

Purple Membrane과 β -carotene에서 산란과 파동전파에 관한 연구

김기준[†] · 박태술 · 성완모

*대진대학교 공과대학 화학공학과
대진대학교 공과대학 환경공학과
(2016년 3월 4일 접수; 2016년 3월 18일 수정; 2016년 3월 23일 채택)

A Study on Wave Propagation and Scattering in Purple Membrane and β -carotene

Kim Ki-Jun[†] · Park Tae-Sul · Sung Wan-Mo

Dept of Chemical Engineering, Daejin, Uni. Pochun 487-711, Korea
Dept of Environmental Engineering, Daejin, University
(Received March 4, 2016; Revised March 18, 2016; Accepted March 23, 2016)

요약 : 무질서 매질에서 형광, 산란과 응집의 영향은 파장과 산란된 형광세기로 나타내는데, laser induced fluorescence(LIF) 분광학에 의한 분자특성으로 나타난다. 산란매질에서 광학적 효과는 광학적 파라미터들(μ_s , μ_a , μ_v)에 의해 표현되고 응집은 고-액상 분리공정과 Photodynamic therapy에서 중요하게 활용되고 있다. 따라서 입자가 서로 접근될 때 콜로이드 입자들의 상호작용을 LIF와 응집효과로 분석하였다. 우리는 레이저 광원에서 검출기까지 거리의 함수에 의해 in vitro 시료의 산란과 형광 스펙트럼을 측정하였다. 산란계수 μ_s 는 산란체의 입자가 증가함에 크게 나타났다. 그리하여 purple membrane vesicle과 β -carotene의 혼합물의 매질에서 광원에서 검출기에 의한 거리에 대한 측정된 값 (I , δ)이 거리가 가까워짐에 따라 크게 나타났다.

주제어 : 빛 산란, 레이저유도형광, 광학적 파라미터, 응집, 광역학적 치료

Abstract : The influences of fluorescence, scattering, and flocculation in random media 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(μ_s , μ_a , μ_v). Flocculation is an important step in many solid-liquid separation processes and is widely used in Photodynamic therapy. The interactions of several colloid particles can come into play which have major effect on the flocculation and LIF process. We measured scattering and fluorescence spectra of the sample in vitro as function of distance from lase source to detector. The value of scattering coefficient μ_s is

[†]Corresponding author
(E-mail: kjkim@daejin.ac.kr)

larger by the increasing particles of scatterer. Therefore, the mixture of purple membrane vesicle and β -carotene were measured as larger values(I, δ) by means of closer distance from source to detector.

Keywords : light scattering, laser induced fluorescence, optical parameters, flocculation, photodynamic therapy

1. 서론

예전에는 혼탁 물질계에서 산란, 흡수계수의 물리적 의미가 불확실하였으나, laser 등의 발명과 분광학 분석에서 산란 횡단면과 흡수 횡단면 [1-2]에 의해 광학적 매개변수의 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 [3-4]. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 항암제를 종양조직에 선택적으로 수송하여 치료함은 물론, 정상조직에는 영향을 미치지 않게 하는 연구들이 많이 수행되고 있는 실정이다[5]. Dougherty 등이 광역학적 치료(photodynamic therapy : PDT)에서 인체에 발생하는 많은 종양에 대한 새로운 치료 모델링[6]을 제한하였으나, 지금까지 이 분야에 대한 연구는 아직 초기 단계에 있다. 본 연구는 이 분야가 급격히 발전하게 될 LIF spectroscopy의 생의학 응용에서 종양의 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 광 조사량에서 PDT의 임상실험과 광생물학 등의 여러 분야에 응용함에 있어서 살아 있는 세포조직에서 산란 및 뭉침의 측정은 광학적 특성을 결정하는 데 가장 중요하다[7]. 따라서 현대의학에서 해결하지 못하고 있는 질병들에 대한 치료 모델의 접근방법이다. 암의 정복에 문제가 되는 것은 항암제의 대부분이 높은 독성을 가지고 있으며, 부작용이 정상세포에 크게 작용하여 후유증이 매우 크다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 항암제를 종양 조직에만 선택적으로 수송하여 치료효율을 증대

시키는 것이다.

