

분광기에 고 분해능 Charge Coupled Device의 설계 및 제작에 의한 Hematoporphyrin Derivative의 분석

김 기준[†]

대전대학교 공과대학 화학공학과
(2004년 12월 22일 접수 ; 2005년 2월 22일 채택)

Analysis of Hematoporphyrin Derivative by Design and Manufacture of High Resolution Charge Coupled Device in Spectrometry

Ki-Jun Kim[†]

Dept. of Chemical Engineering, Dae-Jin University, Pochun 487-711, Korea
(Received December 22, 2004 ; Accepted February 22, 2005)

Abstract : The influence of fluorescence, scattering, and absorbance in turbid material by light scattering was interpreted by the scattered fluorescence intensity and wavelength. The effect of optical property in scattering media was investigated. It is very important to study the charge coupled device(CCD) in spectrometry because we can use the molecular energy level, molecular structure, absorption or emission, intermolecular reaction, weakly bound molecular energy, photochemistry, fluorescence and photodynamic therapy. CCD is very essential to study the molecular structure and medical engineering combined laser spectroscopy in the modern physical and chemistry. Accordingly, this study has designed and manufactured the electromagnetic spectrometry with CCD, and has analyzed the hematoporphyrin derivative.

Keywords : optical property, charge coupled device, photodynamic therapy, hematoporphyrin derivative.

1. 서 론

분자 에너지 준위, 분자구조, 흡수, 방출, 상호 분자 반응 등에 의한 분자 에너지는 광화학, 형광, 광학치료법(Photodynamic therapy ; PDT) 치료 등에 관한 연구를 수행하는데 분광계에서 전하결합장치(Charge Coupled Device ; CCD)는 매우 중요하다. CCD는 현대 물리화학 분야

에서 레이저 분광학에 의한 의공학 및 분자 구조의 연구에 필수적이고, CCD를 이용한 전자기 분광계의 설계 및 제작을 연구하였으며, 광 증감제인 Hematoporphyrin derivative(HPD)를 분석하였다. 예전에 CCD는 방송장비에만 사용한다고 생각했지만, 현대에는 산업발전에 의한 응용으로 로봇공학, 기기분석 및 관측에 대한 산업적 요구에 더욱 많이 활용되고 있다. 분광학에서 필요한 정보는 요구되는 성분물질의 물리화학적 성질을 측정함으로써 얻는다. 분석에 이

[†]주저자 (E-mail : kjkim@daejin.ac.kr)

용되는 기기는 넓은 의미에서 정량적인 값을 직접 측정하기 위한 것이 아니고, 화학적 정보를 관측하기 쉬운 형태로 바꿔주는 역할을 하는데, 이는 신호 전달장치이다. 이러한 목적을 위하여, 본 연구는 에너지 신호가 발생되면 photomultipliertube(PMT)는 광에너지를 전기신호로 바꾸는 전환장치로서 원신호 또는 변환된 신호를 증폭하고 그 신호를 다시 눈금 바늘의 이동이나 기록계의 지면에 기록시킨다[1]. 분광기의 검출기는 입사 복사선을 전류로 바꾸어서 적절한 신호나 그래프로 나타내는 장치이다. 이러한 검출기로서 전하 결합장치는 복사선 감응 반도체 장치가 점점 더 두드러지게 이용되고 있다[2-3]. 전자 결합장치는 광학적으로 생성된 전하를 2차원적인 배열로 저장할 수 있는 감도가 높은 실리콘 검출기이다. 절연성인 SiO₂ 층으로 구성된 다이오드 구조를 만들고, 그 위에 전도성인 Si 전극이 장치되어 빛이 P형 영역에 흡수되면 전자가 전도밴드에 주입되고 구멍은 원자가 밴드에 남게 된다[4]. 전하 결합장치는 관측 후 첫 줄의 각 픽셀에 저장된 전자는 위에 있는 직렬 계산대로 옮겨지고, 한 번에 한 픽셀씩 오른쪽 위 칸으로 옮겨져서 저장된 전하가 읽혀진다[5-6]. 이때 검출되는 신호의 감도가 아주 높다. 분광학에서 스펙트럼의 중요한 특징은 전자 전이의 세기이며, 전이의 세기에 준위별 전하 개체 수 분포와 전이 모멘트 특성에 따른 영향이 크다. 따라서 전하 결합장치는 크기 및 무게가 작고, 암전류가 적으며 정밀성과 정확성이 높은 영상 시스템으로 뿐만 아니라, 분광 특성이 우수하여 분자의 에너지 준위와 분자 개체 수 분포를 측정할 수 있다[7]. 본 연구에서는 전하 결합장치의 여러 가지 분광법과 산업에 활용을 제시하고자 분광기를 설계 및 제작하여 응용하였다.

