

간섭성 반스톡스 라만 산란 현미경 후방 신호의 방사패턴에 관한 이론계산 연구

유용심[†]

한국표준과학연구원 기반표준부
Ⓣ 305-340 대전광역시 유성구 도룡동 1

조 혁

충남대학교 물리학과
Ⓣ 305-764 대전광역시 유성구 궁동 220

(2007년 8월 1일 받음, 2007년 8월 17일 수정본 받음)

높은 수치구경의 대물렌즈를 사용하는 간섭성 반스톡스 라만 산란 현미경(coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy)에서 폴리스틸렌구에서 발생한 신호의 먼거리장 방사패턴에 대한 이론적 계산 연구를 수행하였다. 극초점 조건에서 입사 레이저 광의 전기장 분포를 계산하였고, CARS 신호 생성원인인 비선형 분극(헤르치안 쌍극자) 방사의 간섭성 합을 통하여 먼거리장 방사 패턴을 계산하였다. 폴리스틸렌구의 크기에 따른 후방 방사패턴을 계산하였고, 1100 nm 직경을 가진 폴리스틸렌구와 폴리스틸렌 구껍질의 방사패턴을 비교하였다. 또한, 극초점으로부터 폴리스틸렌구의 중심이 이동함에 따른 방사패턴의 변화를 보였다.

주제어 : CARS, Microscopy, Radiation pattern

I 서 론

간섭성 반스톡스 라만산란 현미경(Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy, CARS microscopy) 은 화학 분자종과 생물 시료의 고분해능 고감도 3차원 이미징에 사용되고 있는 비선형 광기술이다.^[1-4] CARS 현미경 기술은 높은 수치구경(Numerical Aperture, NA)의 대물렌즈를 사용한다는 점에서 간섭성 반스톡스 라만 분광학(Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy)과 구분되며, 신호세기가 자발 라만 현미경의 신호세기보다 10^5 배나 크기 때문에 샘플을 이미징하는데 걸리는 시간을 그 만큼 단축시킬 수 있다는 장점이 있다.

간섭성 반스톡스 라만산란(Coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) 신호가 발생하려면 우선 적어도 두 개의 다른 주파수를 가진 펌프광과 스톡스광이 시료내에서 공간적으로나 시간적으로나 동시에 겹쳐있어야 한다. 시료는 충분한 크기의 3차 비선형 감수율을 가져야 한다. CARS 신호가 화학적 선택성을 가지기 위해서는 두 레이저의 주파수 차가 시료의 진동 라만 모드의 주파수와 일치해야 한다. 그리고 CARS 신호는 형광이나 자발 라만과 같은 비간섭성 신호들과는 달리 간섭 특성을 가지고 있으므로 신호 발생을 위해서는 위상정합조건(phase matching condition)을 만족해야 한다. 즉, 모든 방향으로 CARS 신호가 발생하는 것이 아니고 위상정합조건이 만족되는 방향으로만 신호가 발생하며 위상정합 정도에 따라 신호의 세기가 정해진다. 일반적으로 간섭성 반스톡스 라만 분광학에서는 파수벡터 부정합(wavevector-mismatch)

을 최소화하고 상호작용길이(interaction length)를 최대화 할 수 있는 boxcars^[5,6] 방식을 사용하여 특정 방향으로만 신호를 발생시켰으나, 높은 NA의 대물렌즈를 사용하는 CARS 현미경에서는 boxcars 방식의 공간분해능의 한계 때문에 주로 동일선 방식(collinear geometry)을 채택하여 사용하고 있다.^[7,8] 이 방식이 사용될 수 있는 것은 높은 NA의 대물렌즈에 의해 극초점(tight-focus)이 형성되고, 더구나 CARS 신호는 세 개의 광자에 의해 발생하는 것으로 신호 발생 가능 영역이 초점으로 한정되어 상호작용 길이가 파장 정도에서 위상정합조건을 쉽게 만족시킬 수 있기 때문이다.^[9-11] 그러나 이 방식은 CARS 신호를 특정방향으로만 발생시키지 못하므로 방사 패턴(radiation pattern)을 가지게 된다. CARS 신호의 방사패턴은 시료의 파장 분산특성, 크기와 형태에 따라 정해지는데, 파수벡터 부정합이 큰 후방 CARS(Epi-CARS) 신호는 특히 더 민감하게 반응한다. 이와 같이 비선형 간섭신호 발생 특성에 의해 달라지는 방사 패턴을 이용하면 시료의 크기 및 형태의 식별뿐 아니라 시료의 툴블링(tumbling motions)을 관찰하는데도 사용할 수 있을 것이다.^[9,12] 이러한 위상정합조건은 모든 비선형 간섭 신호 발생 과정에 적용되는데, 2차 조화파(SHG) 현미경을 사용한 논문에서 2차 조화파 신호의 각 방사 패턴(angular radiation pattern)이 입사광의 진행방향과 신호가 발생하는 평면의 기울기에 민감함을 보였다.^[13]

