



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0142468
(43) 공개일자 2016년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) G01J 3/44 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/658 (2013.01)
G01J 3/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0078136
(22) 출원일자 2015년06월02일
심사청구일자 2015년06월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최삼진
서울특별시 동대문구 장한로26길 71 #401호 (장안동, 공감대 4차 아파트)
김완선
서울특별시 동대문구 한천로 300 108동 702호 (휘경동, 휘경동동일스위트리버아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

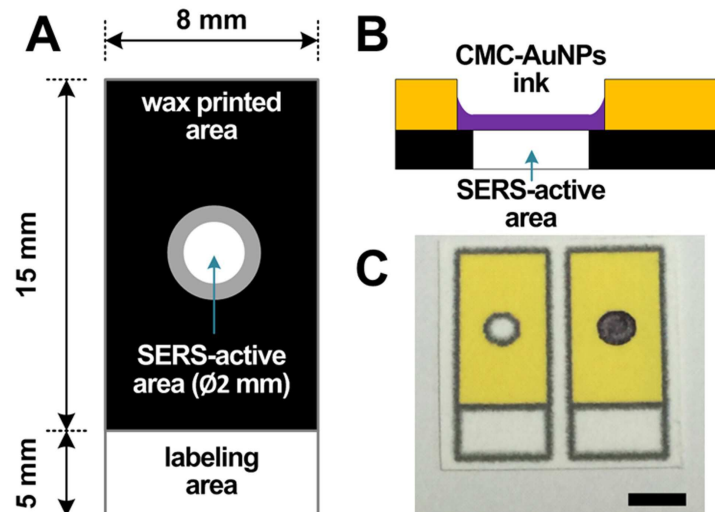
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 종이 기반 표면증강라만산란 플랫폼의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 첨가하여 점성을 갖는 금속 나노입자 용액을 이용하는 종이 기반 표면증강라만산란 기체의 제조방법; 상기 방법으로 제조된, 고안된 패턴에 고르게 분포된 금속 나노입자 및 카르복실메틸셀룰로오스를 포함하는, 종이 기반 표면증강라만산란 기체 및 상기 종이 기반 표면증강라만산란 기체를 포함하는 현장진단용 키트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2013.01)

(72) 발명자

신재호

서울특별시 서초구 잠원로 213-10 6동 401호 (잠원동, 한강아파트)

박헌국

서울특별시 동대문구 무학로34길 8 (용두동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A2054452

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 생체유체 표면증강라만산란을 이용한 바이러스결막염 조기 진단 POC 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

금속 나노입자와 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 혼합하여 금속 나노입자 용액을 준비하는 제1단계;

원하는 패턴이 형성된 종이기재를 준비하는 제2단계; 및

상기 종이기재 상에 제1단계의 금속 나노입자 용액을 코팅하는 제3단계를 포함하는 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자 용액은 500 내지 10,000 cP의 점도를 갖는 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자는 평균직경 10 내지 100 nm의 균일한 크기를 갖는 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 카르복실메틸셀룰로오스 수용액은 0.7 내지 2.5 중량% 농도를 갖는 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자 용액은 금속 나노입자와 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 1:5 내지 1:10의 부피비로 혼합한 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

제2단계는 원하는 패턴이 고안된 종이의 패턴을 제외한 부분을 왁스로 코팅하여 수행되는 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

제3단계 이후 가열하여 건조하는 제4단계를 추가로 포함하는 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

제3단계 및 제4단계를 총 1 내지 5회까지 반복하여 수행하는 것인 종이 기반 표면증강라만산란 기체의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 제조된, 고안된 패턴에 고르게 분포된 금속 나노입자 및 카르복실메틸셀룰로오스를 포함하는, 종이 기반 표면증강라만산란 기체.

청구항 10

제9항의 종이 기반 표면증강라만산란 기체를 포함하는 현장진단용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서,

추가적인 라만 활성 물질의 첨가에 의해 시너지적인 신호 증강 효과를 나타내는 것인 현장진단용 키트.

청구항 12

평균직경 20 내지 40 nm의 균일한 크기를 갖는 금속 나노입자와 1 내지 2 중량% 농도의 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 1:6 내지 1:8의 부피비로 혼합하여 금속 나노입자 용액을 준비하는 제1단계;

원하는 패턴을 제외한 부분을 왁스로 코팅하여 형성된 원하는 패턴을 갖는 종이기체를 준비하는 제2단계; 및

상기 종이기체 상에 제1단계의 금속 나노입자 용액을 코팅하고 건조시키는 제3단계를 포함하는 종이 기반 표면증강라만산란 기체의 제조방법으로서, 상기 제3단계를 2 내지 3회 반복하여 수행하는 것이 특징인 종이 기반 표면증강라만산란 기체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 첨가하여 점성을 갖는 금속 나노입자 용액을 이용하는 종이 기반 표면증강라만산란 기체의 제조방법; 상기 방법으로 제조된, 고안된 패턴에 고르게 분포된 금속 나노입자 및 카르복실메틸셀룰로오스를 포함하는, 종이 기반 표면증강라만산란 기체 및 상기 종이 기반 표면증강라만산란 기체를 포함하는 현장진단용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 라만 분광법은 생물학적 및 화학적 시료에 대한 분자 특이적 정보를 제공하는 기술이다. 그러나, 라만 신호는 내재적으로 매우 약하므로, 이를 증강시키기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다. 표면증강라만산란(SERS) 활성

은 표면에서 흡수 에너지에 의해 라만 스펙트럼의 세기를 현저히 향상시킬 수 있다. SERS 규모의 척도로 사용되는 증강인자(enhancement factor; EF)는 보통 10^4 내지 10^8 이며 단일 분자 수준의 검출이 가능한 10^{14} 에 이르기 도 한다. SERS EF 증가에 대한 대부분의 연구는 표면의 소재 및 나노구조 패턴 수식을 통한 기재 관련 분야에 집중한다. 대부분의 SERS-활성 부분은 리소그래피 또는 고온 과정을 포함하는 복잡적이고 정교한 방법에 의해 제조되어 왔다. 이러한 SERS 활성 기재의 제조방법은 폭발 위험성이 있는 장시간의 복잡한 단계를 거치는 반면, SERS 기재로서 금속 나노입자의 사용은 반응 조건에 의해 크기와 형태가 조절 가능하고 낮은 비용으로 손쉬운 합성법을 제공하며, 응집된 나노입자는 신호를 현저히 향상시켜 단일 분자수준의 민감도를 제공할 수 있다(X.M. Lin *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394: 1729-1745). 이들 나노입자는 라만 레이저 광원에 사용되는 파 장을 흡수하는 광학적 성질 즉, 표면플라즈몬공명(surface plasmon resonances; SPR)을 나타낸다(S. Zeng *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43: 3426-3452). 특히, 금, 은 및 구리 나노입자는 다른 금속 기재에 비해 10^3 배 더 높은 SERS 증강을 달성할 수 있다(B. Ren *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388: 29-45). 은 나노입자 (AgNPs)는 금 나노입자(AuNPs)에 비해 우수한 SERS 증강 효과를 나타낸다. 그러나, AgNPs는 대기 중에서 산화하 여 빠르게 SERS 활성이 감소하는 반면, AuNPs는 산화물층을 형성하여 안정한 SERS 활성을 나타낸다.