1.1. 전하 결합장치를 이용한 분광기의 원리 및 응용

인간의 지적 판단 및 고도의 정신적 감정의 원천으로서 눈에 들어오는 정보, 즉 화상의 역할은 매우 크다. 인간의 감각 중에서 시각적 정보가 가장 오래 남으며, 알고 싶은 욕망이 강하여 작은 것을 보다 확실히 본다거나 장시간 보판을 위한 수단이 요구되어 왔다. 영상의 기본 구성은 촬영과 수상이다. 여기에서 촬영은 광전 변환에 의해 광학적 화상을 전기적 영상 신호로

검출하는 것으로 이것의 역할을 하는 소자가 전하 결합장치인 고체 촬영 소자이다[8]. 전하 결합장치의 발전은 1970년에 출연되어 소형, 경량, 정확성의 장점으로 발전이 가속화되어 다방면에 응용되고 있는 실정이다. 예전에는 인공위성이나 방송국에서만 국한되어 사용되었던 전하 결합장치가 TV와 같이 가정에서 일상 상용화되고 있으며, 특히 산업의 발전으로 의료기술, 화상전송, 광통신, 계측, 공업생산, 교통, 토목건축, 생명공학, 분광분석 등에 광범위하게 사용되고 있다. 전하 결합장치는 크기 및 무게가 작고, 잔상이나, 암전류 및 화상의 찌그러짐이 적으며, 진공 상태하의 충격의 영향에 강할 뿐만 아니라, 전류 소비가 적어 촬영관에 비해 소형경량화, 긴 수명, 정확성과 정밀성으로 영상 시스템을 만들 수 있어 주목을 받고 있다. 따라서 고체 촬영소자의 소형화, 고 해상도화, 고 감도화 및 다 기능화 추세에 부응하여, 본 연구에서 노이즈, 분광특성과 전송효율이 우수하여 laser induced fluorescence(LIF)의 기능 및 스펙트럼을 동시에 측정하는 분광기를 설계 제작하였다. 빛이 물질과 상호작용하면 반사, 산란, 형광 또는 인광의 재방출, 그리고 광화학적 반응, 즉 흡수와 결합 분해 등이 일어난다[9].

이상적인 광원의 조건은 매우 작은 노이즈와 전자 표류를 가지고 장시간의 안정성을 유지해야 한다. 전 파장에 걸쳐 일정한 세기의 빛을 주고자 Ar이온 레이저를 사용했으며 홀로그래픽과 그레이팅을 3개 가진 단색화 장치를 사용하며 파장에 따른 분산이 선형현상으로 온도에 따라 변화가 거의 없고, 원하는 빛만 검출기에 도달할 수 있도록 필터를 사용하였다. 검출기는 광신호를 전기적인 신호로 바꾸는 데 열 전자적으로 냉각을 -70℃까지 할 수 있는 thermoelectrically cooled CCD(TE-CCD)를 사용하여 낮은 노이즈와 높은 강도를 가지고 전 파장에 걸쳐서 일정한 반응을 광전 증배관으로 증폭 단계를 거치면서 신호 변환을 결합하였다. 본 연구에서 설계 제작한 분광 광도계의 개략도는 Fig.1과 같이 514.5nm의 Ar이온 레이저를 전자회로에 직각으로 입사되도록 조절하고, 이 때 레이저와 전자회로 사이에 1mm 직경의 빛 조리개를 설치하였다. 전자회로에 입사한 빛을 광섬유에 이용하여 모았으며, 이렇게 모여진 빛을 단색화 장치에 모아서 광전 증배관으로 증폭된 광자를 전하 결합장치를 이용하여 영상과 스펙

