

## Silver Sol과 Silver Mirror Substrate를 이용한 Fluorescein의 SERS 연구 SERS Study of Fluorescein Using the Silver Sol and Silver Mirror Substrates

이철재\*, 최현국\*\*, 정맹준\*\*\*  
Chul-Jae Lee\*, Hyun-Kuk Choi\*\*, Maeng-Joon Jung\*\*\*

### <Abstract>

It has been recently reported that the SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) effect of the silver mirror substrate made by Tollen's method is much superior to that of other substrates. In this study, the experiments for comparison of surface enhancement of silver sol and silver mirror substrates were done, where we checked the characteristics of silver mirror substrate made by Tollen's method. The surface enhancement of fluorescein was analyzed by silver sol and silver mirror substrates. We observed the SERS spectra of fluorescein. The assignments of the vibrational bands shown in SERS spectra are given based on both literature and the semi-empirical calculations at the PM3 methods. The surface enhancement properties for fluorescein showed that the silver mirror was more superior to silver sol substrates. Spectra of fluorescein revealed that fluorescein was adsorbed on silver surfaces by a common oxygen atom. According to the 'surface selection rule', the vibrations in the band intensities reflect the adsorption orientation of the molecule on to the surface of SERS substrates. Therefore, we deduced that the adsorption orientation of fluorescein was little tilted perpendicular to the silver surfaces by using of the surface selection rules.

**Keywords** : *Surface Enhanced Raman Scattering, Fluorescein, Silver Mirror, Silver sol.*

---

\* 정회원, 경북대학교 사범대학 화학교육과, 理博  
\*\* 정회원, 상주대학교 응용화학공학부 교수, 工博  
\*\*\* 연구책임자, 정회원, 상주대학교 응용화학공학부  
부교수, 理博, jmj@sangju.ac.kr

\* Ph.D, Department of Chemistry Education,  
Kyungpook National University  
\*\* Prof., School of Applied Chemical Engineering,  
Sangju National University  
\*\*\* Corresponding author Prof., School of Applied  
Chemical Engineering, Sangju National University

## 1. 서 론

플루오레세인(Fluorescein)은 옛날에는 양모나 명주 등의 산성염료 또는 명주와 같은 것의 날염(捺染) 등에 사용되었으나 현재는 순수한 플루오레세인을 이용하거나 나트륨 염을 흡착시킨 다음 지시약이나, 형광지시약 등의 분석지시약 등으로 많이 사용한다. 또한, 거름종이를 플루오레세인 증성액으로 염색하고 건조시킨 플루오레세인 시험지는 우물물이나 하천수 등의 미량 암모니아 검출에 사용되어 왔다. 최근 의료용으로 그 용도가 점차 증대되고 있는데 플루오레세인은 조영제를 정맥주입한 후에 망막혈관의 구조와 혈액순환을 빠르게 촬영하는 기술이 그 대표적인 예이다. 이것은 플루오레세인의 높은 형광양자 수율과 우수한 pH-선택성 등이 이와 같은 생체응용 분야에서 형광측정 물질로 광범위한 사용을 가능하게 한다는 것으로 알려져 있다.<sup>1</sup> 이 물질의 라만분광학을 이용한 특성 연구는 Gaigalas, A. K.에 의해 실험과 이론적 연구가 수행되었다.<sup>2</sup>

라만 분광학은 빛의 산란현상에 대한 양자역학적 이론으로부터 출발하여 1930년경에 인도의 물리학자인 C. V. Raman에 의해 액체 벤젠을 사용한 실험을 통하여 이러한 산란현상의 양자역학적 이론을 실험적으로 증명함으로써 분자 진동스펙트럼에 대한 지식으로 발전할 수 있었다. 그 후 수많은 레이저의 개발로 적외선 분광법과 함께 분자의 진동 모드를 관측하는 기본적인 분광법으로 자리를 잡게 되었다. 그러나 이러한 연구가 진행되면서 낮은 농도의 시료 분석과 형광에 의한 분석의 어려움이 대두되었으며 이를 해결하기 위한 여러 가지 연구들이 진행되었다. 그 결과 라만 분광법으로 금속표면에 흡착된 분자의 연구가 가능하게 되었다. 표면 증강 라만 산란(Surface Enhanced Raman Scattering : SERS)은 시료가 거칠게 처리된 특정 금속 표면에 흡착되어 있거나 수백 나노미터 이내의 거리에 위치해 있을 때 발생하는 라만 산란의 일종으로 이때 라만 산란의 세기가 일반 라만의 세기와 비교하여 10<sup>4</sup>~10<sup>6</sup>배 혹은 그 이상 증가되는 현상을 말한다. 이러한 현상이 발견된 이후 표면 증강 라만 산란에 관련된 주제로 발표된 논문은 표면 증강 라만 산란의 이론 규명과 효과를 나타내는 화

