

Silver Colloid를 이용한 젖소 유방염 치료
보조제의 개발

**Subsidiary Healer for the Cow Mastitis
with Colloidal Silver**

한경대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Silver Colloid를 이용한 젖소 유방염 치료 보조제의 개발”
과제”의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11월 19 일

주관연구기관명 : 한경대학교

총괄연구책임자 : 김 영 호

세부연구책임자 : 허 강 칠

연 구 원 : 한 홍 룰

연 구 원 : 정 경 완

연 구 원 : 김 종 태

요 약 문

I. 제 목

Silver Colloid를 이용한 젖소 유방염 치료 보조제의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Silver colloid는 은 이온(Ag^+)이 수용액에서 이온 상태로 ($10\sim 150$ nm 크기) 분산되어 있는 상태의 물질을 말하며 이러한 분산용액(colloidal state)은 약 650여 종의 유해 세균 및 곰팡이류에 대해 강한 살균력이 있음이 밝혀져 있다 [1]. 또한, 이러한 은 이온 입자들(silver colloid)은 인체에 적용하였을 경우에 대부분의 유익한 세균은 사멸시키지 않음이 관찰되고 있다. 특히 은 이온 입자 용액은 기존 항생제로는 박멸이 난해한 곰팡이균류에 있어서도 박멸효과가 뛰어난이 입증되고 있으며 염증치료에도 효과가 큼이 알려져 있다.

따라서 이러한 여러 장점을 갖고 있는 silver colloid가 젖소와 같은 가축의 염증 치료 보조제로서 충분히 활용 가능하리라고 여겨지어 본 연구를 수행하였다.

젖소의 유방은 염증이 잦은데다가 매우 민감하여서 이를 축산 현장에서는 생산 원유의 체세포 수로 관리하고 있다. 즉 체세포의 증가는 염증의 정도와 비례하며 염증은 세균 감염, 유방의 관리 미흡, 소의 임신/출산 등에 의한 면역력 저하 등 그 원인이 여러 가지인 것으로 알려져 있다. 이러한 염증에 의한 유선 손상으로 유선의 우유합성과 분배능력이 저하되어 산유량 손실뿐만 아니라 유단 백질(케이신)의 분해가 증가하여 유고형분이 감소하여 원유의 품질이 저하된다.

이 경우에 축산농가의 피해 뿐 아니라 원유 내 체세포의 증가 (일명 ‘고름우유’)로 소비자의 건강은 물론 국내 유가공업의 신뢰 손상에 의한 매출 감소에 이르기까지 심한 악영향을 미치고 있음은 주지의 사실이다.

현재까지 젖소의 유방염 치료에 적용되는 물질은 일부 키토산 계가 있긴 하나 약효가 미치지 못하고 대부분은 강력한 항생제로 이루어진 물질로서 거의 독일 등 외국산이고 유방염을 일으키는 세균의 종에 따라 적합한 약제를 선별하여 사용하고 있다. 이로 인하여 항생제 투입의 부작용으로 인한 우유의 품질 감소는 물론하고, 적용 젖소의 유방염 세균의 내성 증가로 인한 항생제의 과다 사용과 이로 인한 가축의 최종적 폐기 등 여러 부작용을 낳고 있다. 이는 젖소 자체에 대한 피해만이 아니라 원유품질 등급 하락에 따른 낙농가의 손실, 최종 소비자에 대한 유제품의 인식 저하에 의한 경제적 피해가 매우 크다 하겠다.

따라서 이러한 해결 방법으로서 silver colloid 물질에 의한 염증 치료제의 개발로서 이를 해결할 수 있다고 본다. 본 연구 결과 이러한 젖소에 염증 치료제를 인체 및 젖소에 완전 무해한 물질로 대체되면 생산농가의 소득증대, 최종 소비자의 만족, 국민 건강 증대에 기여, 유가공 업계의 유제품 품질향상 및 매출 신장 등 여러 가지 효과를 기대할 수가 있다고 본다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리나라 젖소 축산업의 경쟁력 강화와 생산 유류의 상품성 향상을 꾀하기 위하여 해결하여야 할 숙제 중 하나인 젖소 유방염 치료 보조제의 개발에 silver colloid를 이용하고자 하였다.

본 연구 개발 내용은 1) 농축 은이온 Colloid의 제조 기술 확립 2)농축 은이온의 안정화 기술 및 3)개발 은 이온의 blending 기술과 임상시험 등으로 구성되어 있다.

은 이온 제조 기술은 전기분해 법과 화학적 환원법에 의하여 행하여졌으며 두 경우 모두 유방염 발병 균에 있어서 박멸효과가 탁월하였다. 은 이온 용액의 안정화는 silver colloid의 살균력에 직접적인 영향을 미치는 중요한 사항으로서 콜로이드 은의 입자 크기가 수 nm이하로 유지하여야 하는 고도의 기술을 필요로 한다. 특히 화학적 환원법에 의한 은 silver colloid 입자의 경우 그 농도를 수천 ppm 까지 올릴 수 있는 대신에 안정화 기술이 더욱 필요로 하게 되

었다. 콜로이드 안정화 기술은 몇 가지 원리가 알려져 있으나 본 연구에서는 표면전하 증대에 의한 안정화 및 기하학적 효과에 의한 안정화 원리를 이용하여 이를 안정화 하였다.

치료보조제로 활용하기 위하여 침투보조제 및 은 입자의 산화를 방지하며 은 이온의 방출속도를 제어하기 위한 blending을 시도하였다. 침투제로서는 PEG(polyethylene Glycol)을 그리고 은 입자의 산화 방지 및 방출속도제어를 위하여 레시틴(lecithin)과 Vitamin A (Tocoperol)를 기반으로 한 베시클(vesicle)을 제조 완료하였으며 베시클 내부에 은 이온 입자가 존재하도록 하였으며 이의 제조기술을 확립하였다.

최종적으로 제조된 치료보조제에 대한 임상시험을 수차례 행하였다. 임상 시험은 실험실적 살균력 시험과 현장 시험 등으로 행하였다. 실험실적 시험은 유방염 발병균주 중 대표적인 균주 5가지에 대하여 행하였으며 현장시험은 민간 농가를 이용하여 악성 임상형 젖소에 대하여 행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구결과 젖소 유방염 치료보조제로 활용할 수 있는 고농도이면서 살균력이 우수한 silver colloid의 제조기술 확립과 젖소 유방염 치료보조제로서 베시클 형태의 보조제를 제조하였다. 실버 콜로이드의 제조는 전기분해법과 화학적 환원법에 의하여 완성하였으며 살균력에 가장 중요한 콜로이드 입자크기 제어와 안정화 기술을 완성하였다. 최종 제조된 입자크기는 수 nm 범위에 드는 살균력이 우수한 것으로 판명이 났으며 안정화가 매우 우수한 제품을 개발하였다.

유방염 발병균주에 대한 시험결과 박멸이 신속히 이루어 졌으며 현장 시험결과 균주에 관계없이 임상형 젖소에 대한 체세포 감소 효과가 현저하게 나타났다. 따라서 향후 본 개발 제품이 젖소 유방염 치료 보조제로서 활용 가능할 것으로 기대된다.

본 연구 개발 제품은 기존 젖소 유방염 치료보조제로 뿐만 아니라, 가축관련 각종 세균에 대한 박멸효과가 뛰어난이 확인되었다. 따라서 유방염 치료보조제 뿐만 아니라 타 질병 치료제나 예방제 그리고 소독제로 활용이 가능할 것으로 판단되므로 이에 대한 검증 및 활용이 요구된다.

SUMMARY

(영문 요약문)

The silver colloid is the that silver(Ag) nanoparticles dispersed with nano size in a aqueous solution. The colloidal states are very effective on the sterilizing of germs, bacterias, and tricomycetes. Especially, it is already well known the fact that the solution of Ag ions is very effective on the killing of tricomycetes that are not killed by extant antibiotics and the healing of inflammations. Therefore, the silver colloid might be applied as a subsidiary healer for the inflammation of stocks such as cow. The study was performed for the application of the silver colloidal as the subsidiary healers for the inflammation of stocks.

The breast of a cow is very sensitive to mastitis and is easily inflamed. The farmers are monitoring the number of sometic cells in the milk. The degree of mastitis inflammation is in proportion to the number of sometic cells. The mastitis is known caused by the decrease of immunity which can be caused from the infection of germs, the pregnation, a birth, and the breasts hygiene, etc.

The inflammation bring about the damages of the mammary gland which reduces the ability of milk production and the decomposition of cellular tissue, so that not only the production of milk but also the quality become lower. The deterioration of the quality has a bad influence on not only the stock farmers but also the health of consumers.

Up to now, even though a kind of chitosan which consisted of strong antibiotics and are foreign productions has been applied for healing of the inflammation of cows the effectiveness is very week and different medicines must be applied according to the kind of the germs. Ill side-effects caused by the injection of the strong antibiotics have occurred so frequently that

not only the deterioration of the milk quality and the increase of endurance of the inflammation germs brought about. the increasement of endurance of the germs make the dosage of antibiotics increase and result in the wastes of stocks.

The study on the healing of a cow inflammation by the colloidal silver is to solved the problems. In order to increase the competition of domestic stock industries and the quality of the dairy productions the silver colloid can be used as an effective subsidiary healer.

The study contains 1) the development of production technique of highly concentrated Ag colloid, 2) Stabilization technique of the concentrated Ag colloidal solution, and 3) Blending technique and clinical test of the Ag colloid.

Ag colloid can be produced by the electrolysis or the chemical reduction. Both of them are very effective on killing the germs of inflammation. The stabilization of the silver colloid directly influences on the power of sterilization so that the size of the Ag particles must be controlled below a few nm.

By using the method of chemical reduction the concentration could increase a few thousands of ppm. However, as the concentration increases the higher stabilization techniques are also required. There are a few kind of techniques for stabilizing colloids. In the study, the increasement of a surface charge density and the using of a geometrical effect have been used for the stabilization.

In order to use the Ag colloid as the subsidiary healer the preventing of oxidation of the Ag particles and the penetration supporter is essential and the release seed should be controlled. PEG(polyethylene glycol) which is for the penetration supporter and a vesicle which is for the preventing oxidation of the Ag particles and the penetration supporter were manufactured. the technique that making Ag colloidal particles exist inside the vesicle was developed.

The clinical tests were performed several times. The sterilizing effect

was investigated both in a laboratory and a farm.

The silver colloidal subsidiary healer manufacture by the study showed the superior effect on sterilizing the fungus of the inflammation of cows. After applying the subsidiary healer the number of somatic cells decreased remarkably in the milk of infected cows.

The study results in the development of superior manufacturing techniques of the silver colloid and the subsidiary healer of vesicle type for the inflammation of cows. The colloid was manufactured by the electrolysis and the chemical reduction. The techniques for the size control of colloid particles and the stabilization were developed. The size of the colloidal particles was below a few nanometer and the sterilizing effect of them was excellent.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chap. 1 Introduction -----	12
Section 1. Research background and necessity -----	12
Section 2. Research objectives and scope -----	12
Chap. 2 Status of Technical Research in Domestic and Foreign -----	17
Section 1. Clinical medicines for the cow mastitis in domestics and foreign -----	17
Section 2. Application cases of the silver colloid in the treatment of cow mastitis -----	17
Chap. 3 Research Contents and Results -----	19
Section 1. Theoretical background -----	19
1. Producing silver colloid -----	19
가. Electrolysis reduction -----	19
나. Chemical reduction -----	20
2. Stabilization of silver colloid -----	22
3. Lipid structure for the anti-oxidization and drug delivery system for the silver colloid -----	25
Section 2. Research and Results -----	29
1. Producing the silver colloid by the electrolysis reduction ---	29
가. Equipment and manufacturing process -----	29
나. Concentrate of silver colloid -----	31
다. Characteristics of the silver colloid produced -----	34
라. Clinical study of the silver colloid for mastitis germs and	

the result of the field test -----	45
2. Producing the silver colloid by the alcohol reduction -----	51
가. Reagents and materials -----	51
나. Producing the silver colloid by the alcohol reduction --	51
다. Establishment of optimum conditions of the production -----	55
라. Clinical study -----	76
1) Clinical study of the mastitis germs in solution ---	76
2) Clinical study of the mastitis germs on culture medium -----	76
3) Field test -----	81
3. Blending and producing the lipid type medical substances --	84
가. Vesicles -----	84
1) Reagents and materials -----	84
2) Equipment -----	84
3) Producing vesicles -----	84
나. Blending and producing the medical substances with silver colloid -----	88
Section 3. Conclusions -----	96
 Chap. 4 Research Accomplishment and Contributions to the Relative Areas -----	97
Section 1. Accomplishment of the research objectives -----	97
Section 2. Contributions to the relative area of the research -----	98
 Chap. 5 Application Plan of the Research Results -----	99
 Chap. 6 Information Obtained from Abroad during the Research -----	100
 Chap. 7 References -----	101

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	12
제1절. 연구배경 및 필요성 -----	12
제2절. 연구의 목적 및 범위 -----	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	17
제1절. 국내외 시판 유방염 치료제 및 보조제 -----	17
제2절. 국내외 silver colloid 적용사례 -----	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	19
제1절. 이론적 배경 -----	19
1. Silver colloid의 제조 -----	19
가. 전기분해법에 의한 제조 -----	19
나. 화학적 환원법에 의한 제조 -----	20
2. Silver colloid의 안정화 -----	22
3. Silver colloid 입자의 산화방지 및 약물방출 제어를 위한 리피드 구조 -----	25
제2절. 연구 내용 및 결과 -----	29
1. 전기분해법에 의한 고농도 silver colloid의 제조 -----	29
가. 장치 및 제조 -----	29
나. Silver colloid의 농축 -----	31
다. 제조된 silver colloid의 특성 -----	34
라. 제조된 silver colloid의 유방염 원인 균에 대한 실험실적 및 현장 임상시험 결과 -----	45
2. 알코올환원법에 의한 고농도 silver colloid의 제조 -----	51
가. 시약 및 재료 -----	51

나. 알코올 환원법에 의한 silver colloid의 제조 -----	51
다. 제조조건의 확립 -----	55
라. 임상시험 결과 -----	76
1) 용액상 병원균 시험 -----	76
2) 배지상 병원균 시험 -----	76
3) 현장임상 시험 -----	81
3. 블렌딩에 의한 리피드형 약물제조 -----	84
가. 베시클의 제조 -----	84
1) 시약 및 재료 -----	84
2) 제조장치 -----	84
3) 베시클의 제조 -----	85
나. Silver colloid를 이용한 젯소유방염 치료보조제의 blending -----	88
제3절. 결 론 -----	96
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	97
제1절. 목표달성도 -----	97
제2절. 관련분야에의 기여도 -----	98
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	99
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	100
제 7 장 참고문헌 -----	101

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구배경 및 필요성

1. 기술적 측면

Silver colloid는 은 이온(Ag^+)이 수용액에서 이온 상태로 ($10\sim 150$ nm 크기) 분산되어 있는 상태의 물질을 말하며 이러한 분산용액(Colloidal State)은 약 650여종의 유해 세균 및 곰팡이류에 대해 강한 살균력이 있음이 밝혀져 있다 [1]. 또한, 이러한 은 이온 입자들(silver colloid)은 인체에 적용하였을 경우에 대부분의 유익한 세균은 사멸시키지 않음이 관찰되고 있다. 외국에서는 이러한 물질을 응용하여 병원성 세균의 박멸 및 치료제로 이용하는 연구가 활발한 상태이며 현재 여러 부분 인체에 직접 이용되고 있다. 또한 본 과제 시행 초기에만 해도 국내에는 이런 효과가 거의 알려지지 않아 silver colloid를 이용한 제품이 거의 없었는데 최근에는 여러 회사에서 외국과 기술 제휴 등을 통한 제품의 국산화로 유사제품의 판매와 더불어 일반인에게도 많이 알려지고 있는 상태이다.

은은 인체에 무독함이 알려진지는 이미 역사적으로 오래이며 미국 등지에서는 silver colloid 용액이 이미 FDA 제약 범위에 들지 않는 인체에는 무해한 천연물로 인정이 되어 있고 최근에는 무독성 방부제로서 식품첨가제로 기능이 인정될 만큼 인체나 생체에 무독한 물질로 입증되어 있다 [1].

Silver colloid의 살균력은 수용액에서 silver의 이온 상태 및 입자 크기(즉, 입자의 크기, 양이온의 세기)에 크게 좌우되는 것으로 알려져 있으며 제조에 있어서 기술적인 최대의 난제는 가급적 작은 크기(10nm 이하)로 유지되면서 물 속에서 침전되지 않고 안정한 상태로 존재하도록 하여야 한다는 점이다. 또한 같은 용량의 수용액에 최대한 많은 양의 silver 이온 입자들을 어떻게 안정한 상태로 분산시키느냐 하는 기술적 난제가 있다.[1]

그 동안 여러 연구가들의 연구 결과에 의하면 수용액 상에서 이온화된 silver는 강력한 살균력을 가지고 있으며 무려 입자들의 크기가 15nm 이하가 되었을 경우 그 살균력이 극대화된다. 더욱이 최근에 미주의 동향을 보면 silver 입자 크기를 2 nm이하로 제조할 만큼 그 기술이 진보되어 있다.

수용액에서 분산된 colloid 은 입자들은 표면 전하에 의한 서로간의 반발력에 의하여 서로 엉기지 않고 고르게 분산되어 그 살균 효과를 나타낸다. 그러나 colloidal silver 입자는 van der Waals 힘, 수용액 상 존재하는 불순물, 제조 방식에 의한 비 이온화된 응집된 큰 입자 등에 의하여 서로 간 응집이 일어나서 입자 평균 크기가 증가하는 경향이 있으며 이 경우에 살균 효과가 현저히 떨어지는 것으로 알려져 있다[1]. 따라서 이러한 silver colloid의 제조에 있어서 1)은 이온 입자들을 제조 과정상 완전히 이온 상태로 해리 시키고, 2)이온화된 입자들을 응집이 일어나지 않도록 안정화시키는 기술이 핵심이다. 또한, 은 이온 입자들의 응집 속도는 수용액에서 은 입자들의 함량에 따라 증가하는 경향이 있으므로 제품의 용도에 맞게 농도를 농축시키는 기술이 중요하다. 입자를 안정화시키는 기술은 1) 첨가제와 수용액의 pH 조정 등에 의한 입자 표면전하의 증가(+전하), 2) 분자량이 큰 천연성 첨가제를 이용한 steric repulsion을 배가시키는 방법, 3) 첨가제에 의한 입자 표면을 보다 친수화 시키는 방법들을 예로 들 수 있다.

Silver colloid 의 살균 기구에 대하여 R.B Thurman등[1] 이 발표한 '*Functions of Silver in Water Purification and Disease Control*'에 의하면 다음과 같이 3가지 기구에 의한다.

- 1) 은 이온의 촉매 적 성격: 은은 산소와 강하게 결합하므로 이러한 잉여 산소가 세균을 침범하여 박멸
- 2) 은 metal의 높은 준위가 박테리아 세포벽의 (낮은 에너지 준위)를 침범하여 파괴
- 3) 은 이온들이 세균의 DNA 와 직접 결합하여 박멸

최근에는 은 함유 용액들이 병원 등지에서 인체에 무해하면서도 유해 세균에 대하여 강력한 살균력을 갖고 있음이 밝혀지고 있어 병원에서 산모 출산 시 은 이온수로 신생아의 눈을 씻도록 의무화하고 있을 정도이다. 또 문헌에 의하면 화상으로 손상된 염증 부위에 탁월한 효과가 있음이 알려져 있으며 외국에서는 이를 이용하고 있다.

이러한 여러 장점을 갖고 있는 silver colloid 수용액이 젖소와 같은 가축의 염증에 효과가 있을 경우 이를 치료 보조제로서 충분히 활용 가능하리라고 본다.

그러나, silver colloid를 유방염 치료 보조제로서 활용하기 위하여 여러 분야에 서 개선을 하여야 하는데 해결하여야 할 기술적 분야는 다음과 같다.

- 1) Silver colloid를 안정한 상태를 유지하면서 그 치료 효과를 높이기 위한

연구: 젖소 유방 조건(원유용액, 온도, pH 등)에서 농도보다 은 이온을 안정화시키고 또 그 농도를 현재보다 수십 배로 높이는 기술 (이온의 안정화 기술)

2) 치료 보조제로서 제품의 형태 선정 및 이에 필요한 제조기술의 확립 (키토산 및 다른 약리 물질과 blending): 약효 및 은 이온이 초기 안정된 상태를 유지하면서 이를 에멀션 타입으로 제조함.

3) 유방염 치료의 모델 실험 및 젖소의 현장 임상실험: 투입방식 (주사, 맛사지, 구강투입, 사료투입 등)선정, 약리시험 및 결과분석을 거쳐 최적 투입방법 선정

2. 경제·산업적 측면

젖소의 유방염은 염증이 잦아데다가 매우 민감하여서 이를 축산 현장에서는 생산 원유의 체세포 수로 관리하고 있다. 즉 체세포의 증가는 염증의 정도와 비례하며 염증은 세균 감염, 유방의 관리 미흡, 소의 임신/출산 등에 의한 면역력 저하 등 그 원인이 여러 가지인 것으로 알려져 있다. 이러한 염증에 의한 유선 손상으로 유선의 우유합성과 분배능력이 저하되어 산유량 손실뿐만 아니라 유단백질(케이신)의 분해가 증가하여 유 고형분이 감소하여 원유의 품질이 저하된다. 이 경우에 축산농가의 피해 뿐 아니라 원유 내 체세포의 증가(일명 '고름우유')로 소비자의 건강은 물론 국내 유가공업의 신뢰 손상에 의한 매출 감소에 이르기까지 심한 악영향을 미치고 있음은 주지의 사실이다.

