

나노라만 분광학(Nano-Raman Spectroscopy)의 최근 연구 동향

Recent Trends in Nano Raman Spectroscopy

이혜미 · 서영덕 | Haemi Lee · Yung Doug Suh

Research Center for Convergence Nanotechnology, Korea Research Institute of Chemical Technology(KRICT)
Yuseong P.O. Box 107, Daejeon 305-600, Korea
E-mail: ydsuh@kRICT.re.kr

1. 서론

분광학은 화학, 물리, 생물 전 분야에 걸쳐 널리 이용되어 왔으며 빛과 물질 간의 상호작용에 관련된 메커니즘에 따라 크게 몇 가지 부류로 나뉜다. 물질을 이루는 분자들이 쪼여준 빛의 에너지를 흡수하는 과정이 관여되어 있는 흡수 분광학과 흡수된 빛의 에너지를 다시 내어놓는 형광(또는) 발광 분광학, 분자들에 의해 단지 빛의 방향이 바뀌게 되는 산란 분광학이 그것이다. 그 중에서도 라만 분광학은 비탄성 산란(inelastic scattering) 메커니즘이 관여된 산란 분광학으로서, 물질의 구조 및 특성을 연구 하는 데 있어 아래에 나열한 몇 가지 중요한 장점들을 가지고 있다.

형광 분광학과는 달리 라만 분광학은 신호검출을 위해 표지물질을 분석시스템에 공유화학적으로 결합 시켜야 하는 번거로움이 없다. 이는 실험적으로도 덜 번거로울 뿐만 아니라, 표지된 형광 물질과 분석하고자 하는 시스템 간의 원치 않는 상호작용을 원천적으로 배제할 수 있다. 또한 라만 분광학은 분자 고유의 진동 에너지 모드들을 보여줌으로써, 물질의 화학적 성분을 밝혀 낼 수 있다. 이는 쪼인 빛에 의해 에너지적으로 들뜬 상태의 분자가 바닥상태로 내려오면서 산란되어 나오는 빛이 분자 고유의 진동 에너지 모드만큼의 에너지를 뺏기거나(stokes) 혹은 얻기(anti-stokes) 때문이다. 서로 다른 선택률을 가지고 진동 모드들을 검출하여 분석물질을 인지해낸다는 점에서는 적외선 흡수 분광학과 라만 분광학이 서로 상호 보완적이라고도 할 수 있으나, 적외선 분광학의 경우 파괴적인 시료 준비 과정, 수용액 상에서의 검출 어려움 등의 큰 단점을 가지고 있어 Bio시료의 경우나 동적인 시스템을 실시간으로 관찰하기에는 적절하지 않다.

이에 반해 라만 분광학은 label-free, 비파괴적 분석물질의 검출이라는 큰 장점들을 가지고 있으나 빛을 받아 실제로 산란 시키는 라만산란 효율이 매우 작기 때문에 라만 신호 자체를 검출하는 데 큰 어려움이 따른다. 이는 산란 단면적(scattering cross-section)의 개념으로 설명될 수 있다. 일반적인 라만의 광학

Author



이혜미

1999 이화여자대학교 화학과(학사)
2002 연세대학교 화학과(석사)
2010 Univ. of Colorado at Boulder (박사)
2010-현재 한국화학연구원 분자고등검지그룹 박사후연구원



서영덕

1991 서울대학교 화학과 나노물리화학(학사)
1993 서울대학교 화학과 나노물리화학(석사)
1999 서울대학교 화학과 나노물리화학(박사)
1999-2000 Swiss Federal Inst. Tech (ETH Zurich) (Post-Doc.)
2000-2001 POSTECH Chemistry Dept. (Assistant Professor(Res.))
2001-2002 Pacific Northwest National Lab. (LTE Staff Member)
2002-2003 Nanohybrid Ltd. (Principal Researcher, RI&P Director)
2003-현재 한국화학연구원 분자고등검지그룹 책임연구원 및 나노기술융합연구단 단장