합물의 종류 및 특성, 금속의 종류와 SERS 효과 유발하기 위한 최적 표면특성 SERS 활성 기질 표면과 다양한 각도에서 특성과 이론적인 측면을 연구하였다.<sup>3-5</sup> SERS 연구에서 주로 사용되는 기질로는 전극형태(electrode type), 졸 형태(sol type), 필름형태(film type) 그리고 박막형태(foil type) 등이 있다. 그 중 금속 콜로이드 형태의 경우에는 수용액상에서 환원제에 의한 화학적인 환원반응을 통해 금속 입자를 석출시킨다. 콜로이드는 제조방법이 간단하고 별도의 장치가 필요하지 않으며, 많은 양을 한번에 제조할 수 있으므로 표면 강화 라만 산란의 기질로서 많이 사용되고 있다. 그러나 금속 콜로이드의 경우 제조 과정에서 석출되는 금속 입자 표면의 전하상태와 주변의 이온 분포 특성에 따라 입자의 크기와 표면 구조 및 표면 전위 등이 변화되고 이것은 표면 증강 라만 산란 특성이나 효율을 변화시키는 요인으로 작용한다. 또한 시료를 첨가하거나 시간이 지남에 따라 응집의 정도나 흡광도 등의 물리, 화학적 특성이 변화하게 되는데 이것은 다른 기질에 비해 비교적 안정성이 낮은 단점을 가진다는 사실을 알 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 폴리머나 계면활성제 등을 안정제로 사용하여 첨가하거나 원심분리기를 이용하여 특정 크기의 콜로이드를 선별해서 사용하기도 한다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 자기조립 단분자막 (self assembled monolayer; SAM)을 활용하여 콜로이드 입자를 고체 표면에 고정하여 표면 증강 라만 산란의 활성기질로 활용하는 방법이 등장하였다. 이렇게 콜로이드를 자기조립 단분자막으로 고체표면에 고정화하는 과정에서 콜로이드 입자의 크기와 표면농도 등을 조절하는 것이 가능하기 때문에 콜로이드의 화학적, 광학적 특성을 잘 이용하면 표면 증강 라만 산란의 효과가 최대가 되도록 조절이 가능하며 시산에 따른 콜로이드의 특성변화를 억제함으로써 콜로이드가 가지는 장점을 최대로 활용할 수 있게 된다. 그러나 몇몇 경우에 있어서는 분석하고자 하는 시료와 콜로이드 입자간의 흡착이 아닌 화학적 반응이 일어나거나, 또는 분석시료가 콜로이드입자를 응결시켜 콜로이드 입자의 크기를 증가시켜 분석할 수 없는 경우가 발생되기도 한다. 최근에 Y. Wu<sup>6</sup> 및 Y. Saito<sup>7</sup>의 보고 자료에 의하면 Tollen의 방법에

의해 제조된 silver mirror substrate가 염료화합물(dye compound)에 대해 다른 substrate와 비교하여 SERS 효과가 뛰어난 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 Tollen's의 방법을 이용하여 silver mirror substrate를 제조하고 또한, Creighton 방법<sup>9</sup>을 이용하여 silver sol을 제조한 다음, 플루오레세인 분자를 이용하여 얻어진 SERS 스펙트럼을 HyperChem의 PM3 방법을 이용하여 각각의 진동모드를 이론적인 방법으로 계산한 후 이를 실험값과 비교하였다. 그리고 각각의 SERS 활성기질에 대한 표면증강효과의 상관성에 대하여 알아본 다음, 최종적으로 기질 표면에 흡착된 Fluorescein 분자의 흡착 배향을 알아보기 위하여 알려진 표면선택법칙(surface selection rule)<sup>8</sup>을 바탕으로 조사하였다.