현재까지 젖소의 유방염 치료에 적용되는 물질은 일부 키토산 계가 있긴 하나 약효가 미치지 못하고 대부분은 강력한 항생제로 이루어진 물질로서 거의 독일 등 외국산이고 유방염을 일으키는 세균의 종에 따라 적합한 약제를 선별하여 사용하고 있다. 이로 인하여 항생제 투입의 부작용으로 인한 우유의 품질 감소는 물론하고, 적용 젖소의 유방염 세균의 내성 증가로 인한 항생제의 과다 사용과 이로 인한 가축의 최종적 폐기 등 여러 부작용을 낳고 있다. 이는 젖소 자체에 대한 피해만이 아니라 원유품질 등급 하락에 따른 낙농가의 손실, 최종 소비자에 대한 유제품의 인식 저하에 의한 경제적 피해가 매우 크다 하겠다.

따라서 이러한 해결 방법으로서 silver colloid 물질에 의한 염증 치료제의 개발로서 이를 해결할 수 있다고 본다. 본 연구 결과 이러한 젖소에 염증 치료제를 인체 및 젖소에 완전 무해한 물질로 대체되면 생산농가의 소득증대, 최종 소비자

의 만족, 국민 건강 증대에 기여, 유가공 업계의 유제품 품질향상 및 매출 신장 등 여러 가지 효과를 기대할 수가 있다고 본다.

3. 사회·문화적 측면

우유의 원유 생산지에서 젖소에 항생제 투입으로 인한 우유의 항생제 함유 시비 논란은 이미 여러 차례 걸쳐 고름우유 파동과 함께 메스컴에 공론화된 지 오래이다. 본 연구에서 개발한 물질은 이미 상기한 바와 같이 천연성 물질로 인체에 무해하고 또 오랫동안 인간이 가까이 사용하여 온 물질이므로 개발완료 시 축산 원유 품질 향상은 물론 유가공업계까지 무항생제 제품의 완성에 일익할 것으로 기대되며 국민의 유가공품에 대한 인식 전환에 큰 도움을 주리라고 생각한다.

제2절. 연구의 목적 및 범위

본 연구에서는 젖소 유방염 치료를 위한 silver colloid를 제조 기술을 확립하고 이를 치료보조제에 적합하도록 설계하여 지속적이며 살균력이 우수한 silver colloid 함유 치료보조제의 개발에 그 목적이 있다.

Silver colloid의 제조 시 전기분해법과 화학적 환원법에 의하여 silver 입자 크기가 수 nm (최하 1~2 nm)인 균일한 고품질의 콜로이드 용액을 제조하며 그 농도도 수천 ppm 이상의 고품질 silver 콜로이드를 제조함으로써 유방염 발병 균에 대한 살균력이 극대화 하도록 하는 연구를 행한다. 이러한 고품질 silver colloid의 제조의 달성을 위하여 다음과 같은 연구를 수행하고자 한다.

이러한 목표를 달성하기 위하여 다음과 같은 범위의 연구를 수행하였다.

1) 고농축 silver colloid의 제조

- 가) 전기분해법 및 화학적 방법에 의한 고품질 silver colloid의 제조기술 확립
- 나) 제조된 silver colloid의 안정화 기술 확립
- 다) 제조된 silver colloid의 고 농축 기술 개발

2) 치료보조제로 활용하기 위하여 보조 기술로서 첨가제를 주사제 등과 같

은 형태를 이루기 위한 blending 기술

3) 임상 세균에 대한 살균력 평가 및 현장 임상시험

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제1절. 국내외 시판 유방염 치료제 및 보조제

기존 국내 축산업계에서 사용 중인 유방염 치료제는 외국산 항생제로서 세균의 종류에 따라 10여종이 수입 활용되고 있다. 그러나 이는 원유에 항생제 오염 등의 문제가 심각하여, 비 항생제제로서 비타민류나 키토산 등이 주성분으로 되어있는 것들이 치료 보조제로서 나와 있긴 하나 염증 치료효과는 기대에 미치지 못하는 상태이다. 이러한 유방염 관리 기술의 문제점으로는 유독한 항생제 사용과 이로 인한 소의 면역성 저하 및 원유 생산량의 감소, 원유 품질 저하, 최종 유가공 품질 저하 등 그 부작용이 우려되고 있다. 최근(본 과제수행 중)에 국내에도 은 이온수 관련업체가 몇 개 등장하여 살균 관련 제품을 생산 판매하고 있으나 아직까지 젖소 유방염 관련 제품은 나오지 않고 있다.

제2절. 국내외 Silver Colloid 적용사례

Silver colloid를 젖소에 적용한 사례가 최근 미국 등지에서 보고 되고 있다 (미국 뉴저지주 목장, 2002년도 기준). 아울러 이들 결과에 의하면 유방염이 심한 젖소에 적용한 결과 그 효과가 탁월함이 관찰되어 현재 FDA에 계류상태에 있다. 그러나 이들 기술은 기존 전기분해법에 의한 은 이온용액을 그대로 적용한 경우로서 제품 개발에는 못 미치고 있다고 본다. 즉 본 연구 내용에서 행하여진 여러 단계의 농축 기술 및 은 입자의 제어기술, 안정화 기술, blending 기술 등 젖소에 투입하기 본격적으로 적용하고 또 이를 제품으로서 상업화하기 위하여 행하여져할 많은 기술이 필요하며 본 연구에서 이를 행하였다. 국내에서 젖소 유방염에 실버콜로이드 사용 예는 아직까지는 없으며 본 연구가 최초 보고서가 될 것이다.

본 연구에서는 이러한 기술이 수행되므로 서 보조제로서 충분히 사용 가능하도록 연구를 수행하였다. 따라서 향후 이를 상업화 하여 염증 치료 보조제로서 상품화가 가능하고 아울러 낙농업-유가공업-소비자의 건강 등과 관련 여러 부분에서 기대 효과가 클 것으로 보고 있다.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제1절. 이론적 배경

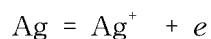
1. Silver colloid의 제조

Silver colloid의 제조는 크게 전기분해방법[2]에 의한 것과 화학적 방법으로 나눌 수 있다. 전기 분해에 의한 방법은 수용액 내에서 두 전극을 설치하고 이 중 음(-)극을 순수한 은으로 하고 양(+)극은 은 혹은 백금 봉 등으로 한 후 양극에 전류를 흘려보내어 음극에서 은 이온 (Ag^+)을 방출하여 수용액에서 클러스터를 형성하게 하는 방식이다. 이러한 전기 분해 방식으로 수 nm 크기의 은 입자를 형성 시킬 수 있는 장점이 있으나 제조 시간이 길고 (보통 1-2 시간) 최종 제품이 10 ppm 이하의 매우 낮은 농도라는 단점이 있다.

반면에 화학적 방법은 유기 은염을 용액내서 환원제를 사용하여 환원 시켜 은 이온(Ag^+)을 얻고 이를 고분자성 안정화제를 이용하여 은 클러스터를 형성시키는 방식이다. 화학적 방법은 적당한 반응조건을 유지해야 하는 단점이 있으나 매우 높은 고농도의 은 콜로이드를 제조할 수 있는 장점이 있다.

가. 전기분해법에 의한 제조

은(silver)의 전기분해는 다음의 전기 화학적 과정을 따른다[2].



전기분해 시 수용액 상에서 은은 음극에서 전자(e)가 방출되고 도선을 따라 양극에서 Ag^+ 이온이 대신 방출되게 된다. 이 과정은 전기화학에서 Faraday 법칙으로 잘 알려져 있으며 이론적으로는 전류밀도, 전하의 세기, 시간 등에 따라서 총 전기분해 되는 은의 양을 계산할 수 있다.

전극과 전해액의 계면에서 전하이동 반응이 진행될 때 통과하는 전기량과 반응하는 화학물질의 질량사이의 정량적 관계는 1830년대 Faraday가 발견한

법칙으로, 그 내용은 전기분해에 의하여 전극 상에 석출 또는 용해되는 화학물질의 양은 통과한 전기량에 비례하며, 같은 전기량에 의해 석출 또는 용해되는 서로 다른 물질의 질량은 각각의 화학당량에 비례한다는 것이다. 1 g 당량을 석출 또는 용해하는데 필요한 전기량을 1 Faraday(F) 라 부르며 1F는 96485 coulomb(C)에 해당하고, 1 ampere x 1sec 에 해당한다.

Faraday 법칙은 다음 식으로 표시된다.

$$W = \frac{Q}{F} \times \frac{M}{n}$$

여기서 W는 전극에 석출되는 물질의 질량, I는 전극과 전해액 계면을 통과한 전류의 세기, t는 전류가 흐른 시간, Q는 석출한 물질의 당량수, 그리고 F는 Faraday 상수이다. Silver의 경우에는 대부분의 경우 원자가가 +1로 분해 되므로 당량 수는 1로 보아야 한다.

나. 화학적 환원법에 의한 제조

환원법에 금속 입자를 얻는 방법으로서 다음과 같이 여러 가지가 있다 [3].

- (1) 알코올 환원 법
- (2) 광(light) 환원 법
- (3) 수소 환원 법
- (4) 전기화학적 환원 법

이중 알코올 환원법이 가장 많이 이용되고 있으므로 본 연구에서는 알코올 환원법을 이용하였다.

화학적 환원법은 전기분해법과는 달리 제조시간이 짧고 또 농도가 매우 높으므로 보다 고농도의 은 콜로이드의 제조에는 적당한 것이 장점이다. 환원법에 의한 금속 나노입자 콜로이드의 제조는 금속 유기화합물 등을 수용액으로 녹인 후 알코올을 투입하여 환원 시켜서 나노입자의 금속 콜로이드를 얻는 방법이다.

그러나 얻어진 입자는 불안정하여 즉시 응집을 하는 경향이 강하므로 안정된 콜로이드를 얻기 위하여 고분자성 물질을 안정화제를 사용하고 있다. 은 콜

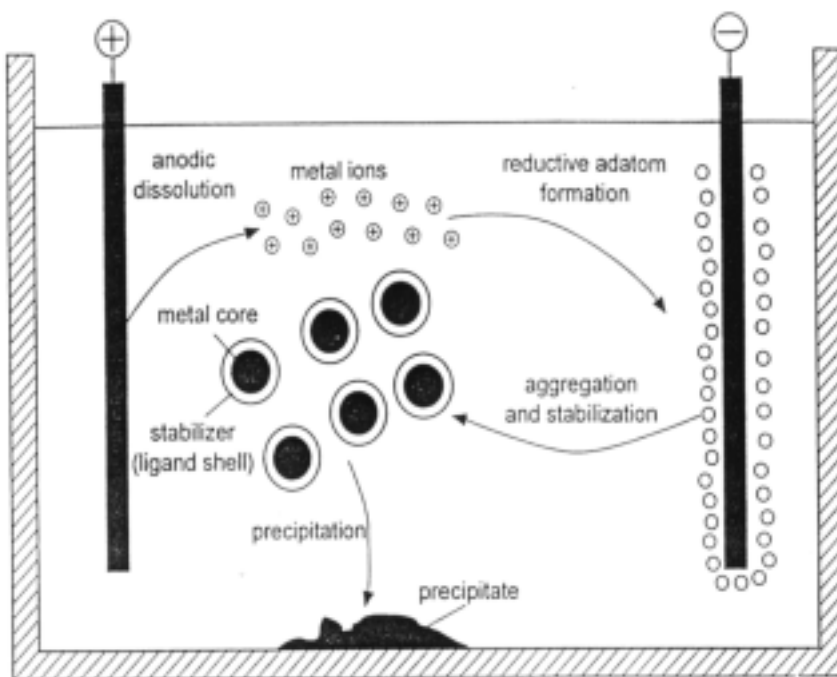


그림 1. 전기분해 방식에 의한 silver colloid의 제조 원리

로이드의 경우에는 친수성계 고분자 분산제로서 PVP (Polyvinylpyrrolidone)와 PVA(Polyvinylalcohol) 등이 많이 알려져 있다. 질산은을 염으로 사용하는 경우 알코올 환원에 의한 은 콜로이드의 제조에 대한 반응기구는 다음과 같다[3].



즉 수용액 상에서 질산은이 에탄올과 환원되고 이러한 silver 원자는 주위의 고분자성 물질에 의하여 안정화 되어 은 입자가 수용액에서 분산 생성되는 원리이다. 이 경우 사용되는 고분자 물질은 은 입자 표면에 흡착되어 표면의 전기적 반발력이나 친수화도 등을 변화시켜서 입자가 수용액서 안정하도록 유도하는 특징이 있다. 위 반응 식 중 두 번째 단계는 생성된 은 입자를 안정화하기 위한 과정으로 흔히 수용성 고분자 등을 이용한다.

2. Silver colloid의 안정화

콜로이드의 분산성을 유지시키는 안정화기구는 그림 3.에 보인 바와 같이 1)정전기적 반발력 (electrostatic stabilization), 2)흡착 고분자에 의한 기하학적 반발력 (steric stabilization), 3)표면 수화작용 (stabilization by hydration forces), 4)depletion stabilization, 및 5) van der Waals 힘의 차폐에 의한 안정화 기구 등으로 알려져 있다. 대부분의 경우에 콜로이드 입자들은 이 중 한두 가지의 작용에 의해 응집이 방해되어 안정화되며 특히 입자의 계면성질이나 흡착된 타 분자들에 의한 입자 표면의 개질에 의한 것으로 알려져 있다. 본 연구의 경우와 같이 안정화제로서 수용성 고분자를 사용하는 경우는 1), 2), 및 3)의 기구에 의한 안정화가 지배적인 경우가 많을 것으로 보인다.

1)의 경우처럼 전기적 반발성에 의한 안정화를 이루는 콜로이드를 흔히 electrostatic colloid라 부르며 3)의 경우처럼 표면 수화에 의한 안정화는 lyocratic colloid라 부른다. 전기적 반발력의 의한 콜로이드의 경우

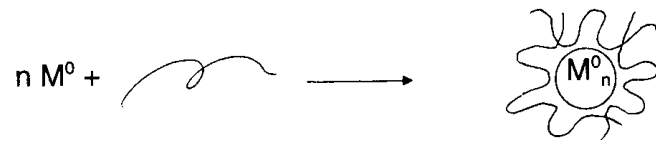
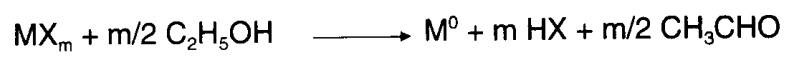


그림 2. 금속 염 환원법에 의한 은 콜로이드의 제조 원리도.

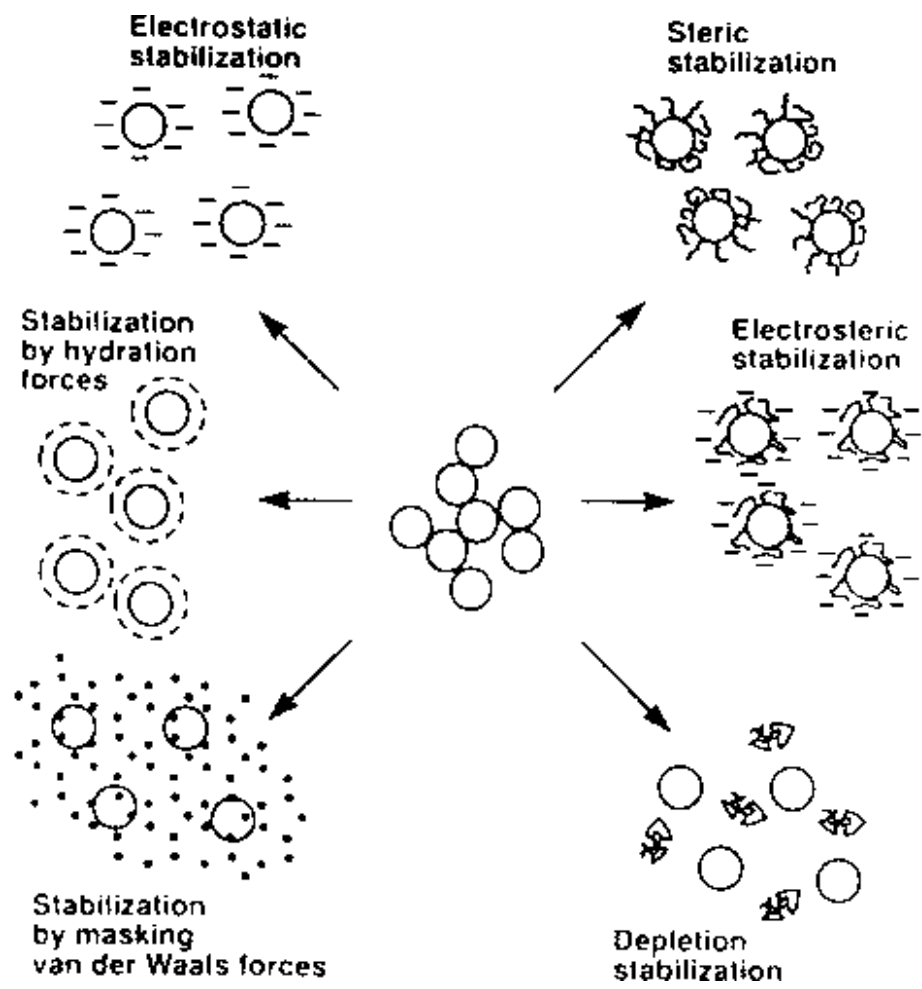


그림 3. Stabilization mechanisms of colloidal nanoparticles.

에는 입자 표면의 정전기력이 가장 중요하며 보통의 경우 전기이중층 중 미끄럼 층에 해당하는 제타전위(ζ -potential)의 값으로서 정전기력을 나타낸다. 따라서 제타전위 절대 값이 클수록 입자간 반발력이 크므로 콜로이드는 안정하다고 볼 수 있다.

3)의 경우처럼 고분자성 물질이 입자 주위를 싸고 입자 표면이 수화되는 경우 콜로이드의 표면과 용액간의 인력이 매우 중요한 변수가 된다[4]. 즉 콜로이드 입자의 표면이 친수성이 증대되면 입자와 용액간의 계면 결합력이 강해져서 열역학적으로 입자-입자 간 응집이 어려워지게 된다 (solute-solvent interaction). 또한 흡착된 고분자 물질은 표면 친수도가 높다는 의미는 고분자의 물에 대한 용해도가 커짐을 의미하므로 화학적으로는 흡착 고분자의 사슬이 물 쪽으로 길게 뻗게 됨을 의미한다. 이 경우에 입자 간에는 뻗은 고분자간 간섭이 먼 거리에서 이루어지므로 입자끼리 응집을 방해하게 된다. 즉 2)의 경우처럼 기하학적 반발력이 발생하게 된다. 본 연구와 같이 친수성 고분자 물질을 안정화제로 쓸 경우 2) 및 3)의 안정화 기구가 동시에 작용하게 된다.

고분자 안정화 물질이 입자 표면에 흡착되어 표면을 친수화 하는 경우 이의 친수화도 측정은 은/수용액/공기 간 접촉각을 측정하므로 서 가능하다.

3. Silver colloid 입자의 산화 방지 및 약물 방출 제어를 위한 Lipid 구조

입자를 환부에까지 운반시키기 위하여 쓰는 고전적인 방법 리포솜 (liposome) 구조 혹은 친수성 계면활성 물질을 이용하여 미셀(micelle)을 형성시키고 미셀 내부에 특정성분을 녹인 후 여기에 약리 성분을 용해시킨 구조를 합성하는 마이크로 에멀션 (리포드(lipid) 구조) 등이 있다. 이렇게 하여 제조된 입자들은 혈액과 같은 수용액상에서 용해성이 뛰어나고 또한 약제의 운반성도 뛰어 나므로 현재까지도 제약업계에서 가장 많이 활용되고 있다.

리포드 구조의 기본 형태는 아래 그림 4.에 나타낸바와 같은 계면활성 물질 혹은 고분자성 물질의 미셀 구조를 일컫는 총칭이다. 이러한 구조는 고분자성

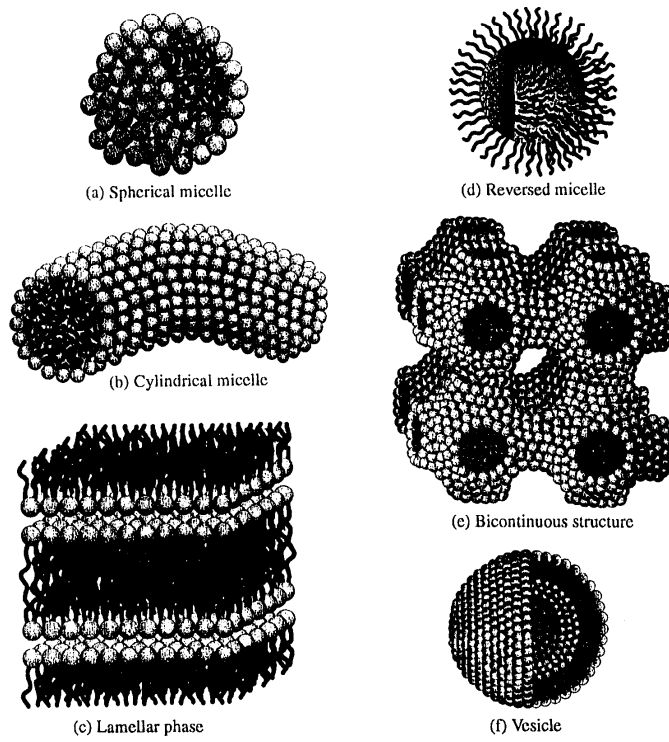


그림 4. 다양한 Lipid 구조의 예시 [3]

물질이 수용액에 다량 녹아 있는 경우에 가능하며 주위의 온도 및 pH에도 크게 영향을 받는다[3].

최근에는 고체 약립입자의 경우 이를 직접 고분자 물질로 쌓는 Solid Lipid Nano Particle (SLNP) 구조의 형태에 대한 연구가 제약학계에서 활발하게 진행되고 있는데 그 이유는 기존의 마이크로 에멀션 구조보다 훨씬 뛰어난 약리 효과를 발휘하기 때문이다. 이 구조는 미셀 내부의 oil core 대신에 약리를 나타내는 제조된 나노 고체입자를 직접 친수성 고분자의 lipid 구조를 표면에 완성시키는 기술이다. 이렇게 하여 얻어진 입자들은 기존의 고체 입자 나체나 마이크로 에멀션 보다 것보다 훨씬 그 운반 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다 [2]. 또한 이러한 제품은 제조상 냉동건조, 대규모 생산 등이 가능하고 생산 단가를 낮추는 장점이 있다.