단면적은 $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2$ 이며 이는 예를 들어 대표적인 형광 염료의 경우인 10^{-16} cm^2 과 비교해볼 때, $\sim 10^{14}$ 배나 작은 크기를 가지고 있음을 의미한다. 다행히도, 이처럼 작은 산란 단면적에서 기인하는 라만의 검출 한계는 표면 증폭 라만 산란(surface-enhanced raman scattering, SERS)이라는 실험 방법을 통해 극복되어왔다. Ag, Au, Cu 등 금속 나노입자의 국부적 표면 플라즈몬(localized surface plasmon)의 공명조건, 즉 입사되는 빛의 진동수와 표면 플라즈몬의 집단 운동(collective motion)의 진동수가 같을 경우, 이 표면 플라즈몬에 의해 유도된 전자기장은 금속 나노 입자 표면에 흡착된 분석 물질의 라만 신호를 증폭시킨다고 알려져 있다. 증폭의 크기는 금속 나노 입자의 크기, 모양, 조사된 빛의 파장과 편광방향 등의 다양한 요인들에 따라 크게 달라지는데, 최적의 조건에서는 형광의 광학 단면적(10^{-16} cm^2)과 거의 같은 크기까지도 도달할 수 있음이 국내외 여러 연구 그룹들에 의해 보고되었다.

나노 라만 분광학은 위에서 언급했던 라만 분광학과 광학 현미경의 접목에 의해 시작된, 최첨단 기술에 토대를 두고 있는 광학분야이다. 마이크로 라만 분광학의 경우, 명칭에서 유추할 수 있듯이 분석 물질을 검출하는 실질적인 영역이 약 수~수십 마이크로미터 수준이다. 따라서, 분석 시료 안의 많은 수의 분자들을 함께 검출함으로써 오는 ‘앙상블 평균화 효과’(ensemble-averaged effect)를 피할 수 없다. 마이크로 라만 분광학과 나노 라만 분광학에서 얻게 되는 정보량의 질적 차이는 아래 일반화 된 식으로 명확히 이해 할 수 있다.

$$A = \sum_i a_i f_i$$

여기서, f_i, a_i 는 관측하고자 하는 분석 시스템의 단일 분자가 처해있는 특정 상태와 그 상태의 분율(population)을 각각 의미하며, A 는 앙상블 평균화된 정보(관측값)를 의미한다. 따라서, A 는 기존의 마이크로 라만에서 얻을 수 있었던 한정된 정보라고 한다면, 나노 라만의 경우 f_i, a_i 각각을 실험적으로 관측 할 수 있기 때문에 분석하고자 하는 시스템을 이해하는 데 훨씬 더 유용한 정보를 제공한다. 이는 특히, 기질 특이성을 가진 생체분자들이나 금속 나노 입자들의 “나노 환경”에 의존하는 광학적 특성 등의 연구에 중요한 실마리를 제공하게 된다.

나노 라만 분광학의 기술적인 모태는 1980년대 초반에 발명된 주사 프로브 현미경(scanning probe microscope, SPM)

이라고 할 수 있다. SPM은 압전(piezoelectric)효과를 가진 물질과 피드백 회로(feed-back loop), 두 핵심적 부분으로 구성되어있으며 시료 표면을 삼차원적으로 훑는(scan) 방식이다. 여기에 레이저, 대물렌즈, 광학 검출기(CCD, APD, PMT) 등을 기본적인 SPM 구성에 결합함으로써 나노 라만 분광학이 비로소 가능해졌다. 이로써, 나노 라만 분광학을 통하여 연구자들은 나노미터 수준에서(혹은 단일 분자 수준에서) 분석 시료의 표면 형태적(morphology) 분석과 광학적 이미지 및 스펙트럼을 동시에 얻을 수 있게 되었다.

오늘날 나노 라만 분광학의 가장 중요한 목표 중의 하나는 생체 분자들이나 나노미터 크기의 유, 무기 합성구조체들의 구조-기능 간의 관계를 단일분자 수준에서 밝혀내는 일이다. 잘 알려진 대로, 생체 분자들의 경우 세포 내의 pH, 이온 농도 등의 생체 내 조건이 달라짐에 따라 구조 변화(conformational change)를 일으키게 되고 이는 곧 활성 변화(activity change)를 가져온다. 또 다른 대표적인 예로써, 금속 나노 입자들의 합성응집체의 경우, 그 응집 정도와 기하학적 구조에 따라 광학적 특성이 달라짐이 보고되었다. 특히 단일응집체(monomer)에 비해 다수 응집구조체(dimer, trimer, etc.)들은 매우 강한 유도 전자기장을 만들어내는 데, 이는 향후 단일 분자 검출 시스템으로서의 높은 가능성을 보여준다. 따라서 본 총설에서는 생체분자, 나노 합성구조체들의 구조-기능 간의 관계의 이해하는데 핵심적 역할을 수행하고 있는 나노 라만 분광학 기술의 기본 원리 및 응용 가능한 몇 가지 대표적 예를 소개해 보고, 향후 전망에 대해 간략하게 살펴보고자 한다.

