고분해능 분자 이미징

김지환

1. 서론

21세기의 주된 과학기술의 화두로서 재료과학, 나노과학, 그리고 생명과학기술이 떠오르고 있으며 급속히 발전되는 이 분야들은 보다 더 신속하고 정확한 영상화 계측기술을 요구하고 있다. 특히 100 nm 이하의 크기를 가지는 단일 금속, 반도체 나노입자의 모양-물성(morphology-physical property) 연관연구, 단일 생체분자의 구조-기능(structure-function)의 연관연구 등을 위해서는 1~100 nm 정도의 분해능(resolution)을 가지는 실공간(real-space) 영상화 기술의 개발이 필수적이다. 불행히도 전통적으로 생물학 및 재료과학에서 흔히 사용되는 광학현미경, 전자 현미경, X-선 결정학 등은 공간분해능이 부족하거나 혹은 복잡한 구조를 관측하기에는 적합하지 않은 경우가 많으며, 생체조건에서의 영상이 가능한 현미경 기술 또한 극히 제한적이다. 이와 더불어 시료(세포, 나노구조) 모양의 단순한 영상화뿐 아니라 공간상의 화학종(chemical species) 분포를 알 수 있는 화학영상화(chemical microscopy) 기술의 필요성 또한 대두되고 있다. 이러한 이유로 많은 광학, 분광학, 생물학 연구자들이 나노미터 공간 분해능을 가지는 화학선택성 현미경기술을 개발하고 있으며 이미 몇 가지 영상화 기술은 성공적으로 나노재료의 영상화에 적용이 되고 있다. 비광학적 현미경(STM, TEM, AFM) 기술에 비해 광학/분광학 현미경 방법은 시료분자의 구조 및 화학적 환경에 민감하여 구조-물성의 연관을 직접적으로 영상화 할 수 있으며 또한 생체조건에 쉽게 적용을 할 수 있다는 장점이 있다.

따라서 본 총설에서는 현미경 기술 중에서 재료과학, 나노과학 생명과학에 유용할 것으로 예측되는 광학적/분광학적 나노영상화 기술의 최신 동향에 대하여 간략히 소개를 할 것이다.

2. 광학현미경의 기본개념

광학현미경기술은 크게 3차원 영상이 가능한 원격장(far-field) 현미경과 2차원 표면에서 초 고분해능을 나타내는 근접장(near-field) 현미경으로 분류될 수 있다. 원격장 현미경기술은 잘 알려진 전통적인 광학현미경의 원리이며 빛의 파장보다 먼 거리에 위치하고 있는 물체를 대물렌즈(objective lens)로 영상화 하는 방법을 의미한다. 원격장 광학현미경의 공간 분해능은 빛의 회절에 의하여 제한되며 시료 표면에서의 수평 공간 분해능은 다음의 식으로 주어진다(**그림 1**):

$$\Delta x = \frac{0.61\lambda}{NA}, \quad NA = n\sin\alpha \tag{1}$$

이 식에서 λ는 광원의 파장이고 α는 대물렌즈의 집광 각도이다. 이 식에서 보여지듯이 원격장 광학현미경의 공간 분해능은 집광 각도가 크면 클수록 좋으며 이 각도를 나타내는 수치로서 numerical aperture(NA) 값을 통상적으로 쓴다. 집광각도를 늘리는 방법 이외에도 대물렌즈와 시료 표면 사이에 기름(oil)을 가함으로 하여 굴절률을 인위적으로 높이는 방법 또한 많이 쓰인다. 위의 식을 볼 때, 최고의 공간 분해능은 약 파장의 반(Δx_{max}~0.5λ)으로 제한되며 이를 Abbe의 회절한계(Abbe's diffraction limit)라 부른다. 통상적으로 쓰이는 광학현미경 및 공초점 현미경(confocal microscope) 등의 현미경이 이러한 회절한계에 제한을 받는 원격장 현미경으로서 약 250 nm 정도의 수평 공간분해능을 가지게 된다. 수직 공간 분해능(빛의 진행방향)은 수평 분해능(시료평면방향)보다 떨어지며 다음의 식 (2)를 따른다:

$$\Delta z = \frac{\lambda}{2(NA)^2} \tag{2}$$

가시광선의 경우 약 1000 nm 정도가 되며 공초점 현미경방법을

김지환

1995 서울대학교 화학(학사)
2002 Stanford University 화학(박사)
2002~2004 U. C. Berkeley (Post-Doc.)
2005~현재 고려대학교 화학과 조교수

High-Resolution Chemical Imaging

고려대학교 화학과(Zee Hwan Kim, Department of Chemistry, Korea University, Anam-dong, Seongbuk-Gu, Seoul 136-701, Korea) e-mail: zhkim@korea.ac.kr