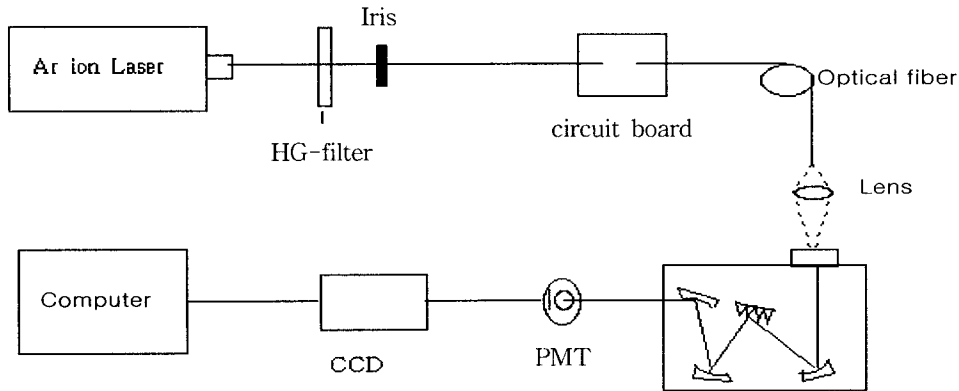


Fig. 1. Diagram of spectrometer for image.

트럼을 측정하였다. 빛살이 회절발에서 분산되어 전하 결합장치에 이르면 전자신호로 변환되고 전기신호는 증폭되어 정류기(synchronous rectifier)에 전달되어 슬릿과 전하 결합장치에 연결됨으로서 움직이며 복사선 세기를 일정하게 유지시켜 준다. 시료 장착부분을 조절함에 따라 흡광, 투광, 산란을 측정할 수 있을 뿐만 아니라, LIF까지도 가능하며 photodynamic therapy (PDT)에 큰 기여를 할 것이다.

2. 실험

검출기로 UV scintillator(lumagen)으로 코팅된 thermoelectrically cooled CCD(TE-CCD)는 격자 이동 칩이 1152×1242이고, CCD-controller(ST-113), CCD-adapter(F-mount)와 영상 출력의 소프트웨어인 자료 획득 보드를 미국 Princeton Instruments Co.에서 구입하여 computer interface system을 구성한 영상분석 및 분광분석을 위한 spectrometer를 제작하였다.

광원인 single line mode의 continuous wave(CW)인 Ar 이온 레이저는 미국 Coherent Co.의 모델 innova-70을 사용했고, 본 실험에 사용된 단색화 장치로 monochromator(Acton Research Co.)는 크기를 조절할 수 있는 측미계가 2개 설치되어 있어 정확성이 우수하였다. 회절발은 300, 1200, 2400 groove/min씩 3개가 내장되어 있어 영상 단색화 장치와 분광 그래프에

사용된다. 따라서 그래픽 디스플레이는 일차원의 단일선 그래프와 3D 그래프로 측정할 수 있다. 또한 ND(neutral density) 필터(Esco Co. 밀도 1.97)와 광섬유(직경 4mm)를 사용했으며, 시약 HPD는 Exiton Co.의 G.R.급을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

TE-CCD의 2차원적 영상은 같은 초점거리를 가진 카메라에 의한 상과 크기가 주어진 거리에서 약간 차이가 난다. 이를 보정한 영상의 크기 M 은 다음과 같이 계산될 수 있다.

$$M = \frac{FD}{(D-B)^2} \quad (1)$$

여기서 D 는 목적물과 CCD사이의 거리이고, B 는 CCD-adapter의 거리를 나타낸다. F 는 렌즈의 초점거리이고, S 는 거리 D 에서 CCD 영상의 수평 또는 수직 면적을 의미한다. 또한 거리 D 에서 영상의 수직 또는 수평상의 크기 O 는 다음과 같이 얻어질 수 있다.