CARS 현미경에 대한 이론 연구는 CARS 신호의 방사패턴 뿐 아니라 3차원 CARS 이미징의 특성을 이해하기 위해서 필요하다. 이 전에 수행된 많은 이론연구 논문^[14-16]에서 사용한 근축 광선(paraxial ray)의 가정은 NA 값이 0.5보다 작은 경우에만 유효하기 때문에 최근에는 극초점 조건하에서의

[†] E-mail: ysyoo@kriss.re.kr

이론 연구가 수행되고 있다. 레이저 광의 회절 한계 초점 부피의 가정하에서 극초점에서의 CARS 신호발생 과정이 보고 되었으며,^[10] 샘플을 헤르치안(Hertzian) 양상블로 가정하고 그린 함수 방법(Green's function method)을 사용하여 샘플의 형태에 따른 먼 거리에서의 방사패턴^[9,17] 및 샘플의 직경에 따른 전방 CARS(Forward-CARS) 신호와 후방 CARS(Epi-CARS) 신호의 세기비에 대한 연구 등이 보고 되었다.^[18]

본 연구에서는 높은 수치구경 대물렌즈를 사용하는 간섭성 반스톡스 라만 산란 현미경에서 동일선방식으로 입사하는 펌프광과 스톡스광에 의해 폴리스티렌구에서 발생하는 먼 거리장 방사 패턴의 이론적 계산 연구를 수행하였다. 극초점 조건에서 입사 레이저 광의 전기장을 기술하기 위해 CARS 현미경을 포함한 레이저를 사용하는 현미경의 이론 계산에 사용되고 있는 각 스펙트럼 표현(angular spectrum representation)^[19]을 사용하였다. 샘플은 CARS 신호의 파장보다 작은 크기이나 많은 수의 유도 헤르치안 쌍극자들을 포함한 픽셀들로 이루어졌다고 가정하였으며, 픽셀 방사 신호들의 간섭성 합을 통해 먼 거리 방사 패턴을 구하였다. 폴리스티렌구의 크기에 따른 방사패턴의 변화를 계산하였고, 겉보기 형태는 같으나 내부의 형태가 다른 경우의 방사패턴의 변화를 보기 위해 속이 찬 폴리스티렌구와 속이 빈 폴리스티렌구껍질의 E-CARS 방사패턴을 계산하였다. 폴리스티렌 구의 위치 이동에 대한 방사패턴의 변화를 보기 위해 폴리스티렌 구의 중심을 극초점의 중심으로부터 이동하면서 방사패턴을 계산하였다.

II. CARS 현미경 이론

CARS 현미경은 높은 NA의 대물렌즈를 사용하기 때문에 근축 근사(paraxial approximation) 방법에 의한 기술이 유용하지 않으며, 회절이론에 근거한 각 스펙트럼 표현이 사용되고 있다. 이론 계산에서 CARS 신호의 방향성, 극초점 전기장의 공간분포, 샘플의 크기와 형태 그리고 굴절률 등 모든 조건을 고려한 계산은 너무 복잡하고 어렵다. 그러므로 계산을 단순화하기 위해 입사 레이저 광과 샘플에 대한 몇 가지 가정을 하였다. 첫째, 펌프광과 스톡스광은 모두 가우시안 세기 분포를 가졌으며 x축 방향으로 선형편광 되었다. 둘째, 이들은 동일선방식으로 샘플내에 입사하며 공간적으로나 시간적으로 겹쳐있다. 셋째, 샘플과 주위 물질의 굴절률은 같아 경계면의 효과는 무시할 수 있다. 넷째, 펌프광과 스톡스광은 근적외선의 파장이라서 샘플에서의 이광자 흡수등 전자의 여기에 의한 어떤 흡수도 일어나지 않는다. 다섯째, 샘플은 쌍극자들로 이루어진 많은 수의 픽셀들로 구성되어 있으며, 각 픽셀의 크기는 파장보다 작지만 많은 수의 헤르치안 쌍극자들이 포함될 정도로 크다. 픽셀들은 샘플과 주위 물질내에서 균일하게 분포되어 있으며 각 픽셀내에 존재하는 쌍극자들은 동일 위상을 갖는다.