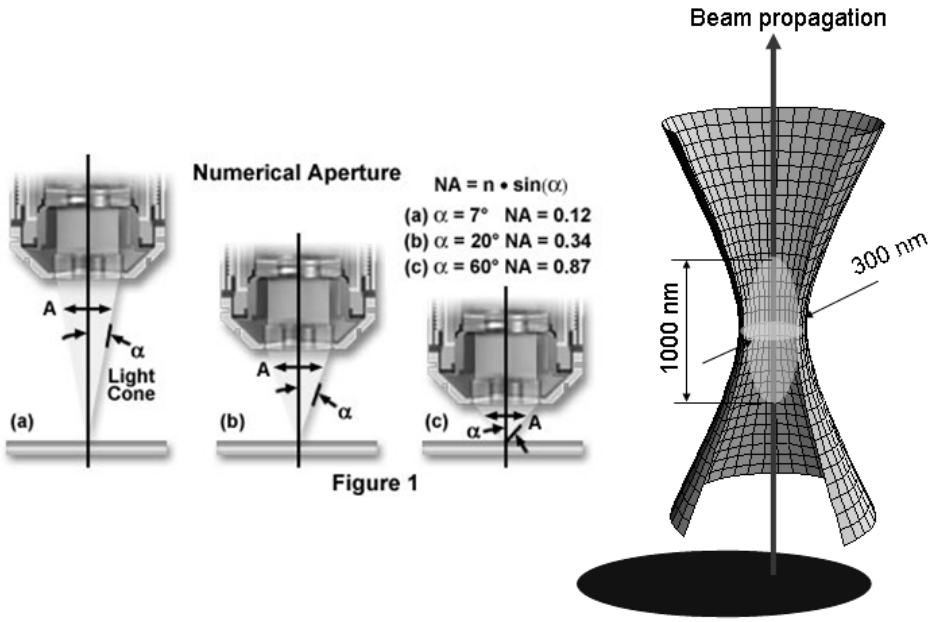


그림 1. (좌) 원격장 현미경의 공간분해능과 numerical aperture (NA)의 관계(출처:http://www.olympusmicro.com), (우) 원격장에서 렌즈를 통하여 빛을 집광 하였을때의 빛의 모양 (시뮬레이션).

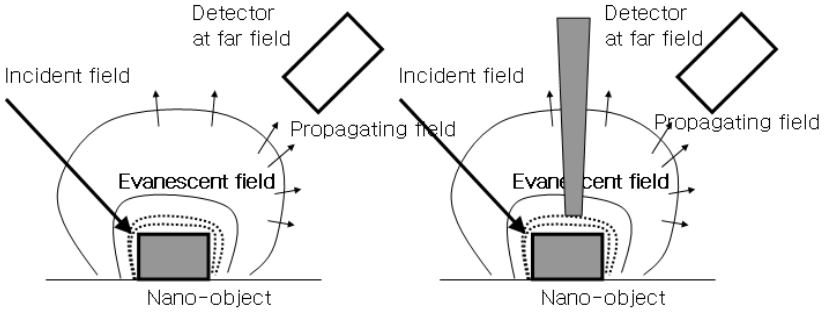


그림 2. (좌) 빛이 쪼여지고 있는 나노물체주위에는 전자기파가 형성이 되며 공간상 주파수(spatial frequency)가 낮은 퓨리에 요소는 원격장에 전달되지만 공간상 주파수가 높은 요소는 물체주변에 근접하여 (near-field) 머무르게(evanescent field) 된다. (우) 물체주변에 형성된 evanescent field 는 근접장 탐침에 의하여 진행파로 변환이 되어 원격장에 위치한 검출기에 기록이 된다.

이용한 경우 위의 식 (2)의 공간 분해능을 얻을 수 있다. 이광자현미경, 혹은 CARS 현미경과 같은 비선형 다광자현미경의 경우 현미경의 신호는 프로세스를 일으키는데 필요한 광자의 수에 따라 광원의 세기에 비선형으로 비례한다(신호의 세기=I^n, I=빛의 세기, n=필요한 광자의 수). 따라서 공간분해능은 선형 원격장 현미경의 경우보다 약간 더 우월하다.

