

빔 분할기와 거울 쌍을 이용한 미량 시료 흡광도 측정 시스템 개발 Spectrophotometric Quantification System using a Beamsplitter and a Mirror pair

*이협, 류성윤, 오승렬, 김진환, 권원식, #김수현

*H. Lee, S. Y. Ryu, S. R. Oh, J. H. Kim, W. S. Kwon, #S. H. Kim(Soohyun@kaist.ac.kr)
한국과학기술원 기계공학과

Key words : Spectrophotometry, Absorption spectroscopy, Microvolume sample, Beamsplitter

1. 서론

흡광광도분석은 측정하고자 하는 시료에 빛을 투과 시켜 특정 파장에서의 흡광도를 측정 후 Lambert Beer 법칙을 적용하여 시료의 농도를 산출하는 분석법이다. 흡광광도 분석을 위해 광원, 회절격자, 시료 고정부, 광검출기 등을 이용해 만들어진 장치는 분광광도계라 한다.

분광광도계를 이용한 시료의 흡광도 측정 시에는 일반적으로 측정하고자 하는 시료에 대하여 정제나 추출 등의 전처리 과정을 거친 후 cuvette이나 capillary 등 광이 통과할 수 있는 용기에 시료를 담아 측정을 한다. 이 경우 용기 크기만큼의 정해진 부피를 채워야 하기 때문에 많은 양의 시료를 필요로 하여 시료의 낭비가 크다. 또한 시료를 투과하는 광경로가 용기의 광축 길이에 의해 큰 값으로 정해지기 때문에 농도에 따른 dynamic range가 좁아져 단백질 등의 흡광도가 높은 시료 측정에는 회색과정이 추가로 필요하다는 문제점이 있다. 이에 시료의 낭비 없이 수 μL 수준의 용액만을 사용하면서 짧은 광경로를 구현하여 고농도의 시료에 대해 회색 과정 없이 바로 측정할 수 있는 미량시료 흡광도 측정법에 대한 연구가 최근 주목받고 있다.[1,2]

본 연구에서는 빔 분할기와 거울 쌍만으로 구성되어 전체 시스템이 간단하고 정렬오차가 작으면서, 분광광도계의 시료 고정부에 삽입되어 미량 시료의 흡광도 측정이 가능한 Beamsplitter & Mirror pair 시스템 (BS-MR system)을 제안하였다. 또한 기준 시료로 과광간산칼륨을 사용하여 농도-흡광도 상관관계 및 가시광 영역 분광 스펙트럼 분석 실험을 통해 제안한 시스템을 검증하였다.

2. 미량 시료 흡광도 측정 BS-MR 시스템

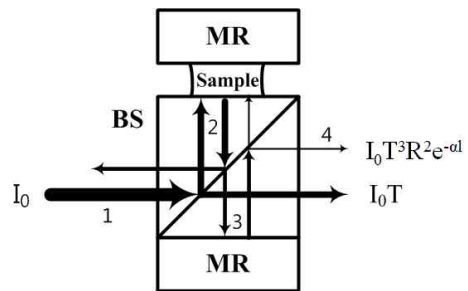


Fig. 1 Schematic of BS-MR system. 0: incident beam, 1: first splitted beam, 2: second splitted beam, 3: third splitted beam, 4: fourth splitted beam, BS: Beamsplitter, MR: Mirror, I_0 : incident beam intensity, T: Transmission of BS, R: Reflection of BS, αl : absorption coefficient of sample

Fig. 1은 본 광학 시스템의 구성이다. 알루미늄 지그를 포함한 전체 시스템은 분광광도계의 시료 고정부에 삽입 가능하도록 일반적인 cuvette 정도의 크기인 12.5mm x 12.5mm의 바닥 면적에 수 cm 높이로 제작되었다. 빔 분할기 중심축은 광경로에 일치하도록 하며, 두 거울의 반사면은 서로 마주 보도록 하여 빔 분할기의 위아래 면과 맞닿도록 위치시킨다. 분광광도계의 광원에서 출발하는 시스템 입사광은 빔 분할기의 분할 면에 의해 반사광과 투과광으로 나뉘게 되는데, 이 때 반사광 광경로 방향의 거울 면과 빔 분할기 면 틈 사이에 미량 시료가 위치한다. 시료 용액은 거울과 빔 분할기의 두 맞닿는 평행한 면 사이에서 표면장력에 의해 고정된다. 양면 사이의 두 배 거리만큼 시료의 absorption pathlength(왕복 투과)가 된다. 표면장력