그림 1은 계산에 사용되는 좌표와 변수들의 정의를 보여준

다. 여기서 p_n 은 n 번째 픽셀을 나타내며, q_m 은 CARS 신호를 측정하는 이미지구(image-sphere) 상의 m 번째 픽셀이다. E-CARS의 경우 신호가 후방으로 발생하므로 초점구(focal-sphere)가 이미지구의 역할을 하게 된다. 여섯째, 이미지구 또는 초점구의 반경인 R 은 대물렌즈의 초점거리 f 와 같다. r' 은 초점으로부터의 거리이다. 최대거리는 일반적으로 초점부피의 축상 거리(axial length)의 절반 또는 펌프광의 파장과 유사하다. 이런 가정하에서 p_n 와 q_m 사이의 거리 r 은 $|R - R \cdot r' / f|$ 로 근사할 수 있다.

극초점 근처에서의 전기장은 구좌표계 (r', θ', ϕ') 내에서 각 스펙트럼 표현으로 다음과 같이 기술될 수 있다.^[19]

$$E(p_n) = -ikf \int_0^{\alpha_{\max}} l(\alpha) e^{iks \cdot r'} \sin \alpha d\alpha, \quad (1)$$

여기서 k 는 물질내에 파수이고 f 는 초점거리이다. $l(\alpha)$ 는 초점에서 방위각에 대칭인 기하학적 광학구획에 의해 계산된 입사광의 전기장이다. s 는 입사광의 진행방향 단위벡터이다. α_{\max} 는 입사광의 최대 입사각으로 대물렌즈의 수치구경(NA)와 물질의 굴절률(n)에 따라 $\alpha_{\max} = \sin^{-1}(NA/n)$ 로 정해진다. 식 (1)을 사용하여 x축 방향으로 선형 편광된 펌프광의 전기장 성분을 직각 좌표로 쓰면,

$$\begin{aligned} E_{px}(r') &= \frac{ik_p f}{2} (I_0 + I_2 \cos 2\phi'), \\ E_{py}(r') &= \frac{ik_p f}{2} I_2 \sin 2\phi', \\ E_{pz}(r') &= -k_p f I_1 \cos \phi'. \end{aligned} \quad (2)$$

여기서 I_0, I_1, I_2 는 다음과 같다.

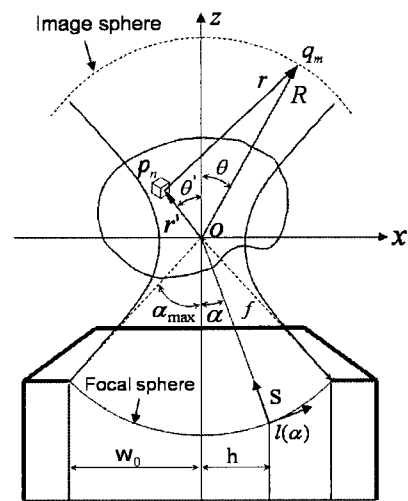


그림 1. 높은 수치구경을 가진 대물렌즈에 의한 극초점에서의 입사광의 전기장분포와 CARS 신호를 계산하기 위해 사용되는 변수의 정의.

$$\begin{aligned}
 I_0 &= \int_0^{\pi} l_p(\alpha) \cos^{1/2} \alpha \sin \alpha (1 + \cos \alpha) J_0(k_p r' \sin \alpha \sin \theta') e^{ik_p r' \cos \alpha \cos \theta'} d\alpha, \\
 I_1 &= \int_0^{\pi} l_p(\alpha) \cos^{1/2} \alpha \sin \alpha J_1(k_p r' \sin \alpha \sin \theta') e^{ik_p r' \cos \alpha \cos \theta'} d\alpha, \\
 I_2 &= \int_0^{\pi} l_p(\alpha) \cos^{1/2} \alpha \sin \alpha (1 - \cos \alpha) J_2(k_p r' \sin \alpha \sin \theta') e^{ik_p r' \cos \alpha \cos \theta'} d\alpha,
 \end{aligned}
 \tag{3}$$

여기서 J_n 은 차수 n 인 베셀함수이다. k_p 는 펌프광의 파수벡터로 $2n_p\pi / \lambda_p$ 의 값을 가지며, n_p 는 펌프파장 λ_p 에서 샘플의 굴절률이다. $l_p(\alpha)$ 는 각도 α 에서 전기장의 세기로 입사 펌프광의 총전기장 세기 l_{p0} , 빔허리 w_0 와 펌프광의 중심에서부터의 거리 h 의 함수로 $h = f \sin \alpha$ (Abbe sine condition)을 만족하는 가우시안 함수, $l_p(\alpha) = l_{p0} \exp(-h^2(\alpha)/w_0^2)$ 이다. 스톡스광의 전기장은 모든 수식에 첨자 p 대신 s 를 붙이면 된다.

