

## 입자 이동 방식에서 Laser Induced Fluorescence와 뭉침에 관한 연구

김기준<sup>†</sup>

대전대학교 공과대학 화학공학과  
(2006년 5월 10일 접수 ; 2006년 12월 5일 채택)

### A Study on Laser Induced Fluorescence and Coagulation in Particle Transport Mode

Ki-Jun Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Daejin University, Pochun 487-711, Korea  
(Received May 10, 2006 ; Accepted Dec. 5, 2006)

**Abstract** : The influences of fluorescence, scattering, and flocculation in turbid material by light scattering were interpreted for the scattered fluorescence intensity and wavelength, it has been studied the molecular properties by the spectroscopy of laser induced fluorescence (LIF). The effects of optical properties in scattering media have been found by the optical parameters( $\mu_s$ ,  $\mu_a$ ,  $\mu_t$ ). Flocculation is an important step in many solid-liquid separation processes and is widely used. When two particles approach each other, interactions of several colloid particles can come into play which may have major effect on the flocculation and LIF process. The value of scattering coefficient  $\mu_s$  is large by means of the increasing particles of scatterer, it has been found that the slope decays exponentially as a function of distance from laser source to detector. It may also aid in designing the best model for oil chemistry, biopharmaceutical products, laser medicine and application of medical engineering on LIF and coagulation in particle transport mode.

**Keywords** : *light scattering, laser induced fluorescence, optical parameters, flocculation, biopharmaceutical products.*

#### 1. 서론

혼탁 물질계에서 산란, 흡수계수의 물리적 의미가 불확실하였으나, laser 등의 발명과 분광학 분석에서 산란 횡단면과 흡수 횡단면[1-2]에 의

의해 광학적 매개변수[3]의 해석이 가능하게 되었다. 페인트, 고분자 합성 등의 공장, 식물이나 동물의 조직세포 등에서 대부분 혼탁 물질과 접하고 있다. 오늘날 외과적인 수술시 종양조직을 완전히 제거하지 못할 뿐만 아니라 방사선 치료와 약물 요법에서 항암제의 대부분이 높은 독성을 가지고 있기 때문에 종양세포 뿐만 아니라 정상세포에 작용하여 부작용을 줄 수 있다[4-5].

<sup>†</sup>주저자 (e-mail : kjkim@daejin.ac.kr)

이러한 문제점을 해결하기 위하여 항암제를 암 조직에 선택적으로 수송하여 치료함은 물론, 정상조직에는 영향을 미치지 않게 하는 연구들이 많이 진행되고 있다[6]. Dougherty 등이 광역학적 치료(photodynamic therapy : PDT)에서 인체에 발생하는 많은 증상에 대한 새로운 치료 모델링[7]을 제한하였으나, 지금까지 이 분야에 대한 연구는 아직 초기 단계에 있다. 본 연구는 이 분야가 급격히 발전하게 될 LIF spectroscopy의 생의학 응용에서 증양의 진단 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있도록 모델링을 세우는 데 있다. 산란 매질에서 빛 에너지 전파가 의학의 진단학적 분광 분석의 발전과 치료적 레이저광 전달에 따른 방사량에서 PDT의 임상실험과 광생물학 등의 여러 분야에 응용함에 있어서 살아 있는 세포조직에서 산란 및 뭉침의 측정은 광학적 특성을 결정하는 데 가장 중요하다[8].

산란과 응집에 의한 시료에 빛의 정확한 양이 조사될 경우에 효과적일 수도 있으나, 비효과적, 치명적인 손상을 입히게 될 수도 있다[9].

그리고 분광분석에서 Beer의 법칙이 적용되기 어려운 "광학적으로 시료농도가 진한" 상태인 문제점들을 극복하고자 레이저, 검출기, 광섬유 및 단색화장치 등을 연결한 LIF 분광법은 실시간 분석과 현장분석을 가능하게 하였다[10]. 또한 본 연구는 혼탁매질에서 형광체, 응집체 및 산란체의 시료에 대한 광원에서 검출기까지의 위치에 따른 빛이 산란매질에서 확산과 이동으로 변화하는 광학적 매개변수와 입자크기를 측정하였다.

