(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월11일
(11) 등록번호 10-2715703
(24) 등록일자 2024년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 15/02 (2024.01) *G01N 15/00* (2024.01)
G01N 21/65 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 15/0205 (2024.01)
G01N 21/658 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0044137
(22) 출원일자 2023년04월04일
심사청구일자 2023년04월04일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020200009026 A
JPWO2016136851 A1
'Fabrication and evolution of multilayer silver nanofilms for surface-enhanced Raman scattering sensing of arsenate' Hao et al. Nanoscale Research Letters 2011, 6:263
'A critical assessment of visual identification of marine microplastic using Raman spectroscopy for analysis improvement' Marine Pollution Bulletin Volume 100, Issue 1, 15 November 2015, Pages 82-91

(73) 특허권자
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
신동하
인천광역시 미추홀구 인하로 100 인하대학교 5호관 5N404
박창민
인천광역시 연수구 해돋이로 107 (송도동, 송도더샵 퍼스트월드) 3동 2105호
임도현
서울특별시 송파구 올림픽로 435(신천동, 파크리오) 218-2801
(74) 대리인
이은철, 이수찬

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 인치현

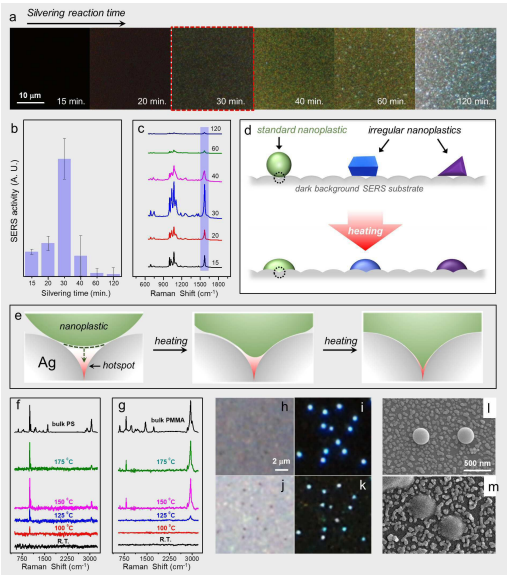
(54) 발명의 명칭 **미세입자의 신규한 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 미세입자의 신규한 검출 방법에 관한 것이다.

본 발명의 검출방법은 모든 실험실에서 쉽게 제조할 수 있는 은-거울 반응으로 만든 SERS 기판을 사용하며, 기존에 확립된 라만 분광기를 사용한다. 또한 본 발명의 검출방법은 DF 모드를 기반으로 하기 때문에 전체 관심영역) 맵핑이 아닌 나노플라스틱이 존재하는 지점을 측정할 수 있어 빠른 측정이 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 2015/0038 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 커버글라스 기판을 준비하는 단계;

2) 준비한 커버글라스를 세척하는 단계;

3) 세척한 커버글라스를 은거울 반응시켜 실버링 기판을 제조하는 단계;

4) 준비한 실버링 기판을 알코올성 나트륨 보로하이드라이드 용액으로 세척하는 단계;

5) 기판 상에 미세입자를 포함하는 유체를 적가하는 단계;

6) 미세 입자가 포함된 유체를 지나도록 광을 조사하는 조사과정; 및

7) 미세 입자로부터 방출되는 라만신호를 센싱하는 센싱과정;을

를 포함하는 것인 미세입자의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

5)기판 상에 미세플라스틱을 포함하는 유체를 적가하는 단계; 후

5-1) 적가된 기판을 가열시키는 단계; 및

5-2) 가열된 기판을 실온으로 냉각시키는 단계;

를 더 포함하고,

8) 센싱한 라만신호를 분석하는 분석과정; 및

9) 분석한 라만신호를 이용하여 미세 입자의 성분과 유체 내 포함량을 검출하는 검출과정;을 더 포함하는 것인, 미세입자의 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미세 입자는, 마이크로 플라스틱 또는 나노 플라스틱인 것인, 미세입자 검출 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 마이크로 플라스틱 또는 나노 플라스틱은 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리메틸메타크릴레이트 및 폴리에틸테레프탈레이트로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 미세입자 검출 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 분석과정은,

라만 신호를 이용하여, 유체 내 포함된 미세입자가 검출하고자 하는 성분인지 아닌지를 분석하는 것을 특징으로 하는 미세입자 검출방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조사과정은,

라만 분광계를 이용하여 미세 입자가 포함된 유체로 광을 조사하는 것을 특징으로 하는 미세입자 검출방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세입자의 신규한 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 플라스틱 폐기물들은 자연에 노출되었을 때 자연적 풍화 등에 의해 5 ㎜ 이하의 마이크로 플라스틱으로 쪼개진다. 그러나, 이 쪼개지는 과정은 마이크로 크기에서 멈추지 않고 더 진행되어 나노플라스틱까지 쪼개진다. 나노플라스틱은 수 밀리미터(< 5 ㎜)에 해당하는 미세플라스틱과 달리 눈이나 현미경으로도 관찰이 어려울 정도로 작은 플라스틱이다. 이와 더불어 미세플라스틱이 환경과 생물에 미치는 영향은 알려져 있지만, 나노플라스틱에 대한 구체적인 체내 흡수나 분포, 그리고 생물학적 영향에 대해선 아직까지 알려져 있지 않았다.

[0003] 나노플라스틱에 대한 관심이 증가하고 있음에도 불구하고, 상온, 상압 조건에서 개별적으로 탐지할 수 있는 기술은 거의 없다. 표면 증강 라만 분광법 (SERS) 은 나노플라스틱 검출에 있어 가장 적합한 후보이지만, 근본적으로 기질의 표면이 거칠어야 하며, 이러한 표면은 강한 원거리 산란을 유발할 가능성이 높다. 이는 나노플라스틱 산란과의 간섭을 만들어 개별 입자에 대한 시각적인 구분을 어렵게 한다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 라만 신호를 방출하면서 동시에 광학적으로 원거리 산란이 적은 어두운 표면을 갖는 기질을 제조하였고, 나노플라스틱을 마치 어두운 밤에 별처럼 빛나게 하는 것처럼 보이게 하여 개별 입자에 대한 시각적 구분과 분광분석이 모두 가능하게 하는 검출 방법을 고안하였다. 본 발명자들은 본 검출방법을 이용해 5종의 불규칙한 형태의 나노플라스틱을 구분하였으며, 실험실에서 흔히 사용되는 미세원심분리 시험관에서 방출되는 폴리프로필렌 개별 나노 입자와 일회용 음료컵에서 방출되는 폴리에틸렌 개별 나노 입자를 측정하여 본 발명을 완성하였다.

[0005] [선행기술문헌]

[0006] (비특허문헌 1) *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 2022, 12:865-888

[0007] (비특허문헌 2) *Environ. Sci. Technol*. 2020, 54, 24,

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예는

[0009] 1) 커버글라스 기판을 준비하는 단계;

[0010] 2) 준비한 커버글라스를 세척하는 단계;

[0011] 3) 세척한 커버글라스를 은거울 반응시켜 실버링 기판을 제조하는 단계;

[0012] 4) 준비한 실버링 기판을 알코올성 나트륨 보로하이드라이드 용액으로 세척하는 단계;

[0013] 5) 기판 상에 미세입자를 포함하는 유체를 적가하는 단계;

[0014] 6) 미세 입자가 포함된 유체를 지나도록 광을 조사하는 조사과정; 및

[0015] 7) 미세 입자로부터 방출되는 라만신호를 센싱하는 센싱과정;을

[0016] 를 포함하는 것인 미세입자의 검출 방법이다.

