

저온플라즈마방법으로 클로르헥시딘
코팅한 티타늄의 *S.aureus*에 대한
항균특성

Anti-Bacterial Properties of Chlorhexidine Coated
Titanium on *S.aureus* using a Low Temperature
Plasma Process

2008년 8월 25 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

윤 창 섭

저온플라즈마방법으로 클로르헥시딘
코팅한 티타늄의 *S.aureus*에 대한
항균특성

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위 논문으로 제출함.

2008년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

윤 창 섭

윤창섭의 박사학위 논문을 인준함

위원장	부산대학교	교수	김형일	인
위원	전북대학교	교수	배태성	인
위원	조선대학교	교수	김홍중	인
위원	조선대학교	교수	최한철	인
위원	조선대학교	교수	고영무	인

2008년 6월 일

조선대학교 대학원

목 차

<i>ABSTRACT</i>	v
제 1장 서 론	1
제 2장 저온플라즈마의 이론적 배경	3
1. 플라즈마의 개념	3
2. 플라즈마의 종류	3
3. 플라즈마 중합반응	4
4. 플라즈마 표면개질	7
가. 고분자의 표면개질	7
나. 접착력 향상	8
다. 생체재료응용	10
제 3장 실험재료 및 방법	11
1. 실험재료	11
2. 플라즈마 반응기	12
3. 플라즈마 중합반응	12
4. 클로로헥시딘 그래프팅	13
5. 표면분석	13

제4장 실험결과 및 고찰	15
1. 플라즈마 표면개질	15
2. 클로로헥시딘 그래프팅 반응	19
3. <i>S.aureus</i> 항균평가	19
 제5장 결 론	 22
 참고문헌	 23

LIST OF TABLES

Table 1. Classification of plasma applications	5
Table 2. The conditions of plasma process	13

LIST OF FIGURES

Fig. 1. States of matter by temperature	5
Fig. 2. Category of plasma by electron density and temperature	6
Fig. 3. Bicyclic step-growth mechanism of plasma polymerization	6
Fig. 4. Molecular structure of chlorhexidine	11
Fig. 5. Schematic of plasma reactor	14
Fig. 6. Contact angles at different plasma first stage reaction conditions	16
Fig. 7. Contact angles at different plasma second stage reaction conditions	16
Fig. 8. FT-IR spectra on titanium (A), poly acrylic acid (B) and plasma treated titanium (C)	17
Fig. 9. SEM image and EDX spectrum of plasma treated titanium	18
Fig. 10. FT-IR spectra on titanium (A), chlorhexidine (B) 1 hr chlorhexidine grafted titanium (C), 2 hr chlorhexidine grafted titanium (D)	20
Fig. 11. SEM image and EDX spectrum of 1 hr chlorhexidine grafted titanium	21
Fig. 12. Anti- bacterial effect of <i>S. aureus</i> on chlorhexidine grafted titanium surface	21

ABSTRACT

Anti-Bacterial Properties of Chlorhexidine Coated Titanium on *S.aureus* using a Low Temperature Plasma Process

Chang-Suep Yoon, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Yeong-Mu Ko, DDS, Ph.D.

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Titanium is used as biomaterial in dental, orthopedic and cardiovascular fields. Dental and orthopedic implants-related bacterial infection is a major rising clinical problem. Chlorhexidine is generally use as disinfectant or antibiotics in medical science.

The aim of this study was to investigate the effect of antibacterial of chlorhexidine grafted Cp-titanium by plasma polymerization process. Cp-titanium surface was modified with acrylic acid plasma polymerization to have carboxyl group on the surface and then grafted with chlorhexidine grafting solution. Anti-bacterial behavior was tested the chlorhexidine coated titanium surface by serial dilution method and microscopic examination. Chlorhexidine inhibited the growth of the *S. aureus* on a Cp-titanium. These results are in focused on immobilizing bio-active molecules on metal surfaces.

제1장 서론

현재 미국에서는 인공관절 및 인체 내 고정기구 시술을 요구하는 환자의 수가 가파르게 상승하고 있다. 미국인구의 1.2% 이상의 사람이 적어도 한 개 이상의 체내 고정 장치를 장착하고 있고, 0.35%의 사람들은 인공관절을 장착하고 있다⁵⁾. 비록 정형외과와 치과 임플란트 시술의 성공이 골-임플란트 융합에 의존한다 할지라도, 시술된 임플란트의 장기간 생존과 성공은 임플란트 주변 박테리아의 유무에 의하여 좌우된다고 할 수 있다. 임플란트 식립 후에 일어나는 박테리아 감염은 심각한 합병증을 유발한다. 비록 박테리아 감염이 임플란트 식립 실패에 대한 일반적인 이유가 되지 않을 지라도 엄청난 의료비용이나 사망률의 증가 그리고 환자만족도의 감소 원인이 될 수 있다⁶⁾. 임플란트 주위에서 감염 발병률을 감소시키기 위하여 다양한 생체재료 표면 처리방법들이 제안되었다. 생체재료 표면에 항균특성을 부여하는 방법으로 재료표면에 기능기를 부착하여 공유 다중양이온부착^{7,8)}, 키토산 나노입자의 로딩 혹은 침적⁹⁻¹¹⁾, 또는 임플란트 표면에 암모니움 화합물이나, 요오드 혹은 은 이온들의 코팅과 같은 표면처리방법들이 이용되었다¹²⁻¹⁵⁾. 티타늄 표면의 골 융합을 개선시키기 위하여 많은 표면개질법이 제안되어왔다. 플라즈마 표면개질법은 표면 및 계면공학에서 접착성, 친수성, 소수성, 내식성 그리고 선택적 표면 에칭 및 세정성을 개선하기 위하여 사용되어져 왔다¹⁶⁻¹⁸⁾.

클로르헥시딘은 Bisbiguanide 계통의 약물로서 처음으로 구강 내 적용 시 치태형성을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려진 이래 가장 효과적이고, 안전한 항균제로 널리 사용되고 있으며, 모든 미생물에 대하여 광범위한 활성을 가지며 그람양성균에는 더욱 효과적이라고 알려져 있다¹⁾. 클로르헥시딘은 대칭성의 양이온 분자로서 수산화인회석(hydroxylapatite), 치아의 유기물질(organic pellicle), 타액 단백질과 미생물 등에 강하게 부착하는데 사용되는 농도에 따라 작용효과는 다르게 나타나고 있다. 즉, 저 농도의 경우 미생물의 세포벽 수송체계(transport system)를 방해하는 정균(bacteriostatic)효과를, 고 농도의 경우 세포벽을 붕괴시켜 세포내 단백질 유출을 야기하는 살균(bacteriocidal)작용을 갖는다²⁻⁴⁾.