상기 3가지 구조에 대한 장단점을 다음 표 1.에 요약하였다.

본과제의 경우는 고체 은 입자를 수용액에서 이용하는 경우이므로 제조상 가장 적합하고 또 장점이 가장 많은 Solid Lipid Nano Particle (SLNP) 구조 형태를 택하고 이에 준하여 약제를 실험실적으로 제조하였다. 그림 4의 Lipid 구조 중 주사제는 (f)의 구형 vesicle lipid에 해당된다고 볼 수 있으며, 연고제 등은 Lamella 형태인 (c)나 그 이외의 혼합 형태로 간주된다. 이에 대한 정확한 분석은 급속 냉동이 가능한 전자현미경(TEM)을 필요로 한다.

표 1. 각 DDS(Drug Delivery System)의 비교

Characteristic	Liposome	Lipid(micro) emulsions	Solid lipid nanoparticle
System	Low	Low	Low
Toxicity	Low	Low	Low
Cytotoxicity	Low	Low	Low
Residue from organic solvents	Depending on the manufacturing method	No	No
Large Scale Production	Possible	Possible	Possible
Controlled release	Low	High	High
Stability in solution	Low	High	High

제2절. 연구내용 및 결과

1. 전기분해법에 의한 고농도 silver Colloid의 제조

가. 장치 및 제조

전기분해 방식에서 사용된 Ag은 직경 0.7cm X 길이 20 cm, 순도 99.9999%의 고순도 은봉 (Junsei, Japan)을 사용하였다. 수용액 상은 초순수를 사용하였으며 초순수는 3차 정제수(18.2 M Ω , Milipore)를 사용하였다.

본 연구에서 이용한 전기분해장치는 다음 그림 5와 같다. 제조장치는 직류 전원 장치 (DC supplier), 고순도 은 전극, 교반기, 항온조 등으로 구성되어 있으며 공급되는 직류 전원은 최고 700 DC 볼트까지, 전류는 0-30 mA 까지 조절이 가능하도록 설치하였다. 은 콜로이드 용액의 제조방법은 항온조로 일정온도가 유지되는 초순수(18.2 M Ω , Milipore)를 일정량(통상 1L) 함유하고 있는 용기에 두 은 전극을 담근 후 일정시간 동안 전류를 흘려보내는 방식으로 하였다. 전극간의 거리는 70 mm로 유지하였으며 전극 표면적은 양극에 각각 47cm²을 유지하였으며 제조용기 내의 순수 물의 양은 1L로 유지하였다. 전기분해시 경우에 따라서는 수용액의 저항에 의하여 발열을 하게 되므로 수용액은 항온조에 의해 냉각 혹은 가열 방식으로 일정 온도를 유지하도록 하였다. 또한 전기분해 시 생성된 입자에 음극에서의 재 부착을 방지하도록 하기 위하여 자석식 교반기를 사용하여 수용액을 교반 시켜가며 제조를 행하였다.

분산 콜로이드 입자의 응집(불안정화)의 근본적인 원인은 입자와 물과의 친수성 결여에서 시작된다. 이러한 입자의 친수성의 결여는 입자들끼리 자체적으로 응집을 야기하는 힘이 강해지고 궁극적으로 불안정해지게 된다. 따라서 만약 실버 콜로이드 입자의 표면이 친수성이 가까워질수록 입자들은 수용액 상에서 잘 분산되고 자체적으로 응집하는 힘이 약하여 안정한 실버 콜로이드 용액을 얻을 수 있다[4].

M.A. Osman 및 B.A. Keller[4]의 실험 결과에 의하면 순수한 상태의 실버 표면은 물과 완전히 젖는 완전한 친수성임을 증명하였다. 따라서 실버 콜로이드 제조 시 입자들의 표면을 친수성에 가깝도록 유지시킬수록 보다 더 안정된 콜로이드 용액을 얻게 된다고 할 수 있다. 그러나 실제적으로 완전히 순수한

실버를 얻기란 극히 힘들 뿐만 아니라 제조 방법 상 일부 입자들이 산소 등의 분자들과 접촉되므로 입자의 표면이 산화되어 친수성이 약화되므로 제조 시 이를 억제하기 위한 조건을 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 사용되는 실버 금속 전극의 순도를 최대한 높은 상태의 것을 사용하였으며 사용되는 물은 Millipore 초순수 제조 장치로 제조된 순수 물 (18.2 M Ω)을 이용하였고, 또한 사용 전 물은 초음파를 이용하여 용해된 산소기체를 방출한 후 제조에 이용하였다. 또한 제조 중 전극에서 일부 물의 분해로 생성되는 산소에 의한 산화를 방지하기 위하여 강력한 교분을 통하여 산소를 제거하도록 제조 조건을 유지하였다. 그리고 최종적으로 제조된 실버 입자들은 보관 시 산화를 방지하기 위하여 빛이 차단되도록 갈색 병 용기에 보관하였다. 특히 전기분해 시에는 전극에서 물의 전기분해에 의해 수소 및 산소가 발생되고 이 산소가 생성된 입자들을 산화시켜 은 콜로이드 계의 안정도를 저하시키므로 될 수 있는 대로 교반을 강하게 하여 산소 기포를 최대한 빨리 제거시켰다.

분산 콜로이드 입자의 응집(불안정화)의 근본적인 원인은 입자와 물과의 친수성 결여에서 시작된다. 이러한 입자의 친수성의 결여는 입자들끼리 자체적으로 응집을 야기하는 힘이 강해지고 궁극적으로 불안정해지게 된다. 따라서 만약 실버 콜로이드 입자의 표면이 친수성이 가까워질수록 입자들은 수용액 상에서 잘 분산되고 자체적으로 응집하는 힘이 약하여 안정한 실버 콜로이드 용액을 얻을 수 있다.

M.A. Osman 및 B.A. Keller[4]의 실험 결과에 의하면 순수한 상태의 실버 표면은 물과 완전히 젖는 완전한 친수성을 증명하였다. 따라서 실버 콜로이드 제조 시 입자들의 표면을 친수성에 가깝도록 유지시킬수록 보다 더 안정된 콜로이드 용액을 얻게 된다고 할 수 있다. 그러나 실제적으로 완전히 순수한 실버를 얻기란 극히 힘들 뿐만 아니라 제조 방법 상 일부 입자들이 산소 등의 분자들과 접촉되므로 입자의 표면이 산화되어 친수성이 약화되므로 제조 시 이를 억제하기 위한 조건을 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 사용되는 실버 금속 전극의 순도를 최대한 높은 상태의 것을 사용하였으며 사용되는 물은 Millipore 초순수 제조 장치로 제조된 순수 물 (18.2 M Ω)을 이용하였고, 또한 사용 전 물은 초음파를 이용하여 용해된 산소기체를 방출한 후 제조에 이용하였다. 또한 제조 중 전극에서 일부 물의 분해로 생성되는 산소에 의한 산화를 방지하기 위하여 강력한 교분을 통하여 산소를 제거하도록 제조 조건을 유지하

였다. 그리고 최종적으로 제조된 실버 입자들은 보관 시 산화를 방지하기 위하여 빛이 차단되도록 갈색 병 용기에 보관하였다.

제조 조건은 온도, 전류의 세기, 수용액에서의 첨가제 종류 및 농도에 따라 제조하였으며 각 제조된 시료는 UV분광기, 입도분석기, TEM 등을 이용하여 입자의 크기분포 및 결정 성상을 확인하였고, AA를 이용하여 수용액에서 은 성분의 농도를 분석하였다.

나. Silver colloid의 농축

전기분해에 의해 제조되는 실버 이온 입자는 그 농도가 수 ppm 정도(보통 10 ppm이하)인 경우가 대부분으로 이의 농도를 높이기 위하여 실버 콜로이드 용액을 농축하였다. 농축 방식은 진공 증류에 의한 방법과 멤브레인을 이용한 여과 방식을 고려한 결과 진공 증류방식은 여과 방식에 비해 공정이 다소 복잡하고 또 가열을 하는 관계로 실버 콜로이드 입자의 안정도를 저하시킬 우려가 있어서 예비 시험 후 최종적으로 멤브레인에 의한 여과 방법을 채택하였다.

여과 방식에서 사용된 멤브레인은 미국 Milipore에서 제공되는 기공크기가 2 nm 정도의 튜브형식의 멤브레인 필터이었으며 주입구에 실버 콜로이드 용액을 주입하고 출구에 농축액과 여과 후 실버이온을 포함하지 않은 폐액이 분리되어 나오도록 구성하였다. 이를 이용한 농축 제조 장치는 그림2와 같다. 농축액의 실버입자의 농도는 용액의 순환 횟수로서 조절이 가능하였으며 폐액으로 나가는 실버입자의 양은 거의 무시할만하므로 이론상으로 10ppm 농도의 용액을 100ppm 이상 농축하기 위하여 최소 10회 이상 순환(recycle) 함으로서 가능하였다. 이러한 원리를 이용하여 100 ppm 이상의 농도를 갖는 농축된 실버용액을 제조하는 공정을 실험실적으로 완성하였다.

농축된 실버 콜로이드의 입자크기, 농도, 형상, 안정성, 살균력 등을 실험실적으로 검사하였다.

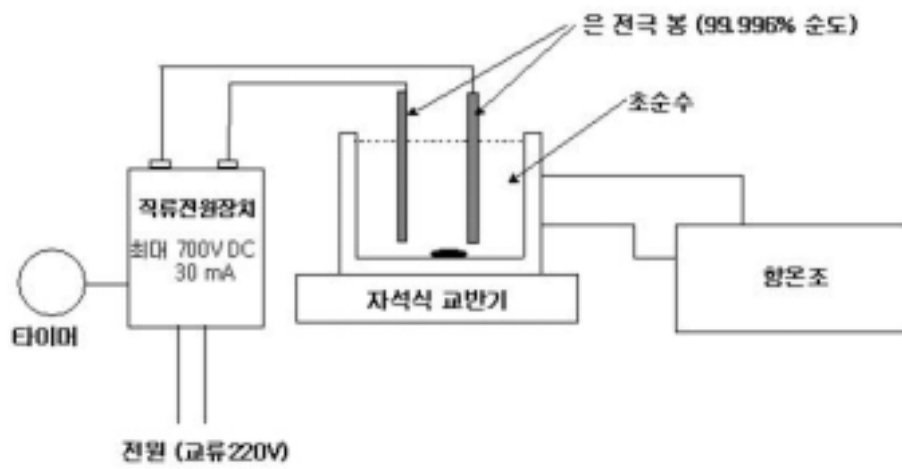


그림 5. 전기분해 방법에 의한 silver colloid의 제조 장치 개략도

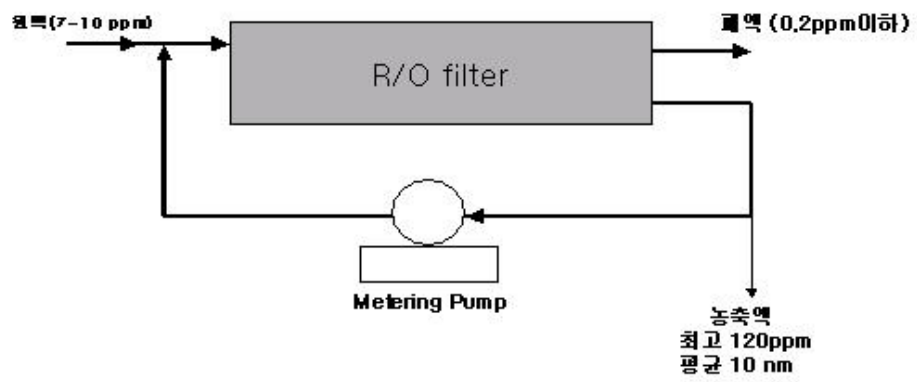


그림 6. Silver colloid의 농축 장치 대략도

다. 제조된 silver colloid의 특성

1) 입자의 표면전하

실버 콜로이드 입자들은 전기분해 시 자체 전자를 내어주고 양이온의 표면 전하를 갖는다. 이러한 표면 전하의 세기가 강할수록 입자들은 더욱 안정되고 (분산되고) 강한 살균력을 갖는 것으로 알려져 있다. 이러한 표면 전하는 입자의 표면 상태뿐만 아니라, 수용액의 수소이온 농도(pH), 전해질의 종류 및 양 등과도 밀접한 관련이 있다. 일반적으로는 수용액의 pH는 산성으로 갈수록 입자들의 양 전하가 강해지고 pH가 알칼리로 갈수록 음전하가 강해지는 성질이 있다.

본 연구에서 제조된 실버 콜로이드 용액의 pH는 약 6.5~6.8 정도로 매우 약한 산성을 나타내었으며 안정화제가 없는 경우에 수개월 (3개월) 후부터 불안정한 입자가 일부 관찰되었다. 콜로이드 안정화 상 매우 중요한 제타전위는 평균 $\pm 30\sim 40$ mV 정도로 매우 안정된 범위에 있었으며 첨가제 투입 시 제타전위 값이 일부 변화하였다.

염(NaCl) 및 투여나 pH에 따라서 제타전위 값이 변하긴 하였으나 큰 변화는 관찰되지 아니하였다. 따라서 본 제조 조건에서 생성된 silver colloid의 안정성은 염의 변화나 pH 등에 크게 영향을 받지 않는 매우 안정한 형태를 이루었다.

2) 안정화제에 의한 실버 콜로이드의 안정화

수용액에 실버 입자와 친화력이 있으면서 분산력이 강한 불 용해성 물질 (안정화제)을 첨가하는 경우 실버 콜로이드 입자들이 이 안정화제에 흡착되어 안정화하는 방식이다. 이 경우에 실버 콜로이드 입자가 안정화제에 흡착하여 분산하던가 아니면 실버 콜로이드 입자를 안정화제 분자가 둘러쌓고 실버 콜로이드 입자 간 입체적 반발력을 일으켜 안정화시키는 두 가지 원리가 있으며 본 연구에 사용된 첨가제의 경우에는 전자에 의한 원리가 작용되는 것이 관찰되었다.

이러한 방식에 의한 콜로이드 입자의 안정화를 위하여 본 연구에서는 식품 첨가용 비이온 계면활성제 중 수용성 키토산 및 수용성레시틴 (lyso-lecithin)을

이용하였으며 키토산은 국내산을 이용하였고 나머지는 전량 외국산 시약급 제품을 사용하였다. 실험 결과 lyso-lecithin을 사용하는 경우에 실버 콜로이드 입자들을 안정화시키는 능력이 매우 탁월함이 관찰되었고 이렇게 제조된 실버 콜로이드는 수개월 동안 응집되지 않고 제조 초기와 같은 형상으로 유지되었다.

3) 제조된 silver colloid의 물성

그림 7.에 이상의 조건 및 온도 30 °C 와 전류 3mA의 조건에서 시간에 따른 은 입자 농도의 농도 변화에 따른 UV 스펙트럼 결과를 나타내었다. 실버 콜로이드는 450 nm 근처 UV 에 대하여 흡수 스펙트럼을 나타내었으며 이는 문헌상 보고 결과와 일치하였다[5]. 문헌에 의하면 흡수대의 흡수율이 많을수록 농도가 높음을 의미하며 입자의 크기분포가 균일할수록 흡수 띠의 모양이 좀더 좁게 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 흡수 띠가 보이기 위해서는 최소 20~25 nm 이하의 크기를 갖아야 한다. 그림 6.의 결과에 의하면 전기분해에 의하여 실버 콜로이드가 생성됨을 보여주고 있으며 시간이 경과함에 따라 그 농도가 점차 높아짐을 보여주고 있다.

제조된 실버 콜로이드의 입자 크기는 제조 전하 밀도의 세기와 관련이 많았다. 즉 이는 원리상으로 볼 때 실버 봉 표면에서 떨어져 나오는 입자의 크기는 표면에 적용된 전류의 세기와 비례함을 의미한다. 위의 온도 30 °C 적용된 각 전류의 세기에 따른 입자의 크기 분포의 변화를 다음 그림 8에 나타내었다. 입자의 크기 측정은 광산란 법에 의하여 하였으며 장비는 일본 Photal Otsuka Electronic사의 입도분석기 모델 ELS-800을 사용하였다. 실험 결과 입도의 변화는 적용하는 전류의 세기와 밀접한 관계를 갖고 있으며 전류의 세기가 강할수록 입도의 평균 크기가 증가하고 또 크기 분포가 넓어짐을 알 수 있다.

실버 콜로이드 입도 및 형상의 정확한 분석을 위하여 TEM을 이용하여 입자의 모양을 관찰하였다. 측정은 콜로이드 입자를 함유하고 있는 수용액을 탄소 grid에 올린 후 진공 건조하면서 순간적으로 촬영하는 방식으로 촬영을 하였다. 그림 8.에 전류의 세기 변화에 의해 서로 달리 제조된 콜로이드 입자의 형상을 보이고 있는데 전류세기가 2mA인 경우에는 그 크기가 10nm가 대부분 입이 관찰되었으며 크기 분포도 매우 균일함을 알 수 있다. 그러나 9mA인 경우에는 그 크기가 50 nm이상이 대부분이며 일부는 응집이 일어난 것을 관찰할

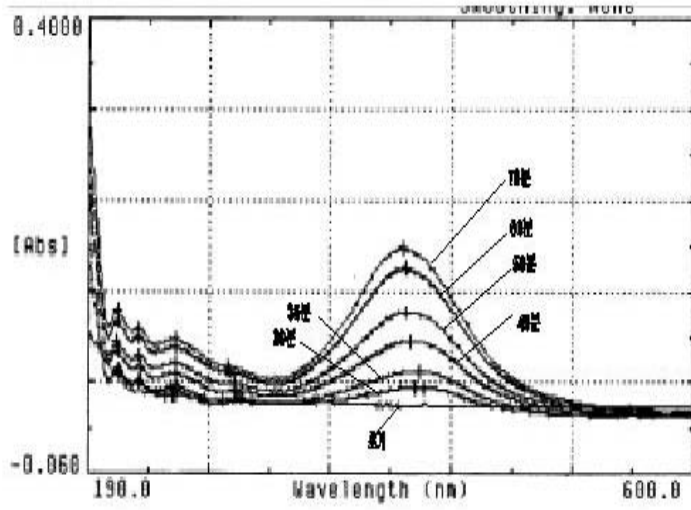


그림 7. 시간경과에 따른 silver colloid의 생성 UV 흡수도

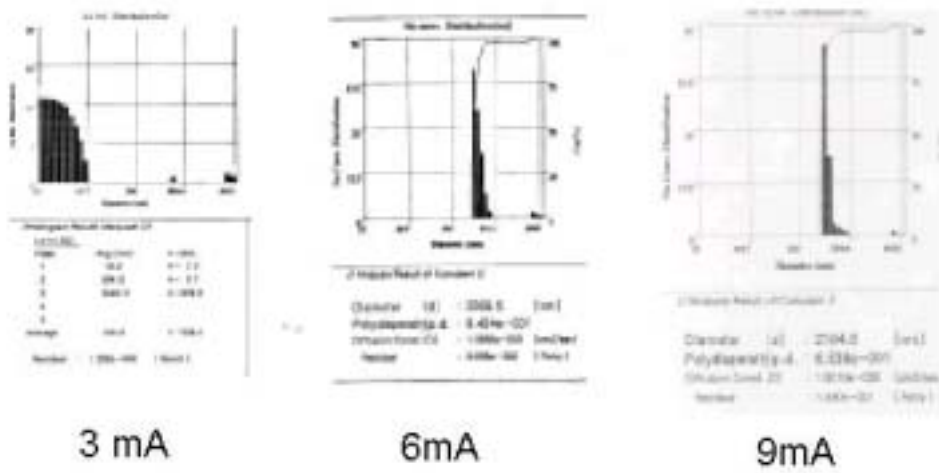


그림 8. 전류세기 변화에 따른 silver colloid의 입도 변화

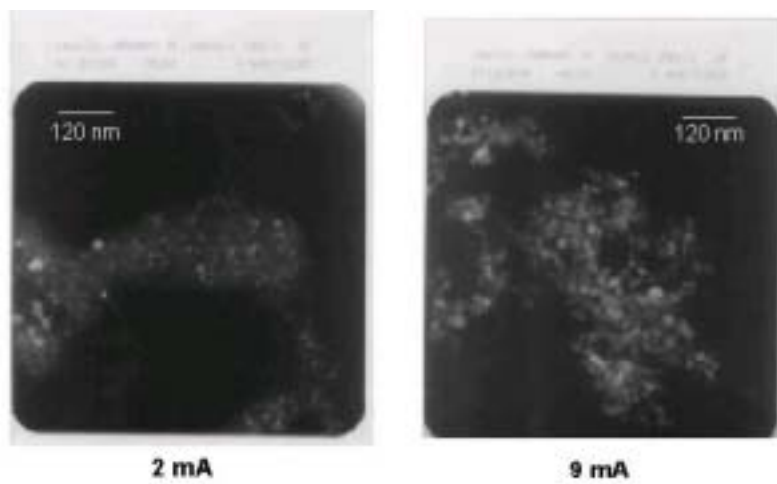


그림 9. 전류세기 차이에 의하여 생성된 silver colloid의 TEM 사진 비교

수 있었다.

또한 입자들은 거의 대부분이 정 육면체 형태의 결정성 모양을 취하고 있으며 문헌상과 비교해 볼 때 이러한 결정상은 살균력 등과 관계가 있는 것으로 보인다.