[0017] 한편, 본 발명에서 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자의 검출방법은

[0019] 1) 커버글라스 기판을 준비하는 단계;

[0020] 2) 준비한 커버글라스를 세척하는 단계;

[0021] 3) 세척한 커버글라스를 은거울 반응시켜 실버링 기판을 제조하는 단계;

[0022] 4) 준비한 실버링 기판을 알코올성 나트륨 보로하이드라이드 용액으로 세척하는 단계;

[0023] 5) 기판 상에 미세입자를 포함하는 유체를 적가하는 단계;

[0024] 6) 미세 입자가 포함된 유체를 지나도록 광을 조사하는 조사과정; 및

[0025] 7) 미세 입자로부터 방출되는 라만신호를 센싱하는 센싱과정;을

[0026] 를 포함하는 것인 미세입자의 검출 방법을 제공한다.

[0027] 이하, 상기 미세입자의 검출방법을 하기에 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명의 검출방법을 통해 검출되는 미세입자는 광을 조사하여 라만신호가 방출되는 모든 미세입자에 적용될 수 있으나, 바람직하게는 상기 미세입자는 미세플라스틱이다. 이때, 미세 플라스틱은 마이크로 플라스틱 또는 나노 플라스틱인 것일 수 있다. 미세 플라스틱은 통상적으로 직경이 5㎜ 이하, 나노 플라스틱은 통상적으로 100 ㎚ 이하인 것을 의미하나, 미세 플라스틱의 형상에 따라 직경이 상이할 수 있으므로 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 검출방법을 통해 검출되는 미세입자의 일 예시는 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리메틸메타크릴레이트 및 폴리에틸테레프탈레이트로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, 본 발명의2) 준비한 커버글라스를 세척하는 단계에서, 세척은 염기성 용액으로 수행되는 것일 수 있다.

[0031] 일 구현예에서, 본 발명의 4) 준비한 실버링 기판을 알코올성 나트륨 보로하이드라이드 용액으로 세척하는 단계는, 기판의 어두운 배경을 확보하면서도 명시야 모드에서도 검출이 가능하게 한다.

[0032] 상기 조사과정은,

[0033] 라만 분광계를 이용하여 미세 입자가 포함된 유체로 광을 조사하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 검출방법의 일 구현예에 있어서,

[0035] 5)기판 상에 미세플라스틱을 포함하는 유체를 적가하는 단계; 후

[0036] 5-1) 적가된 기판을 가열시키는 단계; 및

[0037] 5-2) 가열된 기판을 실온으로 냉각시키는 단계;

[0038] 를 더 포함하는 것일 수 있다. 기판에 적용된 은거울 상에 미세입자를 포함하는 유체를 적가한 후 적가된 기판을 가열시키면 은과 미세입자 사이의 열점으로 인해 미세입자, 바람직하게는 미세플라스틱이 용융되어 열점 공간을 채운다. 따라서, 상압 조건에서 미세입자를 개별적으로 탐지할 수 있으며, 원거리 산란 없이도 개별 입자에 대한 탐지가 가능하게 한다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 가열은 5 내지 15분간 100 내지 200℃로 가열하는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 가열은 5 내지 10분간 100 내지 175℃로 가열하는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 검출방법의 일 구현예에 있어서,

[0041] 8) 센싱한 라만신호를 분석하는 분석과정; 및

[0042] 9) 분석한 라만신호를 이용하여 미세 입자의 성분과 유체 내 포함량을 검출하는 검출과정;을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 분석과정은 라만 신호를 이용하여, 유체 내 포함된 미세입자가 검출하고자 하는 성분인지 아닌지를 분석하

는 것을 특징으로 한다.

[0044] 상기 검출과정은 종래 알려진 미세입자 성분의 피크 값을 활용하여 미세 입자의 성분과 유체 내 포함량을 검출하는 것을 특징으로 한다.

[0045] 상기 미세 입자는, 성분마다 방출하는 라만신호의 파장대역이 상이할 수 있으므로, 파장대역을 활용하여 서로 다른 성분을 식별할 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 상기 커버글라스는 붕규산 커버글라스인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 SERS 검출에 적합한 임의의 다른 커버글라스가 사용될 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 상기 은거울 반응은 에탄올 내 $AgNO_3$의 농도가 0.4mM 내지 0.6 mM인 용액 내에 커버글라스를 침지시켜 진행되는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 에탄올 내 $AgNO_3$의 농도가 0.5 mM로 유지되는 것일 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 상기유체는 탈이온수인 것일 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 검출용 센서는 은이 적용된 붕규산 커버글라스를 포함하는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 적용은, 도금이다. 보다 바람직하게는, 상기 도금은 은거울반응을 통해 화학적으로 증착된 것이다.

[0050] 상기 센서는 표면증강 라만 분광법 SERS(surface-enhanced Raman scattering) 센서인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 검출방법은 모든 실험실에서 쉽게 제조할 수 있는 은-거울 반응으로 만든 SERS 기판을 사용하며, 기존에 확립된 라만 분광기를 사용한다. 또한 본 발명의 검출방법은 DF 모드를 기반으로 하기 때문에 전체 관심영역 맵핑이 아닌 나노플라스틱이 존재하는 지점을 측정할 수 있어 빠른 측정이 가능하다.

[0052] 한편, 본 발명에서 얻을 수 있는 효과는 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1의 a는 실버링 기판의 시간에 따른 DF 이미지 품질이 저하되는 것을 나타낸 것이고, b는 실버링 기판의 시간에 따른 SERS 활성을 나타낸 것이고, c는 실버링 기판 위에 자가 조립된 벤젠티올 단층에서 SERS 스펙트럼을 측정한 것이고, d는 가열 단계에 대한 모식도를 나타낸 것이고, e는 가열시 SERS 핫스팟으로 나노플라스틱의 침투를 보여주는 모식도를 나타낸 것이고, f와 g는 각각 300nm 크기의 표준 PS 및 PMMA 나노구체에서 가열에 의해 유도된 SERS 신호를 나타낸 것이고, h와 i는 각각 SERS 기판에서 300nm 표준 PS 나노구체의 BF 및 DF 이미지를 나타낸 것이고, j와 k는 각각 h와 i를 각각 가열한 후의 이미지이고, l과 m은 각각 가열 전과 후의 SERS 기판에서 PS 나노구체의 FESEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 2의 a는, 혼합 샘플(300nm 크기의 표준 PS 및 PMMA 나노구체)이 있는 SERS 기판의 BF 이미지를 나타낸 것이고, b는 개별 나노플라스틱을 선명하게 볼 수 있는 DF 이미지(a와 동일한 영역)를 나타낸 것이고, c는 a의 점선 상자에서 측정한 전체 영역 SERS 맵핑의 오버레이 이미지를 나타낸 것이고, d는 b에서 나노플라스틱의 포인트별 검출된 SERS 스펙트럼으로서, 녹색 및 빨간색 원은 각각 PS 및 PMMA의 대표적인 라만 대역을 나타낸 것이다.