2. 나노 라만 분광학의 원리와 응용

2.1 표면 증폭 라만 산란(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS)

서론에서 간단히 언급했듯이, 기존의 라만 분광학의 경우, 유효 산란 단면적이 형광에 비해 현저히 작다. 이는 단일 분자 수준에서 라만 신호를 검출하는 것이 불가능함을 의미하는데, 아래의 실험 조건의 예에서 잘 이해 수 있다. 100 mW의 파워를 가진 입사 빛을 $1 \mu\text{m}^2$ 에 해당하는 시료 면적에 쬐어주었을 때, $\sim 10^{-29} \text{ cm}^2$ 의 산란 단면적을 가진 진동모드에서 나오게 되는 라만 포톤의 개수는 1초당 대략 10^4 개가 된다. 다시 말해, 단일분자에서 나오는 단 한 개의 라만 포톤을 검출하기 위해서는 한 시간 이상을 기다려야 하는 것이다. 이처럼 실험적으로 불가능한 검출 조건을 가능하도록 해 주는 실험방법이 SERS이다. SERS가 일

어나기 위해서는 먼저 분석 물질이 Ag, Au, Cu 등의 금속 나노 입자 표면에 흡착되어야 한다. 금속 나노 입자의 표면에 있는 자유전자들의 집단 운동(collective motion)을 국부 표면 플라즈몬(localized surface plasmon, LSP)이라 부른다. 위에서 언급한 금속 나노 입자들의 경우 LSP의 진동수가 가시광선 영역 빛의 진동수에 해당되며, LSP와 입사되는 빛의 진동수가 일치할 때의 조건이 공명 진동수(resonance frequency)가 된다. 미시적(microscopic) 관점에서 볼 때, 표면 플라즈몬은 자유전자와 홀로 이루어진 유발 쌍극자들(induced dipole moments) 합의 집단 운동이 된다. 표면 플라즈몬의 집단운동 규모에 영향을 미치는 중요한 요인들로는 금속 나노입자의 크기(혹은 부피), 기하학적 모양, 입사 빛의 편광방향 등이 있다. 요약해서 SERS는 표면 플라즈몬에 의해 증폭된 분석물질의 라만 신호를 검출할 수 있는 실험적 방법이라고 할 수 있다.

단일 분자의 라만 신호를 검출하기 위한 표면 플라즈몬의 증폭 정도를 극대화시킬 수 있는 방법으로 크게 두 가지 서로 다른 관점이 제시되어 왔다. 우선, Shuming Nie 그룹은 1997년 *Science*지에 단일 은나노 입자에 의해서도 단일 분자의 라만 신호를 증폭할 수 있음을 게재하였다.¹ 흥미롭게도, 최적화된 크기와 모양의 단일 은나노 입자 표면에서의 형광보다 수십 배 큰 라만 신호를 관찰하였다. 이와는 반대로, 그림 2에서 보여주듯이, Kneipp 등의 그룹에서는 단일 금속 나노 입자가 아닌 금속 나노 복합응집체의 시스템이 라만 신호를 증폭시키기에 더 적합하다고 주장하였다.² 오늘날 일반적으로 받아들여지는 견해는 단일 입자들의 접합점(junction)에서 극대화된 표면 플라즈몬 증폭 효과를 기대할 수 있다는 것으로, 이는 국내외 많은 연구 그룹들에 의해 실험적으로 또는 계산상으로도 증명되었다.^{3,4} 그림 3은 본 그룹에서 2010년 *Nature materials*지에 게재한

연구 결과로, 두 금속 나노 입자 사이에서 단일 분자의 라만 신호를 관찰할 수 있었으며 신호의 증폭 정도는 평균적으로 $\sim 10^{11}$ 에 이른다고 보고하였다.³