이상과 같이 제조한 실버 콜로이드의 농도는 약 10 ppm 미만이었다. 따라서 이의 농도를 올리기 위한 방법으로 제조시간을 길게 할 수도 있겠으나 이러한 경우 제조 시 고농도의 실버 입자로 인한 심한 발열과 함께 과도한 전류흐름에 의한 아크 발생 등의 위험이 있으므로 상기의 조건에서 제조한 콜로이드 용액을 물리적으로 농축하였다. 진공 증류 방식은 실험실 적으로 회전증발기 (Rotary Evaporator)를 이용하여 약 40 °C에서 약한 진공을 걸어주어 수분을 제거하여 용액 중 실버입자의 농도를 증가시켰다. 그러나 증류 시 용액을 일부 가열하여야 하므로 안정도에 악영향을 끼칠 우려가 높고 또 공정이 다소 복잡하므로 최종적으로 여과 방식을 택하였다. 즉 그림 6.에 나타낸 바와 같이 역삼투압 방식으로 비이온성 멤브레인을 이용하여 여과 식으로 행하였다. 농축된 실버 콜로이드의 농도는 공정 상 순환횟수와 비례하였으며 약 10회 순환을 통하여 10여배의 농도로 농축이 가능하였다. 농축전과 농축 후의 용액 상에서 실버의 농도는 원자 흡광 광도계 (Atomic Absorption Spectra)에 의하여 측정하였으며 표 2.에 보인바 대로 농축 후의 농도는 120 여 ppm에 달하였으며 수일간 매우 안정하였다.

표 2.에 보인 바와 같이 여과 식은 10회 농축 (10회 순환 (그림 6.))시 약 10배의 농도로 농축되는 것으로 보아 콜로이드의 손실이 거의 없고 또 농축 시 안정한 것으로 보인다. 이 결과는 TEM 사진 분석결과로도 확인되었다. 그러나 증류 방식에 의하여 용액의 부피를 1/10으로 줄였을 경우 용액에 콜로이드 상으로 분산된 실버 입자의 농도는 초기농도의 10배가 훨씬 못되는 농도를 나타내었다. 이는 증류 시 실버 콜로이드의 안정성이 상당수 상실되어 응집되어 침강되었기 때문이다. 농축 후 용기의 바닥에 일부 침전물이 관측되었다.

이상의 결과로 전기 분해에 의하여 10 nm정도의 순수한 실버 콜로이드 용액을 얻고 나아가 여과 방식에 고농축 실버 콜로이드를 얻을 수 있었으며 이의 제조 기술을 실험실적으로 확립하였다.

표 2. 농축 방식에 따른 농축된 실버 콜로이드 용액의 농도 비교

농축 방식	여과 식	증류식
농축 전	13 ppm 원액	8 ppm 원액
농축 후	120 ppm (안정성 우수)	50 ppm (응집 발생)

4) 유방 조건에서 silver colloid의 안정화 기술 확립 (입자특성 포함) 실버이온의 안정화 기술

앞에서 밝힌 고농축 실버 콜로이드는 실버 콜로이드의 농도가 높아진 관계로 그 안정도가 상당히 저하되게 된다. 따라서 이의 안정도를 향상시키기 위하여 기 제조된 용액에 안정화제를 첨가하는 방식으로 안정도를 높이는 연구를 시행하였다. 사용된 재료로는 모두가 식품 첨가물로 FDA 공인 제품으로서 비이온계 계면활성제 인 Tween-80 과 Triton X-100을 사용하였고, 또 수용성 키토산 및 수용성 lecithin을 이용하였다. 비이온 계면활성제인 경우에는 실버 입자의 고/액 간 계면에 흡착되어 콜로이드 특성상 입체적인 효과를 내어 흡착 분자간 반발력에 의한 안정화가 기대되었다. 그러나 실험결과 계면활성제류는 은 입자 표면에 대한 부착력의 약화로 제 기능을 발휘하지 못하고 은 입자는 불안하게 되었다, 최종적으로 lecithin을 적용한 경우 콜로이드의 안정화가 극대됨이 관찰되었다. lecithin의 경우에는 그 분자량이 매우 크므로 은 나노 입자가 lecithin에 부착되고 또 lecithin이 수용액에서 분산력이 매우 크므로 결국 실버 입자들의 응집력을 상쇄시켜 안정화되었다. 이렇게 제조된 용액은 수개월이 지나도 입자의 형상이나 입도분포가 거의 변하지 않을 정도로 안정화되었다. 그림 10.에 lecithin을 첨가한 후 실버 콜로이드의 상태를 TEM으로 관찰한 결과를 나타내었다. 그림에서 보면 뿌연 부분은 lecithin을 나타내고 있으며 여기에 약 10 nm 정도의 결정형 실버 콜로이드 입자가 고르게 흡착되어 있는 것을 볼 수 있다. 따라서 실버 입자들은 자기들끼리는 응집을 못하고 용액에서 안정하게 유지되고 있는 것으로 보인다.

Lecithin의 최종적인 적정 첨가량은 실버 콜로이드 농도의 약 1/100의 미미한 양으로 충분하였다.

이상 안정화된 고농축 실버 콜로이드에 대한 외부 조건에 의한 (예, pH, 온도, 전해질 등) 안정화 상태를 검토하였다. 앞서 밝힌 바와 같이 이온을 띠는 금속 콜로이드 입자는 몇 가지 외부 조건에 의해서도 크게 영향을 받는데 특히 수용액의 수소이온 농도지수(pH)와 밀접한 관련이 있다. 따라서 pH의 변화에 대한 안정화 변화를 관찰하였다. 시험 방법은 상기 제조된 실버 콜로이드에 pH를 변화시켜가며 UV 스펙트럼에 의하여 입자분포의 변화 경시를 관찰하였다. pH는 상온에서 0.1N HCl 표준용액과 0.1N NaOH 표준용액을 콜로이드 용액에

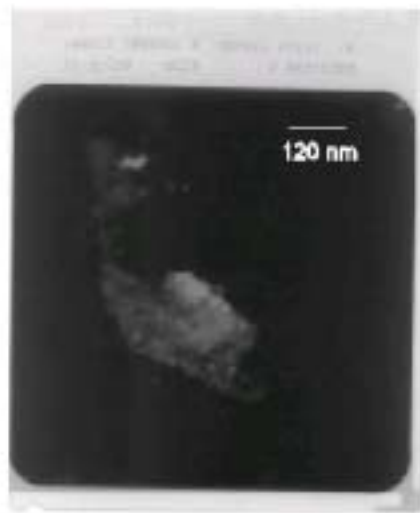


그림 10. Lyso-lecithin 에 silver colloid 입자가 흡착된 상태 (TEM 사진)

소량 적하시켜 원하는 pH에 맞춘 후 3시간 이상 방치한 후에 UV Cell에 콜로이드 용액을 담고 스펙트럼의 변화정도를 관찰하였다. 이의 결과를 그림 11에 나타내었다.

그림 11에 나타낸 UV 분석 결과에서 좀더 뾰족한 peak를 보일수록 입자 분포가 균일함을 의미한다. 그림 11의 결과로 보아 예상되었던 대로 pH가 낮을수록 입자가 더 균일해지고 안정도가 향상되는 것을 알 수 있다. 이는 수용액에서 실버 콜로이드 입자는 플러스 표면 전하를 가지고 이러한 plus 전하간의 입자간 정전기적 반발력에 의해 안정화된다고 볼 때 이론 상 pH가 낮을수록 그림 11. pH 변화에 따른 silver colloid의 UV spectrum 변화

Silver와 같은 무기물은 plus 전하가 더욱 강해져 더욱 안정된 콜로이드 상을 갖는다고 사료된다. 현재 최종 농축 제품은 pH가 6.7정도의 거의 중성에 가까우므로 강알카리를 제외하고는 안정도에 문제가 없는 것으로 판명된다. 젯소 유방의 조건에서 보면 강알카리나 알칼리 상은 거의 불가능하므로 유방 조건에서의 본 연구에서 실험실 적으로 제조된 농축 silver colloid는 안정도에는 별문제가 없을 것으로 예상된다.

Colloid는 그 안정도가 표면 전하에 의한 경우에는 수용액의 전해도와도 밀접한 관련이 있다. 즉 전해농도가 올라가면 입자의 표면전하를 잃게 되어 입자들이 응집하게 되고 안정성 저하뿐만 아니라 결과적으로 살균력에도 막대한 저하를 초래한다. 특히 젯소의 유방 조건은 경우에 따라서 전해용질 (예, 염분) 등이 일부 존재할 가능성이 있으므로 이의 고려를 위하여 전해질 농도에 따른 제조된 농축 silver colloid의 안정도를 상기와 같이 UV Spectrum에 의하여 조사하였다. 시험 방법은 제조된 농축 silver colloid에 일정량의 NaCl 용액을 넣고 3시간 이상 방치 후 시료를 취하여 UV Spectrometer에서 스펙트럼을 조사하였다. 그림 12에 이상의 시험 결과를 보였다. 그림 8에서 보인 것처럼 450 nm 근처의 silver spectrum은 염분의 영향을 크게 받지 않는 것으로 판명된다. 이러한 현상은 정전기력에 의한 안정화 기구와는 별개의 것으로 보이는데 그 이유는 그림 12에서 보인 것처럼 첨가된 lecithin분자에 silver 나노 입자가 흡착하여 안정화하는 경우 염분에 의해 silver 입자의 표면전하가 감소하더라도 lyso-lecithin 분자들의 흡착에 의한 안정화가 이루어져 결국 실버 입자는 안정화하는 것으로 보인다. 따라서 본 제조 silver colloid는 유방 조건 중 염분에 의한 영향은 미미하고 결국 안정된 상태로 존재할 것으로 판명된다.

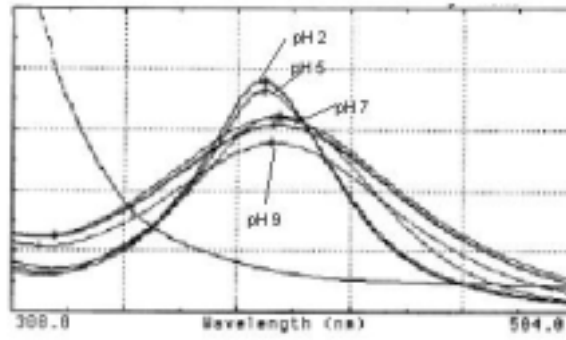


그림 11. pH 변화에 대한 silver colloid의 안정도 변화
(UV 흡수도 변화)

마지막으로 제조된 silver colloid의 안정도에 있어서 온도에 의한 영향을 고찰하였다. 이것도 제조된 silver colloid를 냉동기가 부착된 항온수조를 이용하여 시료를 일정한 온도에서 3시간 이상 방치 후 UV 스펙트럼을 관찰하였다. 온도는 섭씨 4℃부터 50℃까지 변화시켜가며 시험하였는데 UV 분석결과 안정도에는 전혀 영향을 안 미치는 것으로 판명되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 본 연구에서는 입도분포가 10nm 정도의 100 ppm 이상의 농도를 갖는 안정된 고농축 silver colloid를 제조하였고 그 안정화 조건을 첨가제에 의하여 완성하였다.

라. 제조된 silver colloid의 유방염 원인 균에 대한 실험실적 및 현장 임상 시험 결과

실험실적 살균력을 시험하기 위하여 배지에 Colloni 등의 세균을 일정 온도에서 배양한 후 이에 제조된 농축 silver colloid를 투입한 후 생균수를 측정하였다. silver colloid의 시료는 6개월 간 실온 보관된 시료와 6개월간 냉장 보관(4℃) 시료를 이용하였으며 각 silver colloid는 안정제(lyso-lecithin)가 투입된 것과 투입되지 않은 시료를 각각의 보관 조건에서 멸균정도를 측정하고 비교하였다.

다음 표 3에 실온 보관된 시료의 실험실 적 멸균 시험 결과를 보였다.

표 3에서 보인 바와 같이 실온 보관된 시료는 전량 두 박테리아에 대하여 18분 후 완전 박멸이 이루어지는 것으로 판명되었다. 이는 앞서 밝힌 바와 같이 제조된 시료는 장기간 (6개월) 보관 후에도 그 안정도가 크게 저하되지 않고 따라서 살균력이 여전히 강하게 나타나고 있음을 보여준다.

그러나 silver colloid의 보관 상태에 따라 장기간 경과 시 그 안정도가 저하될 가능성이 있으므로 다음과 같이 표2와 동일한 시료를 silver colloid를 6개월간 냉장(4℃) 보관 후의 그 살균력을 평가하여 보았으며 그 결과를 표4에 나타내었다.

표 3과 표 4의 경우를 비교하여 볼 경우 냉장 보관 된 시료의 살균력이 다소 저하되는 것으로 판단되었다. 이는 냉장보관 시 콜로이드의 안정화도가 약화되어 결국 살균력이 저하되는 것으로 보인다. 이상의 결과로 보아 실험실적으로 제조된 농축 silver colloid는 그 안정도가 유지되는 한 박테리아성 세균의 살균에 크게 효과가 있는 것으로 판명된다.

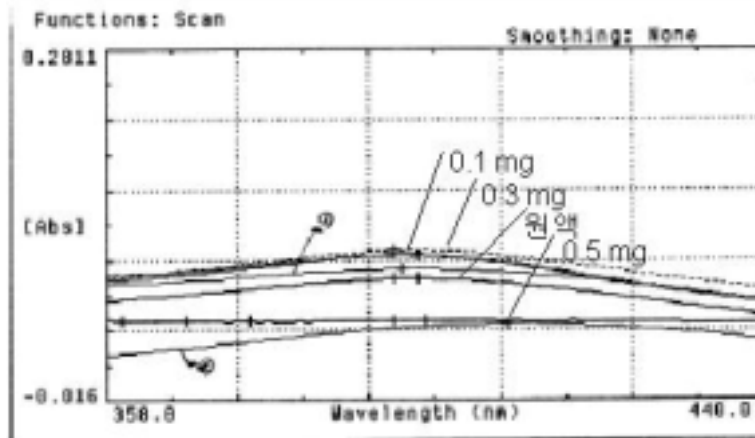


그림 12. 농축 silver colloid의 전해용액에 대한 안정화 UV spectrum

표 3 . 실온보관 된 실버콜로이드의 멸균 정도 결과 (초기 세균수 2.1×10^3)

	농축 여부	안정제 여부	농도 (ppm)	남아있는 균수 (25분후)	
				Colony	E Colli
S1	X	X	69.1	1	없음
S2	X	O	78.2	없음	없음
S3	10nm	O	82.9	없음	1
S4	100nm	O	75.9	없음	없음
S5	10nm	O	75.9	1	3
S6	100nm	X	69.2	1	1
S7	10nm	X	54.2	1	1
S8	100nm	O	71.9	1	4
Blank				8.9×10^2	8.9×10^2

표 4. 냉장보관 된 실버콜로이드의 멸균 정도 결과 (초기 세균수 8.0×10^3)

	농축 여부	안정제 여부	농도 (ppm)	남아있는 균수 (18분 후)	
				Colony	E Colli
S1	X	X	69.1	없음	없음
S2	X	O	78.2	없음	없음
S3	10nm	O	82.9	없음	없음
S4	100nm	O	75.9	없음	없음
S5	10nm	O	75.9	없음	없음
S6	100nm	X	69.2	없음	없음
S7	10nm	X	54.2	없음	없음
S8	100nm	O	71.9	없음	없음
Blank				1.3×10^2	1.4×10^2

다음은 현장 젖소 중 유방염에 기 감염된 젖소를 대상으로 실시한 결과이다. 검사방법으로는 임상형 젖소를 이용하였으며 유방염이 감염된 부위에 유두를 통하여 약물 투입용 주사기를 이용하여 제조된 시료를 하루 2번 5cc씩 주입한 후 감염 젖꼭지에서 생산된 우유를 따로 채집하여 체세포 분석을 실시하였다. 시험 시기는 약 2개월 정도로 하였으며 임상형은 10여마리 행하였고 생산우유의 체세포 변화 추이를 관찰하였다. 그 결과를 그림 13.에 나타내었다.

그림 13에 나타낸 바대로 유두로부터 생산되는 원유의 체세포는 투입직후부터 급격히 감소하기 시작하며 약 20여일 후부터는 만족할 만한 상태로 저하되는 것을 알 수 있다. 실제 생산된 원유의 상태도 대부분의 임상형 젖소에서 투입 후부터 점성이 줄어들었으며 고형물이 나타나지 않았다. 이는 염증부위가 치유되는 것으로 판단되어지나 각 세균별로 차이가 있어서 일부 임상형 젖소에서는 약간의 효과가 나타났다. 그러나 그러한 경우에 기존 항생제와 같이 쓸 경우에 항생제 단독으로 쓰던 때보다는 본 silver colloid를 병행하여 쓰는 경우에 탁월하게 효과가 나는 것으로 현장 시험 중 경험상 밝혀졌다. 그러나 이러한 차이는 세균의 종에 따라 차등을 보이는 것으로 보이며 결론적으로 silver colloid는 임상형 유방염증에 대한 효과가 있으며 일부 기존 항생제와 병행하는 경우 그 효과가 크게 상승하는 것으로 보아 치료 보조제로서의 가능성은 충분하다고 여겨진다.

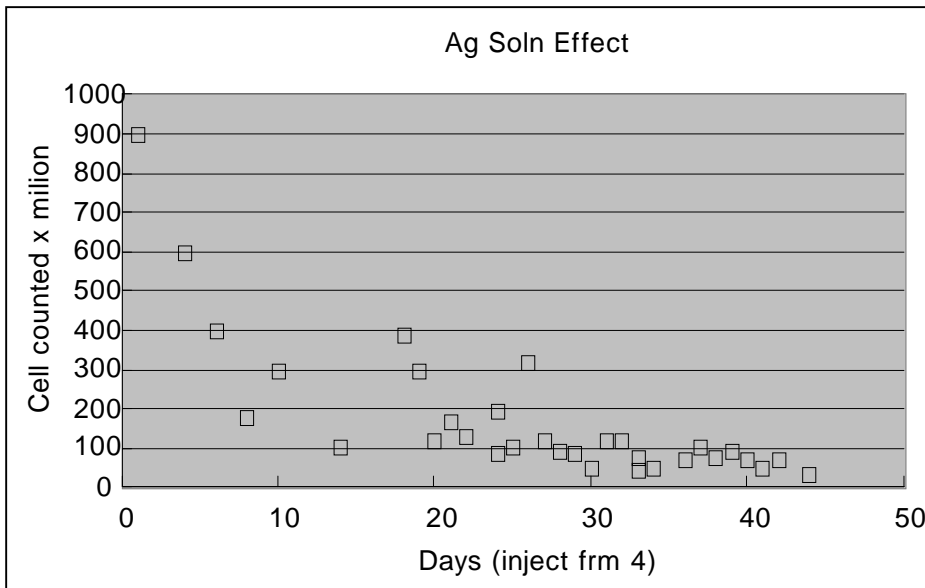


그림 13. Silver colloid를 임상형 젖소의 유두에 투입 후 원유의 체세포 변화추이

2. 알코올환원법에 의한 고농도 silver colloid의 제조

가. 시약 및 재료

본 연구에서 사용한 재료는 질산은(Silver Nitrate, AgNO_3 99+%, Kanto Chem.), 에틸알코올(Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Aldrich, 99%), 초순수(Human Power I+, 18.3M Ω) 등이었으며 분산안정제로서 lyso-lecithin (Aldrich, 99+%) 및 PVP(Polyvinylpyrrolidone, MW 10,000 Junsei Chem.)을 사용하였다.

본 연구에서 사용되는 물은 모두 초순수(Human Power I+, 18.3M Ω)를 사용하였으며 실험에 사용하기 전에 초음파에 의하여 용해된 산소를 모두 제거 후 사용하였다.

나. 알코올 환원법에 의한 silver colloid의 제조

은 나노입자는 그림 14.에 보인바와 같은 반응장치를 이용하여 알코올 환원법에 의하여 제조하였다. 반응기는 항온조와 연결된 자켓형 반응기를 사용하였으며 반응 중 에탄올의 증발에 의한 손실을 방지하기 위하여 냉각트랩(콘덴서)을 설치하였다. 반응온도는 실험조건에 따라 다양하게 변화 하였으며 (25~90 °C) 냉각트랩 온도는 -2°C로 유지하여 증발에 의한 에탄올 손실을 방지하였다. 반응 중에는 반응기 내부를 질소로 purge하여 생성되는 은 입자의 산화를 방지하였고 반응을 촉진하기 위하여 교반기를 설치하여 일정한 속도(약 20 rpm)로 반응물을 교반시켰다.

반응 중 수용액에서 생성되는 은 나노입자의 산화를 방지하기 위하여 사용한 초순수(Human Power I+, 18.3M Ω)는 초음파로 용액속의 산소를 제거하여 반응기에 투입하였으며 반응 전에 반응기 빈 공간 공기는 질소 purge에 의해 제거 후 일정 온도에서 반응을 실행하였다. 환원법에 의한 제조는 반응시간, 반응온도, 반응물의 질량비 (AgNO_3 /안정제함량) 바뀌가며 행하였다.

제조 방법은 반응기에 주어진 량의 AgNO_3 를 넣고 완전히 녹인 후 일정온도를 유지한다. 일정시간이 지나면 에틸알코올 수용액을 일정량 넣고 분산안정제인 PVP 또는 lyso-lecithin을 넣은 후 약 2시간가량 충분히 반응시켜 환원된 은 나노입자의 은 콜로이드를 얻었다.

매 제조시료마다 UV 분광계(601, Shimazu)를 이용하여 환원 정도를 평가하였다. 본 연구에서 측정된 은 콜로이드에 대한 전형적인 UV 흡수 결과를 그림. 15.에 보였다. 은 나노입자는 수 nm에서 수십 nm (약 20~30 nm)의 영역에서 UV 400~450 nm 영역에서 강한 흡수 peak를 갖는 것으로 알려져 있다. 이러한 UV peak로서 알 수 있는 것은 은 나노입자의 형성의 확인뿐만 아니라, 입자크기 분포 및 입자의 농도를 알 수 있다. 즉 입자의 농도가 높을수록 450nm 근처의 흡수 peak의 높이 (최대 높이)가 높아지며, 입도가 작을수록 최대 흡수 꼭짓점이 보다 낮은 파장대로 이동한다. 또 입도 크기 분포가 균일할수록 흡수 peak 밴드가 협소해지고 불균일할수록 밴드 폭이 커지게 된다[5]. 따라서 UV 흡수피크를 관찰함으로써 은 나노입자의 모양과 농도의 상대적 측정이 가능해진다.