극초점에서 펌프와 스톡스의 전기장은 p_n 에서 반스톡스 주파수 $\omega_{as}(=2\omega_p - \omega_s)$ 를 가진 3차 비선형 분극 $P^{(3)}(\omega_{as}, r')$ 을 유도한다.

$$P_n^{(3)}(\omega_{as}, r') = \chi^{(3)}(\omega_p - \omega_s) E_p^2(r') E_s^*(r'), \tag{4}$$

여기서 $\chi^{(3)}(\omega_p - \omega_s)$ 은 3차 비선형 감수율이다. 입사된 펌프광과 스톡스광에 의해 유도된분극을 가진 픽셀들은 펌프광과 스톡스광의 위상들에 의해 위상이 결정되는 헤르치안 쌍극자 방사체로써 행동한다. 위의 여섯째 가정에 따라 p_n 로부터 q_m 에 기여하는 CARS 전기장은 다음과 같이 쓸 수 있다.^[18,20]

$$E_{mn}^{as}(R) = \frac{\omega_{as}^2}{c^2} \frac{e^{i(k_{as}R - k_{as}R' / R)}}{R} M \cdot P_n^{(3)}(r'), \tag{5}$$

여기서 M 은 구좌표계로의 투사행렬(projection matrix)로 다음과 같다.

$$M \begin{bmatrix} \hat{R} \\ \hat{\theta} \\ \hat{\phi} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 \\ \cos \theta \cos \phi & \cos \theta \sin \phi & -\sin \theta \\ -\sin \phi & \cos \phi & 0 \end{bmatrix}, \tag{6}$$

여기서 \hat{R} , $\hat{\theta}$, $\hat{\phi}$ 는 CARS신호의 구면 극좌표계의 단위 벡터이다. x 축 방향으로 선형 편광되었으며 가우시안 세기 분포를 가진 펌프광과 스톡스광이 높은 NA값을 가진 대물렌즈에 의해 집속되는 경우, 초점 근처에서 이들의 y 축과 z 축 성분의 전기장들은 x 축 성분에 비해 작아 3차 비선형 분극은 단지 x 축 성분만을 가진다고 가정할 수 있다.^[9]

$$P_{nx}^{(3)}(\omega_{as}, r') = 3 \chi_{1111}^{(3)}(\omega_p - \omega_s) E_{px}^2(r') E_{sx}^*(r'), \tag{7}$$

여기서 $\chi_{1111}^{(3)}(\omega_p - \omega_s)$ 는 3차 비선형 감수율 텐서로써 다음과 같이 기술될 수 있다.^[21]

$$\begin{aligned}
 \chi_{1111}^{(3)}(\omega_p - \omega_s) &= \chi_R^{(3)}(\omega_p - \omega_s) + \chi_{NR}^{(3)} \\
 &= \frac{S_R}{\Omega_R - (\omega_p - \omega_s) - i\Gamma_R} + \chi_{NR}^{(3)},
 \end{aligned}
 \tag{8}$$

여기서 $\chi_R^{(3)}(\omega_p - \omega_s)$ 는 라만 천이에 의한 공명항이고, $\chi_{NR}^{(3)}$ 는 전자의 기여성분으로 주파수에 무관한 실수 값을 가지는 비공명항이다. Ω_R 은 세기 S_R 과 진동밴드의 반치폭 Γ_R 을 가진 진동 공명 주파수이다. q_m 에서 총 CARS 전기장은 초점 부피내의 모든 픽셀들의 전기장의 간섭성 합으로 주어진다.

$$\begin{aligned}
 E_m^{as}(R) &= \sum_n E_{mn}^{as}(R) \\
 &= \sum_n \frac{\omega_{as}^2}{c^2} \frac{e^{i(k_{as}R - k_{as}R' / R)}}{R} P_{nx}^{(3)}(r') (\cos \theta \cos \phi \hat{\theta} - \sin \phi \hat{\phi}),
 \end{aligned}
 \tag{9}$$

CARS 신호세기는 CARS 전기장의 제곱으로 구해지며, F-CARS 신호와 E-CARS신호는 θ 값에 의해 구분되는데 0° 에서 90° 까지는 F-CARS 신호이고, 90° 에서 180° 까지는 E-CARS 신호이다.

