

## In Vitro에서 광증감제에 의한 광학적 영향에 관한 연구

김기준<sup>†</sup> · 성기천

대진대학교 공과대학 화학공학과  
(2005년 3월 17일 접수 ; 2005년 6월 1일 채택)

### A Study on the Optical Influence by Photosensitizer in Vitro

Ki-Jun Kim<sup>†</sup> · Ki-Chun Sung

Dept. of Chemical Engineering, Dae-jin University, Pochun 487-711, Korea  
(Received March 17, 2005 ; Accepted June 1, 2005)

**Abstract** : The propagation of light radiation within tissues is an important problem that confronts the dosimetry of therapeutic laser delivery and the development of diagnostic spectroscopy. In the clinical application of photodynamic therapy(PDT) and in photobiology, the photon deposition within a tissue determines the spatial distribution of photochemical reactions. Scattered light is measured as a function of the distance ( $r$ ) between the axis of the incident beam and the detection spot. Consequently, knowledge of the photosensitizer(Chlorophyll-a) function that characterizes a phantom is important. To obtain the results of scattering coefficients( $\mu_s$ ) of a turbid material from diffusion described by experimental approach. It was measured the energy fluency of photon radiation at the position of penetration depth. From fluorescence experimental method obtained the analytical expression for the scattered light as the values of  $(I/I_0)_{\text{wavelength}}$  vs the distance between the center of the incident beam and optical fiber in terms of the condition of "in situ spectroscopy(optically thick)" and real time by fluorometric measurements.

**Keywords** : photodynamic therapy, scattering coefficient, photosensitizer,  
Chlorophyll-a, in situ spectroscopy.

### 1. 서론

현대의학에서 아직 해결하지 못하고 있는 질병은 암과 바이러스 질환들이다. 특히 암의 정복에 문제가 되는 것은 항암제의 대부분이 높은 독성을 가지고 있고, 항암제가 암세포에만 작용

하지 않고 정상세포에도 작용하기 때문에 많은 부작용을 유발한다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 광증감제(photosensitizer)를 종양세포에만 선택적으로 전달하여 작용하게 함으로서 정상조직에는 영향을 미치지 않게 하려는 연구들이 많이 진행되고 있다[1]. 따라서 오랫동안 농도가 높은 물질계에서 산란, 흡수계수의 광학적, 물리적 의미가 불확실하였으나, 레이저 등의

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

강력한 광원의 발명과 반사에 대한 분석에서, 산란 횡단면(cross section)과 흡수 횡단면에 의해 광학적 파라미터의 해석이 가능하게 되었다[2]. Dougherty가 photodynamic therapy (PDT)로 인체에 생기는 많은 종양에 대해 새로운 치료 모델링을 제안하였으나, 지금까지 이 분야에 대한 연구는 주로 생의학 분야에서 활발히 진행되어 왔고 아직 초기 단계에 있다[3]. 따라서 이 분야에 대한 기초를 검토하여 급격히 발전하게 될 laser-induced fluorescence(LIF) spectroscopy의 생의학적 응용에서 종양의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있도록 모델링을 세우는 데 있다. 산란 매질에서 빛 에너지 전파가 diagnostic spectroscopy의 발전과 therapeutic laser delivery의 dosimetry에서 PDT의 임상실험과 photobiology 등의 여러 분야에 응용되고 있으나, 특히 살아 있는 조직에서의 비파괴적 흡수 및 산란 성질의 측정은 광학적 특성을 결정하는 데 있어 가장 중요한 문제이다[4]. 따라서 투과된 빛의 정확한 량에 따라 조직에 전달된 빛 중 약간의 차이에 의해 효과적일 수도 있고, 비효과적일 수도 있으며, 치명적인 손상을 입게 되는 경우도 있다[5]. 오늘날 레이저의 발달과 검출기의 발달, 또한 광섬유(optical fiber) 및 퍼스널 컴퓨터의 발달로 인해 LIF spectroscopy에 있어서 real time과 동시에 in situ spectroscopy를 가능하게 해 주었다. 그러나 실제의 in situ 상황은 Beer의 법칙이 적용되지 않은 "optically thick"한 조건에 있다. 또 다른 어려움은 피부의 fluorescence spectroscopy와 같은 형광체(fluorophor)가 scattering media인 피부에 있는 경우이다. 이런 경우에 스펙트럼은 형광체, 흡수체 및 산란체의 농도, 위치 및 성질에 따라 스펙트럼의 선 모양이 달라지게 된다[6]. 이는 빛이 산란 매질에서 마치 확산하는 것처럼 움직이며, 흡수체에 의해 소멸되고, 그리고 형광체에 의해 생성되는 복잡한 과정을 거치기 때문이다. 따라서 본 연구는 빛의 경로에 따라 형광세기가 달라지는 현상을 분석할 수 있도록 광학적 파라미터에 대한 측정 방법을 고안하고, 측정하여 이들에 대해 고찰하였다. 또한 본 연구는 광증감제의 농도 변화에 따른 fluorescenced spectral lineshape이 형광체의 성질에 의해 빛을 흡수하여 산화할 수 있는 최적의 종양치료의 광학적 기하학에 대한 토대를 세우는 것이다. 또한 레이저와 광증감제와의