## 2. 실험

본 실험에서 형광체는 Hematoporphyrin Derivative(HPD, Acros Co., USA)를 사용하였으며, 단일과장의 모드의 argon ion laser(Coherent Co., model No. Innova70, USA)를 이용하여 520 부터 900 nm 사이의 형광을 측정하였다. Laser beam을 산란체(Glucose, Samchun Pure Co., Korea), 응집체는 양이온 전해질(Stamfords Co., Cytec, USA), 효수체(Yeast, Samchun Pure Co., Korea), 광섬유(Diameter : 4 mm)로 측정된 빛을 모아서 광전증배관(photomultiplier tube)에서 검출하며, 광자 계수기로 광자세기를 측정하였다. 실험장치는 Fig. 1과 같다.

또한 연속파(continuous wave, CW)인 argon laser를 사용하여, Dye laser(Coherent Co., model No CR-599, USA)를 동기식 펄핑하였으며, 형광염료는 RA-6G를 사용하였다. 산란된 빛은 광섬유를 통하여 원하는 빛만 검출기에 도달할 수 있는 중성밀도 필터(Esco Co., density 1.97, USA)를 지나 단색화 장치(Monochromator, SPEX Co., model No 1870, 50cm focal length, 1800 groove/mm)에 입사하는데, Monochromator의 과장은 측미계인 Minidrive(SPEX Co., model No. 1872)로 작동하며, Monochromator에 연결된 광전증배관(Products for Research Co., model No RCA 31034A, USA)의 열적 노이즈를 줄이기 위해 수냉식과 DC 전원 공급장치(Power supply, Product for Research Co., model No. TE104RF)를 이용하여,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 실험하였다. 또한 디지털 광도계 (SPEX Co., model No.

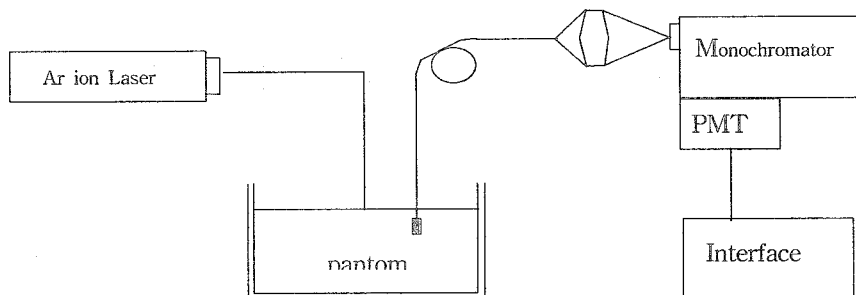


Fig. 1. Diagram of experimental equipment.

DPC-2, USA), single photon amplifier discriminator(SPEX Co., model No. 453, USA), photon counter(Stanford Research Co., model No. SR400, USA)를 이용하여 실험하였다. 데이터 처리 보드(Data Acquisition Board, National Instrument Lab-PC) 등을 연결, 컴퓨터 계간 시스템을 구성하여, 300rpm과 3분동안 교반하여 만든 산란체, 형광체, 응집체의 시료를 변화시켜 가면서 매질의 산란세기를 거리에 따라 실험하였다. 시료를 담은 통은 표면반사, 투광도의 영향을 없애기 위해 크기 200 X 200 X 150 mm인 검정색 통을 사용하였으며, 레이저 광원과 검출기인 광섬유까지의 거리를 측정하는 정밀 측정기인 XYZ stainless steel multi axis stage(Newport Co., model No. M-TSX-1A, USA)를 이용하여, 시료통에서 LIF에 따른 산란과 형광세기를 조사하였다. 본 실험에서 사용된 용매는 이차 증류수를 사용하여 흡광계수( $\mu_s$ ), 산란계수( $\mu_s$ ), 감쇠계수( attenuation coefficient,  $\mu_t = \mu_s + \mu_a$ )를 측정하였다. 혼탁시료의 입자크기 분포(particle size distribution)는 Hollow fiber module(Needham, A/G Technology Co., USA)와 레이저 산란의 Coulter(Miami FL Co., model No. LS230, USA)로 구성되어 있으며, Hollow fiber module 은 6개로 구성되어 있고, 길이 10.9cm, 막표면은 20cm<sup>2</sup>이며, 공극크기는 0.2  $\mu$ m인 정밀 여과막을 사용하였으며, 실험한 장치는 Fig. 2와 같다.