도 3의 a는 5가지 유형의 불규칙한 나노플라스틱에 대한 검출 결과를 나타낸 것이며, b는 5가지 유형의 불규칙한 나노플라스틱의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이며, c 및 d는 SERS-PP의 확대된 스펙트럼 패턴은 벌크와 비교할 때 샘플의 가열 상태를 나타낸 것이며, e 및 f는 SERS-PE의 확대된 스펙트럼 패턴은 벌크와 비교할 때 샘플의 가열 상태를 나타낸 것이며, g는 불규칙한 나노플라스틱의 다른 FE-SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 4의 a는 상업용 미세원심분리기 시험관에서 PP 나노플라스틱을 얻기 위한 실험 계획을 나타낸 것이며, 도 4의 b는 여러 PP 나노플라스틱 잔류물이 있음을 보여주는 DF 이미지이며, c는 b의 여러 지점에서 찍은 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이며, d는 일회용 종이컵에서 PE 방출을 보여주는 모식도를 나타낸 것이며, e는 여러 PE 나노플라스틱 잔류물의 DF 이미지를 나타낸 것이며, f는 e에서 표시된 여러 지점으로부터 얻은 여러 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5의 a는 샘플링 위치로서 서울 시내를 흐르는 한강 하구 근처를 나타낸 것이며, b는 표면 미세층(SML) 수를

선택적으로 수집하고 천연 유기물 제거를 위해 펜톤 시약으로 전처리한 모식도로서, 마이크로플라스틱 및 나노플라스틱 검출 시료의 획득 방법을 나타낸 것이며, c는 일반 라만 분광법으로 확인된 여러 마이크로플라스틱 의 광학 이미지(명시야, Brightfield, 이하 BF 및 암시야, Darkfield, 이하 DF)를 나타낸 것이며, d는 본 발명의 검출방법을 이용하여 분광학적으로 확인된 PET, PP, PS, PE 나노플라스틱의 DF 이미지를 나타낸 것이며, e는 각 나노플라스틱의 SERS 스펙트럼을 벌크 대응 물질과 함께 나타낸 것이며, 이때 점선과 박스는 각 폴리머의 대표적인 라만 밴드를 확인할 수 있는 가이드라인이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명의 실시 예를 첨부된 도면들을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 본 발명의 실시 예는 여러 가지 형태로 변형할 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래의 실시 예들로 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 실시 예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 도면에서의 요소의 형상은 보다 명확한 설명을 강조하기 위해 과장되었다.

[0055] **재료 및 측정기기**

[0056] 표준형 300nm 폴리스티렌(PS) 나노구체, 메틸메타크릴레이트(MMA, 99.0%), 질산은(≥99.0%), 부틸아민(99.5%), 과황산칼륨(KPS, 99.0%) 및 수소화붕소나트륨(99%)은 시그마-알드리치에서 구입하였으며, 공급받은 그대로 사용하였다. 무수에틸알코올(EtOH, 99.9%), 메탄올(MeOH, 99.0%), 과산화수소(34.5%), 황산(95%)은 삼천화학(한국)에서 공급받았다.

[0057] 표준 300 nm PMMA 나노구는 이전 보고(*Macromol Res.* **12**, 240-245, 2004, 참조)에 따라 합성되었으며 평균 크기는 투과 전자 현미경(TEM) 이미지로 확인되었다. 표준 유형 125 및 200 nm PS 및 PMMA 나노구는 모두 폴리사이언스사에서 구입했다.

[0058] 폴리에틸렌(PE, REP) 및 폴리프로필렌(PP, 5014 분말)의 벌크 샘플은 한국석유화학으로부터 입수하였다. 폴리스티렌(PS, GPPS 25SPE) 및 폴리 메틸 메타크릴레이트(PMMA, EG920)는 LG 화학으로부터 입수하였다. 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET, Homo PET BHN80)는 롯데케미칼에서 구입하였다. PE, PP는 분말 상태로 공급되어 그대로 사용하였다. PS, PMMA 및 PET는 버진 펠렛 상태로 공급되었으며 불규칙한 파편을 생성하기 위해 냉동 상태에서 밀링 머신으로 분쇄하였다(6775 Freezer/Mill® Cryogenic Grinder, SPEX. SamplePrep. Co., U.S.).

[0059] FESEM 조사에서는 마이크로플라스틱뿐만 아니라 다양한 종류의 불규칙 나노플라스틱이 생성되었음을 확인하였다. 라만 측정 전에 샘플을 유리 바이알에서 충분한 시간 동안 초음파 처리하여 물 또는 에탄올에 분산시킨 다음 샘플의 1~2 μL 분취량을 은도금 SERS 기판에 떨어뜨렸다. 탈이온수는 모든 수성 실험에 사용되었다. 모든 유리 제품은 피라니아 용액(piranha solution)으로 세척하고 사용하기 전에 풍부한 탈이온수로 철저히 세척했다.

[0060] 라만 측정은 당사의 개조된 상용 라만 시스템(나노베이스, Inc.)을 사용하여 수행하였다. 현미경(BX40, 올림푸스)에 암시야 모듈(DF 대물렌즈, 광원, 광학 콘덴서)을 설치하고 라만 측정을 위한 레이저 라인이 DF 모듈의 광경로 영역 가운데 공간을 통과하도록 하여 암시야 영상과 레이저 조사점을 동시에 이미징할 수 있도록 하였다. 또한 영역 스캔 방식이 아닌 개별 나노플라스틱에 레이저를 조사하여 나노플라스틱을 빠르게 측정할 수 있었다. 나노플라스틱 샘플의 모든 DF 이미지는 백색광(텅스텐 할로겐 램프)의 조명 강도를 동일하게 유지하여 획득했다. 라만 맵핑은 20nm 분해능의 정확도를 가진 갈바노 기반 레이저 스캐닝 시스템(나노베이스, Inc.)을 사용하여 수행되었다. 라만 스펙트럼 보정은 실리콘(520 cm^{-1}에서)과 표준 샘플(아세트아미노펜의 진동 지문)을 모두 사용하여 수행되었다. 조사 레이저 라인(633nm 다이오드, CNI 레이저)은 DF 대물렌즈(MPLAN, 100 X, 0.9 NA, 올림푸스)를 통해 시료 표면에 전달되었으며, SERS 측정 중 시료 지점에서 0.05~0.7mW/m^2로 출력을 유지했다. 후방 산란된 레일리 신호는 롱패스 라만 필터로 제거했다. 레이저는 한 번의 측정에서 통합 시간으로 1초 동안 노출되었고 신호 대 잡음비를 높이기 위해 30배 이상 누적되었다. 벌크 플라스틱에 대한 일반적인 라만 측정은 높은 레이저 출력(> 10mW/m^2)과 긴 축적 시간(> 30초)으로 수행되었다. 분광계 시스템은 상용 공냉식 CCD(iVac, 316, LDC-DD, Andor)와 결합된 높은 처리량의 위상 홀로그래픽 격자(600 gr/mm)를 사용했다. 백금 금속으로 스퍼터 코팅한 후 표준 플라스틱과 불규칙한 플라스틱에 대해 전계 방출 주사 전자 현미경(FESEM, S-4300, Hitachi) 이미지를 촬영했다.

[0061] **실시예**

[0062] **실시예 1. SERS 기판의 준비**

[0063] 실버링(Silvering) SERS 기판의 종래 보고된 준비 방법(*Langmuir, Vol. 22, No. 4, 2006*)은 하기와 같다.