이는 유도 고분자(targeting antitumor agents)인 purple membrane vesicle은 광증감제(photosensitizer)로서 특정파장의 형광을 발생시켜, 종양조직에의 선택적 축적과 위치확인을 할 수 있으며 광활성화 작용에 의해 종양조직을 괴사시키는 중요한 역할을 한다. 그리고 분광분석에서 Beer의 법칙이 적용되기 어려운 "광학적으로 시료농도가 진한" 상태인 문제점들을 극복하고자 레이저, 검출기, 광섬유 및 단색화 장치 등을 연결한 LIF 분광법은 실시간 분석(real time)과 현장분석(in situ)을 가능하게 하였다[8-9]. 또한 본 연구는 혼탁매질에서 형광체, 응집체 및 산란체의 시료를 이용하여 광원에서 검출기까지의 위치에 따른 빛이 혼탁매질에서 확산과 이동으로 변화하는 현상을 PDT에서 매우 중요한 산란세기, 형광세기와 종양부위에 침투하는 빛의 침투깊이에 따른 광학적 매개변수와 입자크기를 측정하였다.

2. 실험

본 실험에서 형광체는 Purple membrane vesicle로서(Acos Co., USA)를 사용하였으며, 단일파장 모드의 argon ion laser(Coherent Co., model No. Innova70, USA)를 이용하여 520 부터 900 nm 사이의 형광을 측정하였다. Fig. 1은 Purple membrane vesicle의 분자구조는 방향족 화합물이며, Laser beam는 산란체(Vesicle, Aldrich. Co., USA), 응집체는 양이온 전해질(Stamfords Co., Cytec, USA), 광섬유(Diameter : 4 mm)로 측정된 빛을 모아서 광전 증배관(photomultiplier tube)에서 검출하며, 광자 계수기로 광자세기를 측정하였다. 실험 장치는 Fig. 1과 같다.

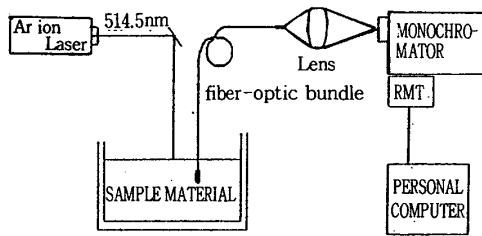


Fig. 1. Diagram of experimental apparatus.

또한 연속파(continuous wave, CW)인 argon laser를 사용하여, Dye laser(Coherent Co., model No CR-599, USA)를 synchronic 펌핑하였다. 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, 50 cm focal length, 1800 groove/mm)에 입사하는데, Monochromator의 파장은 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 °C에서 실험하였다. 또한 디지털 광도계 (SPEX Co., model No. 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 Aquisition Board, National Instrument Lab-PC) 등을 연결, 컴퓨터 계간 시스템을 구성하여, 300 rpm과 10분동안 교반하여 만든 산란체, 형광체, 응집체의 시료를 변화시켜가면서 매질의 산란계수를 측정하였다. 레이저 광원과 검출기인 광섬유까지의 광세기를 측정하는 정밀 측정기기인 XYZ stainless steel multi axis stage(Newport Co., model No. M-TSX-1A, USA)를 이용하여, 시료에서 LIF에 따른 산란과 형광세기를 조사하였다. 본 실험에서 사용된 용매는 이차 증류수를 사용하여 흡광계수(μ_s), 산란계수(μ_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 module은 6개로 구성되어 있고, 길이 10.9 cm, 막표면은 20 cm²이며, 공극크기는 0.2 μm인 정밀 여과막을 사용하여 실험하였다.

본 연구실험에서 PDT의 매우 중요한 광학적 파라미터는 다음 공식으로 유도되며, 광자는 매질의 입자들에 의해 탄성적으로 산란이 되거나 흡수된다. 다음은 forward와 backward의 phase function을 고려한 Two-flux 이론이다[10].

$$\begin{aligned} dI_{(z)} &= -K_{km}I_{(z)} dz - S_{km}I_{(z)} dz + S_{km} J_{(z)} dz \\ -dJ_{(z)} &= -K_{km}J_{(z)} dz - S_{km}J_{(z)} dz + S_{km} I_{(z)} dz \end{aligned} \quad \dots\dots(1)$$

윗 식에서 I와 J는 forward, backward의 산란된 광자 fluxes이고, K_{km} 와 S_{km} 는 Kubelka - Munk의 흡수와 산란 계수이다. Kubelka - Munk 흡수와 산란 계수는 물질층의 확산되는 반사 R과 투과도 T에 관계 된다.