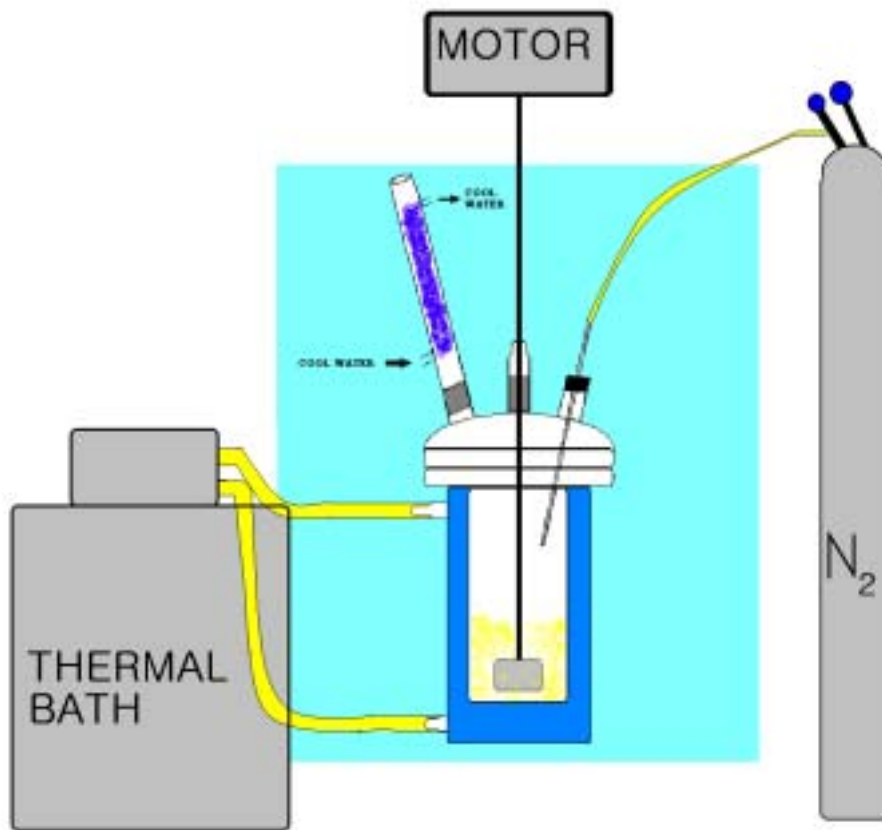


그림 14. Schematics of reaction apparatus for silver nano-particle production.

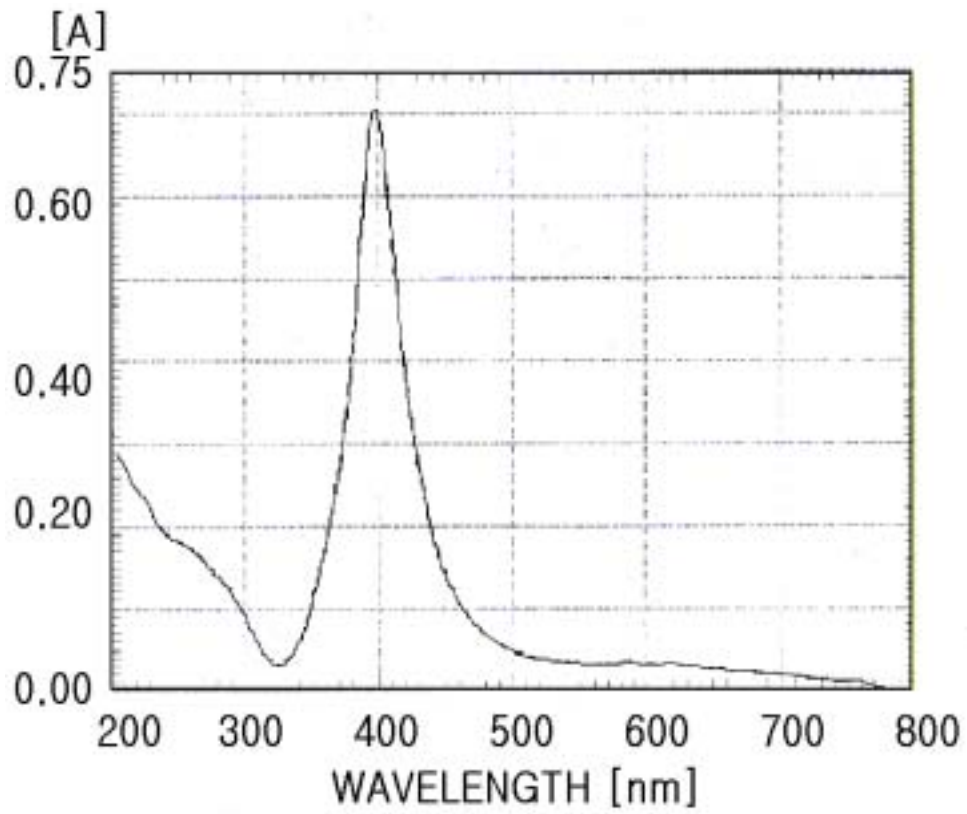


그림. 15. A typical UV absorption spectrum of silver colloidal solution.

다. 제조 조건의 확립

1) 반응온도에 따른 silver colloid의 특성 변화

은 콜로이드의 제조에 있어서 반응온도에 따른 은 입자의 특성을 관찰하기 위하여, 안정화제로서 PVP를 이용하고 반응온도를 변화시켜가며 2시간 반응 후 은 콜로이드의 특성을 조사하였다. 그림 16, 17, 및 18은 AgNO_3 의 농도가 0.025wt%, 에탄올 5.0 w% 및 PVP 0.065 w%인 경우 반응시간이 2 시간인 경우에 반응온도에 따른 환원정도 (UV 최대 peak 값), 입도, 제타전위를 나타낸 것이다.

그림. 16에 보인 바와 같이 PVP를 안정화제로 사용한 경우 환원 반응은 반응온도에 큰 영향을 받았다. 즉, 반응온도가 증가함에 따라 생성된 은 입자의 농도 (UV 최대 peak 값의 크기)가 급격하게 증가 하였다. 그림. 17에 보인 바와 같이 은 입도 변화도 반응온도에 큰 영향을 받는다. 반응온도가 아주 낮은 25 °C의 경우에는 반응이 거의 진행이 되지 않은 관계로 입도가 거의 형성되지 않아서 오히려 매우 낮은 값을 나타낸다. 그러나 반응온도가 충분히 높은 40 °C 이상의 경우에는 반응온도가 높음에 따라서 입자의 평균 크기가 급격히 감소함을 보이고 있다. 이는 온도가 높을수록 환원 반응이 잘 일어남과 동시에 분산성이 우수하고 따라서 입자의 크기가 작아짐을 의미한다. 실제로 시료 보관 중 온도가 높은 것일수록 그 안정도가 우수함을 알 수가 있었다. 즉, 보다 높은 온도에서 제조된 시료일수록 시료용기에서 은의 응집에 의한 침전이 잘 일어나지 않았으며 90°C에서 반응한 경우에는 수개월이 지나도록 전혀 침전이 일어나지 않았다. 이러한 결과는 그림. 10의 제타 전위 값과 비교하면 확연해진다. 즉 반응온도가 높아짐에 따라서 제타전위의 절대값이 커지고 있다. 그림. 16와 비교하면 정확히 그 경향이 일치하는 것을 알 수가 있다. 즉 제타 전위 값이 클수록 입자의 평균 크기가 작음을 알 수가 있다.

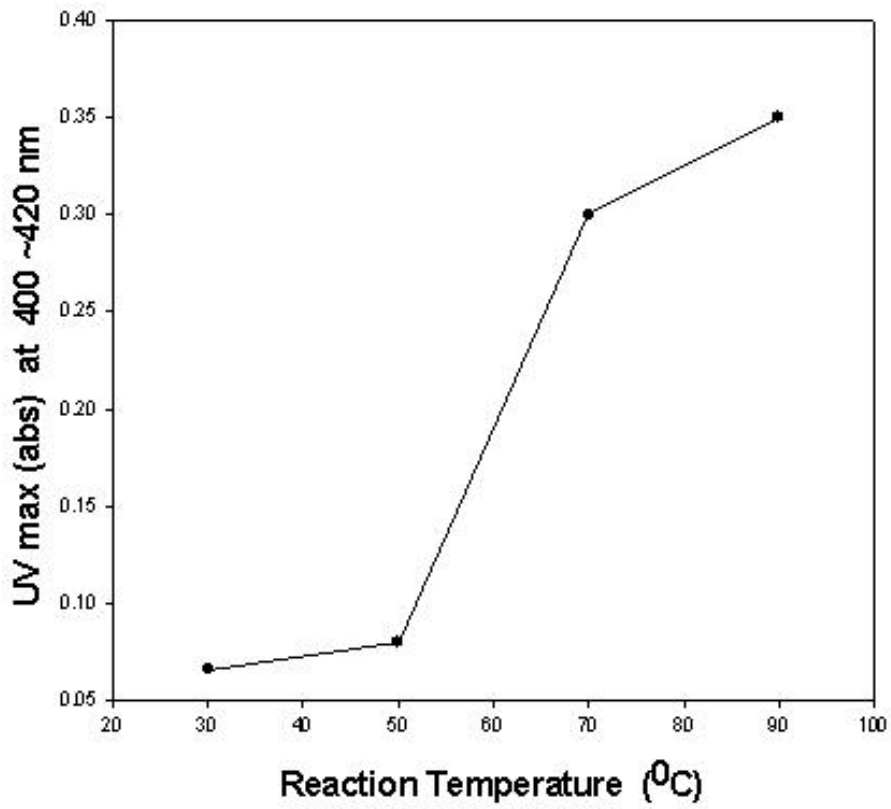
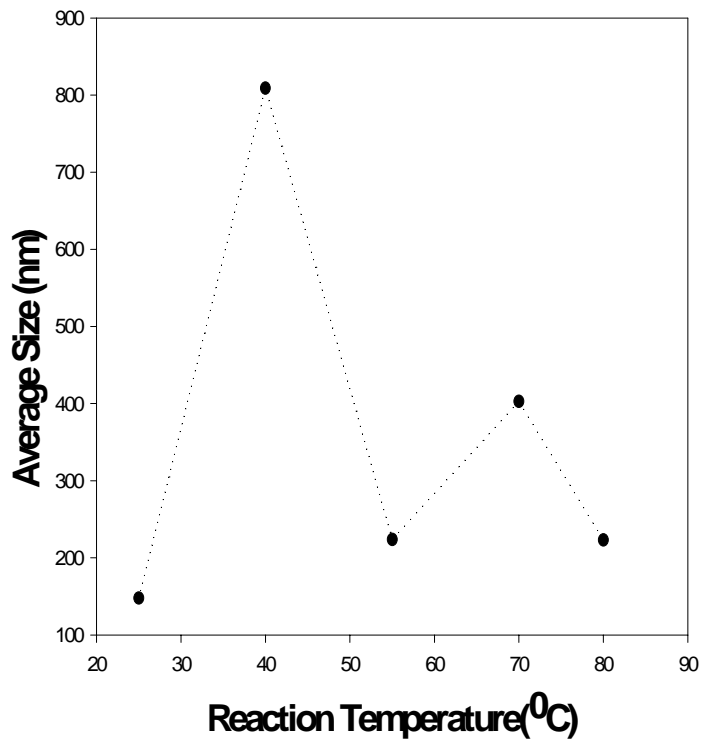
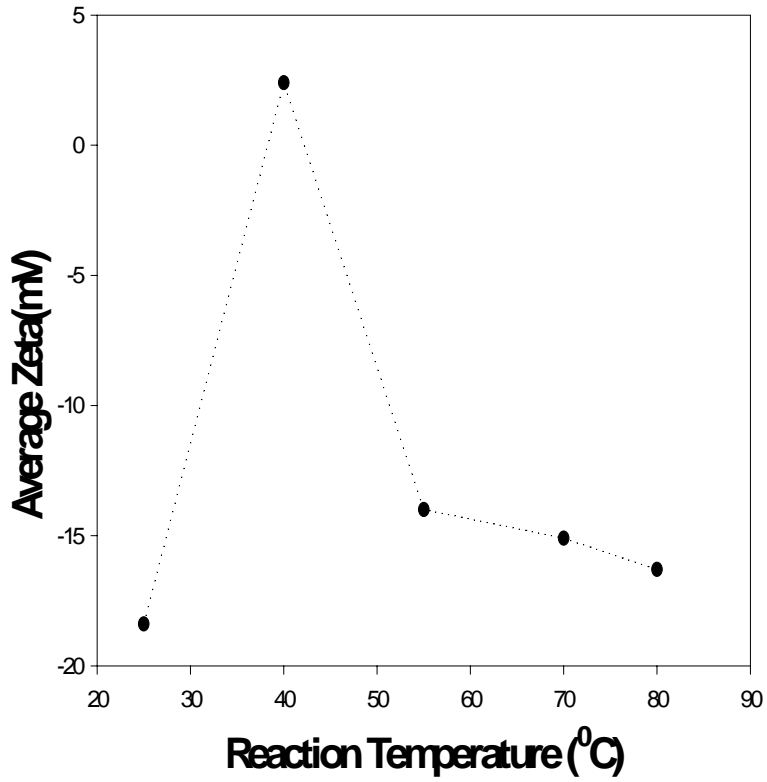


그림 16. Maximum UV peak of silver colloid formed by alcohol reduction of silver nitrate at various reaction temperatures in the presence of PVP stabilizer.



Silver Nitrate 0.025wt%, PVP 0.065wt%, Ethanol 5wt%, Reaction Time 2hr

그림 17. Average particle size of silver colloid formed by alcohol reduction of silver nitrate at various reaction temperatures in the presence of PVP stabilizer.



Silver Nitrate 0.025wt%, PVP0.065wt%, Ethanol5wt%, Reaction Time 2hr

그림 18. ζ -potentials of silver colloids formed by alcohol reduction of silver nitrate at various reaction temperatures in the presence of PVP stabilizer.

이상의 결과를 볼 때 PVP를 안정화제로 사용하는 경우에 반응온도가 높을수록 환원 반응율이 증가하며 또한 제타전위가 증가하여 입자 평균 크기가 작아진다. 또한 PVP를 안정화제로 사용한 경우에는 은 입자의 콜로이드의 안정성은 입자표면의 정전기적 제타전위에 크게 좌우된다고 할 수 있다.

2). PVP 농도변화에 의한 silver colloid의 변화

은 입자의 환원성과 표면제타 전위는 흡착된 PVP의 표면흡착량 (흡착분자 갯수/단위표면적)과 밀접한 관계가 있다. 일반적으로 평형상태에서 표면흡착량은 용액의 흡착질의 농도에 따라 증가하므로 PVP 농도에 따른 은 콜로이드의 특성 변화를 관찰하였다. 실험조건으로는 온도 70 °C에서 에탄올 농도 5w%, 반응시간을 2 hr으로 한 경우, 질산은의 농도 0.025wt% 및 0.125 wt%에 대하여 각각 PVP의 농도를 변화 시키며 silver colloid를 제조하였다.

그림. 19 및 20에 PVP 농도 변화에 따라 제조된 은 콜로이드의 입경과 제타 전위를 보였다. 그림. 19에 보인 바와 같이 은 입자의 크기에는 본 연구에 사용된 PVP 농도 범위에서는 PVP 농도와는 큰 영향이 없는 것으로 보인다. 그러나 은 콜로이드가 없는 PVP의 경우의 2366 nm에 비해서 최저 약 300여 nm로 현저히 낮음을 알 수 있다. 이는 PVP가 자체적으로 존재하는 상태보다는 은 콜로이드 입자와 섞여 있는 경우에 엉켜 있는 PVP입자의 크기가 현저히 작음을 의미한다. 이는 PVP 및 은 입자가 같이 있는 경우에 은 나노입자를 주위로 일부 분자들이 흡착을 하여 결국 입도가 작게 되는 것으로 사료된다. 그러나 PVP 농도 변화에 의한 은 콜로이드 입도 크기는 본 연구 조건에서는 큰 변화가 없는 것으로 보인다. 이는 그림. 20에 나타낸 은 콜로이드의 제타전위 값의 변화에서도 같은 결과를 보이고 있는데, 이는 본 연구에서 사용된 PVP 농도 조건에서는 거의 모든 PVP 분자가 은 입자를 중심으로 플러를 이루며 PVP 양이 이 양이 은 콜로이드의 양에 비해 충분하여 큰 변화를 주지 않는 것으로 보인다. 따라서 입자의 제타전위도 파인 흡착 후 PVP 농도에 따른 큰 변화가 관찰되지 않는 것으로 보인다.

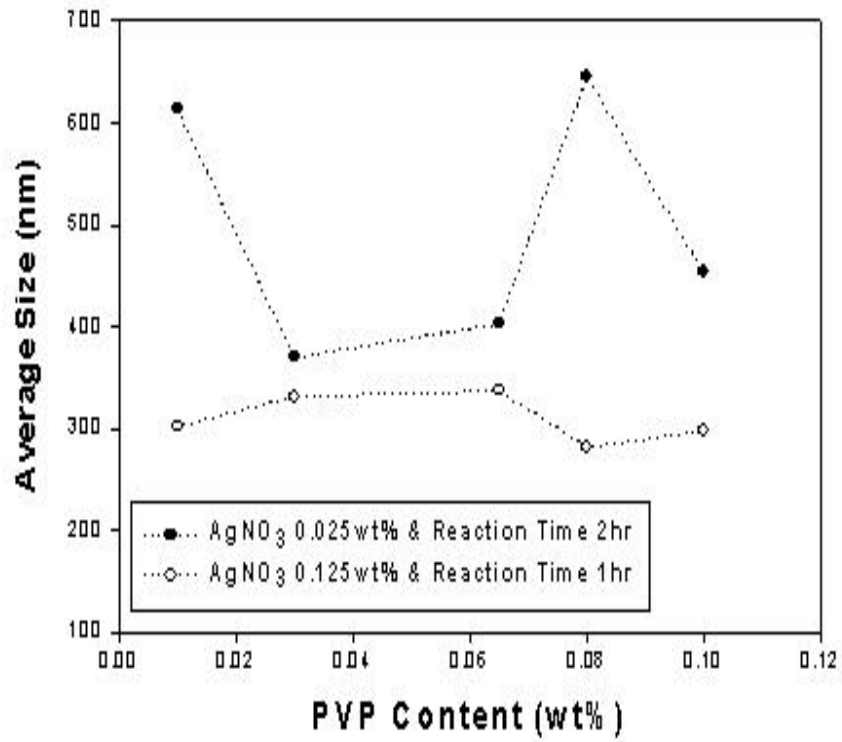


그림. 19. Effect of PVP content on the averaged particle size of silver nano particles at two different silver nitrate concentration.

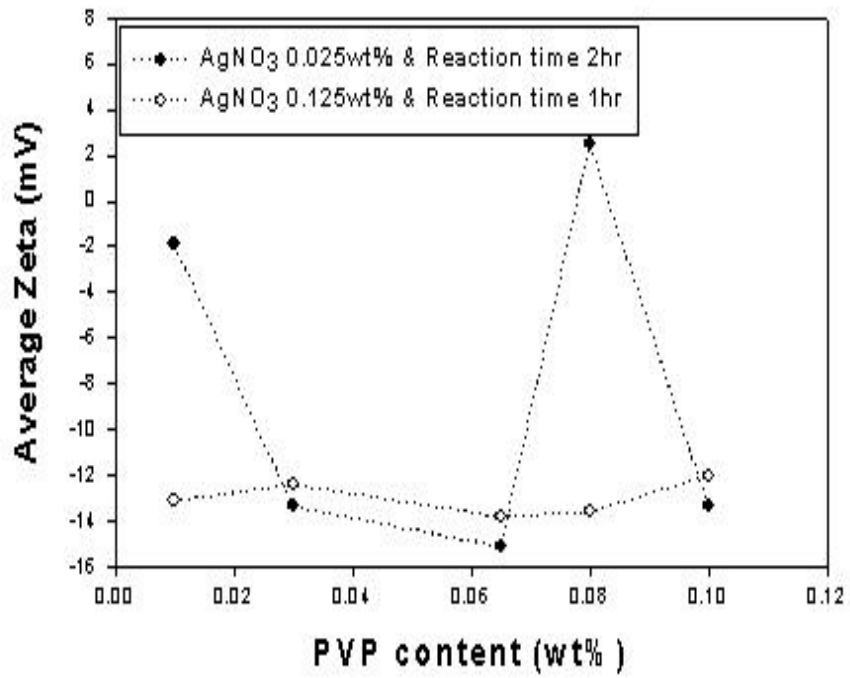


그림. 20. Effect of PVP content on ζ -potential of silver nano particles at two different silver nitrate concentration.

그림 19 및 20.은 AgNO₃ 농도를 달리 했을 경우에 반응 후 생성된 은 콜로이드의 입도분포 및 제타전위를 나타내고 있다. AgNO₃의 농도가 상대적으로 높은 0.125 w%의 경우에는 측정치가 거의 균일한 반면에 상대적으로 낮은 0.025 w%의 경우에는 측정치가 불규칙한 것을 볼 수 있다. 이는 농도가 매우 낮은 0.025 w%의 경우에는 시료 중 생성된 은 농도가 특히 낮아서 측정 시 실험 오차발생이 심하기 때문으로 보이며 결과적으로 AgNO₃의 농도에 따른 은 콜로이드의 입도크기는 거의 영향이 없는 것으로 보인다. 이 결과는 앞서 보인 그림 19 및 20.의 PVP 농도에 의한 영향의 결과와 일치하는 것으로서 본 연구의 실험 조건에 PVP 농도 및 AgNO₃의 농도에 의한 은 콜로이드 입자의 입도 분포나 제타 전위는 큰 영향이 없는 것으로 보인다.