표면 증폭 효과에 관한 또 다른 쟁점으로는 단일 분자의 라만 신호를 관찰하기 위해 요구되는 최소한의 증폭 정도에 대한 견해이다. 서론에서 잠시 언급했듯이, 일반적으로 라만과 형광의 광학 단면적은 각각 $\sim 10^{-30} \text{ cm}^2$, 10^{-16} cm^2 로 알려져 있다. 단일 분자의 라만 신호를 검출하는데 $\sim 10^{14}$ 배의 증폭 효과가 필요하다는 견해는 여기서 비롯되었다. 그러나, 최근 Etchegoin 등 몇몇 그룹들에서 발표된 결과에 의하면 약 $10^7 \sim 10^8$ 배의 증폭으로도 단일 분자의 라만을 검출해 낼 수 있다는 것이다.⁵ 위의 두 쟁점들은 전자 빔 리소그래피(e-beam lithography)를 이용한 array를 만들거나 DNA hybridization을 이용한 복합 나노 구조체 등을 제조하여 금속 나노 입자들의 크기, 모양 등을 조절하면서 라만 신호가 달라지는 양상을 관찰해보는 체계적인 실험방법과, 동시에 FDTD, FEM 등의 병행된 수치계산(numerical calculation) 결과에 의해서 명확해지고 있다.

2.2 탐침 증강 라만 산란(Tip-Enhanced Raman Scattering, TERS)

라만 신호 증폭의 방법으로 앞서 소개했던 SERS의 경우, 실험적으로 가장 까다로운 부분은 최적화된 표면 증폭 효과를 가지는 금속 나노 입자를 제조해야 한다는 점이다. 이는 철저히 실험자의 합성감각에 의존하는 요인이므로, SERS 실험 자체의 재현성 여부와 직결되어 있는 문제이기도하다. 이러한 SERS의 최대 단점을 보완하기 위하여 TERS가 제안되었다. TERS는 원자힘 현미경(atomic force microscope, AFM)을 기반으로 개발되었다. 일반적으로 사용되어지는 AFM 탐침을 Ag나 Au 등의 금속으로 코팅시킴으로써, 용

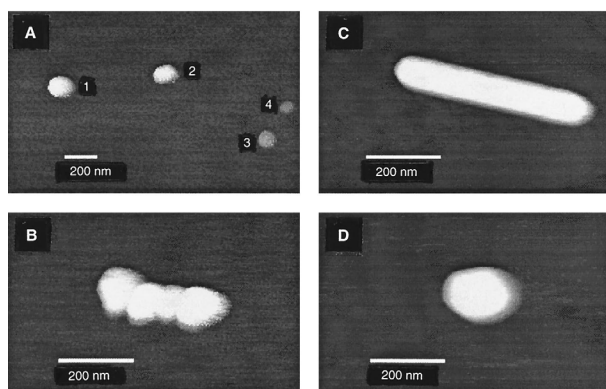


그림 1. 높은 SERS 신호를 보이는 은 나노 단일 입자들의 AFM 이미지. 넓은 스캔영역에서의 은 나노 입자들과(A) 확대된 각각의 단일 은 나노 입자들(B-D).

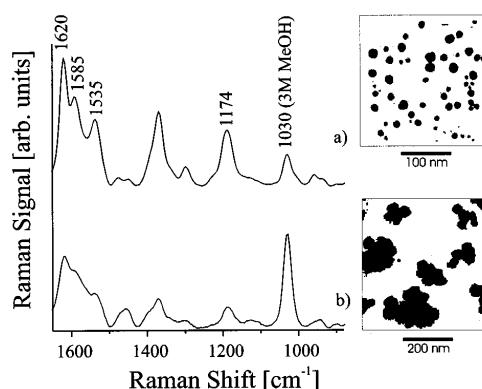


그림 2. 은 나노 클러스터에 흡착된 (a) 10^{-6} M과 (b) 10^{-8} M CV(crystal violet)의 SERS 스펙트럼. 삽입된 이미지는 은 나노 클러스터들의 electron micrographs.