플라즈마 기술의 주요원리는 전자기장에 의해 이온화되고 여기된 분자 라디칼들이 재료의 표면과 반응하는 것이다. 이들 이온들과 라디칼들은 재료표면에서 에칭, 스퍼터, 또는 증착되고 결론적으로 재료의 표면특성이 개선된다. 플라즈마 기술은 상온이며 환경 친화적이다. 이러한 특징들로 인해 플라즈마 기술은 금속, 합금판, 고분자 필름, 종이, 유리 및 특별한 재료를 포함하는 거의 모든 재료의 표면개질 및 박막증착에 이용되고 있다. 플라즈마의 물리적, 화학적 특성은 가스압력, 온도, 유속, 화학종, RF 출력, 반응기 형태 및 전극설계 등 많은 변수에 의존한다. 고분자 생체재료는 세포연구 및 조직공학에 광범위하게 사용되고 있다. 대부분의 경우, 고분자재료에 생체분자를 부착하거나 기능기를 도입하거나 필요한 표면특성을 부여하는데 있어서 표면개질 또는 기능화를 수행한다. 재료표면에 폴리아크릴산(poly acrylic acid, PAA)을 그래프팅 하는 방법은 편리하고 광범위하게 쓰이는 기술이다. 이 방법은 생물학적 응용을 위한 표면개질 이나 기능기도입의 기초적인 기술로 사용되어 왔으며, 대부분의 생체분자들이 PAA사슬 말단의 카르복실기(-COOH)와의 반응을 통하여 결합 될 수 있다.

본 연구에서는 임플란트의 주요소재인 티타늄표면에 플라즈마 중합반응을 이용하여 폴리아크릴산을 코팅하고, 이를 클로로헥시딘 용액에 침전하여 그래프팅 한 다음, 티타늄표면의 *S.aureus*에 대한 항균효과를 조사하고자 하였다.

제2장 저온 플라즈마의 이론적 배경

1. 플라즈마의 개념

재료공정에 있어서 저온 플라즈마의 사용은 야금으로부터 컴퓨터 칩, 금속, 반도체 및 고분자를 포함하는 폭 넓은 다양한 물질의 커버까지 상당히 많은 기술 분야에서 사용되고 있다. 플라즈마는 고체, 액체 및 기체와 구분되는 물질의 제4의 상태라고 할 수 있고, 중성입자와 전하를 띤 입자들의 준 중성(quasi-neutral)기체로 정의한다. Figure 1은 온도에 따른 물질의 상태를 나타낸다. 저온 플라즈마는 에너지와 흐름을 조절할 수 있는 양이온, 중성이온, 준안정 중, 전자, 광자와 같은 활동적인 입자의 균일한 흐름을 만들 수 있다. 기질은 플라즈마 처리된 계면에서 물리적 그리고 화학적 조성을 주는 활동적인 입자와 충돌에 의해 접하게 된다. 플라즈마 sheath를 통해 가속화된 이온에 의한 계면 충돌은 계면에서 발생하는 공정에 영향을 줄 수 있고 증착된 필름과 처리된 계면의 성질에 영향을 줄 수 있다. 물리적 조성은 막을 에칭 하는 동한 방향성을 줄이거나 표면 반응 단계를 촉진시킴으로서 증착된 필름의 성질을 바꿀 수 있다.

플라즈마 공정의 사용은 습식공정 기술의 사용에 있어서 생기는 문제점들을 피하기 위한 필요성 때문에 확대되고 있다. Table 1에 저온 플라즈마의 응용에 대해 요약해 놓았다. 응용은 공급된 가스의 유형, 계면의 반응의 생성물, 그리고 이온 충격의 강도에 따라 구분할 수 있다.

2. 플라즈마의 종류

플라즈마에는 두 종류가 있는데, 하나는 이온화 정도가 높고 구성 요소들이 열역학적으로 평형 상태에 있으며 평균온도가 수 만도에 달하는 “고온 플라즈마”이고 다른 하나는 이온화 정도가 극히 미미하고(이온 농도; 10^{-5} - 10^{-6})구성요소들이 열역학적으로 평형을 이루고 있지 않으며 평균온도가 상온보다 약간 높은 “저온 플라즈마”이다. 플라즈마 중합에 사용되는

플라즈마는 후자의 저온 플라즈마(low temperature plasma 또는 cold plasma)이다. Figure 2는 전자밀도와 온도에 따른 플라즈마의 분류를 나타낸다. 저온 플라즈마는 저압 상태에 있는 기체나 유기 증기들을 전기적으로 방전시키면 손쉽게 얻을 수 있다. 이 때문에 플라즈마 중합은 한 때 “glow discharge polymerization” 으로 불리기도 하였다.

저온 플라즈마는 다시 기체 및 증기들의 종류에 따라 세 그룹으로 분류될 수 있다. 첫 번째는 불활성 기체들의 플라즈마로서 화학 반응이 거의 일어나지 않는다. 두 번째는 수소, 산소, 질소, 이산화탄소 등과 같이 아주 간단한 기체들의 플라즈마로서 각종 반응기들이 생성되어 주위의 고체 표면과 화학반응들을 일으키지만 고분자 물질은 생성되지 않는다. 세 번째는 그 이외의 모든 기체 및 증기들의 플라즈마로서 화학 반응과 함께 고분자 물질이 생성되는 플라즈마 중합용 플라즈마이다. 플라즈마 중합을 이용하면 메탄과 같이 특정한 반응기들을 가지고 있지 않는 비활성 기체들의 중합도 가능하다.

3. 플라즈마 중합반응

플라즈마 중합반응은 기체 및 증기들의 분자들이 플라즈마 상태에서 반복적으로 활성화-비활성화 (consecutive activation-deactivation) 단계를 거치면서 고분자로 성장해 가는 과정이라 볼 수 있다. 반응기에 주입된 기체나 증기의 분자들이 플라즈마 내에 존재하는 전자, 이온, 광자 등과 같이 높은 에너지를 가지고 있는 입자들과 충돌하여 에너지를 흡수하는 활성화 단계에서는 들뜬 상태의 분자들, 자유 라디칼, 이온, 이온-라디칼 등과 같은 반응기들이 생성되고, 비활성화 단계에서는 이렇게 생성된 반응기들이 낮은 에너지 상태에 있는 분자들 또는 주위의 고체 표면과 충돌하여 에너지를 방출하면서 더 큰 분자로 결합해나간다. 비 활성화된 분자들은 또 다시 활성화될 수 있으며 이 과정은 플라즈마 조건이 사라질 때까지 반복된다. Figure 3은 플라즈마 중합반응의 2단계 메카니즘을 단순하게 나타낸 모식도이다.