$$R = \frac{\sinh(S_{km} y t)}{x \cosh(S_{km} y t) + y \sinh(S_{km} y t)} \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$T = \frac{y}{x \cosh(S_{km} y t) + y \sinh(S_{km} y t)} \quad \dots\dots\dots(3)$$

t는 시료의 두께이며, 다음과 같이 나타낸다.

$$S_{km} = \frac{1}{y t} \ln \frac{1 - R(x-y)}{T} \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$K_{km} = (x-1) S_{km} \quad \dots\dots\dots(5)$$

$$x = \frac{1 + R^2 - T^2}{2R} ; y = \frac{1 - R^2 - T^2}{2R} \quad \dots\dots(6)$$

최근 혼탁 매질에서 S_{km} 와 K_{km} 의 분포를 빛의 광자인 입자로 간주하고, 이를 이동 이론에 의해 설명하였다. Ishimaru는 확산이론(diffusion theory)에 의한 광자이동 식[11-12]을 다음과 같이 나타내었다.

$$(s \cdot \nabla_r) L(r, s) = -\rho \sigma_t L(r, s) + \frac{\rho \sigma_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(s, s') L(r, s') d\omega' \dots\dots(7)$$

상기 식에서 L(r,s)는 단위 벡터에 의한 방향에서 거리 r의 radiance (W m⁻² sr⁻¹ Hz⁻¹)이고, ρ는 단위 부피당 산란 입자의 수(mm⁻³)를 나타내며, σ_s는 단일 입자의 산란 횡단면(mm²), σ_a는 단일 입자의 흡수 횡단면(mm²)를 의미하고, σ_t(= σ_s + σ_a)는 전체 횡단면(mm²)를 나타내며, 단일 입자에서 albedo(ω₀ = σ_s / σ_t)와 p(s,s')는 s'방향에서 s(sr⁻¹)으로 산란되는 광자 흐름의 상함수를 의미한다. 경계조건에 의해 상함수를 규격화하면,

$$\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(s, s') d\omega' = \omega_0 \dots\dots(8)$$

로 나타나고, 여기서, dω'는 solid angle(sr)이며, μ(= s·s')는 단위 벡터 s와 s'사이 각도로서 산란 각을 의미하고, 상함수는 다음 식으로 주어진다.

$$p(\mu) = \omega_0 (1-g^2)(1+g^2-2g\mu)^{-3/2} \dots\dots(9)$$

(9)식은 Mie scattering을 고려한 phase function으로 Henyey-Greenstein이 유도한 식으로 μ와 ω₀의 함수이며, 물리적으로 산란 입자가 임의로 방향성을 갖는 의미이다. 여기서, 산란의 anisotropy에서 산란각의 평균 cosine은 g로 서술되는데, g가 1일 때 앞쪽에 피크가 나타나고, g = 0에서는 등방 상태이며, g = - 1일 경우 뒤쪽에 피크가 나타나는 산란상태를 의미한다. 광자 이동식으로부터 산란계수와 흡수계수를 계산하는 식은 아래와 같이 유도할 수 있다.

$$I(r) = I_0(r)\exp(-\mu_t d), \text{ or } \mu_t = -(\ln I/I_0) / d \dots\dots(10)$$

상기 식에서 감쇠계수(attenuation coefficient)는 μ_t = μ_a + μ_s 이고, d는 거리를 의미한다.

3. 결과 및 고찰

산란체인 β-carotene의 산란계수를 측정하기 위해 β-carotene의 농도변화에 따라 산란되지 않은 빛의 양을 측정하였으며, Added Absorber Technique[13]을 사용하여 얻은 감쇠 계수(μ_t = ρσ_t)는 산란 입자에 의한 산란 계수(μ_s)에 잘 일치한다[14]. 전체 감쇠 계수측정은 단일입자 산란만이 일어나는 농도에서 실험하였고, 산란되지 않고 나오는 광자를 검출하기 위해서 아이리스를 사용하였다. Fig. 2는 농도변화에 대한 측정되어진 빛의 형광세기를 보여준다. 이 값들은 재현성 있게 실험하여 평균한 값들이며, μ_s를 측정하기 위한 공식은 다음과 같다.

$$I = I_0 \exp(-\mu_s \cdot c \cdot d) \dots\dots(11)$$

여기서 c는 농도를 의미하고, d는 시료통의 직경, I는 반사 irradiance(W/m²), I₀는 입사 irradiance를 의미한다. 여기서, μ_s는 다음 식으로 나타낸다.