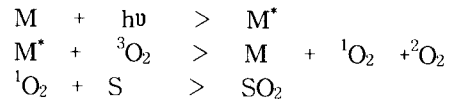
상호작용, 또한 광섬유를 이용한 빛의 전달 등을 연구하여 부작용을 최소화하고 치료효과를 높이는 것이다. 본 연구는 다음과 같은 특징을 고려하여 연구가 진척되어 왔다.

첫째 : 레이저를 이용하여 광증감제(photo-sensitizer)로 종양치료에 활용하는 것이다.

둘째 : 레이저를 열원으로 빛이 흡수체에 의해 흡수될 때 열로 변환되는 것을 이용하는 것이다. 이 경우 레이저의 직진성을 이용하여 작은 면적에 포커스를 맞출 수 있는 간섭성으로 미세한 부분을 집중적으로 또는 순간적으로 가열하여 이때 발생하는 열로 종양조직을 제거할 수 있다. 마지막으로 레이저를 분광학으로 이용하여 세포 시료에 대한 빛의 산란과 형광 등으로 인한 스펙트럼을 관측함으로써 의학에서 조직의 상태를 진단하는 데 사용하고 있다. LIF 분광학은 바닥상태에 있는 분자내의 전자가 레이저에 의해 들뜬 상태로 되었다가 다시 바닥상태로 되면서 나오는 형광의 세기 파장을 측정하여 분자의 성질을 연구하는 방법이다. 특히 LIF는 매우 민감하기 때문에 많은 주목을 받아 왔으며, 레이저의 발명 이후 많은 분야에서 급속히 발달하여 왔다. 또한 LIF 분광학은 분석화학이나 femtomol의 검출 등에 응용되어 왔고 개개의 원자 하나 까지도 검출할 수 있다[7]. Policard는 종양을 유발시킨 실험동물에 hematoporphyrin derivatives(HPD)를 투여한 후 종양 부위를 형광램프에 조사하여 적색 형광이 발생하는 현상을 관찰하였고[8], Winkelmann 및 Rasmussen Taxdall은 walker 256 carcinoma를 발생시킨 쥐에서 HPD 조직내 흡착된 농도를 조사하였으며, 종양 조직내의 HPD의 흡착농도는 정상 조직에서 보다 4배 가량 높은 것으로 보고하였다[9].

HPD는 혈액에서 추출된 hemin으로부터 얻어지며 강력한 광증감제로서 광세포 독성을 지닌 것으로 HPD에 빛을 조사하면 특유한 형광이 발생되고, HPD가 종양세포에 선택적으로 축적한다는 사실이다[10]. 그러므로 HPD의 종양조직의 위치확인, 광세포 독성에 의해 종양을 치료하는 PDT 등에 관심이 매우 크다[11]. PDT는 외부에 발생된 종양뿐만 아니라 광섬유를 사용하여 내부장기에 발생된 종양의 치료에 이용되고 있고, 특히 눈, 방광, 피부 및 기관지 종양의 진단 및 치료에 임상적으로 이용되고 있다. 광활성 작용이란 산화될 수 있는 조건

(oxidative condition: dye + light + oxygen)하에서 물질이 빛을 흡수하여 일중항 산소(singlet oxygen)를 발생하고 생물학적 분자와 생물학적 시스템을 변화시키거나, 파괴시키는 작용을 뜻한다. 광활성화 반응에서 발생한 일중항 산소는 종양세포를 파괴시킴으로 PDT의 결과를 얻어낼 수가 있다. 광증감제가 종양 세포의 조직에 흡착되고 생체내에서 자체 공급되는 산소가 광에너지에 작용하면 우선 광증감제가 광에너지를 받아 들뜬 상태로 되고, 들뜬 상태의 광증감제에서 산소가 에너지를 공급받아 들뜬 상태의 산소가 된다. 산소분자가 에너지를 받으면 다음의 세가지 분자 상태가 되는데 singlet state ( $^1\Delta_g$ ,  $^1\Sigma_g^+$ )과 triplet state ( $^3\Sigma_g^-$ )으로 구분이 된다. 일중항 산소의 메카니즘을 살펴보면 아래와 같다 [12].