Table 1. Classification of plasma applications

	Inert gas plasma	Reactive gas plasma	
		Non-volatile surface product	Volatile surface product
Low ion bombardment	Plasma cleaning	plasma oxidation, Surface activation, Surface hardening, Polymerization, Film depositon	Surface activation, Plasma ashing, Plasma etching
High ion bombardment (high negative bias)	Sputtering, Sputter etching	Reactive sputter etching	Reactive ion etching

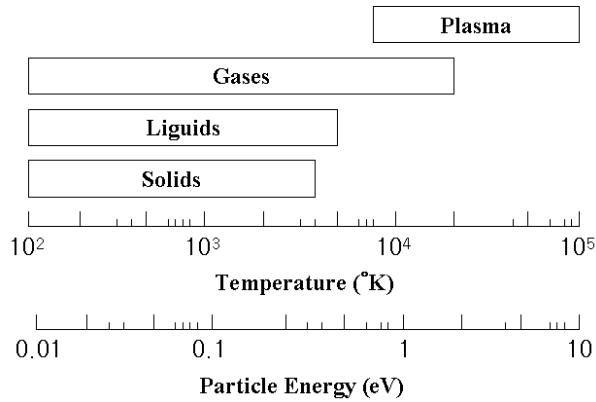


Figure 1. States of matter by temperature.

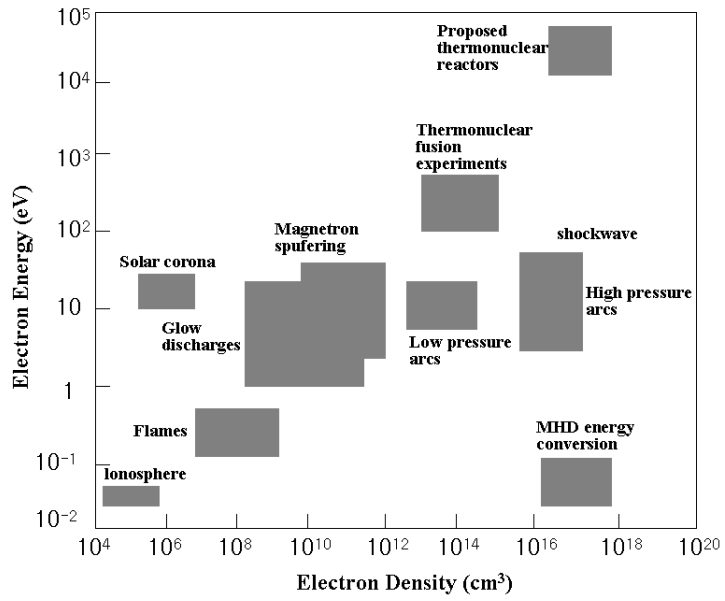


Figure 2. Category of plasma by electron density and temperature.

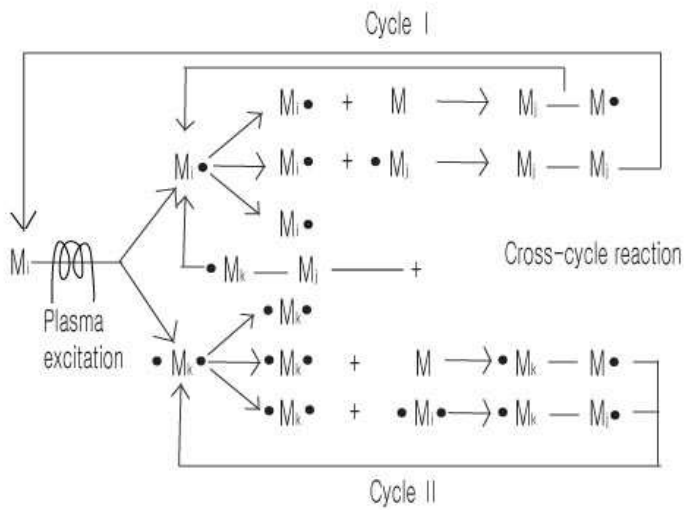


Figure 3. Bicyclic step-growth mechanism of plasma polymerization.

4. 플라즈마 표면개질

가. 고분자의 표면개질

고분자의 계면 활성화를 위해 저온 플라즈마를 사용하는 것은 이미 1968년 Beauchamp와 Buttrill에 의해 제시되었다. 고분자끼리 혹은 다른 물질과의 접촉은 일반적으로 어렵다. 화학적 활성이 없고 열 안정성, 그리고 절연 성질이 있는 것으로 알려진 fluoropolymer와 같은 고분자는 다른 물질과 결합하지 않는 낮은 계면 장력을 가진다. 플라즈마 계면 처리는 내부 성질에는 영향이 없이 향상된 결합을 얻기 위해 고분자의 계면 성질을 개질한다. 고분자 계면의 성질을 개질하는데 사용된 방법으로는 계면 활성화, 증착, 그래프팅과 같은 것들이 있다. 적당한 플라즈마에 고분자가 노출되면 고분자의 계면 혹은 계면 층의 물리적 그리고 화학적 변화를 일으킬 수 있다. 이러한 변화는 좀더 반응성 있는 계면을 만들고 젖음 성질과 가교결합 및 분자량 등에 영향을 준다. 계면 처리된 고분자는 젖음 성질과 접착성, barrier protection, 재료 선택성, 그리고 심지어는 생체적합성까지 필요한 성질을 갖게 한다. 고분자의 계면 활성화는 활성을 가진 플라즈마 입자와 고분자 계면과의 상호작용에 토대를 두고 있다. 플라즈마 활성화는 산소, 질소, 질화물, 암모니아 혹은 비활성 기체와 같이 중합되지 않는 가스에서 여기된 플라즈마를 사용한다. 에너지를 갖은 입자와 고분자 계면의 충돌은 계면의 공유결합을 깨고 처리된 고분자의 계면에 라디칼을 형성한다. 이 계면의 라디칼은 기질의 계면에 다양한 화학적 기능성 그룹을 형성하기 위해 플라즈마의 활성 종과 반응을 한다. 계면의 오염물질에 약하게 싸여진 고분자 층은 반응기의 펌프에 의해 제거된다. 몇 십분 동안 산소와 질소 플라즈마 처리를 하게 되면 대부분의 고분자에 친수성을 만들 수 있다. 활성이 있는 플라즈마 종은 고분자 계면을 공격하고 카르보닐과 카르복실, 하이드록실, 그리고 아미노 그룹과 같은 친수성 그룹을 고분자의 계면에 형성하게 된다. Inagaki는 친수 개질에 중요한 역할을 하는 전자와 이온 종보다 더 나은 라디칼 종을 보고하였다. 산소 플라즈마에서 다양한 재료의 처리는 계면의 젖음 성질과 접착성을 향상시킬 수 있

는 방법 중 하나이다. 플라즈마 처리는 접착성을 증가 시키는 극성 그룹을 고분자의 계면에 주입 시킨다. 산소 중은 처리된 고분자의 계면에서 그들 스스로 합쳐질 수 있다. 그러나 고분자의 분해와 가교결합 역시 산소 플라즈마 의해 일어난다. 산소 라디칼에 의해 개질된 폴리에틸렌의 계면은 산소 플라즈마에 직접적으로 드러나 개질된 것과 같은 기능성 그룹을 가지고 있다. 두 처리는 고분자의 계면에 카르보닐과 카르복실 그룹을 형성하고 산소 플라즈마 처리된 고분자의 계면에는 매우 작은 양 (0.02 %)의 하이드록실기 그룹을 만들며, 따라서 플라즈마 처리된 계면은 좋은 접착성을 갖게된다.