III. 계산결과 및 논의

CARS 신호의 방사패턴은 레이저 파장, 샘플의 굴절률, NA에 따라 현저히 변화하기 때문에 본 논문에서는 식 (9)에 사용되는 변수들을 현재 바이오 분야의 CARS 실험에 주로 사용되고 있는 값들을 기준으로 가정하였다. 펌프광과 스톡스광의 직경은 대물렌즈의 입사구경(back aperture)과 같다. 대물렌즈의 NA는 1.2이며, 펌프광의 파장은 803.2 nm이고 스톡스광의 파장은 1064 nm이다. 이들에 의해 발생하는 CARS 신호의 파장은 644.8 nm이다. 폴리스틸렌구는 구표면이나 구내에 표지(label)를 붙여 세포내에 특정 위치에 침투하거나 약물전달의 경로 등 추적을 위해 공초점 현미경에서 쓰이는 샘플이다. CARS 현미경에서는 생체세포나 조직을 이미징할 때 CH와 CH₂ 분자의 라만 공명 주파수를 주로 사용하는데, 폴리스틸렌이 다수의 CH분자로 구성되어 있고 다양한 크기의 구형 폴리스틸렌이 상용화 되어 있어 CARS 현미경의 성능을 테스트하는데 사용되고 있다. 또한 속이 빈 구껍질과 속이 찬 구에 대한 방사패턴을 계산하고자 하는 것은 겉모양이 완전히 같아 이미징으로는 구분할 수 없는 경우라도 방사패턴으로는 구분이 가능함을 보이고자 하는 것이다. 폴리스틸렌은 스톡스광, 펌프광, CARS 신호의 파장에서 각각 1.58, 1.59, 1.60의 굴절률을 가지며, 폴리스틸렌구를 둘러싼 주위 물질에서는 어떤 신호도 발생하지 않는다고 가정하였다. 레이저광들은 물질을 통과하면서 흡수가 미약하여

세기가 줄어들지 않으며, 레이저광들은 x축으로 선형 편광되었으며 동일한 위치에서 초점이 맺힌다고 가정하였다.

그림 2는 레이저광의 초점과 폴리스틸렌구의 중심을 일치시키고 그림 1의 이미지구상에서 식 (9)를 사용하여 계산한 방사패턴 그림이다. 그림 2(a)는 폴리스틸렌 직경이 100 nm 인 경우이며, 그림 2(b)는 500 nm인 경우이다. 좌표 값들은 $\theta = 0^\circ$ 에서 E-CARS 신호의 값으로 규격화한 것으로 실제로 500 nm 구의 CARS 신호 세기는 100 nm 구의 신호에 비해 10^2 배 크다. 100 nm의 경우는 단일 헤르치안 쌍극자의 방사패턴과 유사하게 레이저광의 편광축인 x축으로의 방사는 적고 수직축인 y축과 z축 방향으로 대칭으로 방사하는 패턴을 보인다. 폴리스틸렌구의 직경이 커짐에 따라 CARS 신호의 방사패턴은 직경 100 nm 구의 CARS 신호 방사패턴에서 직경 500 nm 구의 CARS 신호의 방사패턴으로 변화해 간다. 즉, 폴리스틸렌구의 직경이 커짐에 따라 F-CARS 신호의 방사패턴은 레이저광의 진행방향(+z)으로 모이면서 구의 형태

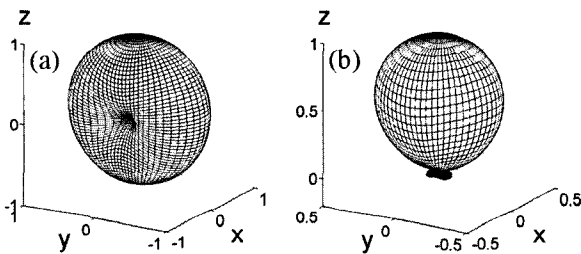


그림 2. 폴리스틸렌구의 CARS 신호의 세기분포 (a) 직경 100 nm (b) 직경 500 nm.

를 보이고, 파수벡터 부정합의 값이 큰 E-CARS 신호의 방사패턴은 폴리스틸렌구의 직경 변화에 민감하여 그림 2(b)와 같이 위상정합조건에 맞는 각도에서만 강한 방사패턴을 보이게 된다.^[17]

E-CARS 신호는 레이저광을 집속시킨 대물렌즈에 의해 측정되는데, 평행하게 입사한 레이저 광이 대물렌즈에 의해 초점에 모인 것과는 정반대로 폴리스틸렌구에서 발생한 E-CARS 신호는 대물렌즈에 의해 다시 평행광이 될 것이다. 실제 실험에서 E-CARS 신호의 방사패턴은 대물렌즈를 통과한 후 신호의 진행방향에 수직인 xy 평면에서의 신호세기 분포를 측정함으로써 구할 수 있을 것이다. 이런 취지에서 앞으로의 계산결과에 대한 그림들은 xy 평면에서의 신호세기 분포들을 보여준다.