2. 실험 방법

2.1 시 약

본 실험에 사용된 silver nitrate, D-glucose, 및 Fluorescein은 Aldrich사 제품을, acetaldehyde와 formaldehyde, ammonium hydroxide, NaBH<sub>4</sub> 등은 Junsei사 제품을 구입하여 더 이상의 정제과정 없이 사용하였다.

2.2 D-glucose를 환원제로 이용한 silver mirror substrate의 제조

12 mm × 25 mm 유리판을 진한 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액과 30 wt % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 3:1 비율로 혼합한 용액에서 세척하고 다시 3차 증류수로 수회 세척한 후 건조하여 배양접시에 넣는다. 여기에 5 wt % 실버암모니아용액(AgNO<sub>3</sub> 0.5 g을 28 wt % -NH<sub>4</sub>OH 10 mL에 녹인 용액; [Ag(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)과 5 wt % D-glucose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 용액을 10 mL 혼합한 후 60~70 °C의 온도로 약 1시간 동안 물증발을 수행한다. 이렇게 만들어진 silver mirror substrate를 3차 증류수로 수회 세척한 후 공기 중에서 건조하여 실험에 사용하였다.

2.3 은줄의 제조

은줄은 Creighton 방법<sup>9</sup>을 이용하여 질산은을 수소화붕소나트륨(NaBH<sub>4</sub>)으로 환원시켜 제조하였다. 2×10<sup>-3</sup> M NaBH<sub>4</sub> 용액 60 mL를 1×10<sup>-3</sup> M 질산은 용액 22 mL와 혼합하면 옅은

오렌지 색깔이 나는 노란색의 콜로이드가 만들어지는데 이것을 본 실험에 사용하였다.

2.4 10<sup>-3</sup> M Fluorescein의 제조

Fluorescein 0.376 g을 1000 mL 용량플라스크에 넣은 후 3차 증류수 500 mL를 넣어 녹인 다음 진한 황산 15 mL를 첨가한 후 3차 증류수로 총량이 1000 mL가 되게 희석하여 최종 pH가 1~2 범위가 되게 한 후 이 용액을 측정기에 사용하였다.

2.5 기기분석

라만 분광기는 0.85 m double monochromator (SPEX 1403)로서 검출기는 열전기적으로 냉각되어 약 -40 °C를 유지하는 PMT(RCA C31034)를 사용하였다. Signal은 PC(Personal Computer)에 interfacing하여 DM 3000R 프로그램으로 라만 스펙트럼을 얻었다. 시료는 아르곤이온 레이저(coherent INNOVA 90-5)로 514.5 nm의 빛을 100 mW로 조사하여 여기 시켰다.

3. 결과 및 고찰

3.1 SERS 효과 비교 및 Fluorescein의 표면 흡착 배향

일반적으로 수용액에서 플루오레세인의 분자 구조는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 pH의 범위에 따라서 dianion과 monoanion의 형태를 나타낸다. 본 실험에서는 진한황산을 이용하여 pH를 1.0의 범위로 조절하여 monoanion형태의 플루오레세인분자의 형태에서 SERS 측정을 하였다. Creighton 방법과 D-glucose로 제작된 silver sol과 silver mirror substrates를 흡착기질로 이용하여 얻은 Fluorescein의 SERS 스펙트럼을 각각 Fig. 2의 (a)와 (b)에 나타내었다.

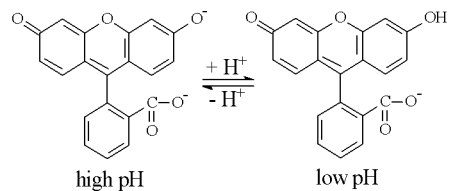


Fig. 1 A diagram of the chemical changes which take place during the protolytic reaction between dianion and monoanion forms of fluorescein.