들뜬 상태의 광증감제가 산소 분자로서 충돌과 소광(quenching)에 의한 에너지 전달의 메카니즘은 Fig. 1과 같다. PDT에서 광증감제가 광에너지를 받아 일중항 산소가 생성되어서 종양조직을 파괴하는 작용이 세포 독성능(cytotoxicity)이다[13]. Khan과 Kasha[14]가 다음 반응식에 대하여 일중항 산소는 20°C, 1atm에서 생성되고 전자적으로 들뜬 일중항 산소의 red chemiluminescence 방출 스펙트럼에 대한 O-O 밴드를 해석하여 그 존재를 규명하였다.

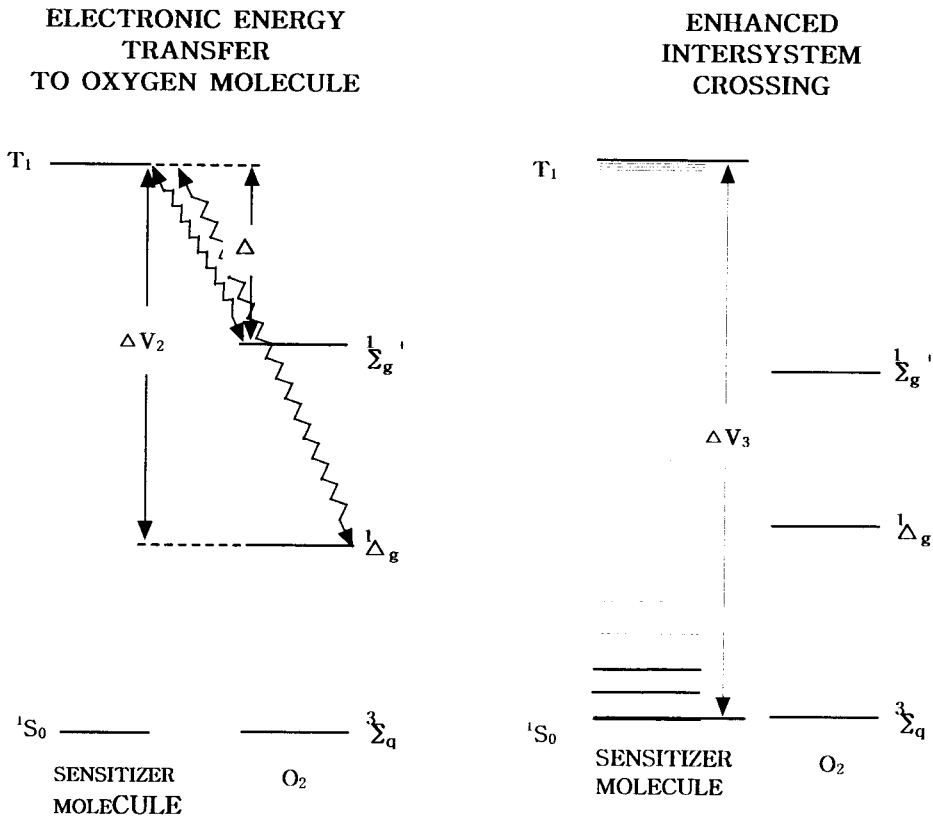
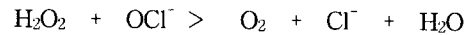


Fig. 1 Schematic diagram of energy transfer processes in the quenching of the organic triplet state by molecular oxygen

이것은 과산화수소와 sodium hypochlorite의 수용액 반응에 의해 일중항 산소분자의 화학적 활성도를 이용한 PDT에 대한 연구이다.