[0064] 반응 용기의 비특이적 은화를 방지하기 위해 폴리프로필렌 용기를 반응 용기로 사용했으며, 은화 기판으로는 붕규산 커버 유리(직경 18mm, 마리엔펠트)를 사용했다. 커버 유리를 염기성 세척 용액(pH) 9.2, 0.5% 헬마넥스 II, 헬마)에 3시간 동안 담근 다음 증류수에 10분간 초음파 처리한 후 에탄올로 헹구고 마지막으로 70° C 오븐에서 20분간 건조시켰다. 세척한 유리를 반응 혼합물에 담그고 45±1° C에서 30분 동안 격렬하게 교반하면서 반응시켰다. 반응 혼합물로서 절대 에탄올의 $AgNO_3$ 농도는 모든 실험에서 0.5mM로 유지되었으며 부틸 아민의 농도는 변경되었다. 마지막으로 은 코팅 유리 기판을 에탄올로 헹구고 공기 건조시켰다.

[0065] 상기와 같은 프로세스대로 실버링(Silvering) SERS 기판을 준비하되, DF 모드에서 어두운 배경을 표시하도록 변경되었다. 구체적으로, 은거울 반응은 기존 방식의 격렬하게 교반하는 방법이 아닌, 교반 막대를 사용한 온화한 혼합 조건으로 수행하였다. 라만 측정 전 흡착된 불순물을 세정하기 위해 제조된 기판을 알콜성(수성 아님) 나트륨 보로하이드라이드 용액에 침지시켰다. 이 단계는 기판의 어두운 배경을 확보하는 데 중요하다. 나트륨 보로하이드라이드 용액에 장기간 노출되거나 고농도에 노출되면 불순물을 완전히 제거하는 데 도움이 되지만 동시에 기판 표면이 손상되어 DF 모드의 샘플 나노플라스틱과 비교할 때 식별할 수 없는 이미지가 나타날 수 있다.

[0066] 선명한 DF 이미지(어두운 배경)와 동시에 최대 SERS 활성을 갖도록 하였다. 도 1a에서 볼 수 있듯이 DF 이미지는 은거울 반응 시간에 따라 어둠에서 빛나는 노이즈로 점차 변화하였다. 기판 이미지는 증착된 나노플라스틱을 방해할 수 있는 60분에서 크게 열화되기 시작하고 120분에서 더 열화되었다. 도 1b는 반응 시간에 따른 기판의 SERS 활성을 보여 주며, 이는 기판에 자체 조립된 벤젠티올 분자의 라만 피크 강도(도 1c의 1570 cm^{-1}에서 고리 스트레칭 모드)로 표시되었다. 이러한 결과를 바탕으로 본 검출방법에서는 30분 기판을 가장 적합한 것으로 선정하여 이 연구의 모든 후속 실험에 사용했다(도 1a의 빨간색 점선 상자).

[0067] **실시예 2. 가열 SERS 측정**

[0068] 시료를 떨어뜨려 상온에서 건조시키는 SERS 기판(커버 글라스에 은 코팅)을 가열 단계에서 고온으로 가열시켰다. 모든 온도 설정에서 샘플을 10분간 가열하고 가열 후 기판이 실온으로 냉각되었을 때 모든 라만 측정을 수행했다. 나노플라스틱의 DF 이미지와 시료 표면에 의도적으로 표시된 위치의 도움으로 모든 온도 조건에서 동일한 개별 나노플라스틱을 라만 측정할 수 있었다.

[0069] 도 1d는 가열 전략에 대한 계획을 나타내었다. SERS 핫스팟은 어두운 배경 기판(표준 나노플라스틱 아래 점선 원)에 묻혀 있기 때문에 표준이든 불규칙적이든 나노플라스틱이 기판 위에 놓여 있을 때는 대부분 핫스팟에 도달하지 못하기 때문에 SERS 신호를 효율적으로 생성할 수 없었다. 그러나 가열 과정을 거치면 나노플라스틱이 핫스팟에 서서히 침투할 수 있었다. (개략도는 도 1e에 표시되어 있으며 해당 영역에 대한 시뮬레이션된 핫스팟 분포는 도 5에 개시하였다.) 이는 가열 온도가 증가함에 따라 나노플라스틱 (300nm 표준 폴리스티렌 및 폴리메틸메타크릴레이트)의 SERS 신호가 나타나는 도 1f 및 1g에서 확인할 수 있었다. 도 1h와 1i는 동일한 표면적에 대한 BF 및 DF 이미지를 보여주는데, BF 모드에서는 나노플라스틱이 나타나지 않는 반면 DF 모드에서는 명확하게 나타났다. 도 1j와 1k는 기판을 가열한 후의 동일한 영역의 이미지를 보여주었다. (도 1h에서 1j로, 1i에서 1k로) 또한 도 1j의 BF 이미지에서도 도 1i 및 1k의 이미지에 해당하는 나노플라스틱의 위치 (검은 점)가 희미하게 표시되어 가열 후 확대된 나노플라스틱을 확인할 수 있었다. FE-SEM 이미지를 통해 가열 시 나노플라스틱의 형태학적 변화를 확인하였다(도 1l~1m).

[0070] 또한, 두 종류의 표준 나노플라스틱 (300nm 폴리스티렌 및 폴리메틸메타크릴레이트)를 혼합하여 기판 위에 펼쳤다. 가열 후에도 광학 해상도 한계로 인해 BF 모드(도 2a)에서 나노플라스틱이 명확하게 나타나지 않았다. 가열 처리 후 일부 입자가 확대되어 보이기는 하지만 대부분의 입자의 크기는 가시 회절 한계 이하였다. 따라서 나노플라스틱의 분포 정보를 얻으려면 BF 모드에서 전체 맵핑 영역(흰색 점선 상자)에서 라만 측정을 수행해야 했다. PS에서 벤젠기의 고리 호흡 모드(1000 cm^{-1})와 PMMA에서 지방족기의 스트레칭 밴드(2900 cm^{-1})를 대표 밴드로 선정하여 지도를 구성하고 이미지에서 각각 빨간색과 초록색으로 채색하였다(도 2c). 분포 정보를 상세하게 제공하지만, 이 과정은 전 영역 맵핑으로 인해 측정 시간이 오래 걸릴 수밖에 없었다. 반면, 도 2b의 DF 모드에서는 나노플라스틱이 선명하게 보이기 때문에 점 단위 라만 측정만 하면 되기 때문에 전체 영역 맵핑에 비해 측정 시간이 매우 짧았다. (전체 맵핑의 경우 50분, 포인트 검출의 경우 30초) 포인트별 검출의 각 SERS 스펙트럼은 도 2d에 숫자로 표시하였으며, 색상 원은 PS와 PMMA의 대표적인 라만 대역을 나타낸 것이다. 도 2c에

서 오버레이된 라만 맵핑 이미지는 도 2b의 이미지와 PS 및 PMMA의 일치하는 위치를 보여준다. DF 모드 덕분에 광학 현미경에서 나노플라스틱도 명확하게 볼 수 있으므로 포인트별 라만 검출이 가능하였다. 이는 실제 환경에서 나노플라스틱을 검출할 때 효율적으로 적용할 수 있다.