### 3. Optical Parameters의 빛 전개 모델

최근 혼탁 매질에서 빛의 분포를 빛의 광자인 입자로 간주하고, 이를 이동 이론에 의해 설명하였다. Ishimaru는 확산이론(diffusion theory)에 의한 광자이동 식[11]을 다음과 같이 나타내었다.

$$(s \cdot \nabla_r)L(r,s) = -\rho\sigma_t L(r,s) + \frac{\rho\sigma_t}{4\pi} \int_{4\pi} p(s,s')L(r,s')d\omega' \tag{1}$$

상기 식에서  $L(r,s)$ 는 단위 벡터에 의한 방향에서 거리  $r$ 의 radiance ( $W m^{-2} sr^{-1} Hz^{-1}$ )이고,  $\rho$ 는 단위 부피당 산란 입자의 수( $mm^{-3}$ )를 나타내며,  $\sigma_s$ 는 단일 입자의 산란 횡단면( $mm^2$ ),  $\sigma_a$ 는 단일 입자의 흡수 횡단면( $mm^2$ )를 의미하고,  $\sigma_t (= \sigma_s + \sigma_a)$ 는 전체 횡단면( $mm^2$ )를 나타내며, 단일 입자에서 알비도( $\omega_0 = \sigma_s / \sigma_t$ )와  $p(s,s')$ 는  $s'$ 방향에서  $s(sr^{-1})$ 으로 산란되는 광자 흐름의 상함수를 의미한다. 경계조건에 의해 상함수를 규격화하면,

$$\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(s,s')d\omega' = \omega_0 \tag{2}$$

로 나타나고, 여기서,  $d\omega'$ 는 solid angle(sr)이며,  $\mu (= ss')$ 는 단위 벡터  $s$ 와  $s'$ 사이 각도로서 산란각을 의미하고, 상함수는 다음 식으로 주어진다.

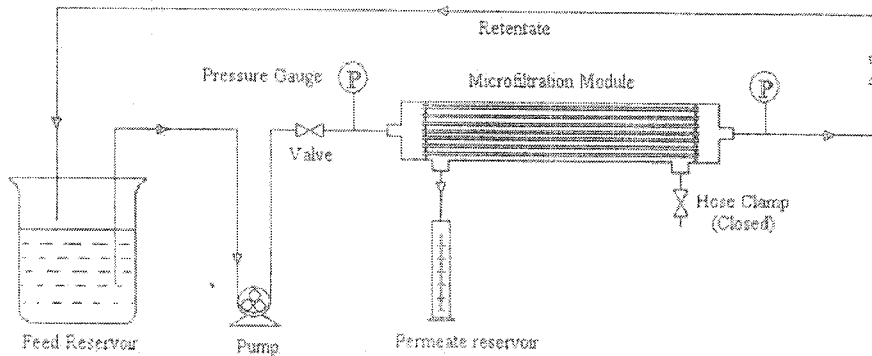


Fig. 2. Measurement equipment for particle size distribution.

$$p(\mu) = \omega_0(1-g^2) (1+g^2-2g\mu)^{-3/2} \dots\dots\dots (3)$$

(3)식은 Mie scattering을 고려한 phase function으로 Henyey-Greenstein이 유도한 식으로  $\mu$ 와  $\omega_0$ 의 함수이며, 물리적으로 산란 입자가 임의로 방향성을 갖는 의미이다. 여기서, 산란의 anisotropy에서 산란각의 평균 cosine는  $g$ 로 서술되는데,  $g$ 가 1일 때 앞쪽에 피크가 나타나고,  $g = 0$ 에서는 등방 상태이며,  $g = -1$ 일 경우 뒤쪽에 피크가 나타나는 산란상태를 의미한다. 광자 이동식으로부터 산란계수와 흡수계수를 계산하는 식은 아래와 같이 유도할 수 있다.

$$I(r) = I_0(r)\exp(-\mu_t d), \text{ or } \mu_t = -(\ln I/I_0)/d \dots\dots\dots (4)$$

상기 식에서 감쇠계수(attenuation coefficient)는  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  이고,  $d$ 는 거리를 의미한다.