또한 광활성화 작용에 소요되는 빛의 파장 선택은 광활성 인자, 즉 감광제의 흡수 스펙트럼으로부터 결정할 수 있으며, 가시광선 범주에서 빛의 파장이 길수록 조직내의 투과력이 증가한다[15]. 빛을 이용한 종양 치료는 광 증감제의 량과 종양이 있는 위치(localization)에서 빛의 분배에 따른 크기, 파장, 조명 범위 및 시간 등을 고려한 에너지 흐름 유속(energy fluence rate)를 정확히 주입시키는 것에 따라 크게 좌우된다. 흡광 계수(absorption coefficient)가 작을 수록 산란이 많아지며 산란된 빛과 광활성을 갖는 물질의 반응성이 증가된다. 반면 흡광 계수가 클수록 산란보다는 빛의 흡수가 많이 일어나므로 광활성을 갖는 물질의 반응성은 줄어든다. 광자의 입사에너지 흐름,  $I_0$ 와 실험 모형을 통과한 광자의 방사 에너지,  $I$ 로부터 거리에 대하여 측정된 결과 감소 계수(attenuation coefficient)를 얻음으로 광학적 영향을 얻을 수 있다.  $(I/I_0)$ wavelength를 광원으로부터 광섬유까지 거리에 대하여 측정하면 광학 특성을 측정하기 어려운 실험 모형, 즉 생체의 같은 부위로 세포수가 다름에도 불구하고 형광 정도를 측정할 수 있다. 광학적 투과 깊이인  $\gamma=1/\mu_t$ 로부터 광원-광섬유 간의 거리 변화에 따른 투과 깊이의 위치에서 광자의 영향을 알 수 있다[14]. 광 증감제인 hematoporphyrin derivatives(HPD)은 in vitro 및 in vivo에서 정상조직에 비해 종양 조직에서 더 많은 양이 축적되고 빛을 조사하면 형광을 발생하여 광활성화 작용에 의한 세포독성을 나타내는 것으로 알려지고 있다. 또한 HPD는 hematoporphyrin의 acetylation 생성물인 hematoporphyrin mono 및 diacetate, hydroxyethyl vinylidenterporphyrin(HVP) monoacetate 및 protoporphyrin 등의 혼합물을 알칼리로 가수분해한 복합성 물질이며, 세포독성이 우수하다[15]. 이러한 광활성화 작용을 보면 HPD와 유사한 구조를 갖는 포르피린 유도체(porphyrin derivatives)에 대한 연구가 수행되고 있다. 따라서 식물의 광활성에 관여하는 chlorophyll 유도체들은 네 개의 피롤 고리를 갖는 포르피린 유도체 물질이며 광활성화 작용을 한다. 식물의 엽록소에 함유된 포르피린 유도체 물질은 chlorophyll, 클로린, methylpheo-

pheorbide, pheophytin, ethioporphin, bacteriochlorophyll 등의 혼합물이며, 이들 중 Chlorophyll-a( $C_{55}H_{72}N_4O_6Mg$ )와 Chlorophyll-b( $C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$ )가 대부분이며, a와 b의 비는 3:1인 것으로 알려지고 있다[15].

## 2. 실험

인체의 세포조직은 지질이 주성분으로 산란체이고, 흡수체(melanin, hemoglobin)가 함유되어 있으며, 항암제가 대부분 형광물질이기 때문에 형광체로 Chlorophyll-a를 Sigma Co.에서 G.R. 급을 구입하여 실험하였고, 황산, 초산, 아세트산나트륨 및 dimethylfuran(DMF)를 국내에서 구입하여 사용하였다. 실험은 single line mode의 argon ion 레이저(Coherent Co., Innova70)을 사용하여 파장 514.5 nm, 형광은 520 부터 900 nm 사이에서 측정하였다. 레이저 빔을 형광체인 광증감제 Chlorophyll-a가 들어갈 수 있도록 시료에 조사하였으며, 광섬유(직경 4mm)를 사용하여 측정된 빛을 모아서 광전 증배관(photomultiplier)으로 검출하며, 광자 계수기로 광자 세기를 측정하였다. 실험장치는 Fig. 2와 같다. 또한 연속파(continuous wave, CW)인 argon 이온 레이저와 dye laser(Coherent Co., CR-599)를 동시에 병행하여 펄핑하였고, 염료는 Rhodamine 6G를 사용하였다. 산란된 빛은 광섬유를 통하여 파장에 따른 분산이 선형현상으로 온도에 의해 변화가 거의 없고, 원하는 빛만 검출기에 도달할 수 있도록한 중성 밀도 필터(Esco Co., density 1.97)를 지나 단색화 장치(monochromator)(SPEX, model No. 1870, 초점 거리 50cm, 1800개 groove/mm)에 입사하는데, 단색화 장치의 파장은 측미계(SPEX, model No.1872)로 작동하며, 단색화 장치에 연결된 광전 증배관(Products for Research Co., model No. RCA 31034A)의 열적 노이즈를 줄이기 위해 수냉식과 DC 전원 공급장치(Product for Research Co., model No. TE104RF)를 이용하여  $-20^{\circ}C$ 로 유지하였다. 또한 디지털 광도계(SPEX, DPC-2), single photon amplifier discriminator(SPEX, model No. 453), 광자 계수기(Stanford Research Co., SR400)와 컴퓨터를 이용하여 측정하였다. 데이터 획득 보드(data aquisition board, National Instrument

