

L- α -Phosphatidylcholine 매질에서 빔산란에 의한 Methotrexate의 측정

김기준[†] · 이주엽

대진대학교 공과대학 화학공학과
(2013년 5월 16일 접수; 2013년 6월 28일 수정; 2013년 6월 28일 채택)

Measurement on the Methotrexate in L- α -Phosphatidylcholine Media by Light Sacttering

Ki-Jun Kim[†] · Joo-Youb Lee

*Department of Chemical Engineering, Daejin University, Poch 487-711, Korea
(Received May 16, 2013 ; Revised June 28, 2013 ; Accepted June 28, 2013)*

요약 : Methotrexate의 영향은 혼탁매질에서 형광체, 산란체와 응집수체에 의해 파장과 산란된 형광 세기로 규명되는데, laser induced fluorescence(LIF) 분광학에 의해 분자특성으로 나타난다. 산란매질에서 광학적 효과는 광학적 파라미터들(μ_s , μ_a , μ_t)에 의해 표현되고 응집은 고-액상 분리공정에서 중요하게 활용되고 있다. 따라서 입자가 서로 접근될 때 콜로이드 입자들의 상호작용을 LIF와 응집효과로 분석하였다. 산란계수는 산란매질, L- α -Phosphatidylcholine의 농도가 증가함에 따라 산란 광학적 파라미터가 증가하였으나 흡수 파라미터는 감소하였다. 광학적 파라미터들은 레이저 광원에서 검출기까지 깊이 함수에 의해 깊이가 깊어짐에 따라 산란세기가 기하급수적으로 감소함을 알 수 있다. 이는 유지화학, 생의학 생성물, 레이저 의학, 의공학 분야적용에 LIF와 입자이동 현상은 아주 적합한 모델 연구에 큰 도움이 될 것이다.

Abstract : The influences of Methotrexate as fluorophor, scatterer, absorber in turbid material by light scattering were interpreted for the scattered fluorescence intensity and wavelength, it has been studied the molecular properties by laser induced fluorescence spectroscopy. It has been found that the effects of optical properties in scattering media by the optical parameters(μ_s , μ_a , μ_t). The value of scattering coefficient μ_s is large by means of the increasing particles of L- α -Phosphatidylcholine, it has been found that the slope decays exponentially as a function of depth from laser source to detector. It may also aid in designing the best model for oil chemistry, laser medicine and application of medical engineering.

Keywords : *Methotrexate, L- α -Phosphatidylcholine, indiaink, fluorescence intensity, scattering media*

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

1. 서 론

농도가 진한 상태의 물질계에서 산란, 흡수계수의 물리적 의미가 불확실하였으나, laser 등의 강력한 광원의 발명과 reflectance 문제에 대한 분석에서, 산란 cross section과 흡수 cross section에 의해 optical parameters의 해석이 가능하게 되었다[1,2]. 페인트, 제지, 분필 등의 공장, 식물이나 동물의 조직세포 등에서, 또는 우리 생활 대부분 농도가 진한 혼탁 물질세계와 접하고 있다고 해도 과언은 아니다. 오늘날 종양에 대한 분자 생물학적인 연구와 면역학의 발전에 따른 원인과 치료법을 연구하고 있으나, 외과적인 수술시 종양조직을 완전히 제거하지 못할 뿐만 아니라 방사선 치료와 약물 요법에서 항암제의 대부분이 높은 독성을 가지고 있기 때문에 종양세포 뿐만 아니라 정상세포에도 작용하여 부작용을 줄 수 있다[3].

이러한 문제점을 해결하기 위하여 항암제를 암 조직에만 선택적으로 수송하여 치료함은 물론, 정상조직에는 영향을 미치지 않게 하려는 연구들이 많이 진행되고 있다[4]. Dougherty 가 Photodynamic Therapy (PDT)에서 인체에 생기는 많은 종양에 대해 새로운 치료 modelling[5]을 제한하였으나, 지금까지 이 분야에 대한 연구는 그 필요성 때문에 주로 생의학 분야에서 활발히 진행되고 있으나 아직 초기 단계에 있다. 따라서 본 연구는 이 분야에 대한 기초를 정립하고자 종양세포가 DNA합성 효소에 관여하는 조효소의 형성을 저해하는 Amethopterin으로 합성된다. 종양을 유발하는 화합물들은 여러 가지의 원인이 규명된 것 중에 석면가루를 오랫동안 들 어마시면 종양을 유발하는 것으로 알려졌는데, 이것은 화학적 성분 때문이 아니라 석면섬유의 크기와 형태가 문제가 된다는 것이 알려졌다. 중금속으로 Be, Cd, Cr, Ni, Pb 등이 시험동물에서 종양을 유발한다는 것이 밝혀졌다. 흡연은 폐암을 유발한다는 것이 알려져 있으며 코올타르 중의 벤조피렌이 피부암을 일으키는 것이 알려졌다. 염료중간체로 사용하는 2-나탈아민이 방광암을 유발하는 것이 알려졌고 살충효과가 있는 2-아세틸아미노플루오렌이 강력한 발암물질로 알려져 연구자들에게 실험용 발암물질로 사용되었다. 이러한 종양을 치료법에 공헌하는 연구개발에 기여하게 될 LIF spectroscopy의 biomedical 응용에서 종양의 진단 및 치료에 효과적으로 이용할 수 있