[0003] 한편, 경제성(저비용), 휴대성, 가요성, 취급의 용이성 및 무해성을 갖는 종이 기재가 생물의학 및 환경 분야에 서 분석용 검출을 위한 신규한 플랫폼으로 주목받고 있다(A.W. Martinez *et al.*, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2007, 46: 1318-1320). 이러한 사용자-친화적 장점은 종이를 이용한 비색법, 전기화학적 및 생화학적 분석을 포 함한 다양한 응용을 가능하게 한다(C. Renault *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136: 4616-4623). 종이 기재 의 이러한 장점은 현장진단(point-of-care; POC)에 적용하기에 매우 적합하나, 효소, 산화환원 염료의 사용 및 복합적 가용성 화합물의 취급에 의한 분석 물질의 제한적인 검출한계를 극복해야 하는 문제가 있다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 낮은 비용과 간단한 공정으로 종이 기재 상에 금속 나노입자가 도입된 SERS 활성 플랫폼을 제조하는 방법을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 금속 나노입자를 포함하는 용액에 소정량의 카르복시 메틸 셀룰로오스를 첨가하여 점도를 조절하여 상기 용액을 원하는 패턴이 형성된 종이 기재 상에 코팅하였고, 이로써 패턴의 가장자리에 입자가 집중되는 커피링 현상 없이 SERS-활성 부분에 일정한 간격으로 고르게 분포되 어 전체 활성 부분에서 신호 증강효과를 나타낼 수 있으므로 휴대가 용이하여 현장진단에 적합하고 재현성 있는 결과를 제공하는 종이 기반의 SERS 기재를 제공할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 금속 나노입자와 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 혼합하여 금속 나노입자 용액을 준 비하는 제1단계; 원하는 패턴이 형성된 종이기재를 준비하는 제2단계; 및 상기 종이기재 상에 제1단계의 금속 나노입자 용액을 코팅하는 제3단계를 포함하는 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법으로 제조된, 고안된 패턴에 고르게 분포된 금속 나노입자 및 카르복실메틸셀 룰로오스를 포함하는, 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 포함하는 현장진단용 키트를 제공하는 것이 다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위한, 본 발명의 제1양태는 금속 나노입자와 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 혼합하여 금속 나노입자 용액을 준비하는 제1단계; 원하는 패턴이 형성된 종이기재를 준비하는 제2단계; 및 상기 종이기 재 상에 제1단계의 금속 나노입자 용액을 코팅하는 제3단계를 포함하는 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제 조방법을 제공하는 것이다.

- [0009] 본 발명에서 기재로 사용되는 종이는 낮은 비용으로도 손쉽게 확보 가능한 기재로서, 섬유질로 구성되어 미시적으로 관찰하면 불규칙하게 배열된 섬유질의 거친 질감을 가짐을 알 수 있다. 일반적으로 표면증강라만산란은 거친 표면에서 라만 산란 신호가 증강되는 효과를 나타내는 것이나, 종이의 섬유질에 의해 형성된 거친 표면은 불규칙한 형태로 이는 오히려 금속 나노입자의 불균일한 분포를 유발할 수 있다. 예컨대, 함몰부에 높은 밀도로 집적되고 돌출부에는 성기게 존재하게 될 수 있다.
- [0010] 본 발명은 종이를 기반으로 하는 표면증강라만산란 기재를 제조함에 있어서, 전술한 종이 기재의 이로운 점은 취하되 불균일한 거친 표면으로 인한 단점을 극복하기 위하여 고안된 방법이다. 구체적으로, 본 발명의 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 제조방법은 카르복실메틸셀룰로오스를 첨가하여 점성을 부여한 금속 나노입자 용액을 코팅하여 수행하는 것이 특징으로, 이로부터 금속 나노입자는 친수성을 갖는 종이의 상호작용을 통해 기재 상에 부착된다. 이때 첨가된 카르복실메틸셀룰로오스는 불규칙하게 배열된 섬유소에 의해 형성된 종이의 거친 표면의 빈 공간을 채워 균일한 표면을 갖도록 하는 동시에 이와 같이 균일해진 표면에 금속 나노입자가 고르게 분포되도록 하는 효과를 갖는다.
- [0011] 구체적으로, 상기 금속 나노입자 용액의 점도는 500 내지 10,000 cP일 수 있다. 보다 구체적으로는, 700 내지 9,000 cP, 보다 더 구체적으로는 900 내지 8,500 cP일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 용액의 점도가 500 cP 미만인 경우, 점도가 낮아 종이 기재 상에 코팅할 때 금속 나노입자의 불균일한 분포를 유발할 수 있다. 특히, 패턴이 형성된 경계선에 입자들이 주로 분포하는 커퍼링 현상이 나타날 수 있다. 반면, 점도가 10,000 cP를 초과하는 용액은 취급이 어렵고 용기나 기재의 불필요한 부분에 다량 잔류하여 낭비될 수 있다.
- [0012] 구체적으로, 상기 금속 나노입자로는 평균직경 10 내지 100 nm, 보다 구체적으로는 10 내지 50 nm의 균일한 크기를 갖는 것을 사용할 수 있다. 상기 금속 나노입자는 크기별로 제조되어 상용화된 것을 구매하여 사용할 수 있다. 또는 당업계에 공지된 금속 나노입자의 제조방법을 이용하여 제조한 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 금 나노입자의 경우 전구체인 HAuCl_4 로부터 화학적 환원을 통한 터케비치법을 기초로 한 구연산 캡핑에 의해 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0013] 구체적으로, 상기 카르복실메틸셀룰로오스 수용액은 0.7 내지 2.5 중량% 농도의 것을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는 1 내지 2 중량% 농도의 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 카르복실메틸셀룰로오스 수용액의 농도가 0.7 중량% 미만인 경우, 금속 나노입자와 혼합하여 금속 나노입자 용액을 제조하였을 때 충분한 점도를 부여하지 못하여, 종이 기재 상에 코팅할 때 금속 나노입자의 불균일한 분포를 유발할 수 있다. 전술한 바와 마찬가지로 점도가 낮을 때 나타나는 현상인 커퍼링 현상으로 인해 패턴이 형성된 경계선에 입자들이 주로 분포하게 되어 입자들의 불균일한 분포로 인해 이를 이용하여 분석을 수행하는 경우 재현성 있는 결과를 제공하기 어려울 수 있다. 반면, 농도가 2.5 중량%를 초과하는 용액은 취급이 어렵고 용기나 기재의 불필요한 부분에 금속 나노입자를 포함하는 용액이 다량 잔류하여 낭비될 수 있다.
- [0014] 구체적으로, 상기 금속 나노입자 용액은 금속 나노입자와 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 1:5 내지 1:10의 부피비로 혼합하여 제조할 수 있다. 보다 구체적으로는 1:5 내지 1:8의 부피비로, 보다 더 구체적으로는 1:6 내지 1:8의 부피비로 혼합하여 제조할 수 있다. 이때, 금속 나노입자는 원심분리하여 농축한 후 대부분의 상층액을 제거한 농축된 상태로 사용할 수 있다. 예컨대, 상기 원심분리는 5000 내지 8000 rpm에서 5 내지 15분 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는 농축되지 않은 금속 나노입자 분산액을 사용할 경우 상기 부피비를 고려하여 카르복실메틸셀룰로오스 수용액의 농도 및/또는 혼합 부피비를 조절하여 사용할 수 있다.
- [0015] 한편, 제2단계는 종이 기재를 준비하는 단계로서, 원하는 패턴이 고안된 종이 기재의 상기 패턴을 제외한 부분을 왁스로 코팅함으로써 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 표면증강라만산란 기재를 이용하여 시료를 분석하는 경우 분광학적 검출방법의 특성상 단일 회차에 분석되는 유효면적은 광원이 집중되는