Lad-PC) 등을 연결한 컴퓨터 계간 시스템 (computer interface system)을 구성하였으며, 형광체의 농도를 변화시켜 가면서 매질의 형광 세기를 광원의 중심에서 검출기까지의 거리를 고정시켜 실험하였다. 시료를 담은 통은 표면 반사, 투광도의 영향을 없애기 위해 크기 200 X 200 X 150 mm 인 검정색 통을 사용하였으며, 레이저 광원에서 검출기인 광섬유 까지의 측정 위치를 정확히 조절할 수 있는 측미계가 부착된 Newport Co. 제품인 XYZ 스테인레스 스틸 multi axis stage(model No. M-TSX-1A)를 이용하여 phantom통 위에서 정확히 LIF에 따른 형광세기를 조사하였다. 실험에서 사용된 Chlorophyll-a의 구조식은 Fig. 3과 같고, 용매로 이차 증류수를 사용하였으며, 시료를 만들어 하루 안에 사용하였다.

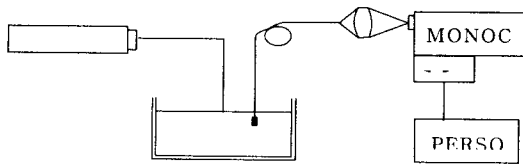


Fig. 2. Diagram of experimental apparatus.

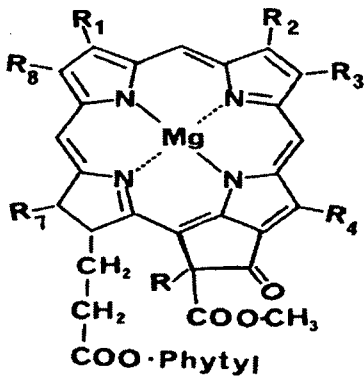


Fig. 3. Structure of Chlorophyll-a.

### 3. 광학적 파라미터의 빛 전개 모델 및 계산

최근에 대부분 농도가 진한 매질에서 빛의 분포는 빛을 광자인 입자로 간주하고 이들의

transport 이론에 의해 설명한다. Ishimaru는 농도가 진한 매질에서 빛전개의 확산이론(diffusion theory)에 의한 transport 식을 다음과 같이 나타냈다[3].

$$(s \cdot \nabla_r) L(r, s) = -\rho\sigma_t L(r, s) + \dots \dots (1)$$

$$\frac{\rho\sigma_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(s, s') L(r, s') d\omega'$$

윗 식에서  $L(r, s)$ 는 단위 벡터에 의한 방향에서 위치  $r$ 의 radiance( $W m^{-2} sr^{-1} Hz^{-1}$ )이고,  $\rho$ 는 단위 부피당 산란 입자의 수( $mm^{-3}$ )를 나타내며,  $\sigma_s$ 는 한 개 입자의 산란 횡단면적( $mm^2$ ),  $\sigma_a$ 는 한 개 입자의 흡수 횡단면적( $mm^2$ )를 뜻하고, 감소계수  $\sigma_t (= \sigma_s + \sigma_a)$ 는 전체 횡단면적( $mm^2$ )를 나타내며,  $\omega_0 (= \sigma_s / \sigma_t)$ 는 한 개 입자의 albedo이고,  $p(s, s')$ 는  $s'$ 방향에서  $s(sr^{-1})$ 으로 산란되는 광자 흐름(photon flux)의 상함수(phase function)를 의미한다.

식 (1)의 오른쪽의 첫 번째 항은 산란과 흡수에 의해 방사(radiance) 감소를 나타내고, 마지막 항은 모든 방향에서 산란되는 에너지에 의해 방사 증가를 나타낸다. 조직 세포 같은 일정하지 않는 내부에서 여러 가지 빛 흐름을 분배과정으로 계산할 수 있다. 경계조건에 의해 상함수를 규격화하면,

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

로 나타나고, 여기서  $d\omega'$ 는 고체각(solid angle, sr)의 요소이며,  $\mu (= s \cdot s')$ 는 단위 벡터  $s$ 와  $s'$ 사이 각도로 부터 산란각의 cosine를 의미하고, 상함수는 다음 식으로 주어진다.