나. 접착력 향상

폴리올레핀을 위시한 대다수의 고분자 소재들은 페인트나 잉크 등을 도장하거나 접착제 등을 사용하여 다른 소재들과 접합하고자 할 때 접착력이 떨어지는 문제점을 안고 있다. 페인트나 잉크 등이 강하게 접착되려면, 우선 이들이 잘 적셔지도록 피착제의 표면에너지가 높아야 하고, 피착제의 표면에는 페인트나 잉크의 고체 성분들과 화학 결합, 수소 결합, 극성 결합, 또는 산-염기 상호작용 등과 같은 강한 결합을 일으킬 수 있는 기능기가 존재하여야 하지만, 대부분의 고분자 소재들은 표면에너지가 낮아서 거의 반응성을 보이지 않는다. 고분자 소재들의 표면에너지와 반응성을 높이기 위한 노력은 오래 전부터 시작되어 화학 처리 등 여러 가지 방법들이 이용되어 왔으나, 최근에는 화염 처리, 코로나 방전 처리, 플라즈마 처리와 같은 건식 방법에 보다 많은 관심이 집중되고 있다. 하지만 이러한 방법들도 몇 가지 단점을 지니고 있는데, 플라즈마 중합은 이러한 단점들을 보완해줄 수 있다.

화염이나 코로나 방전 처리는 주로 고분자 소재들의 표면을 산화시키는 방법이라 볼 수 있다. 따라서 산화물 이외의 기능기를 도입하기가 어렵다. 또한, 각종 산화물들이 동시에 생성되므로 원하는 특정 산화물 한 가지만을 독립할 수 없다. 플라즈마 처리(고분자 물질이 생성되지 않은 저온 플라즈마)의 경우에는 암모니아와 같이 산소가 포함되어 있지 않은 기체를 사용하면 산화물 이외의 기능기도 도입할 수 있다. 하지만 특정 기능기 한 가지만을 선택

적으로 도입할 수 없기는 마찬가지다. 플라즈마 중합을 이용하면 이러한 문제점을 해결할 수 있는데, 그 예로서, C(O)OH 기를 선택적으로 도입하고자 할 경우에는 아크릴산을, 그리고 NH₂ 기를 선택적으로 도입하고자 할 경우에는 diaminocyclohexane을 적절한 공정 조건 하에서 플라즈마 중합시키면 된다. 폴리에틸렌에 아크릴산을 플라즈마 중합시켜 높은 밀도의 C(O)OH 기를 도입할 경우에는 물과의 접촉각을 15°까지 낮출 수 있는 것으로 알려져 있다.

화염, 코로나 방전 및 저온 플라즈마로 처리된 고분자 소재들의 표면 화학 구조는 노화 현상(ageing)을 보이는 경우가 많다. 이는 각 분자들과 한 분자 내의 화학 그룹들이 가지고 있는 이동성 때문으로, 표면에 있던 분자 또는 화학 그룹들이 주위의 환경이 변함에 따라 내부로 숨어버릴 수 있기 때문이다. 폴리올레핀과 같이 골격을 구성하는 탄소 원자들이 단일 결합으로 이루어져 있으며 가교가 되어있지 않은 선형 고분자들의 분자들은 비록 느린 속도일지라도 끊임없이 움직이고 있으며, 분자의 축을 중심으로 하여 회전도 쉽게 일어날 수 있다. 플라즈마 고분자들은 가교되어 있기 때문에 이러한 문제점을 최소화 시킬 수 있다. 고분자 소재들은 다른 종류의 고분자 또는 금속 등과 접착제로 접합되어 사용되는 경우가 많은데, 이 경우 어느 한쪽 또는 양쪽에 플라즈마 고분자 박막을 접착력을 크게 향상시킬 수 있다. Inagaki 등은 폴리에틸렌, 테플론, 알루미늄 및 스테인리스 스틸 판에 메탄, 에틸렌, 및 아세틸렌 플라즈마 고분자를 입히고, 접착제를 사용하여 플라스틱/플라스틱 및 플라스틱/금속의 접합 조인트를 만들어 접착력을 특정한 결과 접착력이 3-10배까지 향상됨을 보고한 바 있다. 이러한 접착력의 향상의 예는 많으나, 여기에서 특히 강조되고 있는 것은 접착력 향상의 효과가 접합 조인트가 처해있는 환경에 따라 달라진다는 것이다. 접착 후 바로 측정했을 때에는 아세틸렌, 에틸렌, 메탄 플라즈마 고분자 순으로 나타났던 접착력 향상 효과가 접합 조인트들을 70도의 물에 담근 후에 측정했을 때에는 반대로 메탄, 에틸렌, 아세틸렌 플라즈마 고분자 순으로 변화되었다.

다. 생체재료 분야응용

플라즈마 중합은 인공 장기들의 생체적합성 향상에 응용될 수 있는데, 두 가지 방향으로 생각해 볼 수 있다. 첫 번째는 생체적합성이 우수한 poly(ethylene oxide)나 헤파린 등을 그래프팅할 수 있도록 화학적으로 반응성이 강한 박막을 코팅시키는 것으로서, 높은 밀도의 NH_2 기를 포함하고 있는 플라즈마 고분자가 이 목적에 적합한 것으로 알려져 있다. 두 번째는 그 자체로서 생체적합성이 좋은 박막을 코팅하는 것이다. 혈액성분들의 흡착은 피 흡착체의 표면에너지가 Baier's window로 알려진 20-30 mJ/m^2 내에 있을 때 가장 약한 접착력을 가지며, 접착력이 약하면 흡착된 단백질들이 변성되기 전에 새로운 단백질들로 교체됨으로써 platelet의 성장이 둔화된다고 알려져 있다. 이 때문에 비교적 낮은 표면 에너지를 가지는 organosilicon과 fluorocarbon 플라즈마 고분자들이 주로 생체적합성 박막으로 연구되고 있다. 하지만 플라즈마 고분자의 생체적합성은 화학 조성보다는 잘 발달된 3차원 구조로 가교되어 있는 구조적 안정성에서 기인하다는 견해도 있다. 플라즈마 중합은 또한 콘택트렌즈의 표면 개질에도 응용되고 있는데, 주로 눈물이 잘 적셔지도록 친수성 박막을 코팅하는 것이 일반적이다. 콘택트렌즈들의 표면을 친수성으로 개질하는 방법에는 여러 가지가 있으나, 플라즈마 중합을 이용하면 시효효과를 줄일 수 있다. 플라즈마 중합은 또한 소프트 렌즈의 소재인 실리콘 고무가 가지고 있는 문제점인 이물질의 흡착에 의한 오염을 방지하는데 효과적인 것으로 알려져 있다. Ho 등은 실리콘 콘택트렌즈에 얇은 메탄 플라즈마 고분자 박막을 입힘으로써 산소의 투과도에 영향을 주기 않고 이물질의 흡착에 의한 오염을 방지할 수 있었다.