4. 결과 및 고찰

산란체인 글루코스의 산란계수를 결정하기 위해서 글루코스의 광원과 검출기 까지 변화에 따라 흡수와 산란된 빛의 양을 측정하였으며, Added Absorber Technique를 사용하여 감쇠계수( $\mu_t = \rho\sigma_t$ )는 산란 입자만 존재하기 때문에 산란 계수( $\mu_s$ )에 일치한다[12]. 전체 감쇠 계수측정은 단일입자 산란만이 일어나도록 하기 위해 매우 묽은 농도에서 실험하였고, 산란되지 않고 나오는 광자를 검출하기 위해서 아이리스를 사용하였다. Fig. 3은 광원에서부터 검출기까지 변화에 의해 측정되어지는 빛의 세기를 나타내었다. 이 값들은 10회를 재현성 있게 실험하여 평균한 값들이다.  $\mu_s$ 를 측정하기 위한 식은 다음과 같다.

$$I = I_0 \exp(-\mu_s \cdot c \cdot d) \dots\dots\dots (5)$$

여기서  $c$ 는 농도를 의미하고,  $d$ 는 시료통의 직경,  $I$ 는 반사 irradiance( $W/m^2$ ),  $I_0$ 는 입사 irradiance를 의미한다. 여기서,  $\mu_s$ 는

$$\mu_s = \frac{1}{d} \frac{\partial \ln (I/I_0)}{\partial C} \dots\dots\dots (6)$$

로 나타나며, Fig. 3에서 농도 대 광자세기( $I/I_0$ )의 기울기로 부터 얻은  $\mu_s$ 값은 Table 1과 같다. Fig. 3에서 광원에서 검출기까지의 거리가 가까울수록 앞 방향으로 투과가 많이 일어나고, 반면에 광원에서 검출기까지의 거리가 멀수록 산란에 의해 측정 광자세기가 크게 작아짐을 알 수 있다. 이는 글루코스 농도가 진해짐에 따라 검출기에 닿는 비율이 적어짐을 의미하는 데, 매질 층이 두꺼워서 산란이 증가함을 예상할 수 있다. 이 실험은 광자가 시료 속에 입사될 때부터 검출기에 도달할 때까지의 거리에 대하여 레이저를 이용한 광원과 광섬유간의 깊이를 1.0cm에 고정시키고, 거리가 각각 1.0, 2.0, 3.0, 4.0cm 따라 측정된 형광세기를 도시하였다. 위 결과로부터 광자의 분포를 조사하면 매질에서 거리가 가까울 수록 산란세기가 증가함을 알 수 있었다.

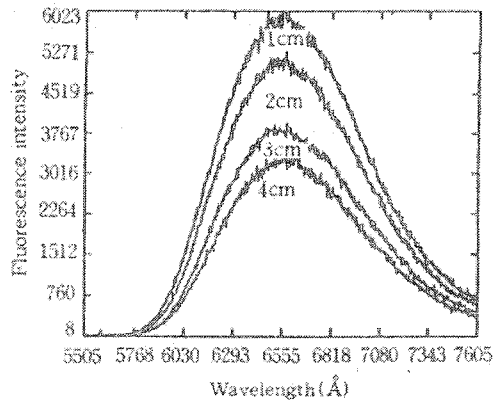


Fig. 3. Scattering spectra intensity according to a function of distance from source to optical fiber in glucose.

Table 1. Measured Mean Values versus Optical Parameters of Glucose

I	$\mu_s(mm^{-1})$	Distance(cm)
6023	13.862	1.0
5271	6.745	2.0
3768	4.329	3.0
3125	1.471	4.0

Fig. 4는 응집체인 Yeast를 상온에서 광원에서 검출기까지의 거리별로 흡수되지 않고 투과

한 빛의 세기를 측정 한 결과를 도시한 것이고, 이에 따른 흡수계수 값은 Table 2와 같다. 이것은 광자가 효소의 시료 속에 입사될 때부터 검출기에 도달할 때까지의 거리에 대하여 레이저를 이용한 광원과 광섬유간의 깊이를 1.0cm에 고정시키고, 거리가 각각 1.0, 2.0, 3.0cm 따라 측정 한 형광세기를 도시하였다. 위 결과로부터 광자의 분포를 조사하면 매질에서 거리가 가까울 수록 산란세기가 증가하였으나, Fig. 3에서 글루코스의 시료보다 작은 효소 값의 세기를 나타낸 것은 산란이 적게 발생한 것으로 사료된다.