도록 모델링을 세우는 데 있다. 산란 매질에서 빛 에너지 전파가 diagnostic spectroscopy의 발전과 therapeutic laser delivery의 dosemetry에서, PDT의 임상실험과 photobiology 등의 여러 분야에 응용되나, 특히 살아 있는 조직에서의 비과격적 흡수 및 산란성질의 측정은 광학적 특성을 결정하는 데 가장 중요한 문제이다[6].

따라서 방사되는 빛의 정확한 량에 따라 조직에 전달된 빛 중에서 약간의 차이에 따라 효과적일 수도 있으며, 또는 비효과적, 치명적인 손상을 입히게 되는 치료가 될 수도 있다[7].

본 연구는 광원인 laser의 발달과 검출기(detector)의 발달, 또한 광섬유(optical fiber) 및 전자기기의 발달로 인해 LIF spectroscopy에 있어서 real time과 동시에 in situ spectroscopy를 가능하게 해 주었다. 그러나 실제의 in situ 상황은 Beer의 법칙이 적용되기 쉽지 않은 "optically thick"한 조건에 있다. Fluorescence spectroscopy에서 spectrum은 fluorophor, absorber 및 scatter 등의 농도, 위치 및 성질에 따라 spectra의 선 모양이 달라지게 된다[8]. 이는 빛이 scattering media에서 마치 확산하는 것처럼 움직이며 absorber에 의해 소멸되고, 또 fluorophor에 의해 생성되는 복잡한 과정을 거치기 때문이며, 따라서 우리는 빛의 경로에 따라 세기가 달라지는 현상을 분석할 수 있도록 optical parameters에 대한 측정방법을 고안하고, 측정하여 이들에 대해 고찰하였다. 그러므로 본 연구의 제 일차목적은 scattering media에서의 fluorescence spectral lineshape이 산란체, 형광체, 흡수체 등의 성질에 따라 optical geometry에 대한 토대를 세우는 것이다. 부차적으로 수반되는 목적은 laser와 광섬유와의 연결기술 개발, 또한 tumor부분에 약물전달계(drug delivery system) 현상[9] 등의 효율을 연구 개발하는 것이다.

2. 실험

인체의 세포조직은 lipid가 주성분으로 산란체로 L- α -Phosphatidylcholine(Sigma Co.)를 사용하였고, 항암제가 대부분 형광물질이기 때문에 형광체로 Methotrexate를 사용했다. 실험은 single line mode의 argon ion laser를 사용하였고(미국 Coherent Co., Innova70 파장 514.5 nm) 형광을 520 부터 900 nm 사이에서 측정하였다. Laser beam을 산란체(L- α

-Phosphatidylcholine), 형광체(Methotrexate), 흡수체(indiaink)가 들어 있는 모의 system에 입사시켜, 광섬유(4 mm 직경)를 사용하여 측정된 빛을 모아서 photomultiplier로 검출하며, photon counter로 photon intensity를 측정하였다. 실험 장치는 Fig. 1과 같다.

또한 continuous wave(CW) argon laser를 사용하여 dye laser(Coherent Co., CR-599)를 synchronous pumping하였으며, 염료는 RA-6G를 사용하였다. 산란된 빛은 광섬유를 통하여 neutral density filter를 지나 monochromator(SPEX, model 1870, 50cm focal length, groove 1800개/mm) 통과한다. Monochromator의 파장은 minidrive(SPEX, model 1872)로 작동하며, monochromator에 연결된 photomultiplier tube(Products for Research Co., model RCA 31034 A)의 thermal noise를 줄이기 위해 수냉식과 DC power supply(Product for Research Co., model TE104RF)를 이용하여 -20°C 로 유지하였다. 또한 digital photometer(SPEX, DPC-2), single photon amplifier discriminator(SPEX, model 453), photon counter (Stanford Research Co., SR400)를 이용하여 측정하였다. Data Aquisition Board(National Instrument Lab-PC)등을 연결한 computer interface system을 구성하여 L- α -Phosphatidylcholine, Methotrexate, indiaink의 농도를 변화시키면서 매질의 산란세기를 거리에 따라 실험하였다. Phantom을 담은 통은 표면반사, 투광도의 영향을 없애기 위해 크기 200 X 200 X 150 mm 인 검정색 phantom통을 사용하

