khalid M, Akhtar MS, Nadeem M, Gilani Z, Asghar HUH, et al. Structural, morphological and optical investigations of silver nanoparticles synthesized by sol-gel auto-combustion method. *Dig J Nanomater Biostructures.* 2018;13(3).
 27. Makuřa P, Pacia M, Macyk W. How to correctly determine the band gap energy of modified semiconductor photocatalysts based on UV-Vis spectra. *J Phys Chem Lett.* 2018;9(23):6814-17.

은 나노 입자가 도핑된 실리카 함유 치과용 레진의 가시광선 조사에 따른 항균성

이민용¹, 윤희원², 김광만¹, 권재성^{1,3,*}

¹연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소

²강남세브란스 치과병원

³연세대학교 치과대학 BK21 FOUR 프로젝트

본 연구에서는 치과용 레진의 필러로 사용되는 실리카에 은 나노를 도핑 해 밴드 갭을 감소시키고 이를 통해 가시광선 영역의 빛을 비췄을 때 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 방출돼 항균성이 증가하는지 알아보았다. 준비된 은 나노 입자가 도핑 된 실리카는 100~500 nm 크기의 비결정성 실리카 표면에 20 nm 이하 결정성 은 나노 입자가 화학적 결합(Si-O-Ag)을 하는 형태로 준비하였다. 은 나노 입자가 도핑 된 실리카의 밴드 갭은 2.10 eV로 감소했고 이로서 가시광선 영역의 빛을 조사할 때 표면 플라즈몬 공명이 일어날 수 있었을 것으로 예상되었다. 실제 은 나노 입자가 도핑 된 실리카가 가시광선 영역의 빛을 받으면 ROS가 방출되는 것을 확인하였다. 은 나노 입자가 도핑 된 실리카 함유량이 전체 레진 대비 0.7~1.5 wt%에서 가시광선을 받지 않았을 때보다 통계적으로 유의미하게 높은 항균성을 보였다. 0.7 wt% 이하에서는 레진 표면에 노출된 필러 양이 부족하여 충분한 ROS가 방출되지 않았으며 1.5 wt% 이상에서는 ROS 효과 대비 은 나노 이온의 효과가 상대적으로 크기 때문에 본 연구 결과에 따라 은 나노 입자가 도핑 된 실리카에 가시광선을 조사해 기존 항균성보다 높은 항균성을 얻고 싶다면 0.7~1.5 wt%의 필러를 첨가해야 할 것으로 사료된다.

색인단어 : 은, 실리카, 활성산소, 가시광선, 밴드갭, 항균