$$O = \frac{S}{M} \quad (2)$$

첨단 반도체 소자인 전하 결합장치형 고체 촬영 소자는 종래 촬영관의 광전 변환기술과 반도체 집적회로 제조기술이 복합된 소자로 열적 전자

냉각기(peltier-effect)를 내장한다. 전하 결합장치가 있는 부분은 냉각 접촉 프로그램이고, 뒤 부분은 진공상태로 열이 제거되는 영역이 조합되어 노이즈를 최소화하고, 신호는 순간적으로 증폭되어 구동 보드에 정렬되며 radio frequency(RF)를 측정한다. 전하 결합장치 뒷부분은 냉매없이 -40°C 까지 팬만으로 냉각되며, 질소 기체가 채워져 있어 -70°C 까지 냉각될 수가 있다. LIF는 Fig. 2에 의해 피크가 장파장 쪽에 내부 전환 및 충돌에 의해 넓게 나타나며, 형광세기에 의해 분석하였다. Ishimaru는 turbid 매질에서 빛전개의 diffusion theory에 의한 transport식을 다음과 같이 나타냈다[10].

$$s \cdot \nabla L(r,s) = -(\mu_a + \mu_s)L(r,s) + \mu_s \int_{4\pi} P(s,s') \cdot L(r,s') d\omega' \quad (3)$$

윗 식에서 $L(r,s)$ 는 단위 벡터에 의한 방향 s 에서 위치 r 에서의 radiance ($\text{W mm}^{-2} \text{sr}^{-1} \text{Hz}^{-1}$)로 전달되는 에너지의 양이고, μ_s 는 단일 입자의 scattering cross section(mm^2), μ_a 가 단일 입자의 absorption cross section (mm^2)이며 $\mu_t (= \mu_s + \mu_a)$ 는 전체 횡단면(mm^2)를 나타내며, $p(s,s')$ 는 s' 방향에서 $s(\text{sr}^{-1})$ 으로 산란되는 광자 흐름의 상 함수를 의미한다. 식 (3)의 왼쪽

항은 radiance의 변화를 나타내고, 오른쪽의 첫 번째 항은 산란과 흡수에 의해 radiance 감소를 의미하며, 마지막 항은 모든 방향에서 산란되는 에너지에 의한 radiance 증가를 나타낸다. 조직 세포같은 반 가소성물질 (nonhomogeneous)의 내부에서 여러 가지 빛 흐름을 3차원적 분배과정으로 계산할 수 있지만, 실험적으로 연구가 행하여지기가 어렵다[11]. 그러나 in vitro 실험에서 3차원인 Z축 방향 (horizontal planar slice)와 2차원적 배열(spherically penetration depth)에 대하여 광자의 확산과 열적 반응에 필요조건인 투과 깊이를 구함으로서 PDT의 중요성을 강조하였다[12]. Jacques와 Prahl[4]은 m인 위치에서 2배 장 파장의 빛을 이용하면 조직 세포속에서 조직 표면보다 투과 깊이가 $0.45c$ 이상 열적 침착이 큼을 보고하였다. 광자의 입사 에너지 흐름, I_0 와 실험 모형을 통과한 광자의 방사 에너지 흐름, I 로부터 위치(거리, 깊이)에 대하여 측정된 결과 감쇠 계수를 얻으므로 정확한 측정 투과도의 결과를 얻을 수 있다. $(I/I_0)_{\text{wavelength}}$ 를 광원으로 부터 광섬유까지 거리와 깊이에 대하여 측정하면 광학 특성을 측정하기 어려운 실험 모형, 즉 생체의 같은 부위로서 세포수가 다름에도 불구하고 산란정도를 쉽게 예측할 수 있다. 광학적 투과 깊이, $Y=1/\mu_t$ 로부터 광원-광섬유 간의 깊이 변화에 따른 투