였으며, laser source와 detector인 광섬유까지의 측정 위치를 micrometer가 부착된 Newport Co. 제품인 XYZ stainless steel multi axis stage(model M-TSX-1A)를 이용하여 phantom 통 위에서 정확히 LIF에 따른 산란과 형광세기를 조사하였다. Scattering coefficient, μ_s 와 absorption coefficient, μ_a 를 측정하여 광학적 파라미터를 구하였다.

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)를 사용하여 측정하였다.

3. Optical parameters of phase function

대부분 농도가 진한 혼탁 매질에서 빛의 분포는 빛을 광자인 입자로 간주하고, 이들의 transport 이론에 의해 설명한다. Ishimaru는 diffusion theory에 의한 transport 식을 다음과 같이 나타냈다[10].

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

윗 식에서 $L(r, \mathbf{s})$ 는 단위 벡터에 의한 방향에서 위치 r 에서의 radiance ($\text{W m}^{-2} \text{sr}^{-1} \text{Hz}^{-1}$)이고, ρ 는 단위 부피당 산란 입자의 수 (mm^{-3})를 나

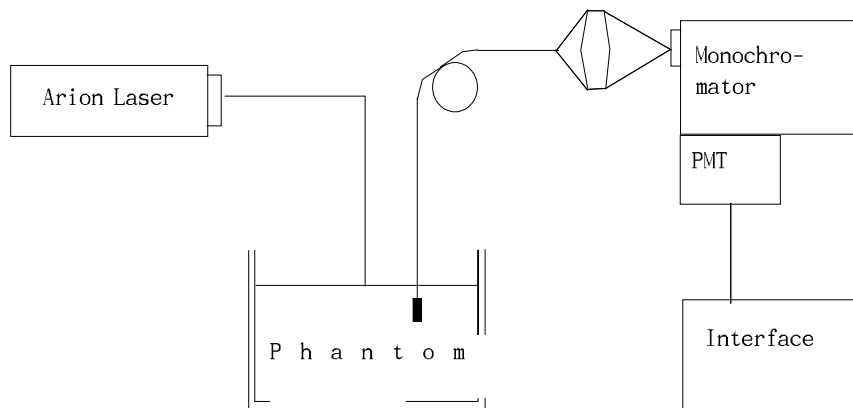


Fig. 1. Layout of experimental apparatus.

타내며, σ_s 는 single-particle의 scattering cross section(mm^2), σ_a 는 single-particle의 absorption cross section(mm^2)를 뜻하고, $\sigma_t (= \sigma_s + \sigma_a)$ 는 전체 cross section(mm^2)를 나타내고, $\omega_0 (= \sigma_s / \sigma_t)$ 는 single-particle의 albedo이고, $p(s, s')$ 는 s'방향에서 s(sr^{-1})으로 산란되는 photon flux의 phase function을 의미한다.

경계조건에 의해 phase function을 규격화하면,

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

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

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

(3)식은 Mie scattering을 고려한 phase function으로 Henyey-Greenstein이 유도한 식으로 μ 와 ω_0 의 함수이며 물리적으로 산란 입자가 random하게 방향성을 갖는 의미이다. 여기서, 산란의 anisotropy에서 산란각의 평균 cosine는 g 로 서술되는데 g 가 1일때 forwardly peak, $g = 0$ 에서는 isotropy, $g = -1$ 일 때는 backwardly peak의 산란상태를 의미한다.

Transport equation으로 부터 scattering coefficient와 absorption coefficient를 계산하는 방법은 (1)식으로 부터 아래와 같이 유도할 수 있다[11].

$$I(r) = I_0(r) \exp(-\mu_t d) \quad (4)$$

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

윗 식에서 attenuation coefficient, $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ 이고 d 는 depth를 의미한다.