그림에 나타난 바와 같이 Fluorescein의 경우에 있어서는 silver mirror substrate가 훨씬 더 우수한 표면증강 효과를 나타냄을 알 수 있다.

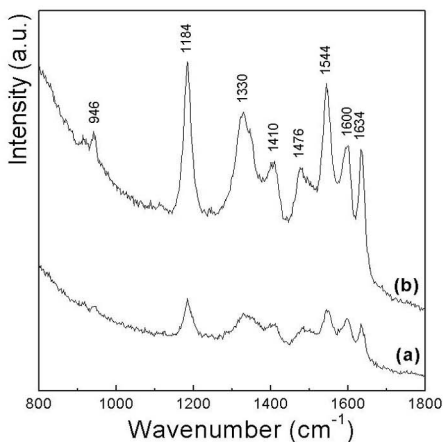


Fig. 2 SERS spectra of  $1 \times 10^{-3}$  M of Fluorescein adsorbed silver sol (a) and silver mirror substrates (b).

이러한 현상은 SERS 활성기질 표면에 존재하는 은 입자의 결정성이 좋을 경우 보다 강한 국부 자기장을 유도하게 되어 표면증강 효과를 높일 수 있으며 이러한 사실로 미루어 볼 때 SERS 활성기질 표면의 결정성이 silver sol 보다 silver mirror substrates가 좋다는 사실을 반증하는 결과라 할 수 있겠다.

Table 1. The vibrational bands(in  $\text{cm}^{-1}$ ) observed in SERS spectra of fluorescein in aqueous solutions their assignments based on both literature and PM3 calculations.

SERS	Calculation	Assignments
946	963	breathing of central bonds
1184	1201	C5-C6 bending, C8-C9 bending and C-OH bending
1330	1324	CC stretching
1410	1422	CCH bending and CC stretching
1476	1541	CO and CC stretching
1544	1568	CC stretching (C13-C14, C9-C11, C3-C4, C1-C6)
1600	1630	CC stretching (C13-C14, C2-C3, C5-C6)
1634	1663	symmetric CO and CC stretching

Fluorescein의 특성 라만 밴드들에 대한 진동 모드를 조사하여 Table 1에 나타내었다. 또한 Fig. 2에서 관측된 특징적인 라만 밴드들을 바탕으로 Fluorescein 분자의 입체적 흡착 배향을 알아보기 위하여, HyperChem 프로그램의 PM3 방법을 이용하여 가장 안정한 형태의 분자 모델을 3차원 balls and cylinders type으로 Fig. 3에 나타내었다.

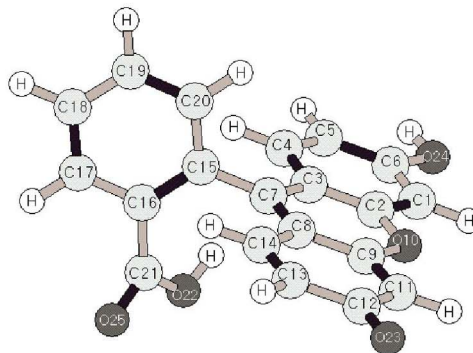


Fig. 3 The conversion for the numbering of atoms of three dimensional of fluorescein molecule. The numbers are used to identify specific nuclei in the theoretical descriptions of the vibrational modes.

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 일반적으로 SERS 활성기질표면에 분자가 흡착할 경우에는 주로  $\pi$ 전자( $\pi$ -electron)나 비공유 전자쌍(lone pair electron pair)을 가진 원자단을 이용하여 SERS 활성기질 표면에 흡착하는 것으로 알려져 있다. 이것은 SERS spectrum을 이용하여 분자의 흡착배향을 알아내는데 있어서 매우 중요한 정보로 이용된다. 따라서 Fig. 3을 통하여 플루오레세인 분자가 어떠한 형태로 SERS 활성기질 표면에 흡착하는지를 짐작할 수 있다. 플루오레세인 분자의 경우 O10, O24, O23, O22, O25번 원자에 비공유 전자쌍이 존재하며 또한 6각 고리형태의 탄소원자에  $\pi$ 전자가 있으며, C7탄소에 연결된 분자와 C15번 탄소에 연결된 분자가 이루는 평면의 각도는 거의  $90^\circ$ 를 이루고 있음을 알 수 있다.