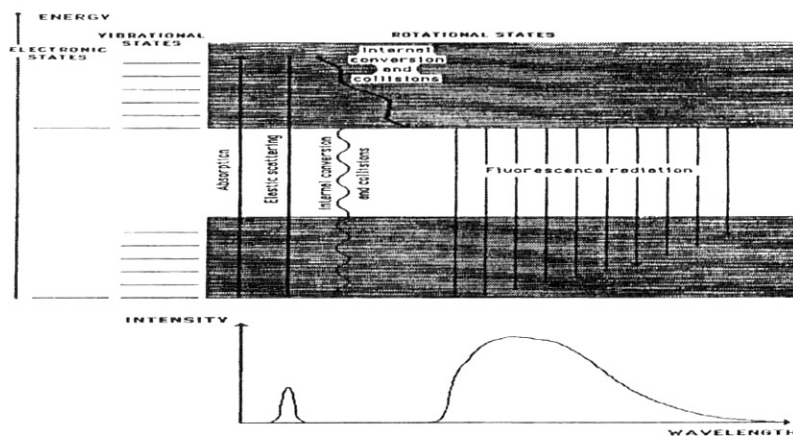


Fig. 2. Two energy bands in a molecule and a general fluorescence spectrum of a solid. The spacings between the rotational levels are enlarged. The narrow peak at the left of the spectrum represents elastically scattered excitation light.

과 깊이위치에서 광자의 영향을 알 수가 있다. Schneckenburger 등[13]은 시간 분석(nanosecond, picosecond) 현미경 기술을 사용하여 몇 가지 포르피린 구성 원소들의 차이 및 흡착에 대한 연구에서 형광 스펙트럼과 머무는 시간에 대해서 종양 세포와 정상 세포 간에 포르피린 영향을 시간에 대한 형광그래프로 확인하여 발표하였다. Fig. 3은 HPD에 대하여 레이저 광원과 검출기인 광섬유까지 깊이 변화에 따른 형광 세기를 도시한 그림이다. 여기에서 LIF의 형광 스펙트럼 모양은 유도 전자 상태에서 광자를 흡수, 방출하는 레이저 빛의 산란보다 민감한 분석 방법이기에 작은 편차가 발견된다고 본다. 형광세기는 광자가 시료 속에 입사됨에 따라 방출은 시료의 구조에 의해 산란, 흡수되고 발색체들은 평면 구조 형태로 전자가 비편재화되어 동력적으로 변화하여 나타나는 현상 스펙트럼이다. 이들에 대한 광학적 특성은 Table 1과 같다.

Fig. 4는 Fig. 3의 (a), (b), (c)에 대하여 레이저 광원-광섬유 간의 침투 깊이에 따라 측정된 형광세기를 그래프로 나타내었다. 여기서 깊이가 증가함에 따라 형광세기는 지수 함수적으로 감소함을 알 수 있다. 이는 다른 연구자[14-15]의 결과와 유사한 경향성을 나타내고, albedo(= μ_s / μ_t)가 증가함에 따라 감쇠 계수가 감소하는 데, 산란에 의한 영향이 크다고 사료된다. 또한 형광 스펙트럼에서 산란체, intralipid가 RA-6G와 공존하는 시료 속에서 산란된 입자의 충돌 효과에 의해 산란이 증가됨에 따라 투과 깊이가 크게 측정되었다. Fig. 4에서도 광증감제, HPD

와 산란체, intralipid가 들어 있는 시료(a)의 형광세기가 가장 크게 나타났고, HPD와 흡수체, india ink가 들어 있는 시료(c)의 형광세기가 가장 작게 나타났다. 따라서 실험모형에서 산란 입자의 농도와 빛의 세기가 큼에 따라 형광세기가 크게 나타났고, 빛의 흡수체가 존재하는 매질에서 산란이 감쇠됨에 따라 형광세기가 작게 나타남을 확인하였다.