제3장 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서는 임플란트의 주요재료로 사용되는 티타늄 시편은 1cm×1cm의 크기로 절단하여 사용하였고, 티타늄표면에 고분자중합체를 코팅하고 클로르헥시딘을 그래프팅 시켰다. 플라즈마 중합 단량체로는 AA (Acrylic Acid, 99.0%, JUNSEI. Co. Japan)를 사용하였고, 티타늄시편 표면에 카르복실기를 생성하기 위해 단량체인 아크릴산을 사용하였다. 한편 클로르헥시딘(Chlorhexidine, Sigma, Co. Ltd., USA)의 분자구조를 나타내었다 (figure 4). 그래프팅 용액은 구연산 나트륨과 EDAC(1-ethyl-3-dimethylaminopropyl carbodiimide)로 제조하였고 용액의 pH는 염산으로 조절하였다. 또한 실험에 사용된 모든 물은 2차 증류수를 사용하였고, 플라즈마 생성을 위해 고순도 아르곤가스 (99.99%, 대성산업가스)를 사용하였다. 아크릴판의 세척은 초음파 세척기 (ultra sonic, BRANSON-3210)로 아세톤과 에탄올용액에서 20분간 세척 후 2차 증류수로 다시 10분간 세척하였다. 세척 후 건조기에서 24시간 이상 건조시켜 사용하였다.

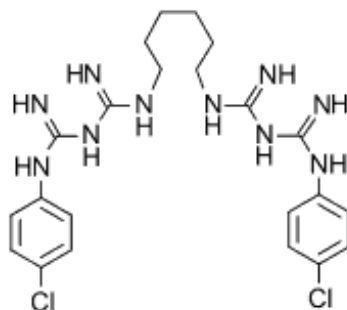


Figure 4. Molecular structure of Chlorhexidine.

2. 플라즈마 반응기

플라즈마 중합반응은 관형 반응기(tubular reactor)에서 진행하였다. 재질은 Pyrex 유리관으로 유리관의 양쪽을 스테인레스관 으로 막고 유리관의 바깥 둘레를 따라 구리관 전극을 설치하였다. 반응기 부피는 4435 cm^3 , 유리관 반응기 전체의 길이는 28 cm, 내경은 14.2 cm, 두께는 0.4 cm이고 두께 0.02 cm인 접지 전극 구리관의 너비는 11.5cm, 열 전극 구리관 너비는 5.7 cm로 하였다. 접지 전극은 진공 펌프 쪽 유리관 끝에서 2.5 cm 떨어진 위치에 고정시켰으며 접지 전극과 열 전극 사이의 거리는 2.3 cm이다. 플라즈마를 발생시키기 위해 RF 전력 공급 장치 (RF power supply, 13.56MHz, ST350)와 매칭 네트워크 (matching network, LC 1000, USA)를 이용하여 발생시켰다. 압력계이지 (Bratron 122B type, USA)와 압력기록계(PDR-D-1 type, digital readout from MKS, USA)를 사용하여 반응기내 압력 증가량을 측정하였다. 진공펌프는 로터리 펌프 (PHI type, 3/4HP, RPM 1725, Marathon electric)를 사용하였다. Figure 6은 플라즈마 반응기의 개략도를 나타낸 것이다.

3. 플라즈마 중합반응

플라즈마 중합반응은 유리재질의 샘플 고정대위에 티타늄 판을 위치시키고 로터리펌프를 이용하여 50 mtorr 이하까지 배기한 후 Ar 플라즈마로 전 처리하여 표면을 활성화시켰다. 그 후 증기 상태의 아크릴산 단량체를 니들밸브를 이용하여 일정한 유량으로 유입시킨 후 RF 전력 공급 장치로 플라즈마를 발생시켜 적절한 시간 동안 플라즈마 중합을 시켰다. 아크릴산 플라즈마 중합조건은 다음과 같이 진행하였다. 플라즈마 중합공정은 아크릴산 단량체의 유량을 일정하게 하고 티타늄표면과의 접촉성과 중합도를 향상시키기 위해서 플라즈마반응처리를 두 단계로 나누어 실시하였다 (Table 2). 티타늄시편은 표면에 생성된 폴리아크릴산의 존재를 확인하기 위하여 FTIR-ATR를 이용하여 분석하였고, 접촉각을 측정하였다.

Table 2. The conditions of plasma process

플라즈마반응 1단계 공정조건*		플라즈마반응 2단계 공정조건*	
60W(2min)	20W(5min)	70W(2min)	10W(5min)
70W(2min)	20W(5min)	70W(2min)	15W(5min)
80W(2min)	20W(5min)	70W(2min)	20W(5min)

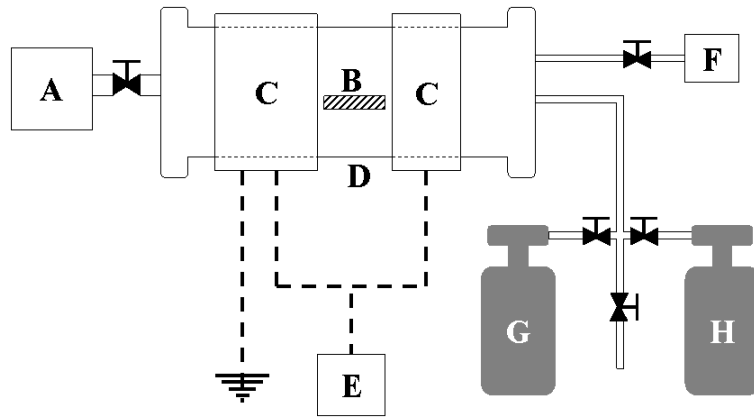
*유량 100mTorr로 10초간 통과시켰으며, 반응종료 후 1분간 진공을 유지함.

4. 클로르헥시딘 그래프팅

클로르헥시딘을 표면개질된 티타늄표면에 그래프트 하기위하여 그래프팅용액을 다음과 같은 순서로 제조하였다. 먼저 구연산나트륨을 0.075 mol/l 로 제조하여 1N HCl 용액을 이용하여 구연산나트륨 용액을 pH 5로 제조하였다. 제조된 용액 중 20 ml를 채취하여 클로르헥시딘 0.03g과 carbodiimide 0.03g 넣은 후 교반 및 미지근하게 가열하면서 1시간 동안 활성화시켰다. 최종적으로 폴리아크릴산이 코팅된 티타늄을 상온에서 Chlorhexidine용액에 침적시켜 그래프팅시간을 1시간 또는 2시간 침적하였다.