그림 3은 초점 위치에 속이 찬 폴리스틸렌구의 중심을 일치시키고 폴리스틸렌구의 반경에 따라 계산한 E-CARS 신호의 대표적인 세기분포이다. x축과 y축 좌표값들을 대물렌즈의 반경으로 규격화하였고, E-CARS 신호세기는 일정 신호세기로 규격화하였기 때문에 폴리스틸렌구의 직경에 따른 신호세기 변화는 참고문헌 [9]의 그림 4(a)와 같은 경향을 보인다. 그림 3(a)는 직경 500 nm 폴리스틸렌구의 E-CARS 방사패턴인 그림 2(b)를 xy 평면상의 세기 분포로 다시 그린 것이다. 그림에서 알 수 있듯이 중앙위치에서 신호 세기가 작고 y축의 양끝에서 피크 값을 가진다. 직경 600 nm와 800 nm에서는 중심에서 피크 값을 가지는 모자형태이며, 직경 1100 nm에서는 다시 중심에서 신호의 세기가 작아지는 경향을 보인다.

그림 4는 직경과 겉보기 형태는 같으나 내부가 다른 형태

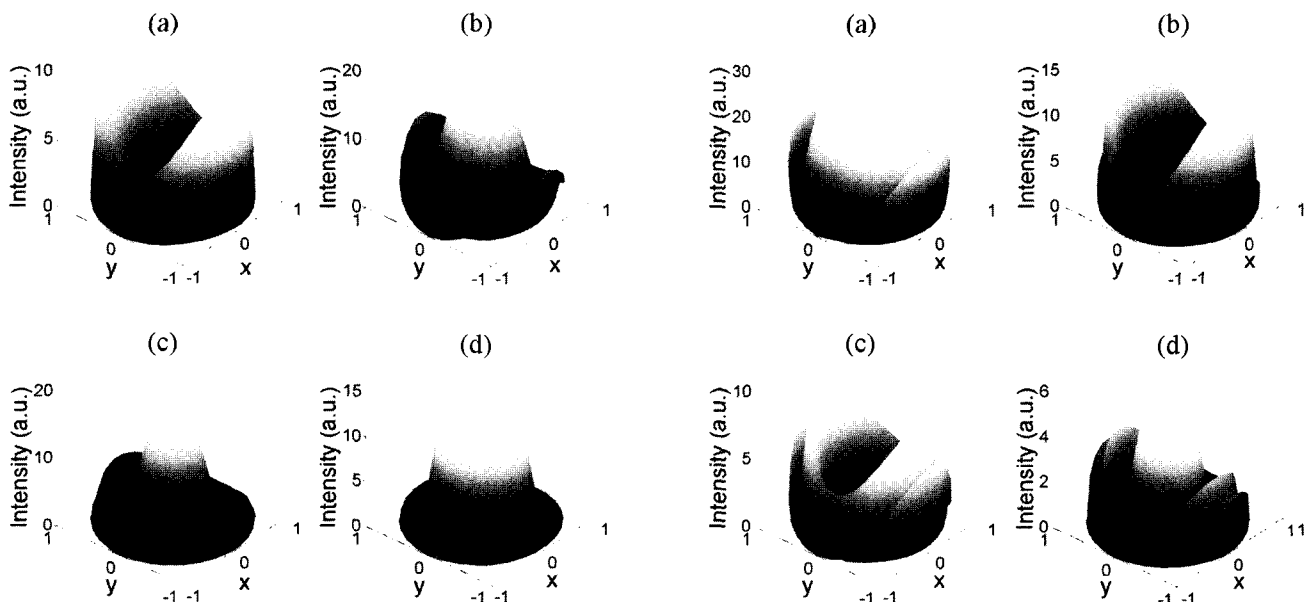


그림 3. 폴리스틸렌구의 직경에 따른 E-CARS 신호의 세기분포 (a) 직경 500 nm (b) 직경 600 nm (c) 직경 800 nm (d) 직경 1100 nm.

그림 4. 속이 빈 폴리스틸렌 구껍질의 직경에 따른 E-CARS 신호의 세기분포 (a) 직경 500 nm (b) 직경 600 nm (c) 직경 800 nm (d) 직경 1100 nm.

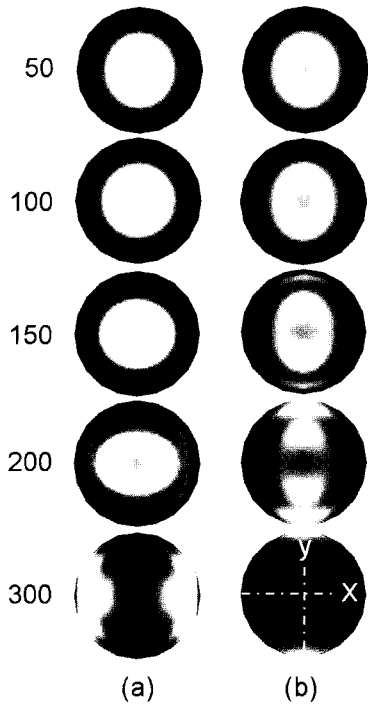


그림 5. 직경 1100 nm의 속이 찬 폴리스티렌구의 중심을 수평 이동하면서 계산한 E-CARS 신호의 세기 분포.