직경 수 mm 이내의 면적으로 제한된다. 따라서 필요 이상으로 넓게 라만활성 부분을 형성하는 경우 시료가 넓게 퍼지므로 동일한 양의 시료를 사용하는 경우 단위 면적당 존재하는 분석물질의 양이 감소되어 미량으로 존재하는 분석물질의 검출이 어려울 수 있다. 따라서, 이와 같은 시료의 낭비를 방지하고 검출의 효율성을 향상시키기 위해서는 제한된 영역으로 라만 활성 부분을 형성하는 것이 바람직할 수 있다. 이에 따라, 고안된 라만 활성 부분 이외의 영역에 금속 나노입자가 코팅되는 것을 차단하기 위해서는 해당 영역에 소수성 물질을 침투시켜 또는 코팅하여 금속 나노입자와의 상호작용을 차단하는 방법을 사용할 수 있다. 상기 소수성 물질의 예로 사용가능한 것이 왁스이다. 본 발명의 기재가 종이를 기반으로 함을 고려할 때, 종이 기재 상에 라만 활성 부분을 표시한 후 이외의 부분에 왁스를 칠함으로써 상기 제2단계를 수행할 수 있다. 종이는 왁스를 흡수할 수 있으므로 어느 한쪽면에만 칠하더라도 양면이 모두 차단되는 효과를 나타낼 수 있다. 상기 왁스를 칠하여 패턴을 형성하는 것은 하나의 구현예일 뿐, 본 발명의 범주가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 또한, 금속 나노입자 용액을 코팅하는 제3단계 이후 가열하여 건조하는 제4단계를 추가로 포함하여 수행할 수 있다. 상기 코팅 및/또는 건조는 당업계에 공지된 방법을 제한없이 이용하여 수행할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 코팅은 코팅하고자 하는 영역에 용액 방울을 가하고 블레이드로 균일하게 도포하는 방식으로 수행할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 가열하여 건조하는 단계는 핫플레이트를 이용하여 40 내지 60℃로 100 내지 200초 동안 유지하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 상기 건조는 5분 이내, 보다 구체적으로는 3분 이내, 보다 더 구체적으로는 2분 이내의 빠른 시간 내에 완료함으로써 용액 중의 금속 나노입자가 가장자리로 퍼지는 것을 차단하여 원하는 영역 내에 고르게 분포되도록 유도할 수 있다.

[0017] 예컨대, 상기 금속 나노입자 용액을 코팅하고 건조하는 제3단계 및 제4단계는 단회 수행하거나 2회 내지 5회까지 반복하여 수행할 수 있다. 일반적으로 일정한 간격으로 이격되어 균일하게 분포된 금속 나노입자들은 표면증강라만산란을 유도할 수 있다. 또한, 상기 표면증강라만산란 정도는 금속 나노입자의 간격을 조절함으로써 극대화할 수 있다. 구체적으로 본 발명에 따른 표면증강라만산란 기재의 제조방법에서는 소정의 농도의 금속 나노입자 용액을 코팅하는 과정을 반복하여 수행함으로써 주어진 면적 내에 존재하는 입자수를 일정하게 증가시키면서 금속 나노입자 간의 간격을 감소시킬 수 있다.

[0018] 구체적으로 상기 금속 나노입자 용액을 코팅하는 단계는 총 1회 내지 5회 반복하여 수행하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 2회 내지 3회 반복하여 수행할 수 있다. 예컨대, 5회 이상 반복하여 수행하는 경우 금속 나노입자 간의 간격이 필요 이상으로 좁아져서 오히려 신호를 감소시키거나 서로 간섭하여 파장을 이동시키는 효과를 나타낼 수 있다. 그러나, 상기 반복 횟수는 금속 나노입자의 농도 즉, 금속 나노입자 용액에서 금속 나노입자와 카르복실메틸셀룰로오스 수용액의 혼합 비율에 따라 조절될 수 있다.

[0019] 본 발명의 제2양태는 상기 본 발명의 제1양태에 따른 방법으로 제조된, 고안된 패턴에 고르게 분포된 금속 나노입자 및 카르복실메틸셀룰로오스를 포함하는, 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 제공한다.

[0020] 전술한 바와 같이, 카르복실메틸셀룰로오스는 종이 기재 자체에 존재하는 섬유질에 의해 형성된 불규칙한 거친 표면을 채워 상대적으로 균일한 표면을 갖도록 하여 라만 활성 부분 전체 면적에서 균일한 표면증강라만산란 효과를 나타내도록 할 수 있다.

[0021] 본 발명의 제3양태는 상기 본 발명의 제2양태에 따른 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 포함하는 현장진단용 키트를 제공한다.

[0022] 상기 현장진단용 키트는 각종 질병의 진단 또는 검사를 비롯하여, 의학, 농업, 축산업, 식품, 군사, 환경 등 다양한 분야에서 표적 분석물질의 정성 및/또는 정량 분석에 사용될 수 있다. 예컨대, 포유류, 구체적으로 인간으로부터 분리된 전혈, 혈구, 혈청, 혈장, 골수액, 땀, 오줌, 눈물, 침, 피부, 점막, 모발 등의 생체시료로부터 표적 분석물질을 검출하기 위하여 사용할 수 있다. 또는 환경 오염 물질, 특히 폐수 및 하수 중의 화합 물질 검출에 사용할 수 있으나, 그 적용에는 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0023] 상기 본 발명의 현장진단용 키트는 라만 분광법에 의해 시료 중의 표적 분석물질을 정성 및/또는 정량적으로 검출 가능한 것이 특징이다.
- [0024] 구체적으로, 본 발명에 따른 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 포함하는 현장진단용 키트는 추가적인 라만 활성 물질이 존재할 때 시너지적인 신호 증강 효과를 나타낼 수 있다. 이때, 라만 스펙트럼은 변하지 않으며 즉, 동일한 피크 위치에서 증가된 세기의 스펙트럼을 제공할 수 있다. 상기 라만 활성 물질은 당업계에 공지된 라만 활성 물질을 제한없이 포함한다. 구체적으로, 로다민 B, 로다민 6G, 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol; 2-NAT)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 상기 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 표면증강산란 기재 상에 라만활성 분자 예컨대, 로다민 B를 도포한 경우 1/1000의 농도로 사용하여도 순수한 종이 기재에 도포한 경우에 비해 현저히 증가된 라만 신호를 나타내었다. 본 발명의 실험예 5에서는 로다민 B의 1356 cm^{-1} 밴드의 세기는 순수한 종이에 1 M 농도로 처리한 경우 328인 반면, 본 발명에 따른 종이 기반 표면증강라만산란 기재에 1 mM 농도로 처리한 경우 5858로 1/1000 농도로 사용하였음에도 약 18배 증가된 세기의 라만 신호를 나타냄을 확인하였다.
- [0026] 이와 같이, 본 발명에 따른 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 포함하는 현장진단용 키트는 라만 세기를 현저하게 증가시키는 효과를 나타낼 수 있으므로, 라만 분광법과 결합시켜 미량 시료 분석에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0027] 상기 현장진단용 키트로 분석 가능한 시료는 눈물, 혈액 부속물, 땀 소변 등의 생체시료 또는 각종 화학 물질, 환경 오염 물질 등일 수 있다. 표적 분석물질이 라만 활성 분자를 포함하는 경우 별도의 표지물질 없이 직접 분석할 수 있으며, 이외의 경우 시료 중의 표적 분석물질에 라만 활성 물질을 표지하여 분석할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 제4양태는 평균직경 20 내지 40 nm의 균일한 크기를 갖는 금속 나노입자와 1 내지 2 중량% 농도의 카르복실메틸셀룰로오스 수용액을 1:6 내지 1:8의 부피비로 혼합하여 금속 나노입자 용액을 준비하는 제1단계; 원하는 패턴을 제외한 부분을 왁스로 코팅하여 형성된 원하는 패턴을 갖는 종이기재를 준비하는 제2단계; 및 상기 종이기재 상에 제1단계의 금속 나노입자 용액을 코팅하고 건조시키는 제3단계를 포함하는 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법으로서, 상기 제3단계를 2 내지 3회 반복하여 수행하는 것이 특징인 종이 기반 표면증강라만산란 기재의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 예컨대, 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 평균직경 약 32 nm의 금 나노입자를 제조하여 농축시키고 이의 7배 부피의 1 중량% 또는 2 중량% 농도의 카르복실메틸셀룰로오스 수용액과 혼합하여 준비한 금 나노입자 용액을 표면증강라만산란 활성을 나타내지 않을 부분에 왁스를 흡수시켜 준비한 종이 기재에 스텐실 기법으로 코팅하고 건조시켜 종이 기반 표면증강라만산란 기재를 제조하였다. 이때, 상기 금 나노입자 용액을 코팅하고 건조시키는 과정을 1회 또는 2회 더 수행하여 총 2회 또는 3회 코팅을 반복하였을 때, 라만 세기는 현저히 증가되고 편차는 감소된 라만신호를 나타냄을 확인하였다(표 1).