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

(3)식은 Mie scattering을 고려한 상함수로 Henyey-Greenstein이 유도한 식이고,  $\mu$ 와  $\omega_0$ 의 함수이며, 물리적으로 산란 입자가 무질서하게 방향성을 갖는 다. 여기서, 산란의 비등방성(anisotropy)에서 산란각의 평균 cosine은  $g$ 로 서술되는데,  $g$ 가 1일때 전방향으로 진행된 피크,  $g = 0$ 에서는 등방성(isotropy),  $g = -1$ 일때는 반사되어 역방향으로 진행된 피크의 산란상태를 의미한다. Transport 방정식으로 부터 산

란 계수와 흡수계수를 계산하는 방법은 (1)식으로 부터 아래와 같이 유도할 수 있다[4].

$$I(r) = I_0(r)\exp(-\mu_t d) \text{ or}$$

$$\mu_t = -(\ln I/I_0) / d \dots\dots\dots (4)$$

윗 식에서 감소 계수,  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  이고, d는 거리를 의미한다.

**4. 결과 및 고찰**

광증감제인 Chlorophyll-a의 광학적 파라미터를 결정하기 위해 Chlorophyll-a의 농도 변화에 따라 형광되는 빛의 양을 측정하였으며, 개량된 흡수계 측정기술(added absorber technique [6])를 사용하여 전체 감소 계수;  $\mu_t (= \rho\sigma_t)$ 를 측정하였다.  $\mu_s$ 를 계산하기 위해서는 다음과 같다.

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

여기에서 c는 농도를 뜻하고, d는 cuvette의 직경, I는 반사 irradiance( $W/m^2$ )이고,  $I_0$ 는 입사 irradiance를 뜻한다. 그러므로 산란 계수인  $\mu_s$ 는 다음과 같이 나타낸다.

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

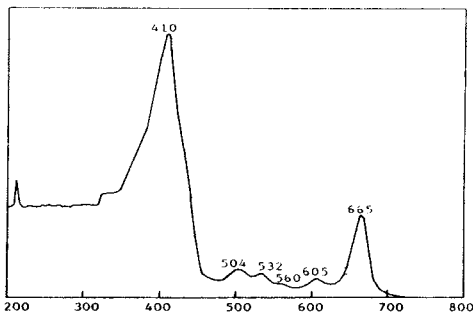


Fig. 4. UV spectrum of Chlorophyll-a.

Fig. 4는 강력한 photodynamic agents중의 하나로 광증감제 물질인 Chlorophyll-a의 UV 스펙트럼을 나타낸 것이다. Chlorophyll a는 정상세포에 비해 세포분열이 왕성한 종양세포가

전이된 세포에 특이적으로 침착하거나 결합하는 능력이 있으며, 자외선이나 빛을 조사하여 활성화시키면 특이한 형광을 발생하므로 종양세포가 전이된 곳의 위치를 확인할 수 있다.

Chlorophyll-a의 특징적인 UV 흡수 파장은 410nm와 665nm부근에서 극대 흡수를 나타내고 있다. Fig. 5에서 Chlorophyll-a의 IR 스펙트럼은 2850~3050 $cm^{-1}$  영역에서 강한 흡수피크가 나타났는데 에스테르 작용기의 C-H stretching에 의한 것이고, 3400 $cm^{-1}$ 은 stretching에 기인된 것으로 예측된다. 또한 1730~1740 $cm^{-1}$ 과 1660 $cm^{-1}$ 은 에스테르 작용기와 carbonyl 작용기의 영향으로 나타났으며, 1700 $cm^{-1}$ 은 고리형의 carbonyl, 1618 $cm^{-1}$ 은 C=C 이중 결합에 의한 흡수피크가 독특하게 나타났다. Fig. 6은 NMR 스펙트럼에서  $\delta=2.0\sim 4.0$  ppm 사이의 강한 흡수 피크가 나타나는데 알킬기의 수소에 의한 것으로 Mg와 cyclopentanone 물질이 성분으로 나타났으며, 포르피린 구조와 같이 네 개의 피롤을 주성분으로 구성되어 나타난 결과로 볼 수 있다. Fig. 7에서 Chlorophyll-a는 초산 0.5몰과 황산 0.5몰을 19:1로 섞은 용액에서 1시간 동안 교반하여 용해한 후, 여과하여 얻은 여과액을 3% 아세트산 나트륨 용액으로 침전시켰다. 침전 후 건조된 Chlorophyll-a를 DMF에 용해시켜 거리에 따라 측정된 스펙트럼이다. 이것은 Chlorophyll-a가 염의 형태로 구성됨에 따라 장파장 이동을 한다[7]. 광증감제인 Chlorophyll-a는 짝이온 전자(conjugate ion electron)들에 의해 상호작용하고 Mg 이온과 산소이온이 반응하여 crown ether 형태가 형성됨에 따라 스펙트럼 밴드변화가 생긴다고 본다.