좀 더 구체적으로 알아보기 위하여 플루오레세인 분자 각각의 원소에 대한 전하 값을 계산하여 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에 나타낸 바와 같이 플루오레세인 분

자의 전하분포를 보면 주로 산소원자에 전하 값이 음의 값으로 크게 나타남을 알 수 있으며 탄소원자들 사이에 있는  $\pi$ 전자에 의한 전하 값은 산소원자의 값들 보다 비교적 작은 음의 값을 나타낸다는 사실을 알 수 있다. 따라서 앞에서 언급한 바와 같이 보면 플루오레세인 분자가 SERS 활성기질에 흡착될 경우 주로 산소원자를 통한 흡착이 이루어 질것이라는 것을 계산된 전하 값을 통하여 짐작할 수 있다.

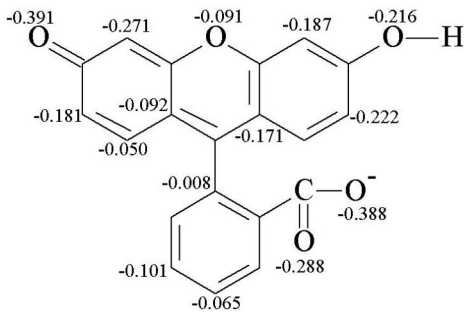


Fig. 4 The electrical charge of the fluorescein molecule calculated by HyperChem PM3 methods.

SERS에서 기질에 흡착된 물질의 배향을 분석할 때 M. Moskovits와 J. S. Suh 등의 연구 자료에 나타난 ‘표면 선택 법칙’(surface selection rule)<sup>2,6,9</sup>이 가장 일반적인 설명방법으로 알려져 있다. ‘표면 선택 법칙’은 어떠한 분자가 거칠게 처리된 금속표면에 흡착될 경우 즉, SERS 활성기질표면에 수직하게 흡착이 되느냐, 수평하게 흡착이 되느냐에 따라 흡착분자의 진동모드들의 SERS spectra의 세기가 달라진다는 이론이다. 즉, 흡착분자가 SERS 활성기질 표면에 수직하게 흡착되는 경우에는 SERS 스펙트럼의 세기가 매우 증가되며, 반대로 수평하게 SERS 기질표면에 흡착되는 경우에는 SERS 스펙트럼의 세기가 감소한다는 이론이다. 결과적으로 각 흡착분자의 면내(in plain) 굽힘 진동이나 신축진동모드에 해당하는 밴드들이 강한 세기로 관측되면 이것은 주로 SERS 활성기질에 수직하게 흡착됨을 말하며, 이와 반대로 면 바깥(out of plain)의 굽힘이나 신축진

동모드에 해당하는 밴드들이 강한 세기로 관측되는 경우에는 주로 흡착분자들이 SERS 활성기질에 대하여 수평하게 흡착되어 있음을 나타낸다. 따라서 Fig. 2에 나타난 플루오레세인의 SERS 스펙트럼을 보면 1184, 1330 그리고 1544  $\text{cm}^{-1}$ 의 밴드들이 강한 증강을 나타냄을 알 수 있다. 따라서 이 세 가지 특성 밴드들의 진동모드를 알아보면 1184  $\text{cm}^{-1}$ 의 경우 C5-C6, C8-C9, C-OH bending의 진동모드임을 알 수 있으며 1330  $\text{cm}^{-1}$ 의 경우 CC stretching의 진동모드임을 알 수 있다. 또한 1544  $\text{cm}^{-1}$ 의 경우에는 C13-C14, C9-C11, C3-C4, C1-C6의 stretching의 진동모드임을 알 수 있다. 따라서 이 사실을 종합해 볼 때 플루오레세인의 SERS 활성기질에 대한 흡착배향은 플루오레세인 분자의 산소원자를 통하여 SERS 활성기질인 silver sol과 silver mirror substrates 표면에 다소 수직한 방향으로 흡착됨을 알 수 있다. 그러나 946  $\text{cm}^{-1}$ 의 central bonds의 breathing mode도 다소 약하게 나타난다는 사실을 고려할 때 최종적으로 수직방향으로 다소 기울어진 형태의 흡착을 하고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 사실을 토대로 예상되어지는 플루오레세인의 SERS 활성기질에 대한 흡착배향을 Fig. 5에 나타내었다.