$$\mu_s = \frac{1}{d} \frac{\partial \ln (I/I_0)}{\partial C} \dots\dots(12)$$

Fig. 2에서 측정한 값들은 Table 1과 같다. Table 1에서 농도가 묽을수록 강한 forward 방향으로 투과가 일어났고, 반면 농도가 진할수록 산란에 의해 on-axis intensity가 크게 작아짐을 알 수 있었다. 이는 농도가 진해짐에 따라 탐색기에 닿는 비율이 적어짐을 뜻하는데, 산란입자가 매질 속에서 증가함에 따라 산란이 증가됨을 알 수 있었다. 또한 산란이 증가함에 따라 MFP(mean free path)가 커지고, on-axis의 투광도는 증가하였다[14]. Fig. 3은 형광체인 Purple membrane vesicle이 산란체인 β-carotene 용액 속에 함유된 시료 속에서 argon ion 레이저로 형광세기를 측정한 것이며, 광원과 검출기에 따른 시료의 농도변화에 대한 photon fluence rate를 측정한 값들이다. 광원과 검출기의 측정거리가 1cm, 2cm, 3cm, 4cm일 때 각각의 형광세기는 6023, 4578, 3429, 3016으로 측정되었다. 이는 Purple membrane vesicle과 β-carotene이 혼합된 용액 매질상태에서 광원에서 검출기의 거리에 따라 검출기에 닿는 광자가 많아짐에 따라 형광 세기가 크게 나타났다. 위 결과로부터 광자의

분포를 조사하면 각 β -carotene 산란매질에서 Purple membrane vesicle의 형광세기를 측정하면 Transport Theory에 의해 광학적 파라미터에 의해 형광세기 등의 파라미터를 구할 수 있었다.

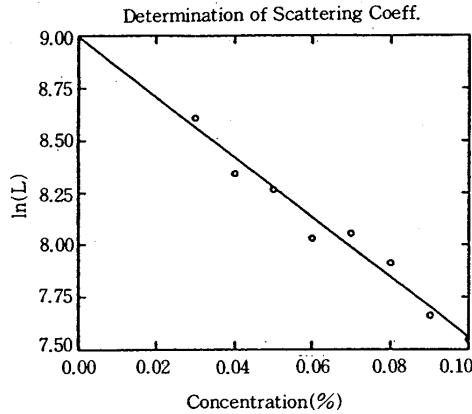


Fig. 2. Transmitted light as a function of the concentration of Purple membrane vesicle in β -carotene.

Table 1. Measured mean values of optical parameters of the concentration of Purple membrane vesicle in β -carotene

species(conc, M)	I	μ_s
3×10^{-2}	5472.60	0.036
4×10^{-2}	4197.55	0.061
5×10^{-2}	3883.34	0.071
6×10^{-2}	3074.21	0.094
7×10^{-2}	3149.55	0.097
8×10^{-2}	2928.17	0.104
9×10^{-2}	2732.96	0.131

Table 2. Measured mean values of the optical properties of β -carotene + Purple membrane(PM) vesicle

Species(media)	I	μ_t	δ	distance(r)
β -carotene + PM vesicle	6,023	20,565	0.049	1.0cm
β -carotene + PM vesicle	5,271	10,416	0.096	2.0cm
β -carotene + PM vesicle	3,767	7,168	0.139	3.0cm
β -carotene + PM vesicle	3,203	5,457	0.183	4.0cm

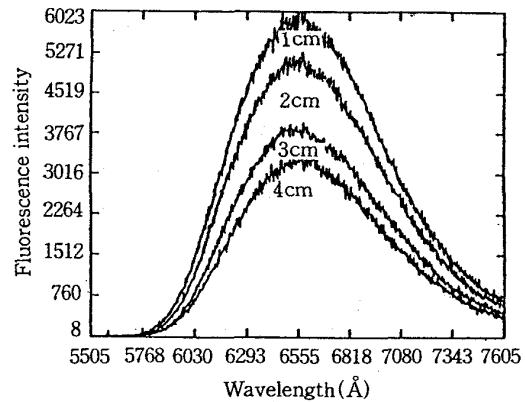


Fig. 3. Fluorescence lineshapes of phantom as a function of distance from dye laser to detector in mixture of Purple membrane vesicle and β -carotene.

Table 2는 Fig. 3에서 측정된 값들을 자세하게 나타내었다.