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따라 소수성 물질 예컨대, 왁스를 SERS 활성 패턴을 형성하고자 하는 부분 이외에 침투시키고, 균일한 크기의 금속 나노입자를 분산시킨 용액에 카르복시메틸셀룰로오스를 더 포함하여 소정의 점도를 갖도록 하여 코팅하는 표면증강라만산란 기재의 제조방법은 낮은 비용으로 간단한 공정을 통해 용이하게 수행될 수 있다. 이에 따라 제조된 표면증강라만산란 기재는 패턴의 경계면에 입자가 집중되는 커피링 현상을 최소화하여 고안된 영역 전체에 고르게 분포되어 균일한 SERS 활성을 나타낼 뿐만 아니라 재현성 있는 결과를 제공할 수 있으며, 특히, 추가적인 라만 활성 물질이 존재할 때 시너지적인 신호 증강 효과를 나타낼 수 있을 뿐만 아니라, 종이를 기반으로 하므로 가볍고 취급이 용이하며 휴대가 간편하므로 감도가 향상된 현장진단용 검출키트로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 본 발명에 따른 SERS 플랫폼을 개략적으로 나타낸 도이다. (A)는 SERS 플랫폼의 디자인으로써, 회색(소

수성)은 왁스 침투로 인해 감소된 규모를 나타낸다. (B)는 종이 기재 상에 형성된 SERS-활성 부분의 단면도를 나타낸다. (C)는 CMC-AuNPs 잉크를 프린트하기 전과 후의 종이 기재의 사진이다. 스케일 바=5 mm.

도 2는 AuNPs 및 CMC 용액의 특성 분석 결과를 나타낸 도이다. (A)는 합성된 AuNPs의 TEM 이미지(스케일 바=50 nm)를, (B)는 AuNPs의 크기 분포를, (C)는 콜로이드성 AuNPs의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을, (D)는 4가지 다른 농도에서의 CMC 용액의 점도를 나타낸다.

도 3은 3가지 상이한 농도의 CMC 용액을 이용하여 제조한 종이 기재 상에서의 AuNPs의 분포를 나타낸 도이다. 스케일 바=500 μm .

도 4는 본 발명에 따른 종이 기재 상에서 AuNPs의 분포를 나타낸 도이다. (A)는 종이 기재 상에 로딩된 CMC-AuNPs 잉크의 SEM 이미지를 나타낸다. 스케일 바=50 μm . (B)는 종이 기재 상에서 AuNPs(노란색 화살표)의 분포를 나타낸 도이다. 스케일 바=500 nm.

도 5는 (A) 순수한 종지와 (B) 왁스를 침투시킨 종지의 표면 형태를 나타낸 도이다. 스케일 바=50 μm .

도 6은 CMC-AuNPs-프린트된 종이 기재의 EDX 분광분석 및 맵핑 파인딩 결과를 나타낸 도이다. 스케일 바=500 nm.

도 7은 5:1 비율의 CMC:AuNPs 잉크로 3회 프린팅시 CMC 농도(각각 1 wt% 및 2 wt%)에 따른 1356 cm^{-1} 밴드에서의 라만세기를 나타낸 도이다.

도 8은 CMC-AuNPs 잉크의 최적화 결과를 나타낸 도이다. (A)는 CMC 용액 및 AuNPs를 각각 5:1, 7:1 및 10:1의 3가지 부피비로 혼합한 CMC-AuNPs 잉크 용액의 프린팅 횟수에 따른 라만 세기를 나타내며, (B)는 2-wt% 7:1 CMC-AuNPs 잉크 용액의 높은 재현성을 나타낸 도이다. RSD=상대 표준 편차.

도 9는 SERS-활성(CMC-AuNPs 잉크가 코팅된) 종이 및 순수한(bare) 종이 상에서 1 mM 및 1 M 농도의 RhB의 라만 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 10은 정상인 및 바이러스 감염성 결막염 환자로부터 채취한 눈물시료를 본 발명의 종이 기재에 가하여 측정 한 라만 스펙트럼을 나타낸 도이다. (A) 및 (B)는 각각 아데노바이러스 및 헤르페스심플렉스 결막염 환자의 눈물 시료에 대한 라만 스펙트럼이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0033] <시약 및 물질>

[0034] 사염화금(III)산 수소(Hydrogen tetrachloroaurate, HAuCl_4 , >99%), 구연산 삼나트륨 무수물(trisodium citrate dehydrate, 99%), 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨(sodium carboxymethylcellulose; CMC), 및 로다민 B(Rhodamine B, RhB, >95%)를 시그마-알드리치사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 모든 시약은 분석용 등급을 사용하였으며, 모든 용액은 $18.3\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 증류수를 사용하여 제조하였다. 두께 0.18 mm 및 선형 유속 $72.22\text{ }\mu\text{m/sec}$ 의 와트만® 셀룰로오스 크로마토그래피용지(Grade 1)는 시그마-알드리치사로부터 구입하였다.

[0035] <기기>

[0036] 금 나노입자(AuNPs)의 크기 및 형태를 200 kV 가속전압에서 구동되는 JEM-2100F 전계방사형 투과전자현미경(field emission transmission electron microscopy; FE-TEM, JEOL, Tokyo, Japan)으로 확인하였다. 콜로이드성 AuNPs의 UV-Vis 흡수 스펙트럼은 1 cm 퀴즈 셀을 이용하여 CARY 300 UV-Vis 분광광도계(Agilent, Santa Clara, CA, USA)로 측정하였다. CMC 용액의 점도는 DV-II+Pro 점도계(Brookfield, Middleboro, MA, USA)로 실온에서 측정하였다.

[0037] 5 kV 가속전압에서 S-4700 전계방사형 투과전자현미경(FE-SEM; Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하여 본 발명에

따른 CMC-AuNPs를 코팅한 종이기재의 형태적 특성을 확인하였다. 7200-H 에너지 분산형(energy-dispersive) X-선 분광계(EDX; HORIBA, Northampton, England)를 사용하여 합성된 생성물의 원소 조성을 확인하였다.

[0038] SENTERRA 공초점 라만 시스템(Bruker Optics, Billerica, MA, USA)을 이용하여 라만 스펙트럼을 획득하였다. 10 mW 전력을 갖는 785 nm 다이오드 레이저 광원을 $20\times$ 대물렌즈(N.A.=0.4)로 약 2.4 μm 스팟 크기로 초점화하였다. 각 포인트에서의 스펙트럼을 $417\text{--}1782\text{ cm}^{-1}$ 범위에서 5 cm^{-1} 분광해상도로 기록하였다. 상기 스펙트럼의 기록은 실온에서 30초 수집시간으로 2회 수행하였다. 각 시료의 라만 스펙트럼을 SERS-활성 영역 상의 10개의 임의의 프린트된 스팟에서 측정하여 신뢰도(reliability)를 확인하였다. 2 μL 분석용 용액방울(analytic droplet)을 사용하여 라만 스펙트럼을 평가하였다.

[0039] 실시예 1: CMC-AuNPs 잉크의 제조

[0040] 화학적 환원을 통한 터케비치법(Turkevich method)을 기초로 한 구연산 캡핑에 의해 AuNPs를 획득하였다. 1 mL의 38.8 mM 구연산 삼나트륨 무수물을 10 mL의 1 mM HAuCl₄에 첨가하고 자석교반하면서 핫플레이트 상에서 90℃에서 20분 동안 가열하였다. 용액의 색상은 옅은 노란색으로부터 짙은 보라색으로 변화하였다. 이후 반응 플라스크를 핫플레이트로부터 즉시 제거하였다. 용액이 실온으로 냉각될 때까지 교반은 유지하였다.