3) PVP로 안정된 silver colloid의 pH변화에 따른 물성 변화

분산안정제로 PVP를 첨가하여 제조한 silver colloid 용액을 pH를 변화시켜 silver colloid의 입도 및 제타전위를 측정하였다. pH 변화는 NaOH 및 HCl 수용액으로 시료에 가하여 변화 시킨 후 콜로이드의 입도 및 제타전위 변화를 관찰하였다. 실험 결과를 그림 21. 및 22.에 pH 변화에 따른 은 콜로이드의 제타전위와 평균 입경을 보였다.

pH 변화에 대한 무기입자의 제타전위는 일반적으로 낮은 pH에서 양전하에 가깝다가 pH가 높아짐에 따라서 음전하로 변하는 것으로 알려져 있다. 이 경우에 어느 pH에서는 제타 전위가 0이 되는 경우가 생기는데 이 pH를 ‘등전점’이라 부른다. 이러한 등전점에서는 입자간의 반발력이 없어지므로 입자끼리 뭉치게 되어 입도가 현저히 커지게 된다[6,7].

그림 21.을 고찰하여 보면 이러한 경향을 알 수가 있는데 PVP로 안정화된 은 입자의 경우 pH가 낮은 범위에서는 제타전위 값이 양(+)전하를 갖다가 알카리화할수록 음(-)전위가 강해짐을 알 수가 있다. 실험에 사용된 은 콜로이드의 경우 pH가 약 4~5인 경우에 등전점이 발생하는 것으로 보이며 pH값이 약 8인 경우에 제타 음전위 세기가 가장 강함을 알 수가 있다. 그러나 pH가 8이상인 경우에는 제타 전위가 오히려 급격히 떨어지는 것을 볼 수 있다. 이는 pH가 아주 높은 경우에는 흡착된 PVP와 은간의 표면결합력이 약화되고 PVP가 자체적으로 코일을 형성하기 때문으로 보인다.

그림 22.에 보인 pH 변화에 따른 은 나노입자의 평균입도 크기 변화와 그림 18.의 제타전위 변화를 비교하여 보면 등전점인 pH 4 근처에서 입도크기가 매우 크며 pH가 4이하이거나 높은 경우에는 입도크기가 상대적으로 매우 작은 것을 볼 수 있다. 또 pH 7~8 부근에서는 제타전위 절대값이 가장 큰 관계로 입자 평균 크기가 가장 작은 것을 알 수 있다. 이는 제타 전위의 절대값이 입도 크기 변화에 매우 큰 영향을 줌을 보이는 것이다. 그러나 pH 8이상에서는 제타전위 절대값이 급격히 떨어지고 따라서 입도크기가 급격히 커짐을 알 수 있다. 이는 pH 8에서는 PVP 분자 특성상 은 입자와의 결합력의 약화로 PVP 분자가 자체적으로 꼬여서 큰 입자를 이루고 제타전위가 떨어지는 것으로 추정된다. 이 결과로 보면 PVP 고분자에 의한 안정한 은 콜로이드를 제조하기 위해서는 본 연구조건 범위에서 적정 pH가 존재하며 수용액 성질이 거의 중성이어야 할 것으로 보인다.

4). Lyso-lecithin의 농도변화에 따른 silver colloid의 변화

Lyso-lecithin는 수분산성 (수용성) 천연 고분자 물질로 많은 용도로 사용되고 있다. 본 연구에서는 이를 분산 안정제로 하여 silver colloid를 제조하였다. Lyso-lecithin 분자는 다량의 수화기(-OH)를 함유하고 있으므로 은 나노입자의 친수화를 촉진할 것으로 보인다. 즉 lyso-lecithin이 은 입자에 흡착하는 경우에는 입자의 친수성이 강화되어 수화력이 증대되어 안정화를 이룰 것으로 보인다. 따라서 lyso-lecithin를 안정화제로 사용한 경우에 대한 AgNO₃의 알콜 환원을 하고 이들 각 시료에 대한 물성을 측정하였다.

그림 23.는 온도 70 °C의 경우 에탄올 5w%, AgNO₃ 0.125 w%의 조건하에서 lyso-lecithin의 농도를 변화에 따른 제조된 silver colloid의 UV 최대 흡수값을 측정한 결과이다. 그림. 23에 보인 바와 같이 lyso-lecithin의 농도가 증가함에 따라 초기에는 은 입자 생성 농도가 높아지다가 약 0.0025 w%에서 최대값을 보이고 그 이상 농도에서는 입자의 농도가 현저하게 줄어드는 것을 볼 수 있다. 이는 lyso-lecithin가 안정제 역할을 하지만 과량 투입 시에 오히려 역효과를 내는 것으로서 은 입자의 표면 코팅에 따른 제타 전위등과 깊은 관련이 있을 것으로 판명된다[7].

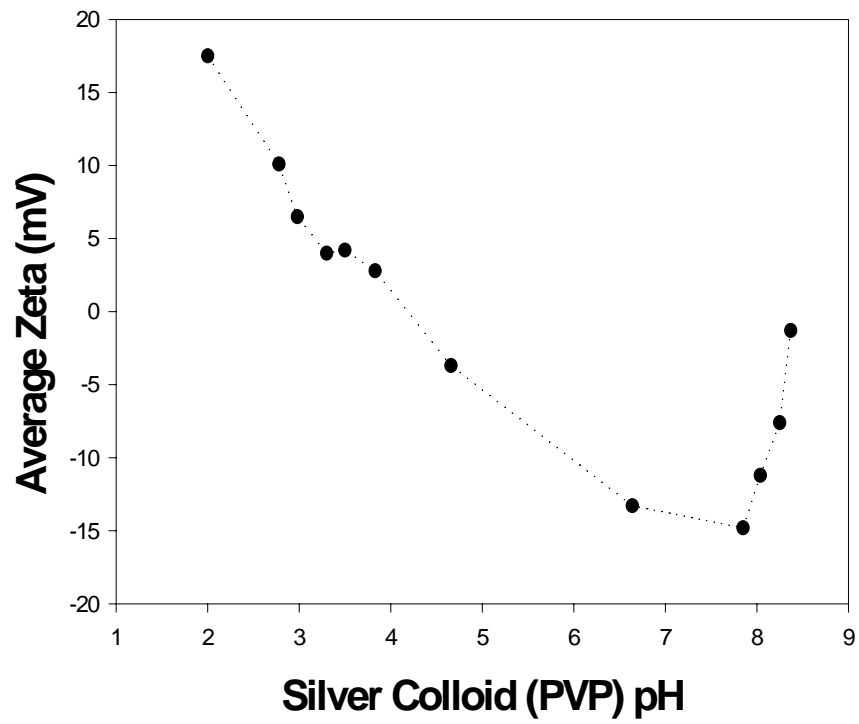


그림. 21. Effect of pH on ζ -potential of silver nano particles.

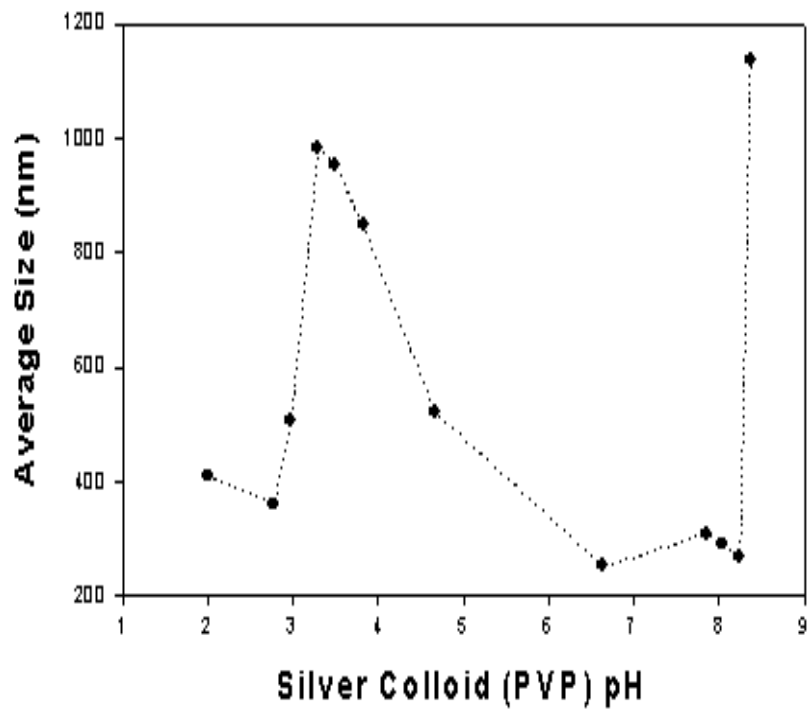


그림. 22. Effect of pH on the averaged particle size of silver nano particles.

은 입자의 입도와의 상관성을 보기 위하여 평균 입도를 측정된 결과를 그림 24.에 보였다. 그림 23.와 마찬가지로 평균입도도 lyso-lecithin의 농도 증가 시에 초기에 입도 크기가 매우 작아지다가 0.0025 w% ($\ln C = -6$ 인 값) 이상 투입 시에는 오히려 그 크기가 커짐을 알 수 가 있다. 최적 lyso-lecithin 투입량은 본 연구와 같은 실험 조건 하에서는 0.0025 w%인 것으로 보인다.

앞에서 밝힌 바대로 PVP의 경우에 은 입자의 제타전위의 크기가 입자의 안정도 및 크기에 결정적인 영향을 주었다. lyso-lecithin의 경우에도 이러한 제타전위의 영향을 알아보기 위하여 PVP의 경우와 마찬가지로 제타 전위를 측정하였다. 측정결과를 그림 25.에 나타내었다. 그림 25.에서 보인 대로 제타전위는 앞의 그림 23. 및 24.의 경우처럼 적정농도인 0.0025 w%보다 훨씬 적은 지점 (약 0.0016 w%, 즉 $\ln C = -11$) 인 지점에서 최대 절대값을 갖은 것으로 판명된다. 더더욱 제타전위가 PVP의 경우에 비하여 매우 낮은 값을 보이고 있다. 즉 제타전위와 입도의 크기 및 안정화와는 밀접한 관계가 PVP에 비하여 훨씬 덜 존재하는 것으로 보인다.

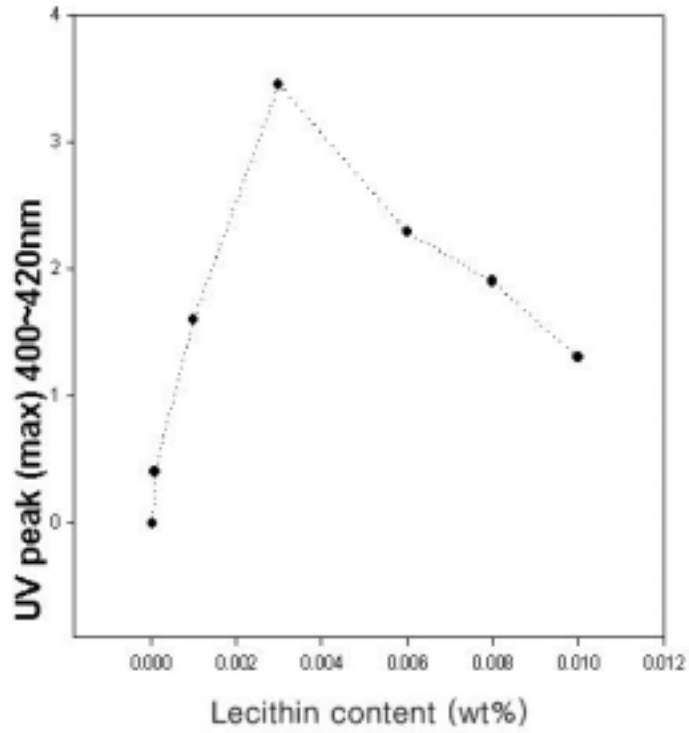


그림 23. Maximum UV peak of silver colloid formed by alcohol reduction of silver nitrate at various content of Lecithin stabilizer.

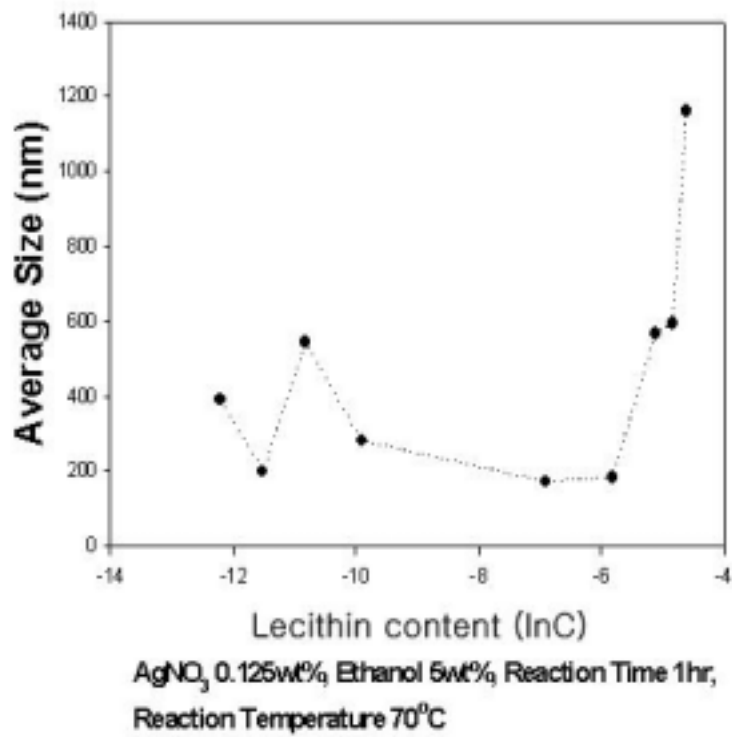


그림 24. Average particle size of silver colloid formed by alcohol reduction of silver nitrate at various content of Lecithin stabilizer.

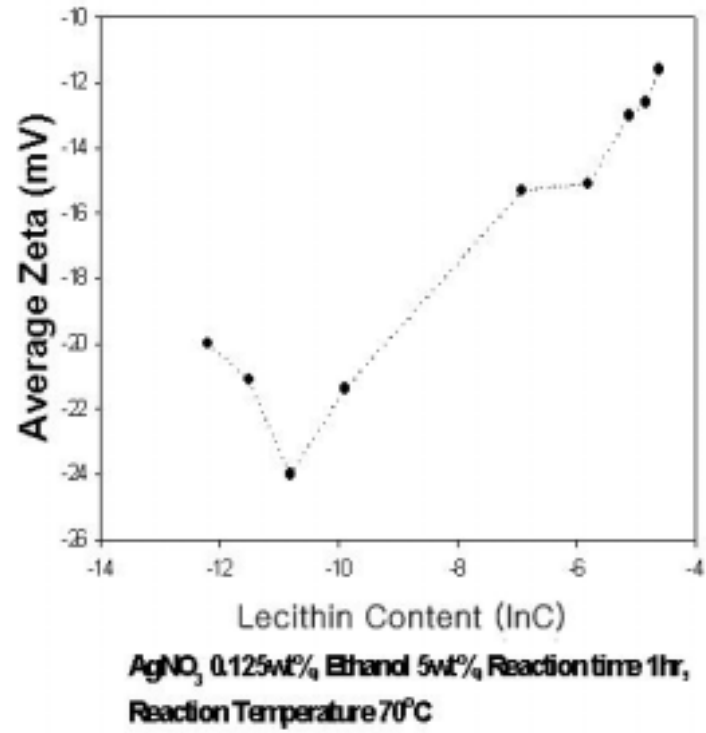


그림. 25. ζ -potentials of silver colloids formed by alcohol reduction of silver nitrate at various content of Lecithin stabilizer.

5). 레시틴(lecithin)에 의한 silver 표면의 수화 (젖음성)

앞서 밝힌 대로 lyso-lecithin를 안정화제로 사용하는 경우에는 입도크기 및 분산 안정도와 제타전위와는 밀접한 관계가 상대적으로 약해 보였다. 따라서 보다 구체적인 lyso-lecithin의 역할을 조사하기 위하여 lyso-lecithin 특성상 수화기가 많으므로 은입자 표면의 lyso-lecithin 흡착에 의한 수화 율을 측정하여 보았다. 즉 입자표면의 젖음성(solute-solvent interaction)이 가장 중요한 인자로 판단되므로 이의 검토를 위하여 silver 표면과 수용액간의 접촉각을 측정하여 표면젖음성을 측정하였다. 그 접촉각 측정 결과를 그림. 26에 보였다. 이 경우 접촉각은 은/공기/수용액 간의 3개의 상이 만나는 지점의 값이 되고 접촉각이 작을수록 수화도가 높음을 의미한다[8,9].

그림 26.의 경우에 lyso-lecithin 농도에 따른 전진접촉각 및 후진접촉각을 보이고 있는데 여기서 수화도(젖음성)를 나타내는 지표는 전진접촉각에 해당된다. 그림.26.의 전진접촉각 측정치를 보면 전진접촉각이 lyso-lecithin의 농도가 0.0025~0.0030 w%일 경우가 가장 최저임을 알 수 있다. 이는 앞의 그림. 23 및 24에서 보인 최저의 입도 분포 및 최대의 안정도를 보인 최적 농도인 0.0025 wt%의 결과와 일치한다. 즉, lyso-lecithin의 큰 특징은 PVP와는 별개로 제타전위의 변화보다는 은 입자 표면의 수화도 향상과 관계가 깊은 것으로 판명된다. 또한 PVP와 비교시 상대적으로 훨씬 적은 양으로 매우 작은 크기의 입자를 형성하는 장점이 있다.

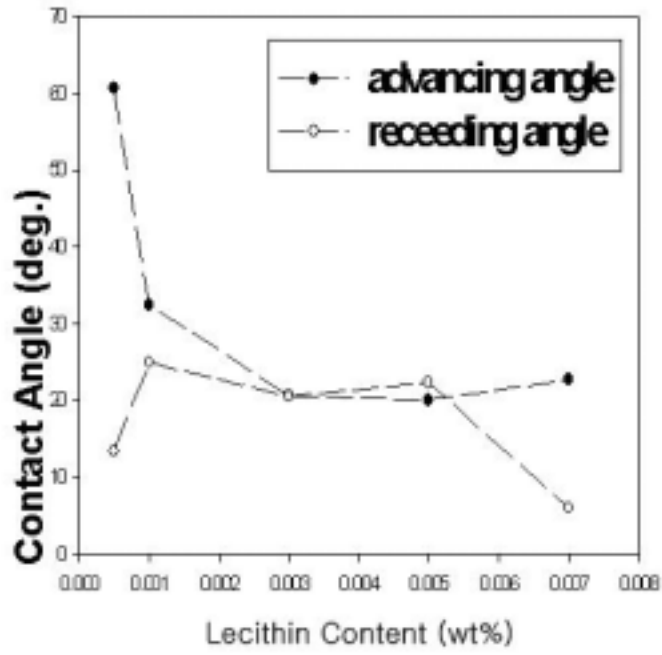


그림 26. Advancing and receding contact angles of silver/air/water when the water contains various amount of Lecithin stabilizer.

그림 26.에서 보면 lyso-lecithin는 은 표면에 흡착하는 경우에 매우 강하게 흡착하는 것으로 보인다. Lyso-lecithin이 전혀 존재하지 않은 경우에는 전진접촉각이 거의 60 °에 이르다가 충분한 양이 가해지면 거의 20°까지 줄어들음을 확인할 수가 있다. 이는 lyso-lecithin의 농도가 높아지면서 은 표면이 강력하게 친수화 됨을 의미하며 또한 lyso-lecithin이 은 표면에 매우 강하게 흡착함을 의미한다[10].

Lyso-lecithin의 은표면 흡착 강도를 알아보기 위하여 그림. 27에 보인 바대로 접촉각 hysteresis를 검토하여 보았다. 그림 27.에 보인 바대로 접촉각 hysteresis는 lyso-lecithin이 은 입자를 가장 적정하게 안정화시키는 적정농도인 0.0025~0.0030 w% 범위에서 가장 낮은 hysteresis 값을 보인다 (거의 0). 이는 lyso-lecithin의 농도가 0.0025~0.0030 w% 범위에서 은 의 표면 성질이 화학적으로 가장 균일함을 의미하는 것으로서 그만큼 안정한 표면을 갖게 됨을 의미한다. 이의 결과를 앞의 접촉각 곡선 (그림 26)과 비교할 때 0.0030 w% 이상에서 전진접촉각이 오히려 약간 증가한 것을 관찰할 수 있는데 이는 표면의 불균일성의 증가에 기인한 것으로 보인다. 따라서 적정 lyso-lecithin의 함량 이상에서는 입자의 크기가 오히려 증가하고 안정도가 감소하는 것으로 보인다.

6) 제조된 silver 콜로이드의 전자현미경 관찰

그림 28. 에 lyso-lecithin의 최적 농도인 0.0025 w% 존재 하에 제조된 silver colloid의 전자현미경 사진을 나타내었다. 전자현미경 측정 결과 콜로이드 상의 은 입자는 미세하게는 2~5 nm 이며 큰 입자들로서 10~30 nm 크기인 것으로 보인다. 앞은 광산란 법에 의해 측정된 결과와 큰 차이를 보이고 있는데 그 이유는 광산란법의 경우 은 입자와 고분자성 안정제인 PVP 혹은 lyso-lecithin분자들이 엉켜있는 형태로서 입자의 실제 크기보다 훨씬 크게 측정되기 때문이다. 그러나 UV spectrum 결과에서는 은 입자가 전자현미경 사진에서처럼 수 nm의 매우 작은 안정된 상태로 나타났다.