를 가진 경우 방사패턴이 어떻게 변하는지를 비교하기 위한 예로 속이 빈 폴리스티렌구에 대한 계산 결과이다. 속이 빈 폴리스티렌 구껍질의 경우 방사패턴은 직경에 따라서 달라질 뿐만 아니라 두께에 따라 달라지는데, 그림 4는 폴리스티렌 구껍질의 두께가 무시할 정도로 얇다고 가정하고 계산한 경우이다. 구껍질의 직경이 커짐에 따라 신호의 세기가 작아지는 것은 CARS 신호가 발생하는 구 껍질이 레이저광의 세기가 가장 큰 극초점에서 점점 멀어지기 때문이다. 그림 3과 비교해 볼 때 방사패턴이 완전히 달라졌으며 더 복잡한 양상을 보인다. 이것은 연속적으로 존재하는 픽셀들이 파수벡터 정합조건에 의해 CARS 신호를 발생하는 속이 찬 구의 경우와는 달리 구껍질의 직경만큼 떨어져 있는 픽셀그룹들의 CARS 신호가 간섭하는 경우와 유사하기 때문이다.

그림 5는 직경 1100 nm의 폴리스티렌구의 중심을 초점으로부터 x축과 y축으로 평행 이동하면서 계산한 xy 평면에서의 세기 분포이며, 밝기는 CARS 신호의 세기에 비례한다. 그림 5의 (a)는 x축 방향으로 평행 이동한 경우이고 (b)는 y축 방향으로 평행 이동한 경우이다. 그림의 왼쪽편에 있는 숫자들은 평행 이동한 거리로써 단위는 nm이다. 폴리스티렌구의 중심이 초점과 일치하는 경우는 그림 3(d)에 이미 보여 주었기 때문에 그림 5에서는 생략하였다. y축 방향으로 이동하는 그림 5(b)의 경우를 보면 이동 거리가 증가함에 따라 안쪽에 있는 링 패턴은 y축으로 길어지면서 세기가 점차 감소하는 반면 바깥쪽 링의 세기는 점차 증가하는 양상을 보인다. y축으로 200 nm의 이동한 위치에서는 안쪽 링의 세기보다 바깥쪽 링의 신호세기가 더 커졌으며 300 nm 이동하면서

안쪽의 링은 완전히 사라지고 바깥쪽 링도 y축 양끝에서만 신호가 보인다. x축으로 이동하는 그림 5(a)의 경우는 x축에 대칭이었던 두 피크가 100 nm 이동하면서 두 피크가 사라지고 완전한 링의 형태로 변하였고, 150 nm에서는 50 nm에서의 링 패턴이 90도 회전하여 y축에 대칭인 형태로 바뀌었다. y축 대칭으로 바뀐 이 후에는 그림 5(b)와 유사한 형태로 변화해 간다.

IV. 결 론

극초점에서의 펌프와 스톡스광의 기술을 위해 회절이론에 근거한 각 스펙트럼 표현을 사용하고, 샘플이 CARS 신호의 파장보다는 작은 크기이나 많은 수의 유도 헤르치안 쌍극자들을 포함한 픽셀들로 이루어졌다는 가정하에 간섭성 중첩을 통해 E-CARS 신호를 계산하였다. 폴리스티렌구의 직경에 따라 구한 E-CARS 신호의 방사패턴으로부터 직경이 변함에 따라 방사패턴이 상당히 변화함을 알 수 있었다. 속이 빈 폴리스티렌 구껍질의 방사패턴은 속이 찬 폴리스티렌구의 방사패턴과는 완전히 다르고 더 복잡한 양상을 보였다. 폴리스티렌 구의 중심을 극초점으로부터 x축으로 100 nm 평행 이동하는 경우, 극 초점위치에서의 방사패턴이 90도 회전하는 현상이 보였다. 위의 결과들로 볼 때 E-CARS 신호의 방사패턴이 샘플의 크기와 형태의 변화, 위치의 이동을 추정하는데 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 산업자원부 융합사업의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