Fig. 4는 300rpm, 10분 동안 교반한 다음, Hollow fiber module에 의한 정밀여과를 통과한 시료의 입자 크기에 대한 응집된 부피를 측정하였다. (a)는 Purple membrane vesicle 10 wt%이고, (b)는 Purple membranr vesicle 15 wt%의 입자크기를 측정하여 도시된 그림이다. 여기에서 Purple membrane vesicle의 농도가 증가함에 따라 입자 직경은 커졌으나 부피%는 작아짐을 알 수 있었다. (c)는 β -carotene 15 wt%이며, (d)는 β -carotene 10 wt%으로 측정된 입자크기인데, β -carotene의 농도가 증가함에 따라 부피%는 증가하였으나 입자 크기는 거의 비슷한 결과 나타났다. 이는 산란세기와 감쇠계수가 크게 나타났으며, 침투깊이($\delta = 1 / \mu_t$)는 감소함을 알 수 있었는데, 에너지 크기에 의한 penetration

depth가 큰 결과로 사료된다. 그리하여 조직 속에서 단파장보다 장파장에 의해 빛이 더 깊게 시료에 침투하여 PDT 효과가 크리라 본다. Table 2는 Fig. 3와 동일조건하에서 β -carotene + Purple membrane의 시료에 광원과 검출기까지의 거리에 대한 함수로 측정된 광학적 파라미터들이다. attenuation coefficient, penetration depth와 빛이 시료에 입사하여 penetration depth에 일치하는 위치에서 광자 축적에 따른 공간적 방사 fluence의 광자 발견확률 $\rho = (I \text{ wavelength}/\text{penetration depth})$ 를 나타냈다. 감쇠계수를 첨가한 vesicle에서 각각 광학적 매개변수들을 측정하여 나타내었다. 이는 단위면적, 단위질량 당에 산란분자의 물질수지가 수소결합을 형성하고 정전기적 힘이 작용하여, 분자표면간의 접촉으로 분산력이 발생하고 전자의 이동으로 결합된 현상이다 [15]. Beer법칙에서 벗어난 결과로서 산란체의 입자가 많을수록 광자 세기가 증가하였고, 이는 뒤쪽에 피크가 나타나는 반사의 영향이라고 사료된다.

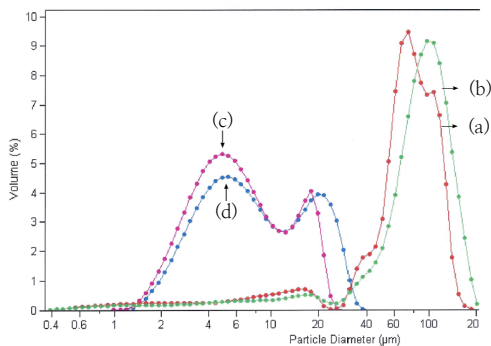


Fig. 4. Particle size distribution after flocculation with (a) Purple membrane vesicle 10 wt%, (b) purple membrane vesicle 15 wt%, (c) β -carotene 15 wt%, (d) β -carotene 15 wt%.

4. 결론

본 연구에서 LIF에 의한 β -carotene, Purple membrane vesicle에 의한 광학적 파라미터를 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 산란매질에 레이저 광이 입사됨에 따라 광자

를 검출하는 광섬유까지의 산란세기는 β -carotene 농도가 증가함에 따라 산란세기가 크게 나타났다..

2. 광자 축적에 따른 공간적 침투에 대한 광자의 발견확률, 침투거리(δ)는 PDT에 활용할 수 있는 β -carotene + Purple membrane vesicle에서 광원에서 검출기까지의 거리가 4.0 cm일 때 가장 크게 나타났다.
3. 빛의 파장에 의해 광자의 확산과 열적반응을 동침과 정밀여과 공정을 거친 후에 입자크기 분포에서 I 가 증가하면 μ_t 가 비례하여 증가하나, δ 는 감소하였으며, ρ 는 증가하였다.
4. β -carotene의 농도 wt %가 증가함에 따라 부피%가 증가하였고, Purple membrane vesicle의 농도 wt%가 증가함에 따라 입자 크기는 증가하였으나 부피%는 감소한 것으로 측정되었다.

References

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 Time-resolved 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. 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).
 14. 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).
 15. S. R. Wickramasinghe, Y. Wu, and B. Han, Enhanced Microfiltration of Yeast Flocculation, *Desalination*, **147**, 25(2002).