식 (1)은 고전 전자기학 및 고전 광학에서 유도된 식이며 따라서 최근까지도 Abbe의 회절한계는 극복하지 못할 근본적인 한계로 인식되어 왔다. 하지만 1928년에 Synge는 이 회절한계는 근본적인 한계가 아니며 이를 극복할 수 있다는 것을 이론적으로 증명하였다.[1] 그 이후 이러한 Synge의 이론적 예측을 Betzig와 Pohl가 1980년대 초반에 실험적으로 처음 구현하였다.[2] Synge의 초기 이론은 그 이후 근접장 광학(near-field optics) 혹은 나노광학(Nano-optics) 라는 독립적인 학문으로 발전되고 있다. 근접장 광학의 이론은 이미 많은 review와 단행본이 출판되었다.[2] 여기서는 본 총설의 분량상 아주 간략한 개념만을 퓨리에 광학(Fourier optics)에 근거하여 소개하도록 하겠다. 기본적인 발상은 다음과 같다: 나노미터 크기의 물체에 대하여 파장의 반 정도의 정보, 혹은 $k=2\pi/\lambda$ 정도의 퓨리에 요소 만을 측정할 수 있다면, 나머지의 자세한 공간상 정보는 어디에 있는가? 원격장에서 관측되지 못한 물체의 정보는 없어지는 것이 아니라 나노 물체 주변에 '머물러' 있는 것으로 해석할 수 있다(**그림 2**). 외부에서 빛을 쪼여주면 물체 주변에 가시광 주파수로 진동하는 전자기장이 형성된다. 이때 공간상으로 변화가 천천히 일어나는 저 공간 주파수(low-spatial frequency) 퓨리에 요소는 공간상으로 공간상으로 전파가 되며 따라서 원격장에 있는 검출기에 기록이 된다. 이렇게 검출된 전자기파의 영상은 Abbe의 회절한계영상에 해당한다. 하지만 공간상의 변화가 빠른 고 공간 주파수(high spatial frequency) 퓨리에 요소는 공간상으로 전파가 되지 않으며 따라서 나노구조의 표면에 머무르는 evanescent field 가 된다. 이 evanescent 장은 원격장에 있는 검출기에 기록이 되지 않으며 전통적인 원격장 현미경으로는 이 정보를 얻어낼 수 없다. 여기에 나노미터 크기의 날카로운 물체인 근접장 탐침(광섬유탐침 혹은 금속탐침)을 나노물체주변(10 nm 내외)에 근접시키면 evanescent field 를 propagating field로 변환시켜 나노구조 주변의 자세한 광

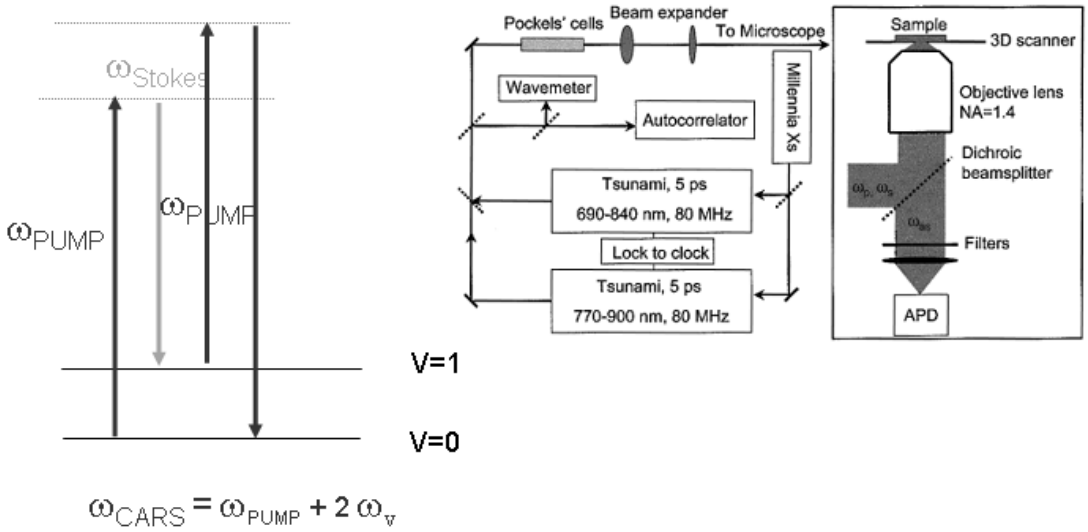


그림 3. (좌) CARS현상의 개념도, (우) 일반적인 CARS microscopy의 실험장치도.[4]

학적 정보를 추출할 수 있다. 초기의 Synge의 이론과 더 발전된 형태의 근접장 광학의 이론의 대해서는 참고문헌 3을 참조하기 바란다. 일반적으로 회절한계에서의 원격장 현미경은 공간분해능이 200에서 300 나노미터로 제한적이지만 시료의 3차원 영상화가 가능하고, 근접장 현미경은 2차원 표면영상화만이 가능하지만 나노미터 수준에서의 영상화가 가능하다. 현재 많은 종류의 원격장현미경기술과 근접장현미경 기술이 존재한다. 이 중에서 최근 들어 각광을 받고 있는 CARS 현미경방법과 무공 근접장 방법들을 다음에 간략히 소개한다.