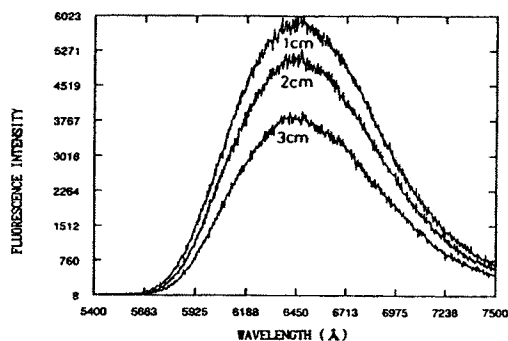
4. 결론

본 연구에서 CCD를 이용한 LIF 분광기는 노이즈 감소가 크고, 분광 특성과 전송 효율이 우수하여 스펙클 영상 및 스펙트럼을 동시에 분광기를 설계 제작하고자 HPD로 분석한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

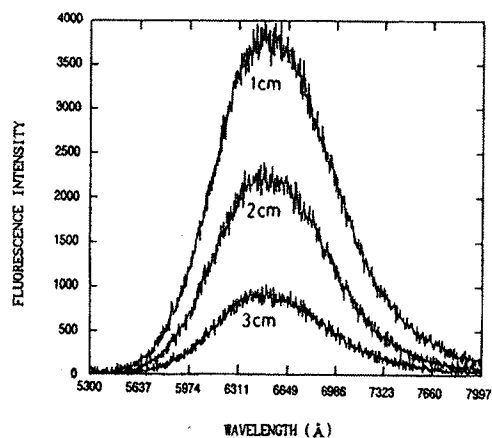
1. 실험 모형 속에서 레이저 광원으로 부터 광자를 검출하는 광섬유까지 깊이가 깊어질 수록 에너지 흐름 유속이 감소하였다.
2. 감쇠 계수, μ_t 는 레이저 광원으로부터 광자를 검출하는 광섬유까지 깊이 변화에 의한 산란 세기를 측정된 결과, 광자 세기가 감소함에 μ_t 값도 감소하였고, 광자 세기가 증가하면 μ_t 값도 증가하였다.
3. HPD + Intralipid, HPD, HPD + India ink 순으로 광자 세기와 감쇠 계수, μ_t 는 감소하였다.
4. RA-6G + Intralipid, RA-6G, RA-6G+ India ink 순으로 투과 깊이, γ 는 감소하였다.

Table 1. Experimental Values of Optical Parameters in Scattering Media at 514.5nm Wavelength

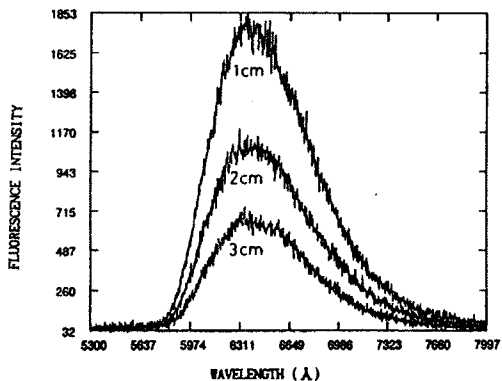
Species (medium)	I	μ_t (cm ⁻¹)	γ (cm)	Depth(cm)
RA-6G	4000	24.62	0.041	1.0
	2756	12.74	0.078	2.0
	984	9.29	0.101	3.0
RA-6G + Intralipid	6023	23.68	0.042	1.0
	5171	12.02	0.083	2.0
	3767	8.25	0.121	3.0
RA-6G + India ink	1853	26.40	0.038	1.0
	1170	13.73	0.073	2.0
	715	9.53	0.105	3.0



(a)



(b)



(c)

Fig. 3. Fluorescence lineshapes of phantom of HPD a function of depth.
 (a): HPD + Intralipid, (b): HPD, (c): HPD + India ink

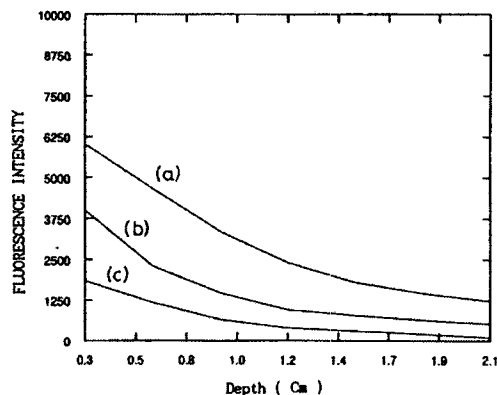


Fig. 4. The detected fluorescence intensity versus depth at Fig. 3.