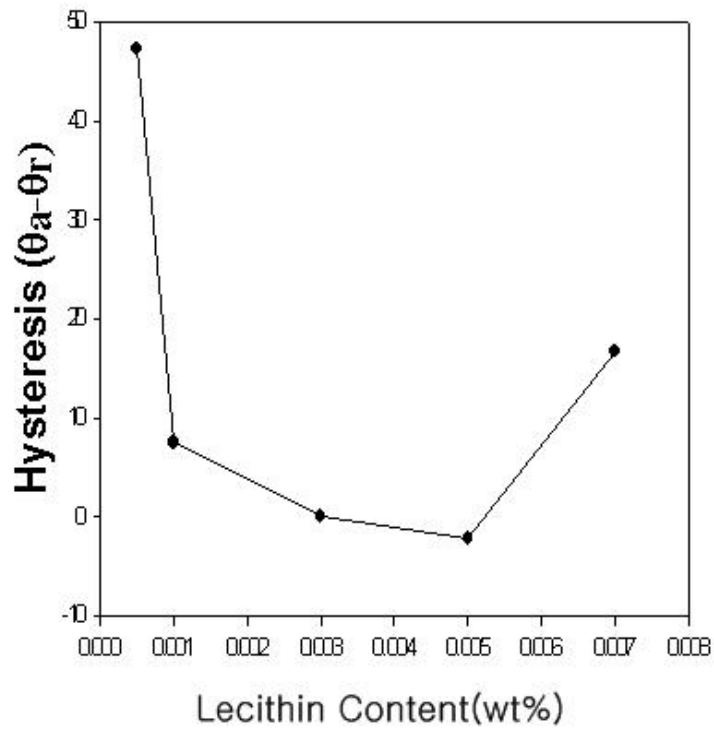


그림 27. Contact angles hysteresis of silver/air/water when the water contains various amount of Lecithin stabilizer.

따라서 이상의 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. PVP는 은 입자의 표면 수화도에는 큰 영향을 안주며 은 나노입자의 표면 제타 전위의 변화에 큰 영향을 주어 콜로이드를 안정화 시킨다.
2. Lyso-lecithin은 안정화제로서 제타전위보다는 은 입자의 수화도를 향상시켜서 안정화 시킨다.
3. PVP보다 lyso-lecithin가 silver colloid의 입도 및 제타 전위에 탁월한 성능을 보여준다.
4. 적정량의 lyso-lecithin 존재 하에서 알코올 환원법에 의하여 수 nm의 silver 나노입자를 제조하였다 (안정된 콜로이드).
5. lyso-lecithin의 흡착이 은 입자표면의 수화를 증대시키고 (θ_a 감소) 콜로이드를 안정화 하였다. 입자의 크기를 크게 감소(수nm)시켰다.
6. 환원 반응 온도가 높을수록 안정된 silver colloid가 생성되며 silver colloid의 농도를 증가하였다. 는 안정화제로서 제타전위보다는 은 입자의 수화도를 향상시켜서 안정화 시킨다.

이상으로 환원법에 의하여 고농도의 silver colloids를 제조하였으며 그 최적 조건을 확립하였다. 최적 조건에서 제조된 silver colloid는 수 nm 크기 (약 5nm 이하)의 고분산성이며 또한 농도가 기존 전기분해 방식하고는 비교할 수 없을 정도로 1000~3000 ppm의 고농축이었다. 그리고 안정도는 몇 개월이 지나도 안정할 정도로 매우 안정된 우수한 silver colloid를 얻게 되었다.

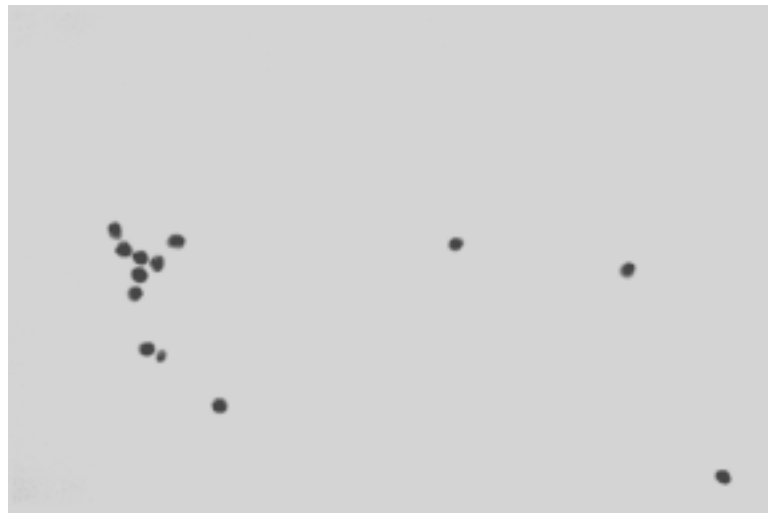
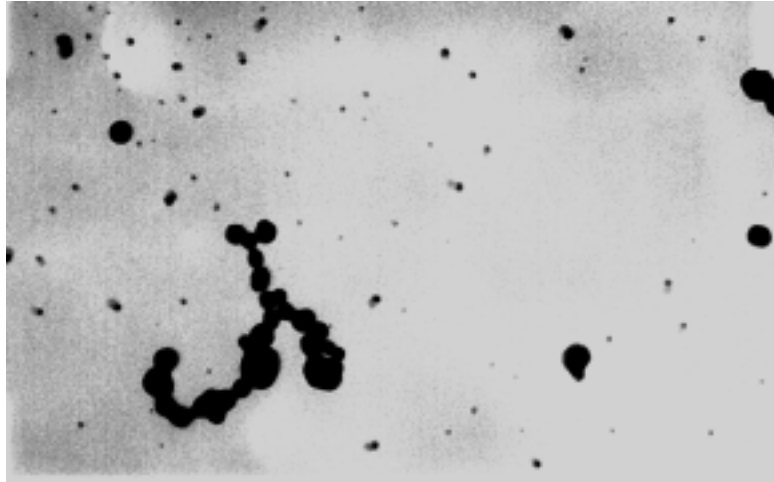


그림. 28. Silver nanoparticles by TEM, which is formed at 0.0025 w% Lecithin. (— 100 nm)

라. 임상시험 결과

1) 용액상 병원균 시험

병원균 시험은 유방염 유발의 대표적인 균을 알려진 다음의 병원균에 대하여 각 시료별로 행하였다.

- 포도상 구균 : *Staphylococcus aureus*
- 연쇄포도상 구균: *Str. agalactiae*
- 대장균 : *E. Coli* & *A. aerogenes*

시험 조건은 유방 조건인 체온 약 35 °C에서 배양된 세균의 생균수를 시간별로 측정하였다. 시험 방법은 배양액 속에 세균을 하루정도 배양시킨 후 준비된 시약을 용액 대비 1.0%로 투입한 후 용액 내 생균수를 시간별로 측정하였다.

우선 은 콜로이드 자체의 상기 병원균에 대한 살균력을 검토하기 위하여 전기분해에 의해 얻어진 은 이온 수용액 과 아울러 같은 은 농도에서 lysolecithin-Ag 리피드 용액의 살균력을 시험하였다. 수용액에 포함된 은 입자의 크기는 2nm 이하이었으며 Ag의 농도는 100 ppm 정도이었다. 표 4에 *Staphylococcus aureus* 및 *Str. agalactiae* 균주에 대한 시험 결과를 나타내었다.

표 5을 보면 Ag는 상기 두 세균에 대한 박멸효과가 뚜렷이 있음을 보게 된다. 특히 동 조건에서 세균 사멸은 약 20분 후부터는 완전 박멸되는 것으로 관찰되었다. lyso-lecithin을 이용한 lipid 형태를 갖는 경우 그 효과가 더욱 뚜렷한 것으로 보이는데 그 이유는 lipid에 의한 구조적인 영향으로 사료된다[1].

2) 배지상 병원균 시험

본 시험에서는 Petri dish 내에서 배지에 세균을 완전히 번식시킨 후 약품을 한방울 가운데에 떨어뜨린 후에 살균력을 육안으로 관찰한 시험이다. 사용된 세균은 상기와 마찬가지로 유방염의 주요 균주 로 알려진 *Staphylococcus Aureus* (포도상 구균) 과 *Str. Agalactiae* (연쇄상구균) 이었으며 시험 온도는 35 ~ 37 °C를 유지하였고 pH는 중성을 유지하였다. 사용된 약품은 앞서 밝힌

제품 중 Ag-PVP 및 Ag-lecithin을 이용하였으며 제조된 원액 (Ag 약 200 ppm)과 이의 1/5 희석액을 각기 사용하였다.

그림에 나타내지는 않았으나 순수 Ag 콜로이드 이용 시 배지에 첨가하는 순간 즉시 세균이 살균되는 특성을 보였다. 그러나 수일 후 살균 부위가 원래 대로 세균이 재생하는 현상을 보였다. 즉 이는 Ag 이온이 초기에는 살균력이 강하나 나중에 그 살균력이 잃는 현상으로 보이며 그 원인으로서는 시험 조건상 Ag가 산화되는 데에 기인하는 것으로 보인다. 따라서 순수 Ag보다는 Ag의 산화를 방지할 수 있는 안정제가 필요함을 알 수 있다. 이러한 안정제 역할로서 lecithin 및 PVP를 이용하였고 첨가제로서 글리콜(polyoxyethylene glycol)을 추가하여 침투력과 분산력을 가미하였다.

그림 29 a는 에 대한 *Str. agalactiae* (ATCC 12692)에 대한 살균 시험 결과를 보이고 있다. 가운데 원을 중심으로 약품이 퍼진 부위는 살균이 이루어져 색상이 변해 있는 것을 볼 수 있다. 여기서 보인 결과로는 레시틴 보다는 PVP를 안정제로 이용 시에 그 퍼짐 효과가 커서 살균 범위가 더 크다. 이는 키토산의 분자량이 PVP보다 훨씬 크기 때문에 PVP가 상대적으로 배지에서 확산이 잘되는 데에 기인하는 것으로 보인다. 이 현상은 약제 원액과 1/5 희석액의 비교 시 (좌우측) 희석액이 더 살균 범위가 더 크게 나타났다. 이는 용액을 희석함에 따라 그 퍼짐성(확산)이 더 우수하여 살균 범위가 더 커진 것으로 볼 수 있다.

상기 시험은 약제를 떨어뜨린 후 하루후의 결과이며 약 15일 후에도 그 무늬가 변하지 않았다. 이러한 무늬의 불변 결과는 약제가 침투한 부위는 세균이 다시는 자라지 않음을 의미하며 이로서 키토산 및 PVP가 Ag의 안정화제 역할을 충분히 하는 것으로 보인다.

그림 29 b는 *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) 세균에 대한 것이다. 그림 29 a의 경우와 마찬가지로 결과를 알 수 있었다.

이상으로 Ag-안정화제 혼화제가 병원균 살균에 우수한 성능을 가진 것을 확인할 수 있으며 병원균의 재발이 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다.

표 5. Ag 콜로이드 및 Ag-lecithin 콜로이드 용액의 균주 살균력시험 결과

균주	Staphylococcus aureus		Str. agalactiae	
	Ag	Ag-PVP	Ag	Ag-PVP
경과시간(min)				
0(초기)	6.3×10^3	7.2×10^3	3.3×10^4	2.7×10^4
5분	6.3×10^1	N.D.	2.5×10^3	1.3×10^2
20분	N.D.	N.D.	7.6×10^2	N.D.
30분	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1시간 후	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

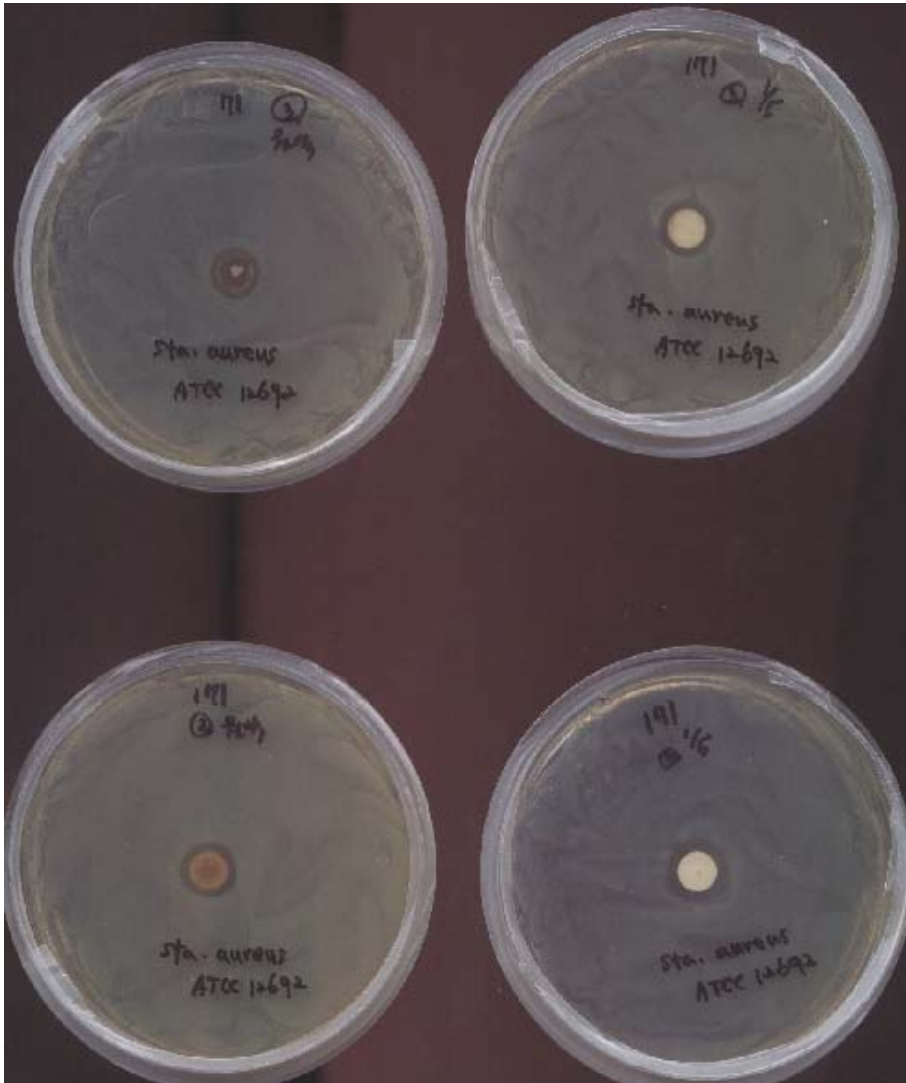


그림 29 a. *Str. agalactiae* (ATCC 12692): 연쇄상 구균 살균 시험
 윗줄 : Ag-lectin 원액(왼쪽) 및 1/5 희석액 (오른쪽)
 아랫줄: Ag-PVP 원액(왼쪽) 및 1/5 희석액 (오른쪽)



그림 29 b. *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600): 포도상 구균 살균 시험
 윗줄 : Ag-lecithin 원액(왼쪽) 및 1/5 희석액 (오른쪽)
 아랫줄: Ag-PVP 원액(왼쪽) 및 1/5 희석액 (오른쪽)

3) 현장 임상 시험

비임상형과 임상형 젖소를 이용하여 임상 시험을 행하였다. 사용된 시료는 Ag-PVP 형 약제를 이용하였으며 제조 원액 (Ag 약 200ppm)을 그대로 사용하였다.

약제 투입은 유두를 통하여 하루 10 cc씩 2회에 걸쳐 주사기로 주사하였다.

비 임상형 젖소에 대하여는 5두를 이용하여 약제를 3일간 주입 후 30일에 걸쳐서 원유에 함유되는 Ag의 함량을 측정하였다. 이 측정은 약제가 얼마간 농도로 어느 기간 동안 유방에 잔류하는가를 검사하기 위하여 행하였다.

검사 결과 주입 후 약제는 약 20여일 정도 잔류하였다. 다음 그림 30은 주사 후 원유 속에 잔류되는 Ag의 함량을 나타낸 것이다.

임상형 젖소에 대한 시험으로는 유방염이 감염된 부위에 약물 투입용 주사기를 이용하여 제조된 시료를 하루 2번 10cc씩 주입한 후 감염 유두에서 생산된 우유를 따로 채집하여 5개의 시료로 분리하여 보관 후 즉시 체세포 분석을 실시하여 검사결과와 평균을 행하였으며 총 10두의 젖소에 대하여도 같은 방법으로 하여 최종적으로 총괄 평균의 체세포 평균을 구하였다. 시험 시기는 약 2개월 정도로 하였으며 사용된 임상형 젖소는 염증 경종에 상관없이 10마리로 행하였다. 얻어진 체세포 변화 추이를 다음 그림 14에 나타내었다.

그림 31.에 보인 바대로 감염유두로부터 생산되는 원유의 체세포는 주사 후부터 감소하기 시작하며 약 30여일 후부터는 만족할 만한 상태로 저하되는 것을 알 수 있다. 실제 생산된 원유의 상태도 대부분의 임상형 젖소에서 투입 후부터 점성이 줄어들었으며 현장경험에 의하면 염증 진행 시 발견되던 점성 고형분도 원유에서 차츰 나타나지 않았다.

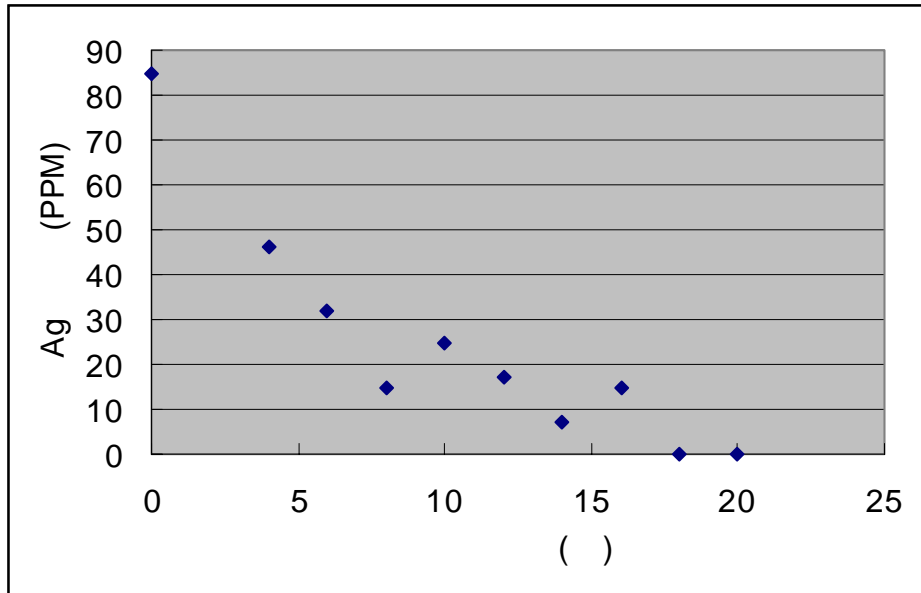


그림 30. 주사제 주입 후 원유 내 Ag 함량 변화 추이 (비 임상형)

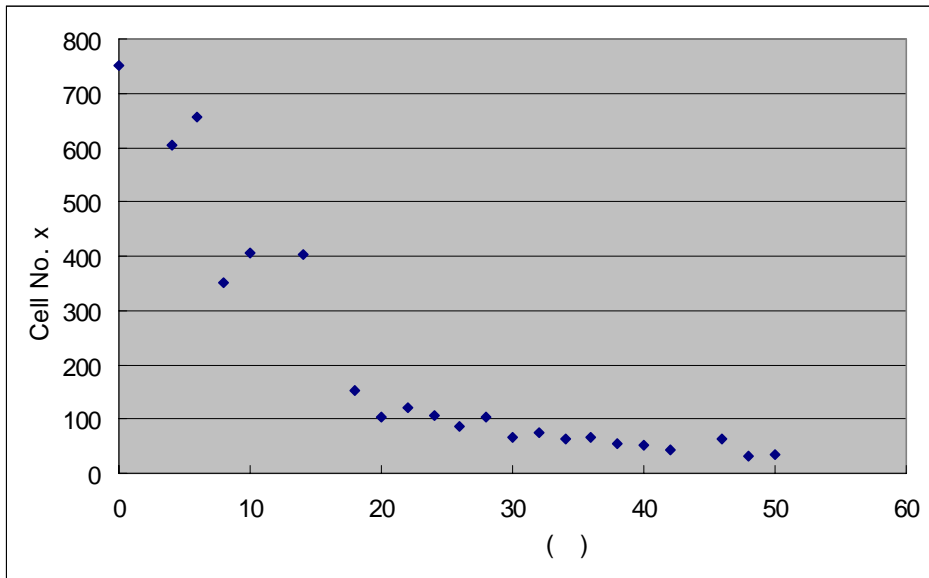


그림 31. Ag-PVP를 유두에 투입 후 원유의 체세포 변화 추이 (임상형)

3. 블렌딩에 의한 리피드형 약물제조

가. 베시클의 제조

베시클(Vesicle) 구조는 양친성 고분자 물질이 일족의 멤브레인 막을 이루는 형태로서 흔히 물전달 시스템 설계에 있어서 매우 중요한 구조이다. 즉 베시클 내부에 약리작용 물질이 있는 경우 내부로부터 약물성분이 일정 시간동안 일정농도로 제어되면서 서서히 방출하게 되는 것이다.

본 연구에서는 이러한 베시클을 기본 구조로서 포화레시틴을 이용하여 제조하였다. 여기서 제조된 베시클은 silver colloid를 함유하게 제조하였으며 추가로 침투 보조제로서 polyethylene glycol (PEG), 알파 토크페롤 (베시클 지지벽체), 수용성 키토산, 및 안정제로서 lyso-lecithin 및 PVP를 사용하였다. 여기서 안정제로 사용된 lyso-lecithin 및 PVP는 이전 silver colloid의 제조 때 이미 사용되어진 것이므로 제조 용액에 이미 존재하게 되며 베시클 제조 시에는 추가로 따로 투입하지는 않았다.

이러한 베시클 구조를 본 연구의 최종 연구인 유방염 치료 보조제 형태로 선택하게 된 이유는 1)은 이온의 방출 농도 제어 (유방 내부의 약리작용 지속성 향상), 및 2)은 입자의 산화 방지(막에 의한 외부로부터 보호)가 주 이유이다.