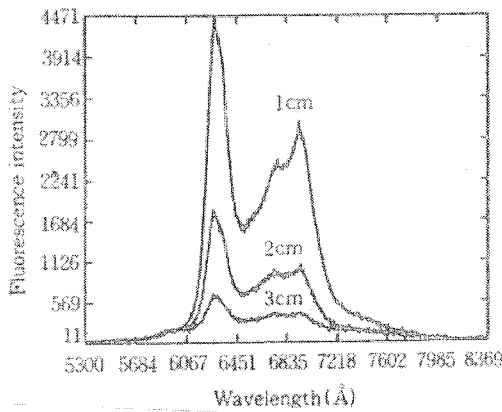


Fig. 4. Scattering spectra intensity according to a function of distance from source to optical fiber in yeast.

Table 2. Measured Mean Values versus Optical Parameters of Yeast

I	$\mu_s(\text{mm}^{-1})$	Distance(cm)
4471	11.084	1.0
1842	4.917	2.0
723	0.168	3.0

효소의 농도가 증가함에 따라 산란세기가 증가하고, 몽침에 의해 빛의 흡수가 강해진다. 이는 투과된 빛의 세기가 약해지는 현상이다. 이 현상은 광자가 상호 작용하여 매질의 농도가 클수록 입자간의 거리, 즉 MFP(mean free path)가 작아지며 축방향 투광도 역시 작아짐을 확인하였다. Fig. 5는 강력한 광활성제 중의 하나이면서 항종양성 물질인 HPD의 형광 스펙트럼을

나타낸 것이다. HPD는 정상세포에 비해 세포분열이 왕성한 종양세포 및 종양세포가 전이된 세포에 특이적으로 결합하는 능력이 있으며, 자외선이나 빛을 쬐어 활성화시키면 특이한 형광이 발생하므로 종양 및 종양세포가 전이되는 위치를 확인할 수 있다.

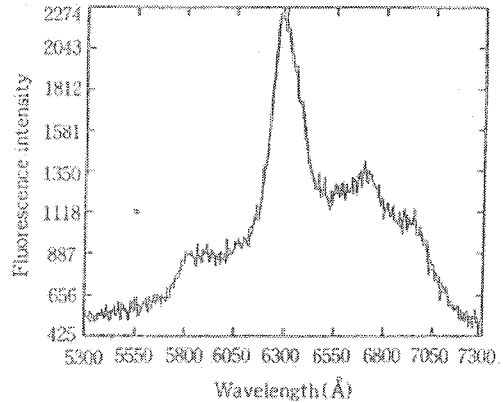


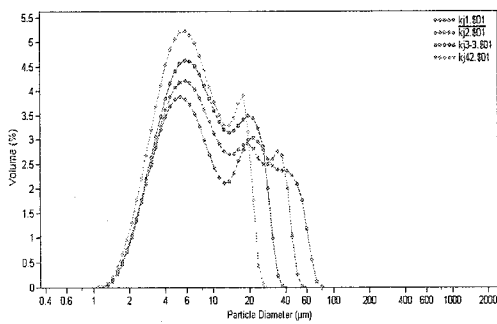
Fig. 5. Fluorescence lineshape of HPD in ethylalcohol.

광역학적 작용이란 어떤 물질이 빛을 흡수하면 산화될 수 있는 조건(dye + light + oxygen) 하에서 생물학적 분자계를 변화시키거나 파괴시키는 작용을 의미하며, 일중항 산소에 의해 PDT결과를 얻어 낼 수가 있다[12-14]. 따라서 Fig. 6은 300rpm, 3분동안 교반한 다음, Hollow fiber module에 의한 정밀여과를 통과한 시료의 입자크기에 대한 응집된 부피를 측정하였다. (a)는 Fig. 3과 동일조건하에서 같은 종류의 시료로서 글루코스의 입자크기를 나타내었다. 이는 글루코스의 산란세기가 증가함에 따라 부피(%)는 증가하였으나, 입자크기의 직경은 점점 감소한 것으로 나타났다. (b)는 Fig. 4와 동일조건하에서 같은 종류의 시료, 효소에 대한 입자크기 분배를 측정 한 그래프이다. 이것은 산란세기가 감소함에 따라 부피(%)는 감소하였으나, 입자크기의 직경은 점점 증가하였음을 알 수 있다. 이 결과는 혼탁매질 속에서 위치함수로 산란이 증가함에 따라 MFP는 짧아지며, 충돌에 의해 에너지 흐름이 많아져서 감쇠계수가 증가한 현상으로 사료된다.