[0041] 스크린 프린팅 잉크를 제조하기 위하여, 1 mL 콜로이드성 AuNP를 6000 rpm에서 10분 동안 농축하고, 상층액의 99%를 제거하였다. 농축된 AuNPs는 나트륨 CMC와 함께 증류수에 분산시켰다. CMC의 농도 및 AuNPs의 비율을 조절하여 최적의 스텐실 잉크를 구현하였다.

[0042] 실시예 2: SERS 플랫폼의 제조

[0043] SERS-활성 부분 및 라벨링 부분과 같은 2개 부분을 포함하도록 SERS 종이 플랫폼을 구성하였다. 제록스 ColorQube 8570N 프린터(Fuji Xerox, Tokyo, Japan)를 이용하여 $8\times 20\text{ mm}^2$ 크기의 종이에 프린트한 오토캐드(Autodesk, San Rafael, CA, USA)에 의해 디자인된 2 mm 친수성 원형 부분과 라벨링 부분을 도 1A에 나타내었다. 건조오븐에서 130℃에서 45초 동안 종이의 SERS-활성 부분 및 라벨링 부분을 제외한 영역에 왁스를 균일하게 침투시키고, 실온에서 건조하였다.

[0044] 3 mm 직경 및 180 μm 두께의 스텐실의 구멍(cut-out hole)을 조정하였다. 친수성 SERS-활성 부분은 2 mm 직경을 가지므로, 고른 SERS 신호를 얻기 위하여 스텐실 구멍의 크기는 이보다 더 넓게 되도록 고안하였다. 이는 잉크와 소수성 왁스 부분인 마스크벽의 측면에서 작용하는 외부로 유도되는 표면장력으로 인한 커피링 효과에 기인하였다(도 1B). 4 μL CMC-AuNPs 잉크를 스텐실 구멍에 적가하고 블레이드를 스텐실을 가로질러 이동시켰다. 핫플레이트 상에서 50℃로 120초 동안 건조시켰다(단회). 왁스를 침투시킨 종이 상에 CMC-AuNPs 잉크를 프린트하여 SERS-기능화된 기재를 사진으로 찍어 도 1C에 나타내었다.

[0045] 실험예 1: AuNPs의 특성분석

[0046] 구연산 캡핑된 AuNPs의 특성을 TEM 이미지와 UV-Vis 스펙트럼으로 분석하였다(도 2). FE-TEM 이미지로부터, AuNPs는 평균 직경 $25\pm 8\text{ nm}$ 의 안정한 단분산성(monodispersity)을 나타내었다. AuNP 콜로이드의 UV-Vis 스펙트럼은 525 nm의 최대 흡수 파장(λ_0)을 가졌다. 일반적으로, 25 내지 100 nm 범위에서 입자의 크기는 하기 방정식에 의해 결정된다;

$$\lambda_{\text{max}} - \lambda_0 = L_1 \exp(L_2 d) \quad (1)$$

[0048] 여기서 λ_0 은 최대 흡수 파장을 나타내고, λ_{max} 는 λ_0 의 최대값을 나타내며, d는 입자 크기를 나타낸다($L_1=6.53$

및 $L_2=2.16 \times 10^{-2}$ 는 실험 플롯으로부터의 상수로 설정됨). 계산된 평균 입자 크기는, AuNPs의 피크 파장이 525 nm일 때, 31.9 nm였다(도 2C). AuNPs는 콜로이드에서 다소 응집되었으나, 계산된 입자 크기는 TEM으로 측정된 입자 크기 범위 내에 있었다. AuNPs의 크기는 SERS 향상을 결정하는 중요한 요소 중 하나이다.

[0049] 실험예 2: CMC 용액의 점도

[0050] 농축된 AuNPs 콜로이드만의 직접 프린팅은 낮은 점도로 인해 균일한 분산에 적합하지 못하므로, 수 가용성이며 농도에 따라 상이한 점도를 갖는 기존의 점성 시약인 CMC 용액에 AuNPs를 첨가하여 프린팅 잉크의 적합한 점도로 조절하였다. CMC는 물보다 훨씬 더 높은 점도를 가지므로, 종이 기재 상에 균일하게 AuNPs를 지지하는 데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대되었다. 4가지 다른 농도의 CMC 용액의 점도를 점도계로 측정하였다. CMC의 점도는 농도가 증가함에 따라 기하급수적으로 증가하였다(도 2D). 3-wt% CMC 용액은 점도가 너무 높아 잉크를 제조하는 과정에서 취급이 어려운 반면, 0.5-wt% CMC 용액은 점도가 너무 낮아 종이 기재 상에 AuNPs의 불균일한 분산을 유발하였다(도 3). 한편, 1-wt% 및 2-wt% CMC 용액은 모두 종이 기재 상에 AuNPs를 고르게 분포 및 부착시키기에 적합하였다. 또한, 종이 기재의 높은 표면 거칠기는 CMC 용액이 접착제로서 역할을 하는데 시너지적 효과를 부여하였다. 1-wt% 및 2-wt% CMC 농도를 주된 스크린 프린팅 잉크의 조건으로 선택하였다.

[0051] 실험예 3: CMC-AuNPs 잉크 프린트된 종이의 표면

[0052] 종이 기재 상에 프린트된 CMC-AuNPs의 형태를 SEM으로 관찰하고 획득한 이미지를 도 4에 나타내었다. 정렬되지 않은 셀룰로오스 섬유들의 존재가 관찰되었고(도 4A), 셀룰로오스 섬유들 사이의 다공성 구조는 순수한 또는 왁스를 침투시킨 종지와 달리(도 5) 점성을 나타내는 나트륨 CMC 용액으로 채워졌다(도 4B). AuNPs는 라만 스펙트럼을 측정할 수 있는 $2.4 \mu\text{m}$ 초점크기(focal spot size)의 범위 이내에서 셀룰로오스 섬유 상에 잘 분포되었다(도 4B). CMC-AuNPs-프린트된 종이 표면의 흐릿한 SEM 이미지는 나트륨 CMC와의 혼합에 기인하였다. 다음으로, 이들 입자들이 AuNPs인지 아닌지 여부를 결정하기 위하여, 이들 입자들의 구성에 대한 EDX-기반 분자 관찰을 수행하였다(도 6). EDX 맵핑 파인딩(mapping finding) 결과는 CMC-AuNPs-로딩된 종이가 SERS 기재로 사용될 수 있음을 나타내었다.

[0053] 실험예 4: AuNPs 및 CMC 용액의 혼합 비율에 따른 효과

[0054] AuNPs와 CMC 용액의 비율에 따른 라만 신호 세기 변화를 확인하기 위하여, $2 \mu\text{L}$ 의 1 mM RhB(라만 분광분석을 위한 탐침 분자)를 SERS-활성 부분에 적하하여 CMC-AuNPs 잉크의 조건을 탐색하였다. RhB의 우세한 라만 피크는 620 cm^{-1} (방향족 굽힘), 1201 cm^{-1} (방향족 C-H 굽힘), 및 1356 cm^{-1} (방향족 C-C 신장)에서 나타나며, 1356 cm^{-1} 에서의 현저한 라만 피크를 RhB 분석을 위한 참조 피크로 선택하였다.

[0055] 최대 라만 세기를 나타내는 최적의 CMC 농도를 1-wt% 및 2-wt% CMC 농도에서 평가하였다. CMC 용액과 AuNPs의 부피비가 5:1(CMC:AuNPs=5:1)인 잉크 용액을 상기 2가지 농도의 CMC 용액을 이용하여 제조하였다. CMC-AuNPs 잉크를 3회 반복 프린팅한 기재에서 라만 신호를 측정하고 그 세기를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 1-wt% CMC 용액에 비해 2-wt% CMC 용액과의 조합이 더 우수한 SERS 신호 및 낮은 분광 편차를 나타내었다. 이는 CMC 용액의 보다 높은 점도로 인해 외부로 이동하려는 장력을 저해하고 AuNPs를 수용하기 때문일 수 있다(도 3). 또한, 프린팅을 반복하여 수행하는 동안 50°C 에서 CMC-AuNPs의 빠른 건조 과정은 AuNPs가 가장자리로 퍼지는 것을 차단하고 SERS-활성 부분에 잘 분포하도록 유도하였다. 따라서, 2-wt% CMC-AuNP를 최적의 프린팅 잉크 조합으로 선택하였다.