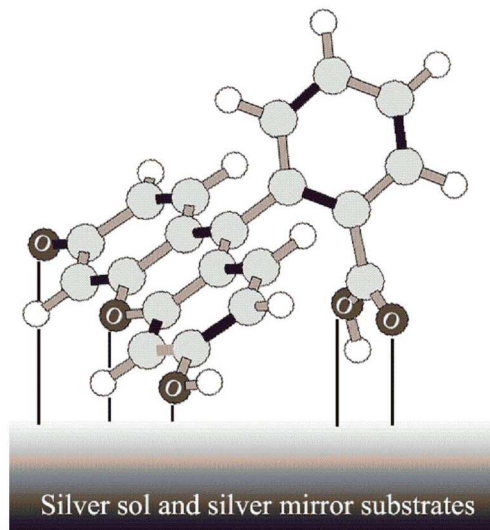


Fig. 5 Plausible adsorption orientation of fluorescein on silver surface via five oxygen atoms

## 4. 결 론

본 연구에서는 형광이 센 물질이나 저농도의 생화학물질의 분석에 유용한 SERS의 방법으로 silver mirror substrate와 silver sol을 이용하여 염료나 생체물질의 형광지시약으로 사용되는 플루오레세인을 이용하여 SERS 스펙트럼을 얻은 다음 각 SERS 활성기질을 표면 증강 효과를 비교해 본 결과 silver mirror substrates의 표면 증강 효과가 우수하게 나타났으며, 이것은 SERS 활성기질 표면에 존재하는 은 입자의 결정성이 좋을 경우 보다 강한 국부 자기장을 유도하게 되어 표면증강 효과를 높일 수 있으며 이러한 사실로 미루어 볼 때 SERS 활성기질 표면의 결정성이 silver sol 보다는 silver mirror substrates가 좋다는 사실을 확인하였다. 또한 SERS 활성기질에 흡착된 플루오레세인 분자의 흡착배향은 silver sol과 silver mirror substrates에 대하여 모두가 플루오레세인 분자에 있는 산소 원자를 통하여 다소 기울어진 수직배향으로 흡착한다는 사실을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- 1) L. Wang, A. Roitberg, C. Meuse, A. K. Gaigalas, *Spectrochimica Acta Part A* **57**, 1781 (2001).
- 2) J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy, second ed.*, Kluwer/Plenum Publishers, New York, 1999.
- 3) J. S. Suh and K. H. Michaelian, *J. Phys. Chem.*, **91**, 598 (1987).
- 4) Y. Wu, B. Zhao, W. Xu, B. Li, Y. M. Jung, and Y. Ozaki *Langmuir* **15**, 4625 (1999).
- 5) Y. Saito, J. J. Wang, D. A. Smith, and D. N. Batchelder, *Langmuir* **18**, 8 (2002).
- 6) M. Moskovits and J. S. Suh, *J. Phys. Chem.*, **92**, 6327 (1988).
- 7) J. A. Creighton, C. G. Blatchford, and M. G. Albrecht, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **75**, 790 (1979).
- 8) I. Persand, E. William, and L. Grossman *J. Raman. Spectrosc.* **24**, 107 (1993).
- 9) J. A. Creighton, *Surface Sci.*, **124**, 209 (1983).
- 10) J. R. Lombardi, R. L. Birke, *J. Chem. Phys.*, **84**, 4174 (1986).
- 11) L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. Garcia-Ramos, and G. Morcillo. *Langmuir* **17**, 574 (2001).
- 12) A. M. Michaels, J. Jiang, and Brus, L. *J. Phys. Chem. B* **104**, 11965 (2000).

---

(2006년 9월 26일 접수, 2007년 2월 23일 채택)