- [1] E. O. Potma, C. L. Evans, and X. S. Xie, "Heterodyne coherent anti-Stokes Raman scattering imaging," *Opt. Lett.*, vol. 31, no. 2, pp. 241-243, 2006.
- [2] X. Nan, E. O. Potma, and X. S. Xie, "Nonperturbative Chemical Imaging of Organelle Transport in Living Cells with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy," *Biophys. J.*, vol. 91, no. 2, pp. 728-735, 2006.
- [3] L. Li and J.-X. Cheng, "Coexisting Stripe-and Patch-Shaped Domains in Giant Unilamellar Vesicles," *Biochem.*, vol. 45, no. 39, pp. 11819-11826, 2006.
- [4] Y. Fu, H. Wang, and J.-X. Cheng, "Characterization of photodamage in coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Opt. Express*, vol. 14, no. 9, pp. 3942-3951, 2007.
- [5] M. Muller, J. Squier, C. A. de Lange, and G. J. Brakenhoff, "CARS microscopy with folded BOXCARS phase-matching," *J. Microsc.*, vol. 197, pp. 150-158, 2000.
- [6] J. A. Shirley, R. J. Hall, and A. C. Eckbreth, "Folded

- BOX-CARS for rotational Raman studies,” *Opt. Lett.*, vol. 5, pp. 380-382, 1980.
- [7] A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie, “Three dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, no. 20, pp. 4142-4145, 1999.
- [8] G. C. Bjorklund, “Effects of focusing on third-order nonlinear processes in isotropic media,” *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. QE-11, pp. 287-296, 1975.
- [9] J.-X. Cheng, A. Volkmer, and X. S. Xie, “Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 19, no. 7, pp. 1363-1375, 2002.
- [10] E. O. Potma, W. P. de Boeij, and D. A. Wiersma, “Nonlinear coherent four-wave mixing in optical microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 17, no. 10, pp. 1678-1684, 2000.
- [11] Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, (John Wiley and Sons Inc., New York, 1984) p. 268.
- [12] J.-X. Cheng and X. S. Xie, “Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 3, pp. 827-840, 2004.
- [13] L. Moreaux, O. Sandre, and J. Mertz, “Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 17, no. 10, pp. 1685-1694, 2000.
- [14] S. G. Guha and J. Folk, “The effects of focusing on the efficiency of coherent anti-Stokes Raman scattering,” *J. Chem. Phys.*, vol. 75, no. 6, pp. 2599-2562, 1981.
- [15] L. C. Davis, K. A. Marko, and L. Rimai, “Angular distribution of coherent Raman emission in degenerate four-wave mixing with pumping by a single diffraction coupled laser beam: configurations for high spatial resolution,” *Appl. Opt.*, vol. 20, pp. 1685-1690, 1981.
- [16] W. Kaabar and R. Devonshire, “A versatile model of CARS signal generation: optimum diameter ratios for different phase-matching geometries,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 186, no. 6, pp. 522-530, 1991.
- [17] J.-X. Cheng and X. S. Xie, “Green’s function formulation for third-harmonic generation microscopy,” *J. Opt. Soc. Am. B*, vol. 19, no. 7, pp. 1604-1610, 2002.
- [18] A. Volkmer, J.-X. Cheng, and X. S. Xie, “Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 87, no. 2, pp. 0239011-0239014, 2001.
- [19] B. Richards and E. Wolf, “Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system,” *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, vol. 253, no. 1274, pp. 358-379, 1959.
- [20] J. D. Jackson, *Classical Electrodynamics* (John Wiley and Sons Inc., New York, 1975) p. 395.
- [21] H. Lotem, R. T. Lynch, Jr., and N. Bloembergen, “Interference between Raman resonances in four-wave difference mixing,” *Phys. Rev. A*, vol. 14, pp. 1748-1755, 1976.

Theoretical Calculation on Radiation Patterns of Epi-signal in CARS Microscopy

Yong Shim Yoo[†]

Division of physical Metrology, KRISS, Daejeon 305-340, Korea

[†]*E-mail: ysyoo@kriss.re.kr*

Hyuck Cho

School of Physics, Chungnam University, Daejeon 305-764, Korea

(Received August 1, 2007, Revised manuscript August 17, 2007)

We theoretically investigated the far-field radiation pattern of epi-signal from a polystyrene sphere in coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy with an objective lens of high numerical aperture. We calculated the field distribution of the incident laser beams under the tight-focusing condition and the far-field radiation pattern through coherent addition of radiation from the nonlinear polarizations (Hertzian dipoles) as the origin of CARS signal generation. The epi-radiation patterns for polystyrene spheres of different diameters are calculated, and the pattern of a sphere is also compared with that of a shell for a diameter of 1100 nm. We finally show how the radiation pattern of the polystyrene sphere changes as the center of the sphere shifts from the focus of the beam.