액 상에서 금속 나노 입자들을 합성해야하는 수고를 덜게 되었다. 뿐만 아니라, TERS는 분석물질을 기관 위에 고정 시켜놓고 금속으로 코팅된 AFM 탐침을 스캔하는 방법이므로, 라만 산란 증폭 효과를 정량화하기에도 매우 용이하다. 이 때 증폭 효과는 금속 코팅된 탐침이 있을 때와 없을 때의 라만 모드의 세기와 쪼여준 빛의 유효 초점 단면적을 고려하여 결정된다. 또한 TERS는 기존의 전통적인 분광학이 가지고 있는 빛의 회절 한계(diffraction limit)를 넘어선 광학 해상도를 갖는다는 데에 큰 장점이 있다. 가시광선 영역에서의 회절 한계는 약 200~300 nm 정도이며 이 값은 입사파장, 대물렌즈의 개구수(numerical aperture)에 의존한다. 다시 말해, 전통적인 분광학에서의 공간 분해능(spatial-resolution)은 이 회절한계에 의해 규정된다. 물론 최근 들어 하버드대학의 Zhuang 그룹 등에 의해 초분해능(super-resolution) 분광학이 생체 내 세포 연구에 이용되고는 있으나, 여전히 수십 nm의 공간 분해능이라는 한계를 가지고 있다. 반면 TERS의 경우 공간 해상도가 탐침의 팁 첨단(tip apex)에 달려있어, 공간 분해능은 금속 코팅된 탐침의 제조 기술에 따라 약 10 nm 이하까지도 향상될 수 있다.

위와 같은 이점을 가지고 있는 TERS는 2000년 스위스 Zenobi 그룹에서 최초로 제안됨을 시작으로, 나노/바이오 합성 복합체의 광화학적 특성 연구, single/multi-carbon nanotube의 이미징, 특정 물질에 반응하는 막단백질의 반

응 전후의 조성변화, 박테리아 세포벽에 존재하는 화학 물질의 조성 분포 등을 연구하는데 광범위하게 사용되고 있다. 의학 분야에서도 활용도가 점점 높아지고 있는 추세인데, 그 예로써 정상세포와 암세포의 세포 표면에 존재하는 특정 물질의 조성 성분의 변화를 관찰하는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 이외에도, TERS에 비선형 라만 현상을 결합하여 세포 내 분자들의 진동 모드들을 광학 이미징하는 실험 결과들도 최근 보고된 바 있다. 이러한 연구결과들은 TERS의 단일 분자 수준에서 얻어지는 형태적 정보와 동시에, 높은 공간 분해능을 갖는 광학 이미징 정보에 그 토대를 두고 있다.

3. 나노 라만 분광학의 고분자(Polymer) 분석 연구

앞서 원리에서 소개했던 SERS(혹은 TERS)가 고분자 분석에 어떻게 이용될 수 있는지를 다음의 예를 통하여 간략하게 살펴보고자 한다. 그림 4는 높은 공간 분해능을 가진 TERS가 이중 폴리머 복합체인 PMMA/SAN(poly(methylmethacrylate)/poly(styrene-co-acrylonitrile) 시스템에 적용된 예를 보여준다.⁶ PMMA, SAN 각각 고유 라만 모드들을 시간에 따라 TERS로 이미징(혹은 맵핑)하였다. 결과적으로 PMMA/SAN 비율의 조성이 맵핑 영역 상에서 국소적으로 달라짐을 확인하였는데, 이는 약 수 분에 걸쳐 PMMA/SAN 사이에 층 분리가 일어나고 있음을 보여주는 것이다. 또한, 높은 공간 분해능과 고감도 TERS를 수행함으로써 서로 다른 상(phase) 간의 경계면에서 각각의 화학성분들의 농도 기울기를 얻을 수 있었다. 이와 비슷하게, TERS를 통한 폴리이소프렌과 폴리스타이렌으로 구성된 다조성 폴리머 복합체의 표면 조성에 대한 연구도 국내외의 여러 그룹들에 의해 진행되고 있다.

한편, 그림 5는 SERS를 통한 CDS9(carbazolyl-diacetylene

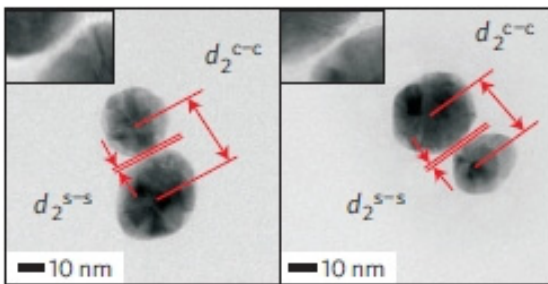


그림 3. 단일 분자 SERS 신호를 보이는 은 나노 복합체(dimer)의 high resolution TEM 이미지.