에 의해 고정되므로 한 방울 정도 되는 수 μL 의 미량 액체 시료가 광경로 안에서 안정적으로 고정된다. 투과와 반사의 비율이 50:50인 빔 분할기를 사용할 경우 입사광의 절반가량은 빔 분할기를 곧장 투과하여 시료를 거치지 않고 바로 광검출기로 들어간다. 이 광량(Fig1.의 2번 빔에 해당)은 시료의 흡광도와 관계없이 항상 일정하기 때문에 시료 측정과 별도로 따로 측정하여 시료 흡광도 계산 과정에서 일종의 offset 성분으로 가정하여 제거한다. 위아래 거울 면에 의해 수평축 빔은 다중 반사를 일으키게 되며, 빔 분할기를 사이에 두고 다중 반사된 빔의 일부는 수평축으로 진행방향을 바꿔 시료 흡광정보를 가지고 광검출기로 향한다. 광검출기로 향하는 빔의 최소 투과, 최소 반사 횟수는 3회와 2회이며(Fig1.의 4번 빔), 그 이상의 다중 반사된 빔은 광량이 미약하여 무시할 수 있다. 광검출기로 측정된 광량을 분석, 미량 시료의 흡광량을 추산할 수 있다.

3. 시스템 검증 실험 결과

시스템의 신뢰성 판단을 위해 총 8 종류의 서로 다른 농도를 가지는 과망간산칼륨 용액(25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600ng/ml)을 시료로 하여 525nm 파장에서 흡광도를 측정하고 시료 농도-흡광도 사이의 상관관계를 구하였다. 또 450-650nm 파장 구간에 대해 흡광 스펙트럼을 측정하고 이를 일반 cuvette을 이용한 측정 결과와 비교하였다. 사용한 시료의 부피는 4 μL 이며, pathlength는 1mm이다.

흡광도와 농도 사이의 상관관계는 결정계수 R^2 이 0.9969로 나타났으며, 이는 가공 및 조립 공차에 의한 오차를 고려하면 매우 높은 값이다. 흡광 스펙트럼의 경우 cuvette을 이용한 측정 결과와 대체로 유사한 경향을 가졌으나, 450-500nm 파장 구간에 대해서는 다소 차이를 보였다.

4. 결론

미량 시료를 빔 분할기와 거울 면 사이에 위아래로 접하게 하여 표면 장력을 통해 고정함으로써 안정적으로 흡광도를 측정할 수 있는 소형 광학 시스템을 구성하였다. 고흡광 시료에 대해서도 회석 과정 없이 넓은 농도 범위에서 측정이 가능하며, 높은 신뢰성을 보였다. 향후 분광광도계에 삽입 가능한 미량 시료 측정 모듈로의 응용이 기대된다.

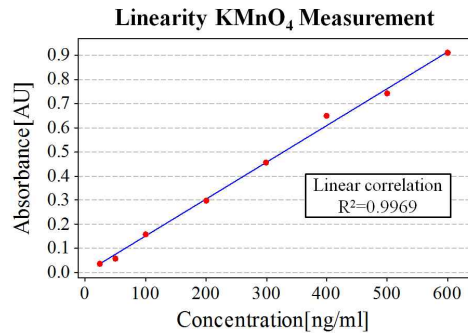


Fig. 2 Linearity as determined by measuring 8 concentration conditions of an KMnO_4 solution at 525nm with the beamsplitter & mirror pair system

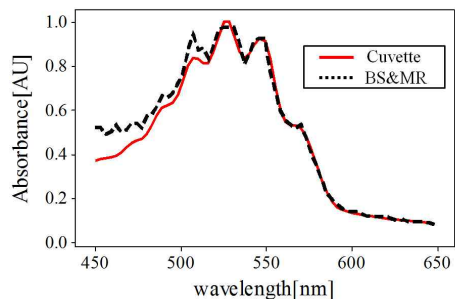


Fig. 3 Comparison of absorbance spectra of KMnO_4 with a conventional cuvette and the BS-MR system over a wavelength range from 450nm to 650nm

후기

본 연구는 메카시스 2011년 ‘Micro-volume spectroscopy 분석 장비 개발을 위한 기초연구’ 과제에 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. Francisco Pena-Pereira, Isabel Costas-Mora, Vanesa Romero, Isela Lavilla, Carlos Bendicho, "Advances in miniaturized UV-Vis spectrometric systems", Trends in Analytical Chemistry, **30**, 1637-1648, 2011.
2. Reena Kartha, Fabienne Trotier, Andrea Kreuz, Andrea Huber, "Spectrophotometric Quantification of Nano- and Standard-Volume Samples", Application Notes, American Biotechnology Laboratory, June/July, 2008.