4. 결과 및 고찰

산란체인 L- α -Phosphatidylcholine의 scattering coefficient를 결정하기 위해 L- α -Phosphatidylcholine의 농도 변화에 따라 산란되지 않은 빛의 양을 측정하였으며, Added Absorber Technique[12]를 사용하여 total

attenuation coefficient; $\rho\sigma_t$ 는 산란 입자만 존재하기 때문에 scattering coefficient에 일치한다. 전체 attenuation coefficient측정은 single scattering만이 일어나도록 하기 위해 매우 묽은 농도에서 실험하였고, 산란되지 않고 나오는 light detection의 각도를 작게 하기 위해 Iris를 사용하였다. Fig. 2는 농도 변화에 대한 빛의 세기를 나타낸 것으로 재현성있게 실험하여 평균한 값들이다. μ_s 를 측정하기 위한 공식은 다음과 같다.

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

여기에서 c 는 농도를 뜻하고, d 는 cuvette의 직경, I 는 irradiance (W/m^2), I_0 는 입사 irradiance를 뜻한다. 그러므로 μ_s 는 다음과 같으며,

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

Fig. 2에서 c vs $\ln(I/I_0)$ 의 기울기로 부터 얻은 μ_s 값은 Table 1과 같다. Table 1에서 농도가 묽을수록 강한 forward쪽으로 투과가 일어나고, 반면 농도가 진할수록 산란에 의해 on-axis intensity가 크게 작아짐을 알 수 있다. 이는 농도가 진해짐에 따라 detector에 닿는 비율이 적어짐을 뜻하는 데, 매질 층이 두꺼워짐에 따라 산란 세기가 증가함을 알 수 있었다.

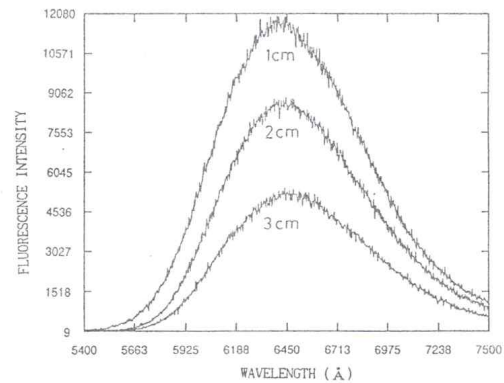


Fig. 2. Scattering spectra intensity according to a function of distance from source to optical fiber in (a) L- α -Phosphatidylcholine (b) Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine (c) Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine + indiatink.

Table 1. Measured mean values of optical parameters of L- α -Phosphatidylcholine

species(conc)	I	$\mu_s(\text{mm}^{-1})$
3×10^{-2}	15472.60	0.036
4×10^{-2}	14197.55	0.063
5×10^{-2}	13883.35	0.071
6×10^{-2}	13075.21	0.094
7×10^{-2}	13149.55	0.098
8×10^{-2}	12733.00	0.106
9×10^{-2}	12123.31	0.131
1×10^{-1}	8893.89	0.109

흡수체인 indiaink를 상온에서 농도별로, 흡수되지 않고 투과한 빛의 세기를 측정하여 도출한 것이며, 이에 따른 absorption coefficient 값은 Table 2와 같다.

Table 2. Measured mean values of optical parameters of indiaink

species(conc)	I	$\mu_s(\text{mm}^{-1})$
2×10^{-3}	4688.19	0.015
3×10^{-3}	3319.84	0.043
4×10^{-3}	3173.26	0.059
5×10^{-3}	2468.61	0.065
6×10^{-3}	2039.21	0.078
7×10^{-3}	1586.94	0.094
8×10^{-3}	1369.33	0.103
9×10^{-3}	968.69	0.121

Indiaink 농도가 진해짐에 따라 빛의 흡수가 많이 일어나서 투과된 빛의 intensity가 작으며 광자가 상호 작용하여 매질의 농도가 진해질수록 입자간의 거리, 즉 MFP(Mean Free Path)가 작아지며 on-axis 투과도 역시 작아짐을 확인하였다. 강력한 photodynamic agents 중의 하나인 항종양성 물질인 Methotrexate의 형광 spectrum을 나타낸 것이다. Methotrexate는 정상세포에 비해 세포분열이 왕성한 종양세포 및 종양세포가 전이된 세포에 특이적으로 결합하는 능력이 있으며, 자외선이나 빛을 쬐어 활성화시키면 특이한 형광을 발생하므로 종양 및 종양세포가 전이된 곳의 위치를 확인할 수 있다.

광활성 작용이란 어떤 물질이 빛을 흡수하여

산화될 수 있는 조건(oxidative condition: Methotrexate + light + oxygen)하에서 biological molecule system을 변화시키거나 파괴시키는 작용을 뜻하며 singlet oxygen에 의해 photodynamic therapy(PDT) 결과를 얻어낼 수가 있다[13]. Fig. 3은 항암제인 Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine, Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine + indiaink가 들어 있는 phantom속에서 산란 세기를 측정하여 도출한 것이다. Beer법칙에서 벗어난 결과로서 산란체의 입자가 많을수록 광자 세기가 증가하였고, 이는 backscattered retroreflectance의 영향이라고 사료된다.