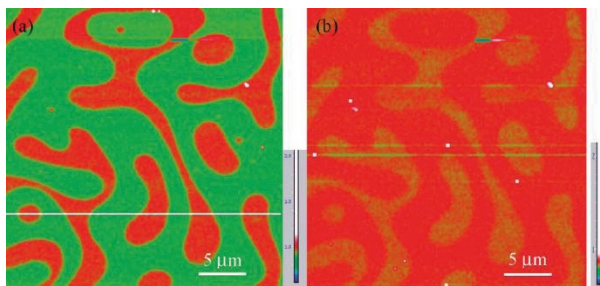


그림 4. SAN과 PMMA 각각의 특정 진동모드 1002 cm⁻¹ (a), 800 cm⁻¹ (b)에서의 TERS 이미지 분포.

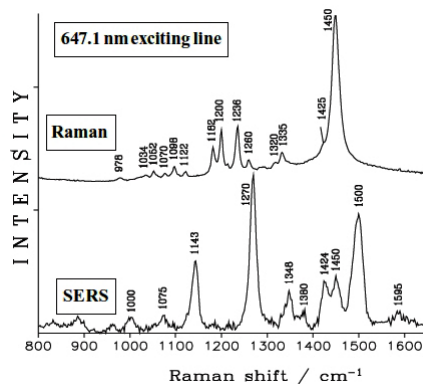


그림 5. 중합반응 이후의 CDS9의 SERS 스펙트럼.

14-(9H-9-carbazolyl)-tetradeca-10, 12-diyne-1-yl disulfide)의 자기조립 단분자막(self-assembled monolayers, SAM)의 중합(polymerization) 반응 검출을 보여준다.⁷ 이를 위하여 표면 거칠기 정도가 평평한 금 기판 위에 재차 은 나노 입자들을 증착(deposition) 시킴으로서 SERS의 감도를 향상시켰다. 먼저 UV-VIS 소광 스펙트럼(extinction spectrum)으로부터 구조 규칙성(structural order)이 상이한 두 상이 있음이 가정되었는데, 이 두 상의 존재는 SERS 실험으로부터 검증되었다. 또한 용액 상에서 관찰된 라만 스펙트럼과 SERS 스펙트럼을 비교함으로써, 중합 반응시 표면에서의 C=C 등 특정 결합들의 표면에 대한 방향성에 대한 정보를 얻을 수 있었다. 이는 SERS가 고분자의 검출 및 구조 분석 이외에도, 고분자 중합 반응시 표면에 흡착된 고분자의 배향 연구에도 중요한 실마리를 제공할 수 있음을 보여주는 것이다.

4. 결론

지금까지 나노 라만 분광학의 원리와 기술적 측면, 그리

고 고분자 분석에의 응용에 대해 간단히 살펴보았다. 서론에서 언급했던 대로, 나노 라만 분광학은 기존의 마이크로 라만 분광학에 비해 양상불 평균 효과를 피할 수 있어 단일 분자 수준에서의 미세구조 분석, 실시간 반응 관찰 및 금속 표면에 흡착된 (고)분자들의 배향 연구 등에 다양한 정보를 제공해 준다. 이는 이미 물리, 화학, 생물 등 전 분야에 걸쳐 가장 중요한 이슈가 되고 있는 나노/바이오 시스템의 광물리적, 광화학적 연구에 돌파구가 되어왔으며, 앞으로 그 응용 분야는 더욱 더 확대될 전망이다.

참고문헌

1. S. Nie *et al.*, *Science*, **275**, 1102 (1997).
2. K. Kneipp *et al.*, *Phys. Rev. E.*, **57**, 6281 (1998).
3. D.-K. Lim *et al.*, *Nature Mater.*, **9**, 60 (2010).
4. H. Xu *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **83**, 4357 (1999).
5. W.-H. Park *et al.*, *Chemphyschem* **9**, 2491 (2008).
6. L. Xue *et al.*, *Macromolecules*, **44**, 2852 (2011).
7. M. Muniz-Miranda *et al.*, *Macromol. Symp.*, **230**, 67 (2005).