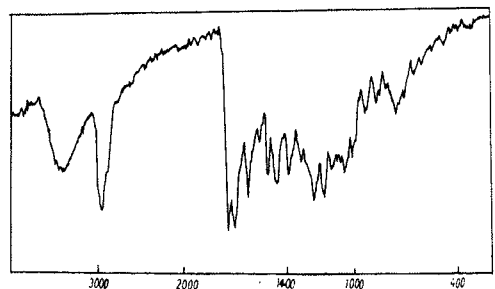


Fig. 5. IR spectrum of Chlorophyll a in KBr disc.

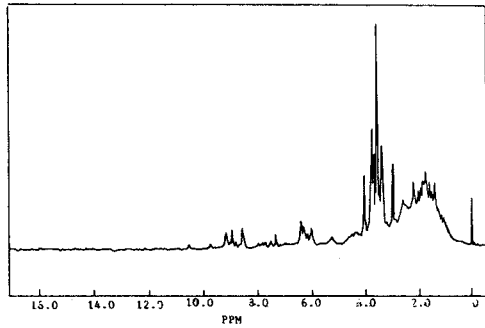


Fig. 6. NMR spectrum of Chlorophyll-a.

Fig. 7은 argon ion레이저로 형광세기를 측정 한 것이며 광원과 검출기인 광섬유와의 거리를 1cm로 고정해 놓고 Chlorophyll-a의 농도변화에 대한 photon fluence rate를 측정 한 값들로서 10번을 실험하여 평균한 값들이다.

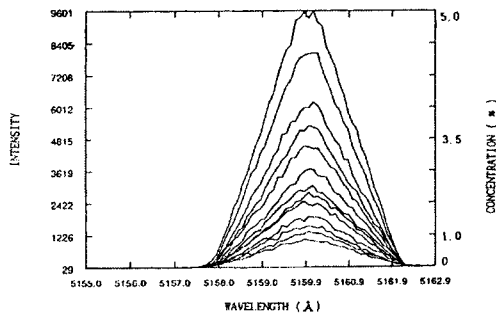


Fig. 7. Fluorescence spectra of phantom of Chlorophyll-a with different concentrations(mol/L) (a)  $10 \times 10^{-3}$ , (b)  $9 \times 10^{-3}$ , (c)  $8 \times 10^{-3}$ , (d)  $7 \times 10^{-3}$ , (e)  $6 \times 10^{-3}$ , (f)  $5 \times 10^{-3}$ , (g)  $4 \times 10^{-3}$ , (h)  $3 \times 10^{-3}$ , (i)  $2 \times 10^{-3}$ , (j)  $1 \times 10^{-3}$ .

Chlorophyll-a 농도가 증가함에 따라 형광세기 또한 증가함을 확인할 수 있다. 또한 Chlorophyll-a의 농도가 감소함에 따라 피크가 낮게 검출된 것은 광학적 파라미터 중에서 감소 계수  $\mu_t$ 는 29.063, 14.943, 10.358, 7.946, 6.500, 5.579, 4.902, 4.339, 3.923, 3.649  $\text{cm}^{-1}$  순으로 점점 작은 값으로 측정되었다. 이는 Beer법칙에서 벗어난 결과로서 광증감제의 농도가 진할수록 산란 입자의 증가나 충돌에 의해 에너지 흐름이 증가한 것으로 사료된다. 그리고 광증감제

인 Chlorophyll-a 농도가 증가함에 따라 측정된 광학적 파라미터들이 큰 값으로 나타난 것으로 볼 때, 세포 분열이 왕성한 종양세포에 광증감제의 흡착이 잘 되며 항균작용도 증가한다고 사료된다.

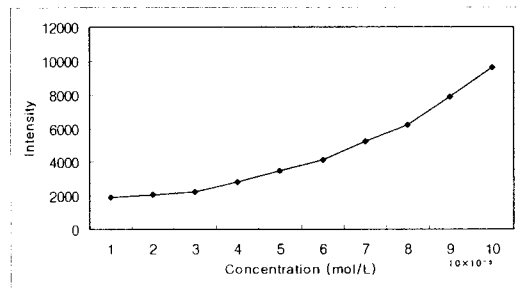
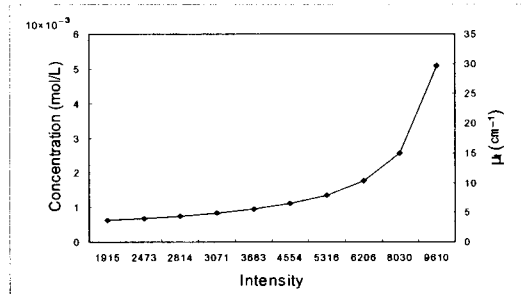


Fig. 8. The detected fluorescence intensity vs (a) attenuation coefficient( $\mu_t$ ), (b) concentration with Fig. 7.