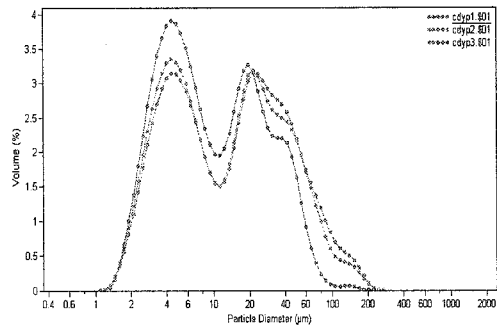
Table 3은 Fig. 6과 동일조건하에서 같은 종류의 시료에 광증감제로 사용되는 HPD를 첨가

Table 3. Experimental Values of Optical Parameters on Scattering Media at 595nm Wavelength

species(medium)	I	$\mu_t$ (cm)	$\delta(1/\mu_t)$	distance(cm)
HPD + Glucose	5023	21.563	0.148	1.0
HPD + Glucose	4917	13.425	0.293	2.0
HPD + Glucose	3702	9.167	0.334	3.0
HPD + Glucose	2956	7.378	0.591	4.0
HPD + Yeast	6023	20.563	0.043	1.0
HPD + Yeast	5271	10.415	0.085	2.0
HPD + Yeast	3767	7.167	0.118	3.0



(a) HPD + Glucose



(b) HPD + Yeast

Fig. 6. Particle size distribution after flocculation and microfiltration with (a) HPD + Glucose, (b) HPD + Yeast.

한 글루코스와 효소에 각각 광학적 매개변수들을 측정하여 나타내었다. 글루코스의 경우가 효소의 경우보다 거리가 가까울 수록 산란계수와 감쇠계수가 크게 나타났으며, 침투깊이( $\delta = 1 / \mu_t$ )는 감소함을 알 수 있었다.

응집된 양은 고체물질의 흡착매(absorbent)의 단위면적, 단위질량 당에 흡착분자의 물질량이 수소결합을 형성하고 정전기적 힘이 작용하여, 분자표면간의 접촉으로 분산력이 발생하고 전자의 이동으로 결합된 현상이다[15]. Beer법칙에서 벗어난 결과로서 산란체의 입자가 많을 수록 광자 세기가 증가하였고, 이는 뒤쪽에 피크가 나타나는 반사의 영향이라고 사료된다.

### 5. 결론

본 연구에서 LIF에 의한 글루코스, HPD, 효소에 의한 광학적 파라미터를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 산란매질에 레이저 광이 입사됨에 따라 광자를 검출하는 광섬유까지의 거리가 가까울수록 산란계수가 증가하였으며, 산란계수는 글루코스의 현탁액이 효소의 현탁액보다 크게 나타내었다.
2. 광자 측정에 따른 공간적 침투에 대한 광자의 발견확률, 침투거리 ( $\delta$ )는 HPD+글루코스의 시료가 HPD+효소의 경우보다 더 크게 나타났다.

3. 빛의 파장에 의해 광자의 확산과 열적반응을 뭉침과 정밀여과 공정을 거친 후에 입자크기 분포에서 HPD+글루코스의 시료가 HPD+효소의 시료의 경우보다 부피가 큰 반면에 입자크기는 작게 나타났다.

### 감사의 글

본 연구는 대전대학교 교내 연구비의 지원에 의해 수행되었으며, 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 Chemist' 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. 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).
8. 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).
9. S. R. Wickramasinghe, Y. Wu, and B. Han, Enhanced Microfiltration of Yeast by Flocculation, *Desalination* 147, 25, (2002).
10. L. O. Poicard, C. J. Gomer, and A. E. Profio, Laser-Induced Hyperthermia of Ocular Tumors, *Appl. Opt.*, 28(12), 2318 (1989).
11. M. Winkelmann, 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).
12. K. Lee, I. J. Forbes, and W. H. Betts, Oxygen Dependency of Photocytotoxicity with Hematoporphyrin Derivative, *Photochem. Photobiol* 39(5), 631 (1984).
13. R. Hilf, P. B. Leakey, S. J. Solitt, 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).
14. H. Schneckenburger, M. Frenz, Y. Tsuchiya, U. Denzer, and L. Schleinhofer, Picosecond Fluorescence Microscopy for Measuring Chlorophyll and Porphyrin Components in Conifers and Cultured Cells, *Lasers in the Life Science* 1(4), 299 (1987).
15. S. R. Wickramasinghe, Y. Wu, and B. Han, Enhanced Microfiltration of Yeast Flocculation, *Desalination*, 147, 25(2002).