[0071] 실제 환경을 고려할 때, 대부분의 나노플라스틱은 완벽한 구형이 아니라 불규칙한 모양일 가능성이 높다. 보다 현실적인 상황에서 전략을 검증하기 위해 벌크 플라스틱 샘플을 부수어 마이크로 및 나노 크기를 포함한 불규칙한 파편을 생성했다. 도 3a는 본 발명의 검출방법에서 샘플링한 다양한 불규칙한 나노플라스틱의 DF 이미지를 보여주었다(작은 것만 선택적으로 표시됨). 비교를 위해 표준 구 PMMA와 PS의 DF 이미지를 함께 표시했는데, 이는 모든 불규칙한 나노플라스틱의 크기가 최소 1 μm 미만임을 의미한다. 정확한 크기와 형태는 인셋으로 표시된 FE-SEM 이미지를 촬영하여 별도로 확인했다. 도 3b는 가열 처리 후 불규칙한 나노플라스틱에서 촬영한 각 SERS 스펙트럼을 보여주었다.

[0072] **실시예 3. 시차 주사 열량 측정**

[0073] 시차 주사 열량 측정 실험은 상용 장비(DSC4000, Perkin Elmer Inc.)를 사용하여 수행했다. 최소 및 최대 온도는 각각 -30.00 ℃ 및 300.00 ℃로 설정되었다. 가열 및 냉각 과정은 10.00 ℃/분의 속도로 두 번 반복되었다. 온도는 -30.00℃에서 1.0분간 유지한 후 같은 속도로 300.00℃까지 가열한 후 300.00℃에서 1.0분간 유지했다. 냉각 과정은 동일한 속도와 유지 조건으로 진행되었다.

[0074] **실시예 4. FDTD 시뮬레이션**

[0075] 상용 소프트웨어(Ansys Lumerical 2021 R2.4)를 사용하여 3차원 유한차분 시간 영역(3D-FDTD, Finite-difference time-domain) 전기 역학을 시뮬레이션하여 은 나노 구조물 주변의 국부 전자기장 분포를 도출했다. 나노구조를 모델링한 다음 기판의 실제 FE-SEM 이미지, 특히 강화된 전자기 국부장의 근원인 갭 거리 또는 날카로운 모서리에 초점을 맞춰 모델링했다. 총 시뮬레이션 영역은 996nm × 1137nm × 379nm이었다. 은의 유전 상수(팔릭, Palik)는 소프트웨어에서 제공했다. 오버라이드 메쉬가 구조에 사용되었으며, 특히 갭 영역(0.25nm)에 중점을 두었다. 입사 광원으로는 전파 방향이 z이고 편광 방향이 x 또는 y인 TFSF(전계 산란장) 파(633nm 파장)가 선택되었으며, 경계 조건으로는 완벽하게 일치하는 레이어가 선택되었다.

[0076] **실험예 1. 미세원심분리기 튜브의 나노플라스틱 검출**

[0077] 대부분 PP 플라스틱으로 만들어진 널리 사용되는 미세 원심 분리 시험관을 선택했다. 일반 실험실에서 다양한 생물학적 또는 화학적 실험을 수행할 때 이러한 튜브는 원심 분리 및 분산을 목적으로 일상적으로 사용된다. 사용 중 PP 나노플라스틱이 방출되어 튜브에 포함된 DNA, 단백질, 세포, 심지어 박테리아 등 생물학적 시료에 손상을 줄 수 있다는 의구심이 있었다.

[0078] 일반적인 실험실 환경에서 나노플라스틱의 방출을 조사하기 위해 상업용 미세원심분리기 튜브를 사용하였다. 과량의 탈이온수로 세척한 후, 많은 생화학 실험에서 수행되는 것과 마찬가지로 새로운 탈이온수를 다시 튜브에 붓고 10분 동안 초음파 처리하였다. (초음파 처리는 일반적으로 반복되는 원심분리와 분산 공정 사이에 사용된다). 1-2 L의 초음파 처리된 물은 유리 피펫으로 옮겨져 기성품 SERS 기판에 적재되었다. 샘플은 라만 측정 전에 실온 및 상대 습도 50% 조건에서 30분 이상 건조되었다. (도 4a) DF 모드에서 많은 수의 나노플라스틱이 존재하는 것을 직접 확인할 수 있었고(도 4b), 라만 측정을 통해 이를 PP로 분해하여 도 4c에 나타내었다.

[0079] **실험예 3. 일회용 종이컵의 나노플라스틱의 나노 플라스틱 검출**

[0080] 내부에 폴리에틸렌 층이 코팅된 상업용 일회용 종이컵(최대 180mL)을 사용하여 폴리에틸렌 나노플라스틱의 방출을 조사했다(도 4d). 과량의 탈이온수로 세척한 후 70mL의 깨끗한 탈이온수를 컵에 붓고 전자레인지에 5분간 가열시켰다. 실온으로 식힌 후 1-2L의 물을 유리 피펫으로 옮겨 기성품 SERS 기판 위에 올려놓고 10분간 건조시킨 후 라만 측정하였다.

[0081] DF 모드에서 개별 나노 입자를 직접 확인하고 (도 4e) 폴리머 유형을 확인하여 (도 4f) 컵에서 나노 크기의 PE 입자가 방출된다는 증거를 확인할 수 있었다. 도 3에서 이미 논의한 바와 같이, PP와 PE 나노플라스틱 모두에서 약간 변화된 스펙트럼 패턴은 SERS를 측정할 때 플라즈몬으로 가열된 환경의 증거를 보여주었다.

[0082] **실험예 4. 해수의 나노플라스틱 검출**

[0083] 샘플링 지점으로 서울을 관통하는 한강 하구와 가깝고 이미 해양 마이크로플라스틱 측정에 자주 활용되고 있는 한국의 서쪽에 위치한 영종도 연안 지역(도 5a)을 선택했다. 표층수(SSW)에 비해 마이크로플라스틱 농도가 높을

것으로 예상되는 표면 미세층 수(SML)를 채취하였다(도 5b). 표면 미세층(Surface microlayer, SML) 수를 얻기 위해 그물망(스테인리스 스틸, 기공 크기 2 X 2 mm^2, 30cm X 30cm)을 해수 표면에 부드럽게 접촉시킨 후 스테인리스 스틸 용기에 여러 번 빠르게 옮겼다. 그물망에 한 번 채집할 수 있는 용량은 약 10 ml이며, 총 2 L까지 모은 후 전체 유리로 만들어진 병(병의 뚜껑과 연결 부분은 플라스틱이 전혀 사용되지 않음)에 옮겨 보관하였다. 전처리 절차로 천연 유기물 제거를 위해 펜톤 시약을 사용했는데, 최근 연구에 따르면 펜톤 시약이 마이크로플라스틱에 가장 적은 영향을 미친다는 사실이 밝혀졌기 때문이다. 그 후 전처리된 샘플을 3■㎛ 기공막(셀룰로오스, Advantec)을 통해 진공 여과시켰다. 여과 후 멤브레인 필터에 남아있는 샘플을 탈이온수로 여러 번 세척하고 조심스럽게 물에 다시 분산시킨 다음 미리 세척된 실리콘 웨이퍼 표면에 로드하여 정상적인 라만 측정을 수행했다. 반면, 여과된 물 샘플은 2mL의 마이크로 원심분리기 튜브에 로드하여 원심분리(30분간 15000rpm)한 후 상층(부피 20%)을 버리고 여과된 물을 새로 추가했다. 그 후 용매를 교환하기 위해 샘플을 다시 원심분리하고 탈이온수에 재분산시켰다. 최종적으로 여과된 물 시료 125mL에서 침전된 시료와 여과된 시료에서 각각 5개의 마이크로플라스틱과 5개의 나노플라스틱이 발견되었다. (서브마이크론 크기의 나노입자 최대 1000개가 본 발명의 나노플라스틱 검출 기법으로 조사되었다.)