5. 표면분석

티타늄 표면의 폴리아크릴산은 FTIR/ATR(Jasco-430, MIRacle Accessory, Japan)을 이용하여 분석하였으며 티타늄 표면관찰은 SEM으로 분석하였다. XPS, EDX로 표면에 존재하는 원소들을 확인하였다. 표면의 카르복실기에 의한 친수성의 변화를 확인하기 위해 접촉각 (ERMA-INC, G-I, Japan)을 측정하였다.



A	: vacuum pump	E	: R.F generator
B	: sample	F	: pressure gauge
C	: electrode	G	: gas
D	: chamber	H	: gas

Figure 5. Schematic of plasma reactor.

제4장 실험결과 및 고찰

1. 플라즈마 표면개질

Figure 6은 플라즈마 1단계 반응조건 변화에 따른 접촉각 변화를 나타낸 것이다. 플라즈마출력은 60W에서 80W까지 조절하며 반응시간을 2분으로 유지하였다. 그 후 다시 20W에서 5분을 유지하여 고분자막 (폴리아크릴산)을 코팅하고 접촉각을 측정하였다. 순수 티타늄 표면의 접촉각은 79.5도를 보여 주었고, 70W 2분-20W 5분의 플라즈마 반응조건에서 고분자막이 코팅된 티타늄표면의 접촉각은 45도를 유지함을 알 수 있었다. 그러나 상대적으로 약한 플라즈마출력 60W에서는 상대적으로 큰 접촉각을 보였다. 이것은 약한 플라즈마파워에서는 고분자 중합이 충분히 일어나지 않은 것으로 사료된다.

2단계 플라즈마 반응조건에서 접촉각의 변화를 Figure 7에 나타내었다. 70W 2분-20W 5분의 플라즈마 반응조건에서 가장 큰 접촉각을 보였다. 이것은 티타늄표면에 카르복실기가 많이 존재할수록 친수기로 변한다는 이론과 일치한다고 사료된다.

Figure 8은 티타늄표면에 플라즈마 중합반응처리를 하여 폴리아크릴산에 존재하는 카르복실기(C=O) 피크를 FT-IR 스펙트럼으로 나타낸 것이다. 플라즈마 반응 70W 2분-20W 5분 조건에서 처리한 티타늄표면 (C)에서 카르복실기를 나타내는 C=O 피크는 1700cm^{-1} 근처에서 관측되었다. Figure 9는 플라즈마 처리하여 폴리아크릴산이 코팅된 티타늄표면의 형상을 전자현미경 사진으로 보여준 것이고, 그 표면의 성분을 EDX로 분석하여 나타낸 것이다. EDX결과에서 산소와 탄소 그리고 티타늄의 존재를 확인 할 수 있었다. 또한 전자현미경의 관찰결과에서는 아크릴산이 중합되어 티타늄표면에 막으로 존재함을 확인 할 수 있었다.

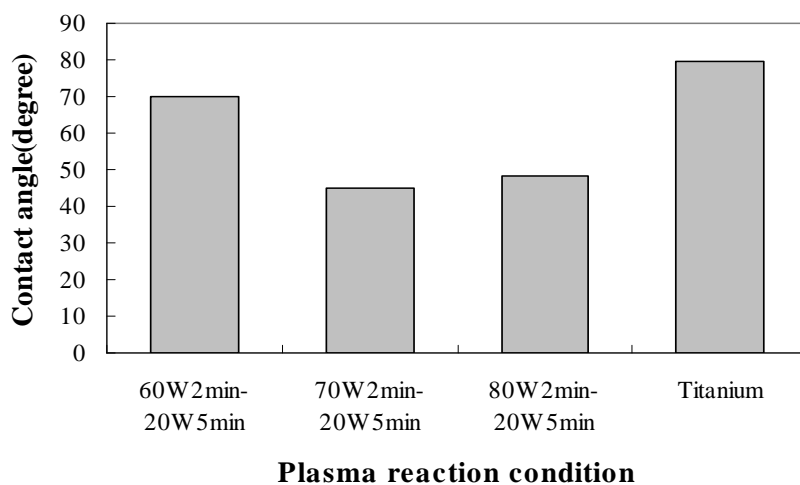


Figure 6. Contact angles at different plasma first stage reaction conditions.

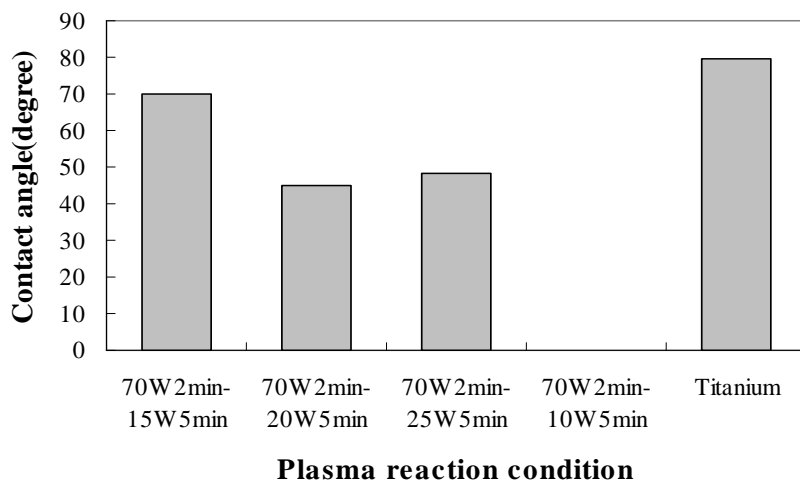
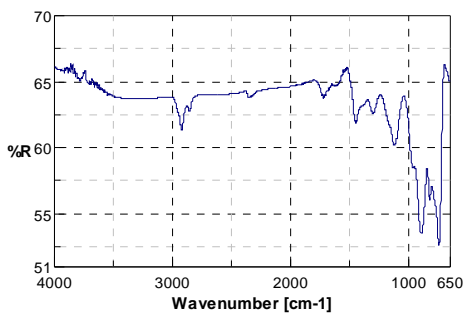
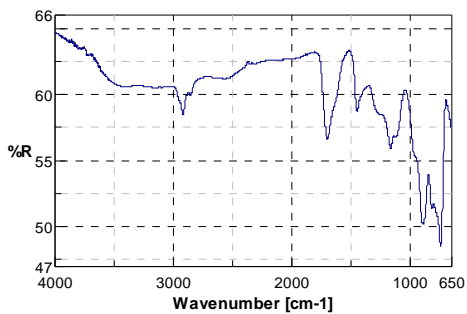


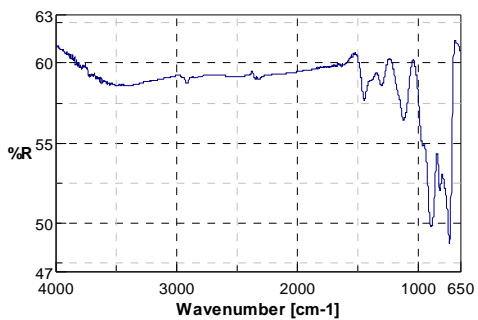
Figure 7. Contact angles at different plasma second stage reaction conditions.