[0056] 다음으로, 스크린 프린팅 잉크 용액에서 AuNPs의 부피비를 변화시키면서 라만 세기에 대한 AuNPs의 양의 효과를 확인하였다. 이를 위하여, 2-wt% CMC 용액을 하기 3가지 부피비로 AuNPs와 혼합하였다: CMC 용액:AuNPs 부피비= 각각 5:1, 7:1 및 10:1. 상기 3가지 상이한 부피비로 제조한 CMC-AuNPs 잉크 용액의 라만 세기를 프린팅 횟수에

따라 측정하여 도 8A에 나타내었다. 이들 중 7:1 CMC-AuNPs 잉크 용액이 다른 부피비로 제조한 용액에 비해 우수한 SERS 효과를 나타내었다. 최대 SERS 세기는 해당 부피비의 용액을 2회 프린팅하였을 때 관찰되었다. 기본적으로, 종이의 표면에서 NPs의 공명은 입자들 사이의 수 나노미터 공간으로의 입사 에너지에 의해 야기된다. 반사되는 에너지는 공명에 따른 산란에 의해 증폭되며, 이 에너지는 SERS에 현저한 효과를 나타낼 수 있다. 입자들 사이의 공간은 입자 수에 의해 영향을 받는다. 나노입자의 크기가 일정하고 제한된 면적에서 입자의 수가 증가할 때, 입자들 간의 거리는 감소하며 라만 산란은 증가한다. 그러나, 입자의 수가 과도하게 증가할 때, AuNPs는 개별 입자라기보다 필름의 특성을 갖는다. 이에 따라, NPs의 공명은 약해지고 라만 세기는 감소한다. 본 발명의 결과 역시 이러한 현상과 일치하였다; 2회 반복하여 프린팅한 경우 단회 프린팅한 경우에 비해 2배의 SERS 세기 증가를 유도하였다. 그러나, 종이 기재 상에서 추가적인 반복 프린팅은 SERS 세기의 감소 및 라만 피크의 보다 큰 편차를 유발하였다. SERS 스펙트럼의 신뢰도를 검증하기 위하여, 최적화된 조건인 7:1 CMC-AuNPs 잉크 용액으로 2회 반복 프린팅하여 제조한 종이 기재의 SERS-활성 부분 내의 10개 다른 위치에서 임의로 SERS 스펙트럼을 측정하였다. 1356 cm⁻¹에서 SERS 피크의 지점-대-지점의 평균 세기 및 편차는 5858±279였으며(표 1), 상응하는 상대 표준 편차(RSD)는 4.77%였다. SERS 신호의 세기는 SERS 효과, 레이저 광원 초점화, 생물시료 및 서너가지 다른 변수에 의해 조절되었다. 라만 세기는 검출 사이트 간에 변화하였음에도 불구하고 5% 미만의 전체적인 변이(variance)는 SERS 기법의 높은 재현성을 나타내는 것이다. 따라서, SERS 분광 신호의 잡음-의존성, 균일성 및 재현성은 본 발명에서 제안하는 평가법이 생물학적 유체에 대한 높은 민감성과 선택성을 갖는 평가방법일 수 있음을 뒷받침한다.

표 1

2 wt% CMC:AuNPs 잉크		라만 세기		
부피비	프린팅 횟수	평균	SD	RSD @1356 cm ⁻¹ (%)
CMC:AuNPs (5:1)	1	3416.7	540.4	15.82
	2	3456.4	366.4	10.60
	3	3655.8	505.5	13.83
	4	3409.3	590.8	17.33
	5	3233.0	529.3	16.37
CMC:AuNPs (7:1)	1	3331.7	310.3	9.31
	2	5858.4	279.4	4.77
	3	5442.7	313.4	5.76
	4	4492.1	421.0	9.37
	5	3619.2	587.9	16.24
CMC:AuNPs (10:1)	1	2501.3	434.3	17.36
	2	2310.5	241.2	10.44
	3	2840.4	395.6	13.93
	4	2804.8	583.9	20.82
	5	2553.8	718.6	28.14

*SD; 표준 편차(standard deviation), RSD; 상대 표준 편차(relative standard deviation)

실험예 5: CMC-AuNPs 잉크 프린트된 종이의 SERS 활성의 정량적 비교

스크린 프린팅 잉크의 SERS 활성을 정량하기 위하여, 1 mM 및 1 M RhB를 이용하여 CMC-AuNPs 잉크가 프린트된 SERS 종지와 처리되지 않은 순수한 종지의 라만 스펙트럼을 측정하고 그 결과를 도 9에 나타내었다. SERS 종지에서 1 mM RhB의 1356 cm⁻¹ 밴드에서의 라만 세기(5,858)는 순수한 종지에서 1 M RhB에 대한 측정값(328)의 약 18배였다. 따라서, 증강인자(enhancement factor; EF)는 2개 상이한 기재 간의 라만 세기 차이로부터 하기 방정식에 의해 계산되었다;

$$EF = \left(\frac{I_{SERS}}{I_{bare}} \right) \left(\frac{N_{bare}}{N_{SERS}} \right) \quad (2)$$

[0061] 상기 식에서 I_{SERS} 및 I_{bare} 는 각각 SERS 종지와 순수한 종지에서 측정된 분자의 라만 세기를 나타내며, N_{SERS} 및 N_{bare} 는 각각 SERS 및 비-SERS 부분에 대한 산란 부피 내에 흡착된 분자의 평균 갯수를 나타낸다. 기재 상에 탐침 분자가 고르게 분포함을 가정할 때, 흡착된 분자의 갯수는 다음과 같이 계산될 수 있다.

$$N = (N_A \cdot c \cdot \frac{V_{droplet}}{A_{spot}}) A_{laser} \quad (3)$$

[0062] 상기 식에서, N_A 는 아보가드로 상수를, c 는 탐침 분자의 농도를, V 는 분자 방울의 부피를, A_{spot} 은 기재의 크기를, 그리고 A_{laser} 는 레이저 스팟의 크기를 나타낸다. 라만 측정을 평가하기 위하여 동일한 방법을 2개 기재에 적용하였으므로, RhB의 N_A , V , A_{spot} , 및 A_{laser} 관련 변수들은 서로 동일하였다. 따라서, 상기 식 (2)는 다음과 같이 작성될 수 있다:

$$EF = (\frac{I_{SERS}}{I_{bare}}) (\frac{c_{bare}}{c_{SERS}}) \quad (4)$$

[0065] 상기 식에서, c_{SERS} 및 c_{bare} 는 각각 SERS 종지와 순수한 종지 상의 RhB 농도를 나타낸다. 1356 cm^{-1} 밴드에서 최종 EF는 1.8×10^4 였다. 상기 EF 값은 CMC-AuNPs 잉크 프린트된 종지 상에 SERS 활성이 존재함을 나타내는 것이다.