본 연구에서 사용된 포화 레시틴은 특정의 인지질인 phosphatidylcholine(PC)이며 생체막의 일부로서 그 안정성이 뛰어나므로 최근에 제약업계 등지에서 베시클 제조에 대한 연구가 활발한 편이다.

1) 시약 및 재료

베시클 제조에 사용된 포화레시틴으로는 PC 함량이 약 40%인 Lecinol S-10 (Nikkol, Japan)을 사용하였으며. 물은 초순수, silver colloid 수용액, 알파 토크페롤 등은 주원료로 제조하였다.

2) 제조 장치

리포솜(베시클)을 소량 제조할 경우는 초음파를 이용하는 경우가 많고 대량 제조 시에는 고압 homogenizer(Micro-fludizer)를 흔히 사용한다. 본 연구에서는 실험실적으로 초음파를 이용하였다. 사용된 초음파 기기로는 (주)주성엔지니어링의 sonicator(Model 740)을 이용하였다. 초음파의 출력은 최대 750 MW 정도이며 초음파 분산 시간 및 분산파형을 선택적으로 조절이 가능하였다.

3) 베시클의 제조

초음파를 이용한 베시클 제조는 다음과 같이 행하였다. 시약급 PC(포화레시틴)를 100 mL 비이커에 0.1g 취하고 잔량을 물로 채워 100g이 되도록 한다. 이것을 약 1시간 정도 마그네틱 스트러로 혼합하여 초음파를 조사하였다. 초음파 출력은 370 MW로 70°C에서 1시간 처리 후 마이크로 필터 (0.5 μm)로 여과하여 통과된 에 다시 토크페놀을 첨가 후 초음파를 700 MW에서 2시간 조사하였다.

제조된 베시클의 형태는 편광 및 고배율 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다. 그림 32.에 편광 및 그림 33.에 고배율 광학 현미경에 의해 얻어진 베시클 용액의 편광사진을 보였다. 그림 33.에 보인 편광 현미경 사진 스펙트럼은 전형적인 스펙트럼 리피드 구조를 나타낸다[3].



그림 32. Ag-레시친 Vesicle 용액의 편광 현미경 사진 (스펙트럼 리피드 구조를 나타냄 [3])



그림 33. Ag-lecithin 베시클의 고배율 광학 현미경 사진 (X2000)

나. Silver colloid를 이용한 젯소 유방염 치료보조제의 blending

앞의 레시틴을 이용한 베시클(리포드)구조를 이용하여 젯소 유방염 치료 보조제로서 활용하기 위한 보조제를 제조하였다.

본 연구 중 가장 핵심이랄 수 있는 silver colloid와 첨가물의 blending은 기본적으로 앞의 베시클을 토대로 제조하였다.

본 연구에서는 여러 형태의 수용성 고분자 물질을 이용하여 은 입자와 결합한 SLNP 형 시약을 제조하였다. 이러한 제품은 수용액 분산 형태로 얻었으며 특별히 환원법에 의한 방식의 경우에는 최종 불순물 제거 과정 후 분말 형태의 제품을 얻은 것도 있다.

본 연구 결과로 얻어진 은-PVP 혹은 Ag-lysolecithin 혼화물 제품은 매우 고농도의 은 콜로이드를 함유할 수 있고 (분말시 최대 10w%), 수용액으로 하였을 경우에도 실버이온이 약 1wt% (1000 ppm)까지 하여도 그 입자들이 매우 안정한 형태로 존재함이 관찰되었다. 이는 고농축 약제에 사용 시 안정도에 전혀 문제가 없음을 의미하는 것으로서 약제 완성에 전혀 손색이 없는 것으로 판명되었다. 또한 수용액에서 안정도가 매우 뛰어나고 농도도 자유롭게 조절 가능하기 때문에 약제 제조 상 유리한 이점도 있다.

전기분해 방식으로 제조하는 경우에는 은 입자의 크기는 기존 전기분해 제조 시 이미 결정되므로 첨가된 고분자 물질의 양에는 크게 영향을 받지 않았다. 그러나 환원법의 경우에는 lipid 제조 시 은 입자가 동시에 생성되므로 반응 조건에 크게 영향을 받았다. 제조 방법은 앞서 이미 기술하였으며 특별히 PVP 및 수용성 키토산에 대하여 다음과 같은 최적 조건을 확립하였다.

1. 고분자성 물질 : 분자량이 약 10,000인 PVP (Junsei 일본산)을 준비
혹은 분자량 약 30만 수용성 키토산(국산)
2. 100 CC의 물에 30mL의 에탄올을 혼합한 용액을 준비
3. 20g의 PVP 혹은 키토산을 반응기에 투입하고 2.의 용액을 투입
4. 반응기를 70 °C에서 10여 분 간 가열
5. 5 wt%의 AgNO₃ 수용액 50cc를 반응기에 서서히 투입 후 70 °C에서 3시간 이상 반응시킴.

상기한 제품 중 PVP을 이용 환원법에 의한 이용한 Lipid 구조의 분말 시료와 이를 다시 물에 재 분산시킨 용액을 그림 34. (a)및 (b)에 각각 보였다.



그림 34 (a). 제조된 PVP-Ag 분말 시료 (Ag 50-70wt% 함유)



그림 34 (b). Ag-PVP 1wt%수용액 (주사제: Ag 1500ppm함유)

또한 그림 35 (a). 및 35(b).에 lecithin 및 키토산을 이용한 lipid 형 수용액을 그리고 그림 35(c)에 키토산을 이용한 연고제 시료를 보였다.

이상의 주사제의 수용성 제형 등은 그 분산성이 매우 뛰어났으며 3달 이상 상온에 방치하여도 두어도 응집이나 침전이 관찰되지 아니하였다. 또한 냉장고 (시약 저장고)에서 4℃로 수일 방치 후 상온에 두어도 그 침전 등이 없는 것으로 보아 그 분산성이 우수한 것으로 판명되었다.

수용액에 분산된 각 lipid의 입자의 크기는 1 nm ~ 4nm 정도인 것으로 전자현미경 사진 분석결과 판명되었다 (그림 36). 그림 36.은 분산된 lipid의 전자현미경(TEM) 사진으로서 PVP-Ag의 경우 수용액 시료의 분석 결과이다. 그림 36.에서 보는 바와 같이 입자가 PVP 고분자 사이에 부착되어 있는 것으로 판명되며 lipid의 구형구조는 기기의 분석의 제약 상 관찰이 불가능하였으나 x-ray 산란 입도 분석결과 거의 구형에 가까운 베시클 구조로 판명되었다.

Lipid 구조의 크기 및 형태는 X-ray 산란 법에 의하여 가능하였다. 표 3은 키토산-Ag, PVP-Ag 및 lecithin-Ag에 대한 측정된 평균 입도 크기와 형상을 정리한 것이다.



(a)



(b)



(c)

그림 35. 제조된 lipid 형 주사제 및 연고제; (a). lecithin+Ag (주사제), (b). 키토산+Ag (주사제), (c) 키토산+Ag (연고제).

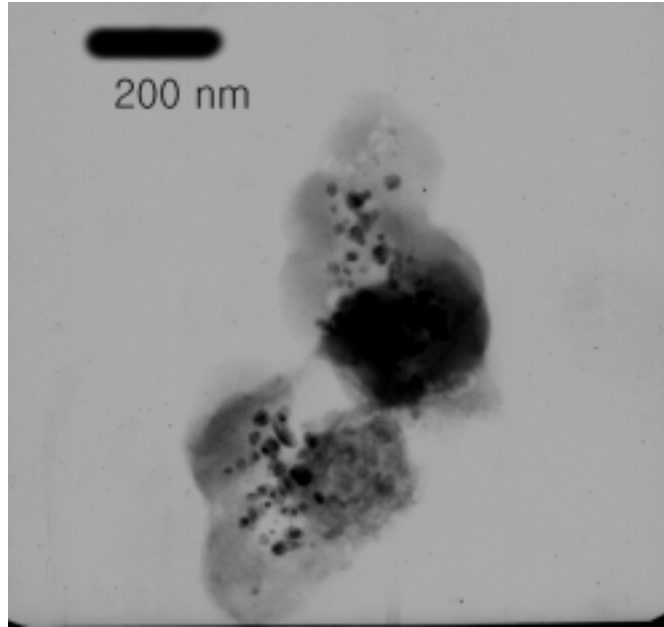


그림 36. PVP-Ag 의 TEM 사진: PVP 고분자 물질에 은 입자가 혼재되어 있음. 측정 원리상 시료의 측정 중 lipid가 응집되어 있고 크기가 실제보다 훨씬 크게 보임.



그림 37. Ag-PVP lipid 용액의 고배율 광학현미경 사진 (X2000)

제조된 lipid 물질의 원소 분석은 UV 분석 분석법으로 행하였다. 전기분해 방식 및 환원법에 의한 lipid 형태의 약제의 수용액에 대한 UV Spectrum 흡수 결과는 그림 38 (a) 및 (b)와 같다. 그림 38 (a)에서 보인바 와 같이 약 450 nm 부근에 거대한 흡수 밴드가 측정되는 것은 보아 Ag 입자가 순수한 상태로 존재함을 의미한다. 따라서 정성적으로 PVP와 함께 Ag 입자가 존재하는 것을 보여 주고 있다.

그러나 키토산의 경우에는 그림 38(b)에서 보인바와 같이 같은 조건에서 450 nm 부근의 흡수 띠가 매우 약하게 관찰 되었다. PVP 에 비하여 키토산의 경우 흡수 띠가 약하게 검출되는 이유는 키토산의 분자량이 PVP 에 비해 매우 거대함으로 상대적으로 Ag 입자를 크게 가리는 것으로 사료된다.

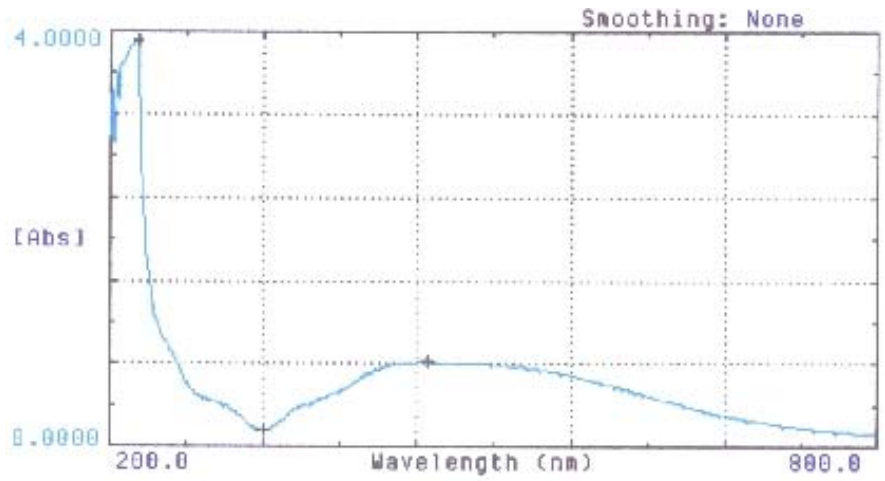


그림 38 (a). Ag-PVP lipid 용액의 UV 흡수도

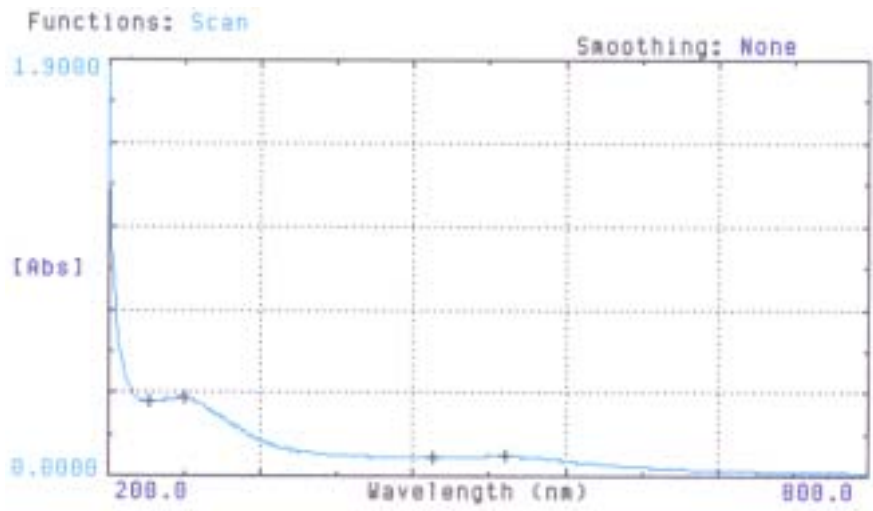


그림 38 (b). Ag-키토산 lipid 용액의 UV 흡수도

제 3 절. 결 론

본 연구 내용을 결과적으로 요약하면 다음과 같다.

1. 전기분해 방식 및 화학적 환원 방식에 의하여 수 nm 크기의 살균력이 우수한 silver colloid를 제조하였고 최적 제조조건을 확립하였다.
2. 고농도(약 1500 ppm)의 안정도가 매우 우수하며 살균력이 우수한 silver colloid를 제조하였다. 제조과정 중 silver colloid의 분산 안정성을 유지하기 위한 천연 고분자성 물질을 사용하였고 이들의 성능을 평가하였다. 첨가물로는 lyso-lecithin, 수용성 키토산, PVP(Polyvinylpyrrolidone,) 등이었다.
3. 최적 조건에서 제조된 silver colloid는 젖소 유방염 발병균주에 대하여 매우 우수한 살균력을 나타냈다.
4. 병원균 균주에 대한 silver colloid의 살균력 시험을 행하였고 균주 종류에 크게 관계없이 그 살균력이 매우 우수하였다.
5. 치료보조제로서의 적합성을 위한 연구로서 리피드형 베시클을 제조하였다. 베시클 성분으로는 silver colloid, α -tocopherol, polyethylene glycol, lecithin 등으로 구성되었으며 분석결과 스펙트럼형 구형 베시클임이 확인되었다.
6. 제조된 리피드형 베시클을 이용하여 분말형, 주사제용, 연고제용등으로 나누어 실험실적 제품을 제조하였다. 분말형은 희석 시 외부 소독용제로서도 사용이 가능하게 하였다.
7. 향후 본 실험실적 제품은 젖소유방염 치료보조제 뿐 아니라 기타 외용 살균제로서도 적합함이 각종 병원균 살균력시험 결과 확인되었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 목표달성도

본 연구 수행결과 다음과 같이 목표에 달성하였다.

세부과제 및 주요내용	연 도			가중치 (%)	목표 달성도 (%)
	1999년 (1차년도)	2000년 (2차년도)	2001년 (3차년도)		
○ 농축 Silver Colloid 제조기술 확립 -분산 안정성 -은함량 농축기술 -제조기술 확립				33	100
○ 염증치료보조제로서의 제품화 연구 -안정성 향상 기술 -Blending 기술 확립				33	100
○ 시제품 임상시험 및 현장적용 연구 -기초임상시험 -치료효과 시험 -현장 실험				33	95
사 업 진 도(%)	33	34	33	100	
소 요 인 원(명)	6	7	7		
소 요 예 산 (천원)	36,500	36,500	36,500	109,500	
주요 연구 결과	-고농축 Silver Colloid 제조 -예비 임상시험	-보조첨가제 이용 blending 기술 (1차 제품) -임상시험 결과	-현장 적용 연구 -현장 임상 시험결과 -제조공정		

제 2 절. 관련분야에의 기여도

본 연구 수행 중 부수적으로 다음과 같은 관련분야에 기여하게 되었다.

1. 순수 은(Ag)의 안정된 콜로이드를 얻는 기술을 개발하여 관련 살균제나 기술에 기여하였다. 특히, 최근에 silver colloid에 대한 관심이 국내외에 높아지고 있는 상황이므로 위생제로서 사용 가능한 silver colloid의 제조기술을 확립하여 추후 관련 분야에 크게 기여하게 될 것으로 본다.
2. 금속 나노 제조기술에 학술적으로 기여하였다. 최근 나노 금속 입자 제조 기술에 학계 및 산업계에서 많은 연구가 활발히 진행되고 있다. 수 nm 이하의 크기로 이루어진 금속 나노입자 콜로이드 제조기술은 아직까지도 미지의 분야라 할 만큼 고난도의 기술이다. 본 연구에서는 수 nm의 매우 안정한 콜로이드의 제조 기술을 확립하였다. 특히 본 연구 수행 중 행하여진 화학적 환원법은 산업계에서 바로 응용할 수 있는 기술로서 관련분야에 바로 응용 가능한 기술이다. 특히 은(Ag) 나노입자를 이용한 전자 산업이나 전자기 분야 등 여러 분야에서 본 기술이 적용될 수 있을 것으로 본다.
3. 콜로이드 안정화 기술 개발에 기여하였다. 콜로이드 안정화 기술은 본 보고서 내용 중에서도 밝힌 바와 같이 여러 기구로서 가능하며 본 연구 내용에서 행한 알콜 환원법은 이의 기술 개발 확립을 이루었다고 할 수 있다.
4. 본 연구 중 제조된 Ag 콜로이드는, 젖소 유방염 균주 뿐만 아니라 기타 균주에 대한 실험에서도 매우 탁월한 살균력을 나타냈다. 이로서 유방염 뿐만 아니라 기타 축산 위생 분야에서도 활용 가능한 만큼 축산 위생 분야에도 향후 기여가 예상된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

본 연구 결과를 젯소 유방염 치료보조제로서 활용하기 위하여 상업화를 위한 제품화에는 크게 두 가지의 경우로 나누어 볼수 있다. 첫째는 개발된 silver colloid 제품을 그대로 적용하는 경우이고, 두 번째는 기존의 유방염 치료제에 개발된 silver colloid를 첨가시키는 경우이다. 실제 현장 시험 결과에 의하면 본 silver colloid를 기존 치료제와 혼용하여 사용하는 경우에 기존 치료제만 사용한 경우보다 월등히 치료효과가 좋은이 관찰되기도 하였다. 그러나 후자의 경우처럼 기존 치료제에 혼화하는 경우에는 다음의 연구가 추가로 진행되어야 할 것이다.

- 1) 기존 항생제 약제와 화학적 반응이 없을 것
- 2) 기존 약제에서 silver 입자가 안정할 것

기존 항생제 물질 성분 대부분은 순수 Ag와는 크게 반응성이 없을 것으로 판단된다. 그러나 기존 약제혼화물에서 silver 콜로이드 입자가 안정하게 유지하기 위하여는 부수적인 연구가 뒤따라야 할 것이다.

본 연구에서 얻어진 silver colloid 제품은 젯소 유방염 치료 보조제 이외에도 일반 축산 분야의 위생제로서도 충분히 활용가능할 것으로 본다. 유방염 발병균 이외에도 여러 세균에 대하여 강력한 살균력이 실제 연구 수행 중 관찰되었으며 앞으로 이에 대한 활용이 충분히 가능할 것으로 보인다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

본 연구 수행 중에 다음과 같은 해외 과학 기술을 습득하였다.

1. 은(Ag) 나노입자 콜로이드의 제조기술 : 화학적 방법에 의한 은(Ag) 나노입자 제조기술을 습득하였다. 미주 및 동구권에서 이에 대한 연구가 활발하며 제조 및 안정화 기술이 핵심이다. 기타, 비수용액에서 제조하는 기술 등도 자료수집 되었다.
2. Silver colloid를 이용한 각종 위생제로서의 활용: 연구 수행 중 전기분해 및 화학적 방법으로 얻어진 유사 제품을 해외 등지에서는 일반 소독제로서 그 연구가 매우 활발함을 알게 되었다. 특히 일반 제품으로서 여러 응용제품에 대한 정보를 여러 분야에 대해서 습득하였다.
3. 약물방출 제어 시스템으로서 리피드 구조 제조기술: 본 연구 수행 중 약물 방출 제어를 위한 리피드 구조 제조 기술 및 제조 재료에 대한 해외기술을 습득하였다. 특히 레시친을 이용한 베시클 제조 기술을 습득하여 본 연구에 활용하였다.

제 7 장 참고문헌

1. R.B. Thurman and C.P. Gerba, "The Molecular Mechanism of Silver Ion Disinfection of Bacteria and Viruses", paper presented in *The First International Conference on Gold and Silver in Medicine*, The Silver Institute: Washington, v.8 (4), p. 295 (1989).
2. J. Lipkowski and P.N. Ross, "Electrochemistry of Novel Materials", VCH Publish, NY (1994).
3. P.C. Hiemenz and R. Rajagopalan, "Principles of Colloid and Surface Chemistry", 3rd ed., Marcel Dekker, NY (1997)
4. M.A. Osman and B.A. Keller, "Wettability of native silver surfaces", *Applied Surface Science*, **99**, 261-263 (1993).
5. N. Simonetti, G. Simontetti, F. Bougnol, and M. Scalzo, "Electrochemical Ag⁺ for Preserve Use", *Applied Environmental Microbiology*, vol.58 (12), pp. 3834-3836 (1992).
6. M.L. Luis and Lado-T. Isabel, Reduction and Stabilization of Silver Nano-Particles in Ethanol by Nonionic Surfactants, *Langmuir*, **12**, 3585-3589, (1996).
7. Zeta-電位-微粒子界面の物理化學(北原文雄, 古澤邦夫, 尾崎正孝, 大島廣行 共著)サイエンティスト社, 1995
8. D.Y. Kwok and A.W. Newman, Contact Angle Measurement and Contact Angle Interpretation, *Adv. in Colloid and Interface Sci.*, **81**, 167-249, (1999).

9. Y. Li, X. Dwan, Y. Qian, L. Yang, H. Liao, Nanocrystalline Silver Particles: Synthesis, Agglomerasation, and Sputtering Induced by Electron Beam, *J. of Colloid and Interface Sci.*, **209**, 347-349, (1999).

10. I. Pastronige and L.M. Liz-Maizan, Formation and Stabilization of Silver Nanoparticles through Reduction by N,N-Dimethylformamide, *Langmuir*, **15**, 948-951, (1999).

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