(A)



(B)



(C)

Figure 8. FT-IR spectra on titanium (A), poly acrylic acid (B) and plasma treated titanium (C).

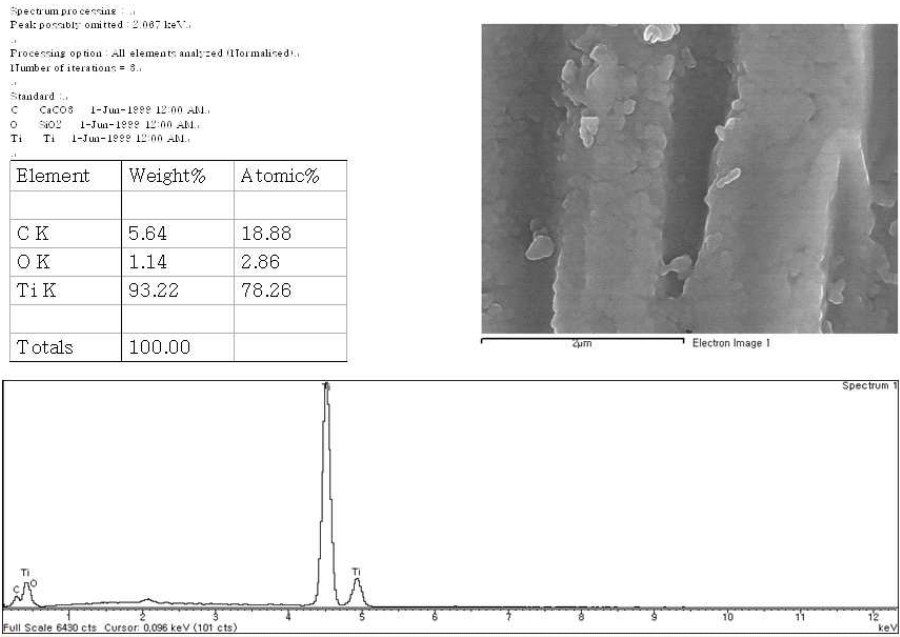


Figure 9. SEM image and EDX spectrum of plasma treated titanium.

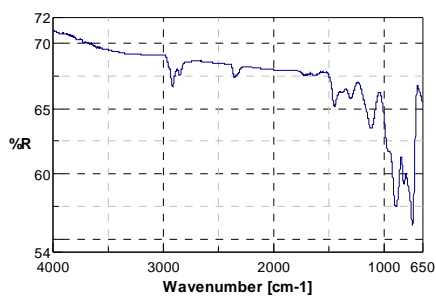
2. 클로르헥시딘 그래프팅 반응

Figure 10은 저온 플라즈마로 표면개질 처리를 하여 티타늄 표면에 폴리아크릴산 (PAA)박막을 코팅하고, 이 시편을 클로르헥시딘 용액에 1시간과 2시간 동안 그래프팅하여 티타늄표면을 FT-IR로 분석한 결과이다. 클로르헥시딘 용액의 스펙트럼과 클로르헥시딘을 1시간, 2시간동안 그래프팅한 티타늄 표면의 스펙트럼은 유사한 양상을 보였다.

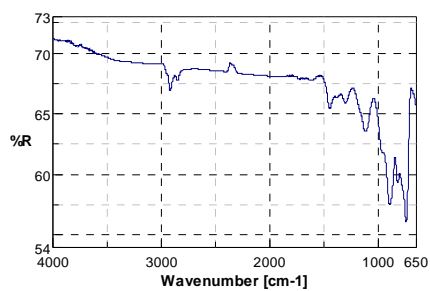
Figure 11은 그래프팅한 티타늄표면의 전자현미경사진과 EDX결과를 나타낸 것이다. 전자현미경의 표면관찰에서 클로르헥시딘이 존재함을 확인 할 수 있었고, EDX 피크로 클로르헥시딘의 염소원소의 존재를 확인할 수 있었다.

3. *S. aureus* 항균평가

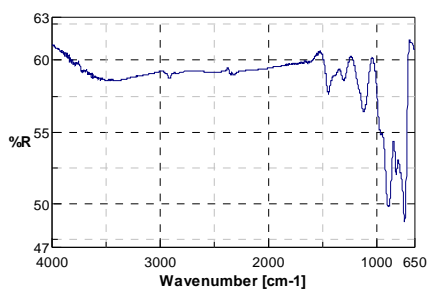
항균평가실험에 사용된 구강 미생물은 *Staphylococcus aureus* ATCC 29231이고 KCCM에서 구입하여 배양하였다. 구입한 균주는 BHI 배지에 37°C, 24시간 배양하고 다시 균주를 희석하여 초기균수를 2×10^4 CFU/ml O.D값을 0.5로 조절하였다. 항균실험은 클로르헥시딘이 그래프팅된 티타늄시편을 실험군으로 하고, 대조군은 순수 티타늄시편과 포리아크릴산이 코팅된 티타늄시편으로 구분하여 평가하였다. Figure 12는 평판도말법에 의한 항균 실험의 결과를 나타 낸 것이다. 대조군에 비하여 실험군의 균주의 수가 현저히 감소되었음을 알 수 있었다. 이것은 티타늄표면에 그래프팅된 클로르헥시딘이 *S. aureus*에 성장을 억제 한 것으로 사료된다.



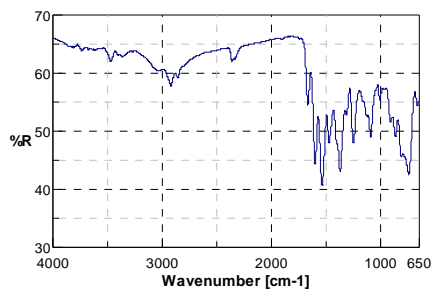
(A)



(B)



(C)



(D)

Figure 10. FT-IR spectra on titanium (A), chlorhexidine (B) 1 hr chlorhexidine grafted titanium (C), 2 hr chlorhexidine grafted titanium (D).