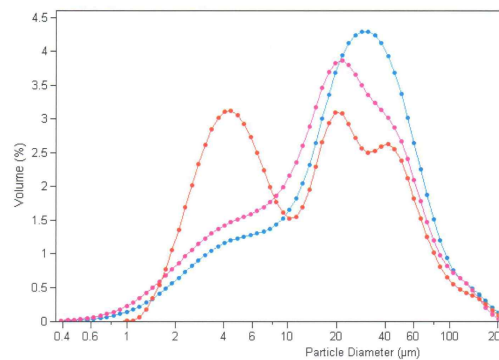


Fig. 3. The detected scattering light versus a function of distance from source to detector (a)Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine, (b)Methotrexate, (c)Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine + indiaink.

Fig. 3은 지질인 L- α -Phosphatidylcholine, 광증감제로 사용되는 항암제 Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine, (c)는 산란체, 형광체와 흡수체가 혼합된 시료인 Methotrexate + L- α -Phosphatidylcholine + indiaink에 대해 빛세기를 측정하여 나타낸 것이다. L- α -Phosphatidylcholine의 경우가 Methotrexate의 경우보다 깊이가 가까울수록 산란세기와 감쇠계수가 크게 나타났으며, 침투깊이($\delta = 1 / \mu_t$)는 감소함을 알 수 있었다.

응집된 양은 고체물질의 흡착매(adsorbent)의 단위면적, 단위질량 당에 흡착분자의 물질량이 수소결합을 형성하고 정전기적 힘이 작용하여, 분자 표면간의 접촉으로 분산력이 발생하고 전자의 이

Table 3. Experimental values of optical parameters in scattering media at 595nm wavelength

species, medium	I	μ_t (cm)	$\delta(1 / \mu_t)$	r
MT + PPC	3142	21.861	0.046	0.5 cm
MT + PPC	1126	11.959	0.084	1.0 cm
MT + PPC	489	8.529	0.117	1.5 cm
MT + PPC + II	6023	20.565	0.049	0.5 cm
MT + PPC + II	5271	10.416	0.096	1.0 cm
MT + PPC + II	3767	7.168	0.139	1.5 cm
MT + PPC + II	3205	5.457	0.183	2.0 cm

cf : Methotrexate; MT, L- α -Phosphatidylcholine; PPC, Indiaink; II

동으로 결합된 현상이다[13]. Beer법칙에서 벗어난 결과로서 산란체의 입자가 많을수록 광자 세기가 증가하였고, 이는 뒤쪽에 피크가 나타나는 반사의 영향이라고 사료된다.

Methotrexate는 산란체에 비하여 측정된 빛의 세기가 감소한 현상을 보이며, penetration depth도 약간 감소하였다. 이는 Methotrexate속에 형광성분이 함유되어 약물전달 효과가 크나, 산란효과가 작은 Methotrexate의 absorption coefficient는 산란체보다 더 크기 때문에 생긴 결과라고 사료된다. 또한 L- α -Phosphatidylcholine 농도가 증가하고, source와 detector의 거리가 가까울수록 μ_t 는 증가하고 penetration depth는 감소하였다. 이것은 세포 분열이 왕성한 종양세포에 광증감제의 흡착이 잘 이루어졌다.

5. 결 론

Cuvette 속에 있는 매질의 농도가 증가함에 따라 transmission은 감소하나, optically thick하여 Beer법칙으로 부터 오차가 증가하고, 반면 산란에서 L- α -Phosphatidylcholine농도가 증가함에 따라 intensity는 증가한 현상으로 나타났다. 또한 산란체, 형광체, 흡수체의 형광 스펙트럼의 선모양에서 optical parameter를 분석하여 보면, μ_a 값에 의해 영향을 크게 받아 fluorescence distribution은 exponential decay정도가 빠르게 drop이 된다. 따라서 absorption coefficient가 작을수록 광산란이 많아지며 산란된 빛과 광활성을 갖는 물질의 반응성이 증가된다. 반면 absorption coefficient가 클수록 산란보다는 빛의 흡수가 많이 일어나므로 광활성을 갖는 물질의 반응성은

줄어든다. Turbid 매질에서 source로 부터 detector까지 거리가 가까울수록 μ_a 는 증가하고, 빛이 시료를 통과하는 위치인 penetration depth가 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 대전대학교 학술연구비 지원에 의한 것임

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. Jacqu

- es, 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. 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).