[0066] 실험예 6: 생체 물질 분석에의 적용

[0067] 상기 본 발명의 SERS 기재에 눈물시료를 가하고 라만 스펙트럼을 측정하여 바이러스 감염여부를 분석하였다. 획득한 라만 스펙트럼의 분석은 본 발명자들의 선행논문에 개시된 방법으로 수행하였다(*Anal. Chem.*, 2014, 86(22): 11093-11099). 구체적으로, 측정한 라만 스펙트럼을 1003 cm^{-1} 에서의 피크에 대해 정상화한 결과, 정상인으로부터 채취한 눈물과 바이러스 감염자로부터 채취한 눈물에서 라만 피크의 이동은 관찰되지 않았으나, 1242 및 1342 cm^{-1} 에서의 라만 피크의 비율이 변화하는 것으로 나타났다. 따라서, 하기 방정식으로 도출되는 값을 비교하여 눈물시료로부터 바이러스 감염여부를 확인할 수 있었다:

$$\delta_{VIRUS} = \frac{I_{1342}}{I_{1242}}$$

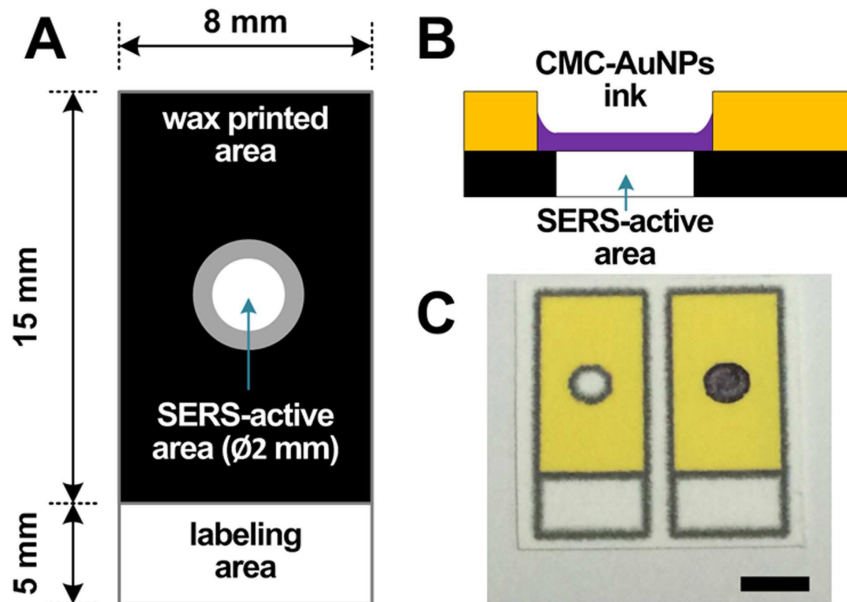
[0069] 상기 I_{1242} 와 I_{1342} 는 각각 아미드 III -시트 및 C-H 변형에 상응하는 피크의 라만 세기에 해당한다.

[0070] 정상인 및 아데노바이러스 또는 헤르페스심플렉스 감염에 의한 결막염 환자의 눈물시료를 채취하여 본 발명의 SERS 기재에 도포하여 라만 스펙트럼을 측정하고(도 10), 상기 수식을 이용하여 δ_{VIRUS} 값을 도출하였다. 그 결과, 정상인의 눈물로부터 측정한 라만 스펙트럼에서 도출한 δ_{VIRUS} 는 0.80인 반면, 아데노바이러스 결막염 환자의 눈물로부터 측정한 라만 스펙트럼에서 도출한 δ_{VIRUS} 는 1.87, 헤르페스심플렉스 결막염 환자의 눈물로부터 측정한 라만 스펙트럼에서 도출한 δ_{VIRUS} 는 2.47로 크게 증가하였다. 상기 실험을 복수의 환자에 반복수행하여 재현성 있는 결과를 나타냄을 확인하였다. 이는 상기 δ_{VIRUS} 이 바이러스 감염에 의한 결막염을 진단하는 마커로 작용할 수 있음을 나타내는 것이다. 즉, 바이러스 감염성 결막염이 의심되는 환자의 눈물시료로부터 측정한 라만 스펙트럼으로부터 도출된 δ_{VIRUS} 값이 1을 초과하는 큰 경우 바이러스 감염에 의한 결막염 환자로 판정할 수 있고 나아가 상기 δ_{VIRUS} 값이 2를 초과하는 경우 상기 결막염은 헤르페스심플렉스 바이러스 감염에 의한 것으로

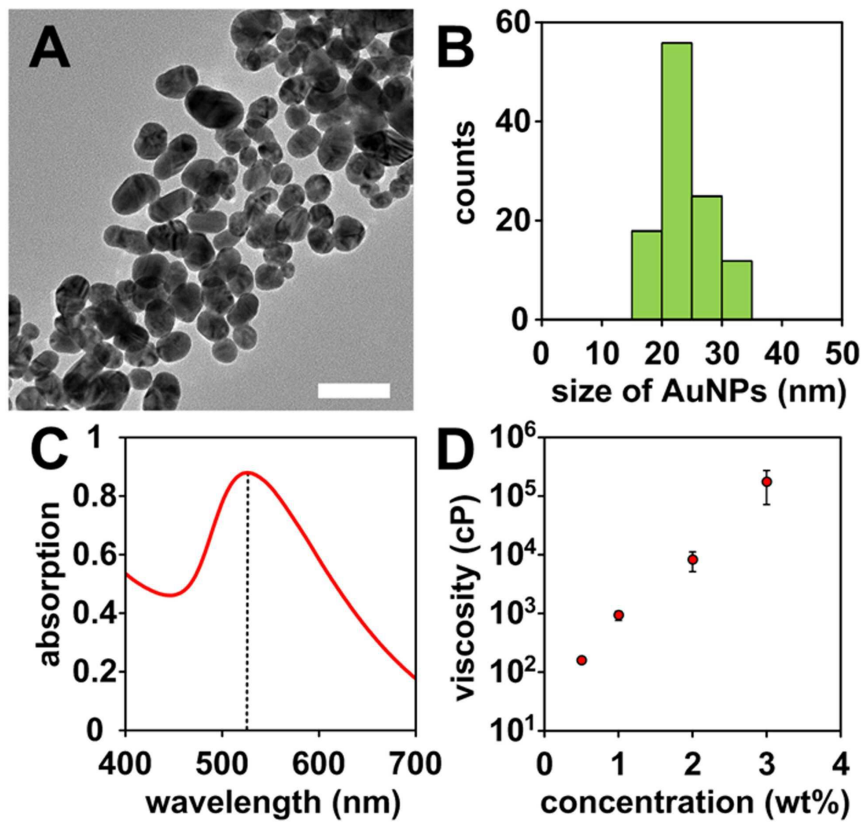
판정할 수 있다.