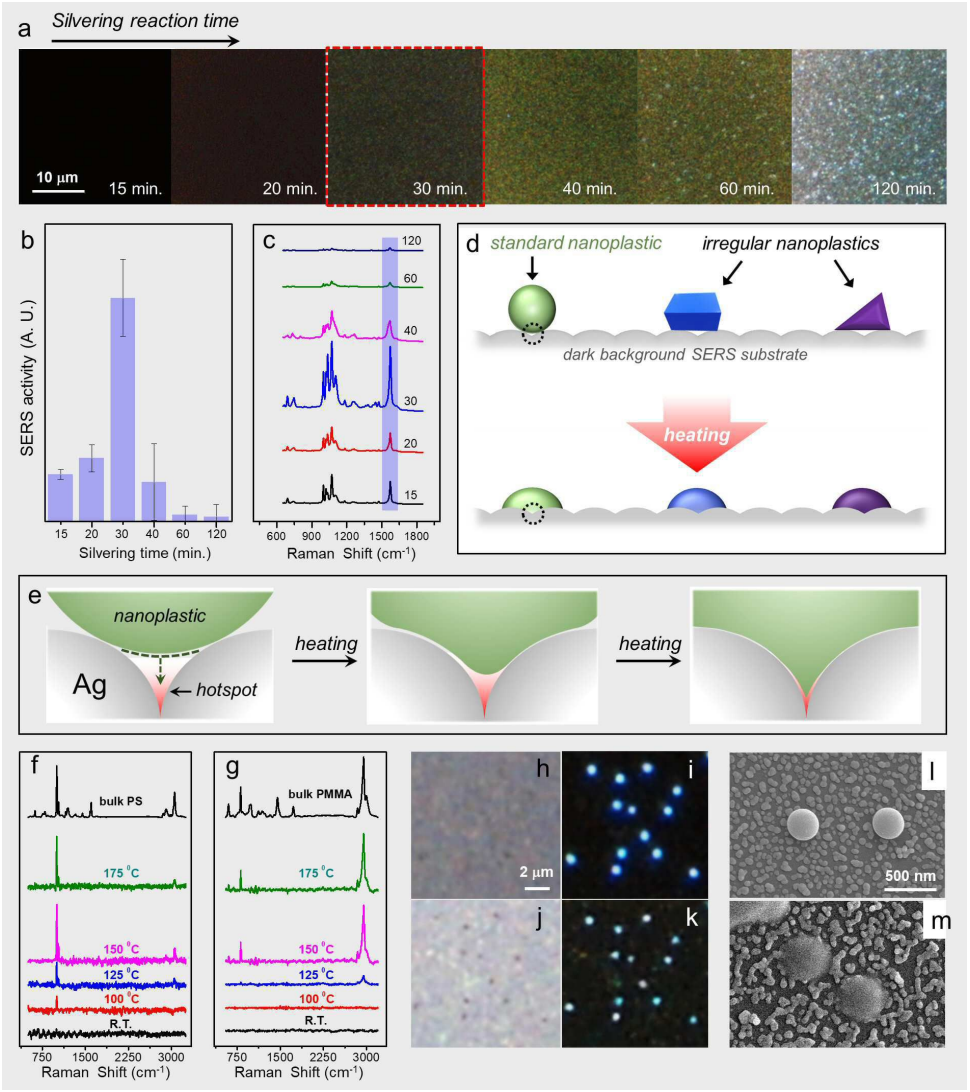
[0084] 도 5c는 채취한 해수에서 일반 라만 분광법으로 쉽게 확인할 수 있는 여러 종류의 마이크로플라스틱을 나타낸다. 이러한 마이크로플라스틱 외에도 일부 나노플라스틱을 발견할 수 있었으며 PET, PP, PS 및 PE로 확인되었다. 도 5e는 각 벌크 시료의 분자 지문 피크와 유사한 나노플라스틱의 대표적인 분자 지문 피크를 명확하게 보여 주지만, 용해되지 않은 (흡착된) 종에서 나올 수 있는 일부 다른 피크도 함께 관찰되었다.

[0085]

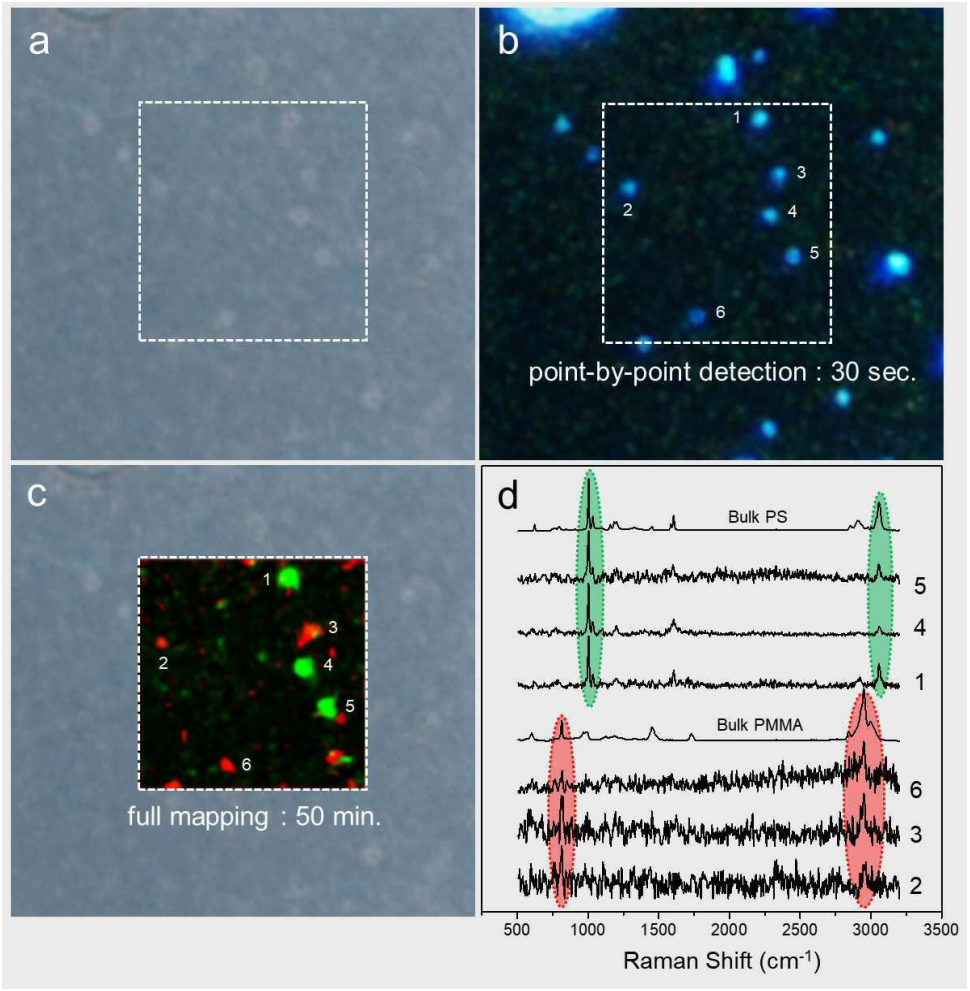
[0086] 이상의 상세한 설명은 본 발명을 예시하는 것이다. 또한 전술한 내용은 본 발명의 바람직한 실시 형태를 나타내어 설명하는 것이며, 본 발명은 다양한 다른 조합, 변경 및 환경에서 사용할 수 있다. 즉 본 명세서에 개시된 발명의 개념의 범위, 저술한 개시 내용과 균등한 범위 및/또는 당업계의 기술 또는 지식의 범위 내에서 변경 또는 수정이 가능하다. 저술한 실시예는 본 발명의 기술적 사상을 구현하기 위한 최선의 상태를 설명하는 것이며, 본 발명의 구체적인 적용 분야 및 용도에서 요구되는 다양한 변경도 가능하다. 따라서 이상의 발명의 상세한 설명은 개시된 실시 상태로 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 또한 첨부된 청구 범위는 다른 실시 상태도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