Fig. 8에서 (A)는 감소 계수에 대한 형광세기를 Fig. 7에 의해 측정된 그래프를 도시하였고, (b)는 Chlorophyll-a의 농도에 대한 형광세기를 나타낸 그래프이다. 일반적으로 시료는 매질의 농도가 증가함에 따라 투광도(transmittance, T)는 감소하고 반사도(reflectance, R)는 증가하는데, 매질에서 레이저 에너지의 전체 흡광도는  $[1-(T+R)]$ 로 매질의 굴절률과 비례함은 물론 투광도가 증가하여 반사가 감소한다[8]. 따라서 각각의 스펙트럼에서 농도가 증가함에 따라 산란에 의해 축방향(on-axis)세기가 증가하고 full width half maximum(FWHM)은 감소하여 피크 모양이 날카로운 모양을 나타냈다. 이들에 대한 광학적 파라미터들은 Table 1과 같다.

Table 1에서 Chlorophyll-a 농도가 감소할수록 형광세기가 감소되었으며, 감소 계수 값도 낮은 값으로 나타났고, penetration depth는 증

Table 1. Measured Mean Values of Optical Parameters in Phantom of Chlorophyll a at 514.5nm Wavelength

species (medium, mol/L)	I	$\mu_t(\text{cm}^{-1})$	$\Upsilon(\text{cm})$	Depth(cm)
10 X 10 <sup>-3</sup>	9.610	29.063	0.003	1.00
9 X 10 <sup>-3</sup>	8.030	14.943	0.067	1.00
8 X 10 <sup>-3</sup>	6.206	10.358	0.097	1.00
7 X 10 <sup>-3</sup>	5.316	7.946	0.126	1.00
6 X 10 <sup>-3</sup>	4.554	6.500	0.154	1.00
5 X 10 <sup>-3</sup>	3.683	5.576	0.179	1.00
4 X 10 <sup>-3</sup>	3.071	4.902	0.204	1.00
3 X 10 <sup>-3</sup>	2.814	4.339	0.230	1.00
2 X 10 <sup>-3</sup>	2.473	3.923	0.255	1.00
1 X 10 <sup>-3</sup>	1.915	3.649	0.274	1.00

가함을 알 수 있었다. 이는 농도가 진해짐에 따라 진자의 평균 자유경로가 감소됨에 따라 형광이 증가한 결과로 나타남을 알 수 있다.

#### 4. 결론

Phantom 중에 매질의 농도가 증가함에 따라 투광도는 감소하나, 광학적으로 농도가 진하여 Beer법칙으로 부터 오차가 증가하고, 반면에 산란에서 광증감제인 Chlorophyll-a 농도가 증가함에 따라 형광세기가 증가하는 현상을 나타냈다. 또한 형광체의 형광 스펙트럼의 선모양과 광학적 파라미터들을 분석한 결과 산란 계수인  $\mu_s$ 값에 의해 영향을 받아 형광분배(fluorescence distribution)는 지수적 붕괴(exponential decay)의 정도에 따라 빠르게 나타났다. HPD의 재료는 사람의 혈액으로 대량 생산에 큰 제약이 따른다. 그러나 Chlorophyll-a는 조직 세포내로 투과력이 좋고, 자연계에서 대량으로 얻을 수 있으며, 항균작용이 우수한 약품으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 LIF에 의한 광증감제인 Chlorophyll-a의 광학적 파라미터를 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Chlorophyll-a 농도가 증가함에 따라 형광세기가 증가하였다.
2. Chlorophyll-a 농도가 증가함에 따라 산란세

기,  $\mu_s$ 가 증가하였다.

3. Chlorophyll-a 농도가 진해짐에 따라 감쇠 계수,  $\mu_t$ 가 큰 값으로 증가하였다.
4. Chlorophyll-a 농도가 진해짐에 따라 침투깊이가 감소하였다.

#### 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. 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. Poicard, C. J. Gomer, and A. E. Profio, Laser-Induced Hyperthermia of Ocular Tumors, *Appl. Opt.*, **28**(12), 2318 (1989).
10. 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).
11. K. Lee, 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. Soltt, 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. Tsuchiya, 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. A. A. Khan and M. Kasha, The Discovery of the Chemical Evolution of Singlet Oxygen, *International J. of Quantum Chem.* **XXXIX**, 251 (1991).
15. 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)