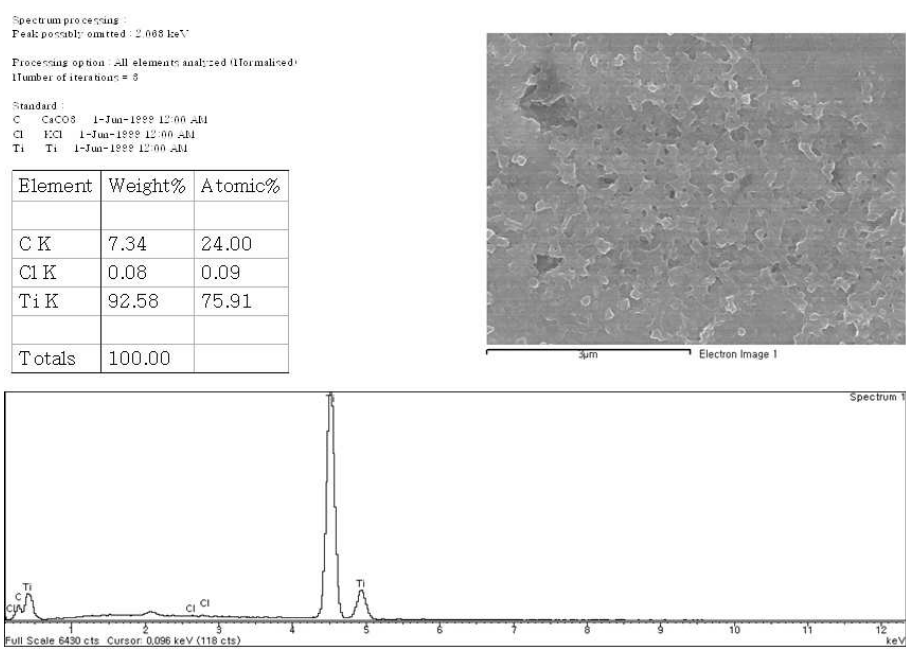


Figure 11. SEM image and EDX spectrum of 1 hr chlorhexidine grafted titanium.

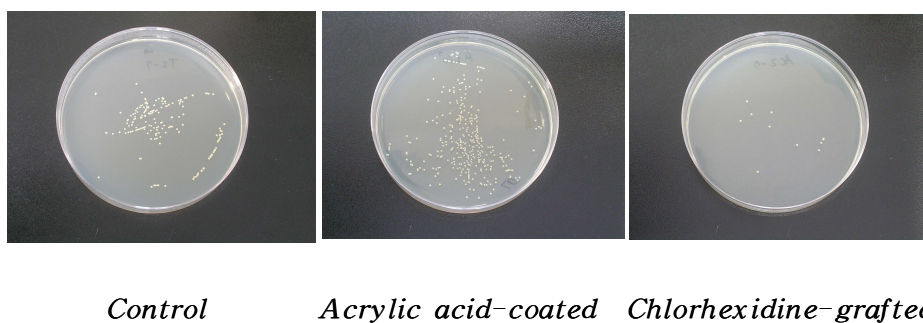


Figure 12. Anti- bacterial effect of *S. aureus* on chlorhexidine grafted titanium surface.

제5장 결 론

임플란트의 주요재료로 사용되는 티타늄 표면에 항균성을 부여하기 위하여 저온플라즈마 중합반응으로 카르복실기를 도입하고 클로르헥시딘을 그래프팅하여 *S. aureus*에 대한 항균효과를 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저온 플라즈마 중합반응으로 티타늄표면에 카르복실기가 존재하는 폴리아크릴산을 코팅하였으며, FT-IR분석으로 카르복실기의 C=O 피크 존재를 확인 할 수 있었다.
2. 저온 플라즈마 중합반응으로 티타늄표면에 클로르헥시딘 처리된 티타늄 표면 (실험군)과 무 처리 티타늄 (대조군)을 *S. aureus*에 대하여 항균실험 비교 결과, 클로르헥시딘이 *S. aureus*의 성장을 억제함을 알 수 있었다.
3. 저온 플라즈마를 사용한 티타늄 표면에 대한 폴리아크릴산의 코팅으로 티타늄 표면의 접촉각이 79.5°에서 45°로 감소되었다.

이상의 결과들에서 클로르헥시딘 코팅 치과용기소재는 *S. aureus*에 대하여 항균성이 우수한 것으로 사료되며 향후 의료용 기소재표면의 항균성 부여에 플라즈마 표면처리기술이 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- [1] Tanner J, Swarbrook S, Stuart J. Surgical hand antisepsis to reduce surgical site infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;23. [CD004288].
- [2] Edmiston Jr CE, Seabrook GR, Johnson CP, Paulson DS, Beausoleil CM. Comparative of a new and innovative 2% chlorhexidine gluconate-impregnated cloth with 4% chlorhexidine gluconate as topical antiseptic for preparation of the skin prior to surgery. *Am J Infect Control* 2007;35:89 - 96.
- [3] Napolitano LM. Decolonization of the skin of the patient and surgeon. *Surg Infect (Larchmt)* 2006;7(Suppl. 3):S3 - 15.
- [4] Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, McCarter RJ, Roghman MC. Prophylactic chlorhexidine oral rinses decreases ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)* 2001;2:5-18.
- [5] Praemer A, Furner S, Rice DP. *Musculoskeletal conditions in the United States*. IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1992. 27 - 41.
- [6] Nasser S. Prevention and treatment of sepsis in total hip replacement surgery. *Orthop Clin North Am* 1992;23:265 - 77.
- [7] Hendriks JG, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Backgrounds of antibiotic-loaded bone cement and prosthesis-related infection. *Biomaterials* 2004;25:545 - 56.
- [8] Tiller JC, Liao CJ, Lewis K, Klibanov AM. Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5981 - 5.
- [9] Cen L, Neoh KG, Kang ET. Antibacterial activity of cloth functionalized with N-alkylated poly(4-vinylpyridine). *J Biomed Mater Res A* 2004;71:70 - 80.

- [10] Shi Z, Neoh KG, Kang ET, Wang W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials* 2006;27:2440 - 9.
- [11] van de Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone cements. A review. *Acta Orthop Scand* 2001; 72:557 - 71.
- [12] Schmidmaier G, Lucke M, Wildemann B, Haas NP, Raschke M. Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: a review. *Injury* 2006;37:S105 - 12.
- [13] Yorganci K, Krepel C, Weigelt JA, Edmiston CE. In vitro evaluation of the antibacterial activity of three different central venous catheters against gram-positive bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21:379 - 84.
- [14] Nohr RS, Macdonald JG. New biomaterials through surface segregation phenomenon: new quaternary ammonium compounds as antibacterial agents. *J Biomater Sci Polym Ed* 1994;5:607 - 19.
- [15] Tyagi M, Singh H. Preparation and antibacterial evaluation of urinary balloon catheter. *Biomed Sci Instrum* 1997;33:240 - 5.

저작물 이용 허락서

학 과	치의학과	학 번	20067614	과 정	박사
성 명	한글: 윤 창 섭 한문 : 尹 彰 燮 영문 : Yoon Chang Suep				
주 소	서울시 동대문구 장안동 286-1 제노치과				
연락처	011-379-8525	E-MAIL	yoonDMD@nate.com		
논문제목	한글: 저온플라즈마방법으로 클로로헥시딘 코팅한 티타늄의 S.aureus에 대한 항균특성				
	영어: Anti-Bacterial Properties of Chlorhexidine Coated Titanium on S.aureus using a Plasma Process				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용 변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용 기간은 5년으로 하고, 기간 종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정 기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대()

2008년 8월 일

저작자 : 윤 창 섭 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하