감사의 글

이 논문은 2004년도 대전대학교 학술연구비 지원으로 수행된 연구의 결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. K. J. Kim and K. C. Sung, A Study on Spectra of Laser Induced Fluorescence in Phantom, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **16**(4), 329 (1999)
2. K. J. Kim and K. C. Sung, Monte Carlo Simulation on Light Distribution in Turbid Material, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **15**(4), 11 (1998)
3. K. J. Kim and K. C. Sung, Studies on Measurements of Optical Parameters in Turbid Material by Light Scattering, *J. of Korean Oil Chemists' Soc.*, **12**(2), 151 (1995)
4. S. L. Jacques and S. A. Prahl, Modeling Optical and Thermal Distribution in Tissue During Laser Irradiation, *Laser in Surgery and Medicine* **6**, 494 (1987)
5. B. C. Wilson, Y. D. Park, Y. Hefetz, M. S. Patterson, S. J. Madsen and S. L. Jacques, "The Potential of Timeresolved

- Reflectance Measurements for the Noninvasive Determination of Tissue Optical Properties, in Thermal and Optical Interactions with Biological and Related Composite Materials", M. J. Berry and G. M. Harpole, eds., Proc. S. P. I. E., p. 97, (1989)
6. S. L. Jacques, C. A. Alter, and S. A. Prahl, Angular Dependence of HeNe Laser Light Scattering by Human Dermis, *Laser in the Life Science*, **1**(4), 309 (1987)
 7. R. R. Alfano, G. C. Tang, A. Pradhan, W. Ran, S. J. Daniel, and E. Opher, Fluorescence Spectro from Cancerone and Normal Human Breast and Lung Tissues, *IEEE J. Quan. Elec. QE*, **23**(10), 1806 (1987)
 8. R. W. Henderson, G. S. Christie, P. S. Clenzy, and J. Lineham, Haemato-porphyrin Diacetate: A Probe to Distinguish Malignant from Normal Tissue by Selective Fluorescence, *Br. J. Exp. Path.* **61**, 345 (1980)
 9. L. O. Svaasand, C. J. Gomer, and A. E. Profio, Laser-Induced Hyperthermia of Ocular Tumors, *Appl. Opt.*, **28**(12), 2318 (1989)
 10. M. > Patterson, B. Chance, and B. C. Wilson, Time Resolved Reflectance and Transmittance for the Noninvasive Measurement of Tissue Optical Properties, *Appl. Opt.*, **28**(12), 2331 (1989)
 11. K. Lee, S. I. J. Forbes, and W. H. Betts, Oxygen Dependency of Photocytotoxicity with Hematoporphyrin Derivative", *Photochem. Photobiol.* **39**(5), 631 (1984)
 12. R. Hilf, P. B. Leakey, S. J. Solltt, and S. L. Gibson, Photodynamic Inactivation of R3230AC Mammary Carcinoma in vitro with HPD: Effects of Dose, Time and Serum on Uptake and Phototoxicity", *Photochem. Photobiol.* **37**(6), 633 (1983)
 13. H. Schnecknburger, M. Frenz, Y. Tsnchiya, U.. Denzer, and L. Schleinkofer, Picosecond Fluorescence Microscopy for Measuring Chlorophyll and Porphyrin Components in Conifers and Cultured Cells, *Lasers in the Life Science* **1**(4), 299 (1987)
 14. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, and K. R. Weishaupt, Energetics and Efficiency of Photoinactivation of Murine Tumor Cells Containing Hematoporphyrin, *Cancer Research* **36**, 2330 (1976)
 15. M. Motamedi, S. Rastegar, G. LeCarpentier, and A. J. Welch, Light and Temperature Distribution in Laser Irradiated Tissue: The Influence of Anisotropic Scattering and Refractive Index, *Appl. Opt.*, **28**(12), 2230 (1989)