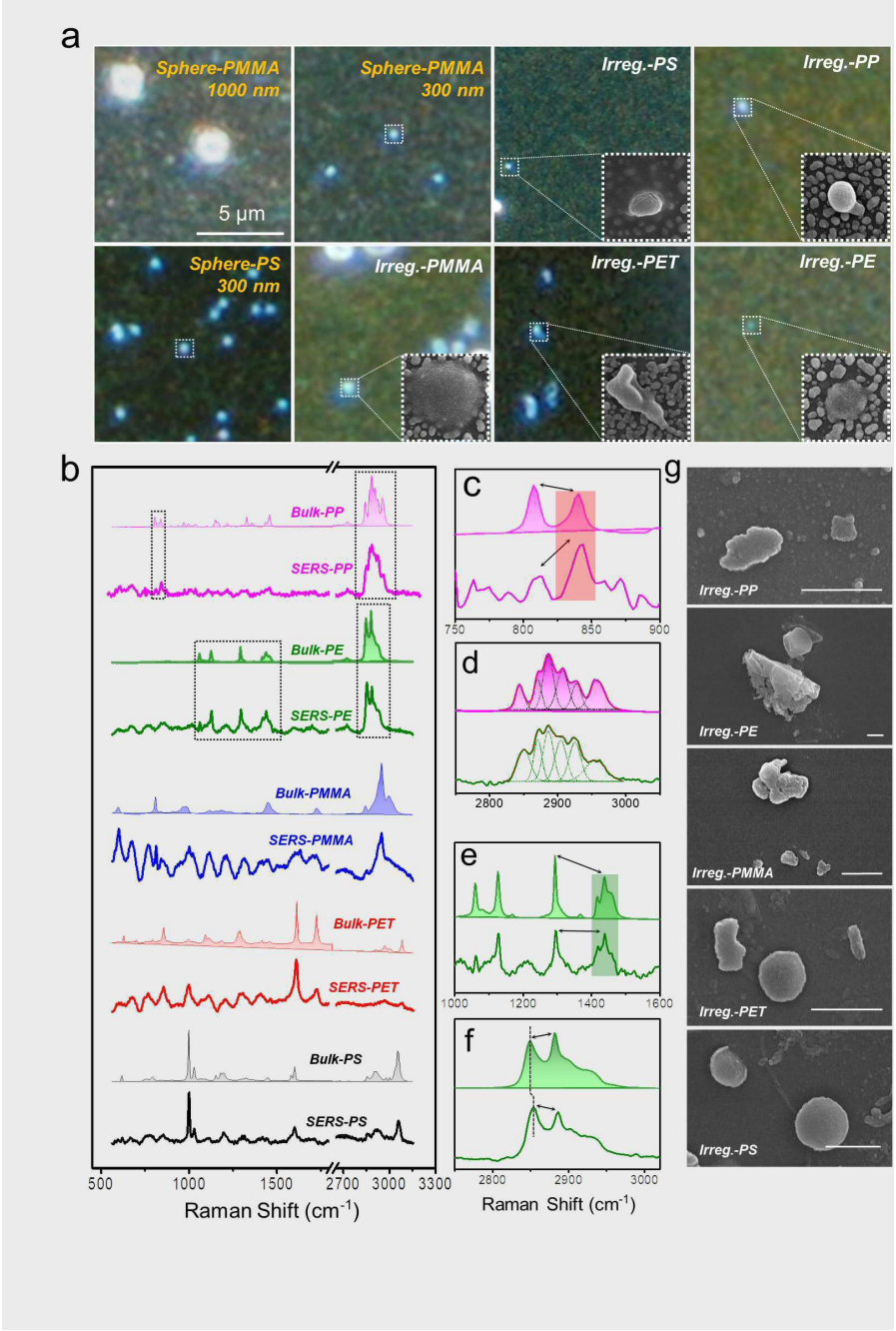
도면1


a
Silvering reaction time
10 μm
15 min.
20 min.
30 min.
40 min.
60 min.
120 min.
b
SERS activity (A. U.)
15 20 30 40 60 120
Silvering time (min.)
c
120
60
40
30
20
15
600 900 1200 1500 1800
Raman Shift (cm-1)
d
standard nanoplastic
irregular nanoplastics
dark background SERS substrate
heating
e
nanoplastic
Ag
hotspot
heating
heating
f
bulk PS
175 °C
150 °C
125 °C
100 °C
R.T.
750 1500 2250 3000
Raman Shift (cm-1)
g
bulk PMMA
175 °C
150 °C
125 °C
100 °C
R.T.
750 1500 2250 3000
Raman Shift (cm-1)
h
2 μm
i
j
k
l
500 nm
m