도면

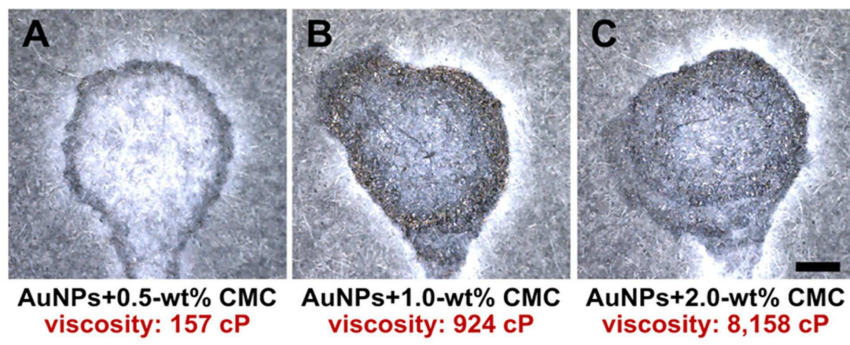
도면1



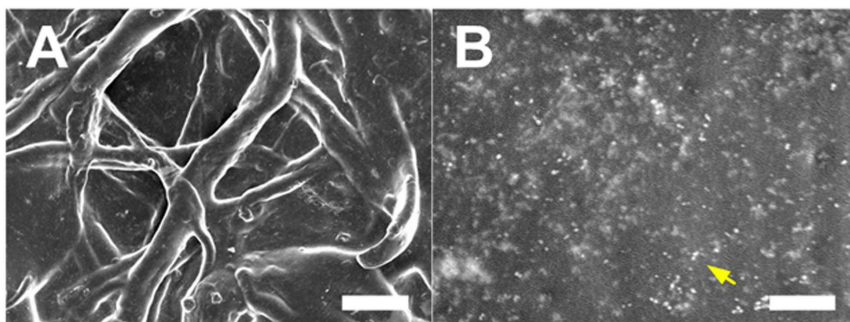
도면2



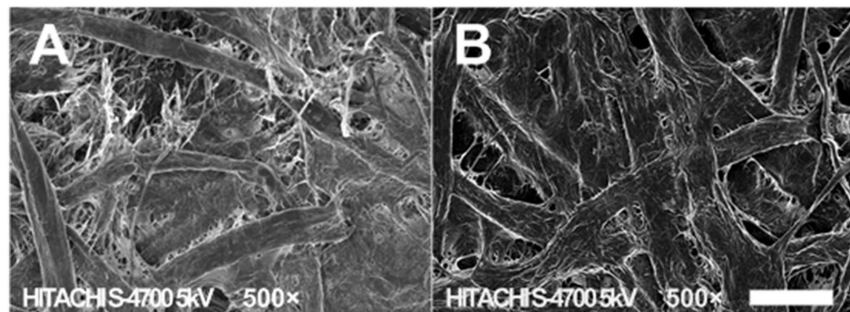
도면3



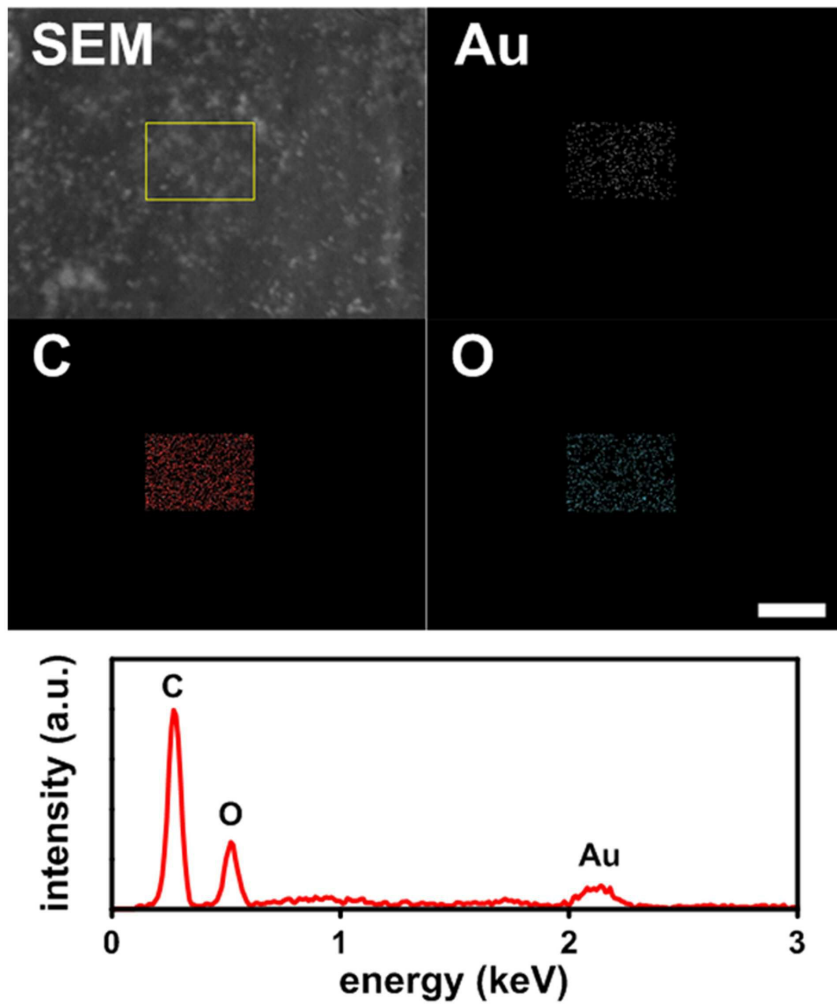
도면4



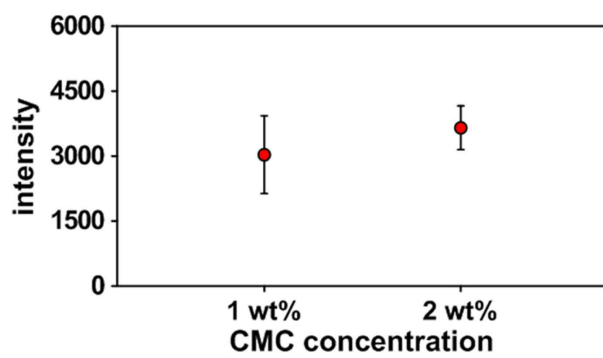
도면5



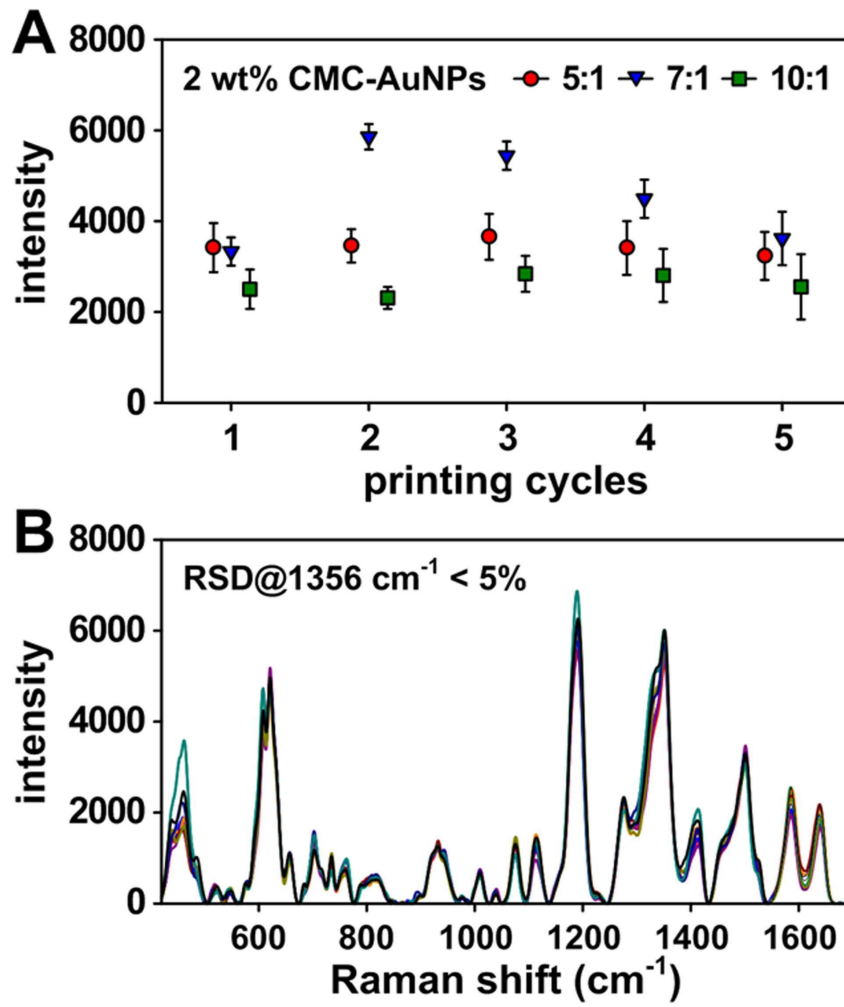
도면6



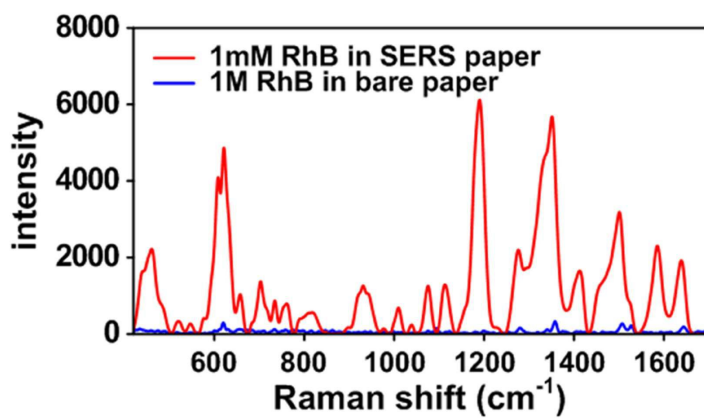
도면7



도면8



도면9



도면10