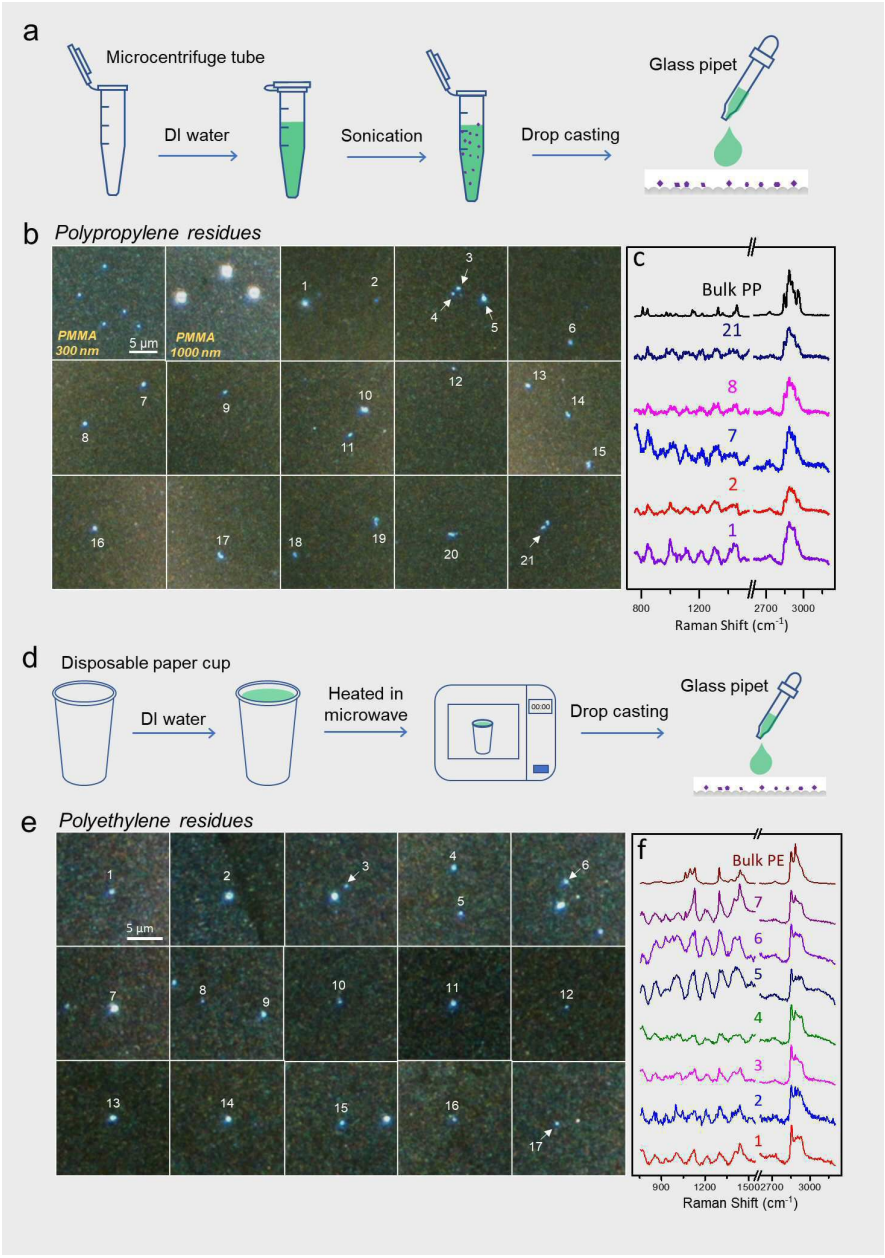
도면2


a
b
1
2
3
4
5
6
point-by-point detection : 30 sec.
c
1
2
3
4
5
6
full mapping : 50 min.
d
Bulk PS
5
4
1
Bulk PMMA
6
3
2
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
Raman Shift (cm-1)

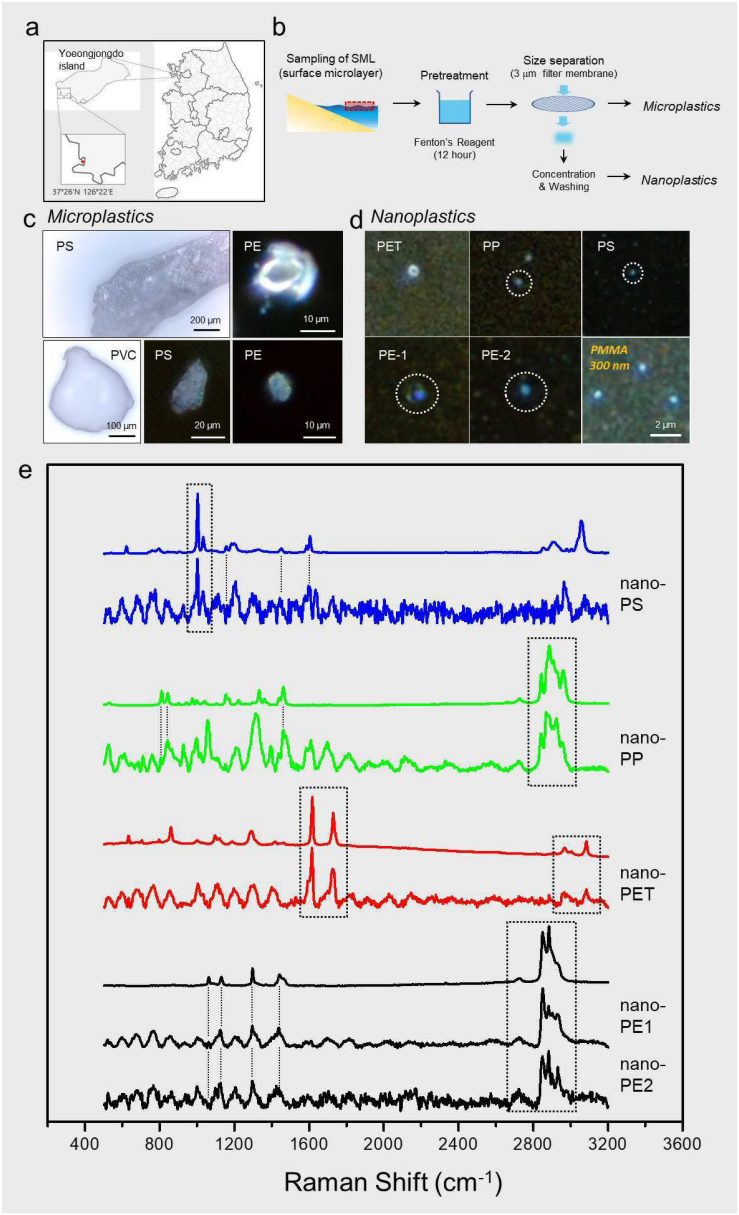
도면3


a
Sphere-PMMA 1000 nm
5 μm
Sphere-PMMA 300 nm
Irreg.-PS
Irreg.-PP
Sphere-PS 300 nm
Irreg.-PMMA
Irreg.-PET
Irreg.-PE
b
Bulk-PP
SERS-PP
Bulk-PE
SERS-PE
Bulk-PMMA
SERS-PMMA
Bulk-PET
SERS-PET
Bulk-PS
SERS-PS
500 1000 1500 2700 3000 3300
Raman Shift (cm-1)
c
750 800 850 900
d
2800 2900 3000
e
1000 1200 1400 1600
f
2800 2900 3000
Raman Shift (cm-1)
g
Irreg.-PP
Irreg.-PE
Irreg.-PMMA
Irreg.-PET
Irreg.-PS

도면4


a
Microcentrifuge tube
DI water
Sonication
Drop casting
Glass pipet
b Polypropylene residues
PMMA 300 nm
5 μm
PMMA 1000 nm
c
Bulk PP
Raman Shift (cm-1)
d
Disposable paper cup
DI water
Heated in microwave
Drop casting
Glass pipet
e Polyethylene residues
5 μm
f
Bulk PE
Raman Shift (cm-1)

도면5


a
Yeoongjongdo island
37°26'N 126°22'E
b
Sampling of SML (surface microlayer)
Pretreatment
Fenton's Reagent (12 hour)
Size separation (3 μm filter membrane)
Microplastics
Concentration & Washing
Nanoplastics
c Microplastics
PS
PE
200 μm
10 μm
PVC
PS
PE
100 μm
20 μm
10 μm
d Nanoplastics
PET
PP
PS
PE-1
PE-2
PMMA 300 nm
2 μm
e
nano-PS
nano-PP
nano-PET
nano-PE1
nano-PE2
400
800
1200
1600
2000
2400
2800
3200
3600
Raman Shift (cm-1)