3. 원격장 현미경 방법: CARS 현미경법을 중심으로

원격장 현미경, 특히 공초점 현미경의 일반론은 경우 이미 이전 총설(이현정, 이원목, 윤종승, **17**, 90)에 자세히 언급되어 있으므로 여기서는 전 총설에서 언급 되어지지 않은 CARS(coherent anti-Stokes Raman Scattering) 현미경방법에 대하여 소개하도록 하겠다. Coherent anti-Stokes Raman 산란은 물질의 3차 비선형상호작용을 이용하는 비선형 라만 분광법의 일종이며 기존의 단일 레이저 광원을 쓰는 선형 라만분광법에 비하여 감도면에서 뛰어난 특성을 보여준다. 전통적인 라만산란분광법(Raman scattering spectroscopy)은 주파수 ω_0의 빛을 시료에 조사했을때 적색편이된 Stokes 산란광으로부터 시료의 분자진동 정보를 얻는 것이다. 반면, 결맞음 라만산란분광법(coherent anti-Stokes Raman Scattering, CARS)은 라만분광법의 비선형분광학적 방법으로서, 세기가 강한 두 가지의 주파수 ω_p(pump beam)과 ω_s(Stokes beam)을 동시에 시료에 조사한다(**그림 3**). 이때 두 주파수의 차이가 분자진동주파수와 같을때 공명) pump beam으로부터 분자진동 주파수만큼 청색편이 된 anti-Stokes 빛($\omega_p+\Delta$)이 나오게 된다. 따라서 ω_p과 ω_s의 상대적인 파장을 변화시키면 시료의 분자진동에 대한 정보를 얻을 수 있다. CARS 분광법의 전통적인 라만산란에 비교한 장점은 (1) 더 증강되고(1000~10,000배), 또한 결맞은(coherent) 산란이 나오며, (2) 전통적인 라만산란이 조사된 방향에 관계없이 모든 방향으로 산란되는 반면, CARS의 경우 위상맞음 조건(phase-matching condition)에 의해 한쪽방향으로 집중되어 나오며, (3) 특수한 dye labeling이 필요 없다는데 있다.

이러한 CARS 현상을 현미경에 도입한 것이 CARS 현미경 방법이며 하버드대학의 Sunney Xie 연구팀에 의하여 주도적으로 개발되었다.[4] 이 연구팀에서 쓰는 실험장치의 개략도를 **그림 4**에 나타내었다. 2 대의 피코초 Ti : sapphire 펄스 레이저가 800 nm 근처의 파장영역에서 각각 Pump와 Stokes 광원으로 쓰이며, 이 두 펄스를 현미경에 입사시키고 시료에서 생성된 CARS 신호는 분광기나 고감도의 APD(avalanche photodiode)에 기록된다. 이때 공간상으로 광원을 움직이며(혹은 시료를 움직이며) CARS 신호를 기록하면 시료내의 작용기(functional group)의 공간상 라만 영상화가 가능하다. **그림 4**는 인공적으로 생성된 phospholipid vesicle(좌상)과 인간 epithelial cell(우상)의 세포막을 이루 phospholipids의 aliphatic C-H 그룹의 CARS 신호만을 영상화 한 것이다.[4] 형광표지를 사용해야 하는 공초점 형광영상화에 비교하여 CARS 현미경법이 가진 장점은 (1) 세포의 거동에 변화를 줄 수 있는 형광표지를 사용하지 않으며, (2) 화학성분을 선택적으로 영상화할 수 있으며, (3) 비선형 광학을 쓰기 때문에 공간 분해능이 20~50% 정도 더 뛰어나다는 점에 있다. 초기에 CARS 영상법 개발의 주된 목적은 단일 세포의 무 표지 영상화에 있었으나 고분자 및 재료과학에의 응용 또한 어렵지 않으며 실제로 Leone 연구단은 패터닝된 photo-resist polymer[5] 및 PS-PMMA 계면의 화학 영상화를[6] 쉽게 구현할 수 있다는 것을 보였다. 현재 많은 분광학, 광학 연구단에서 이 CARS 영상화 방법을 더 일반적이고 상용적인 생물학적 도구로써 쓸 수 있도록 하기 위한 많은 연구가 진행 중에 있다. 특히 생물학에의 응용에 있어서는 수용액 상에서의 영상화가 필수적인데 CARS 현상에서 물분자는 거대한 background로 작용하며 이를 최소화 하기위한 여러 가지 방법이 개발되고 있다. 또한 초기의 Xie 연구팀의 CARS 영상화 방법은 한가지 진동수만을 한번에 영상화할 수 있었는데 실제 단일세포 내의 화학성분은 매우 복잡하며 따라서 단일 분자진동주파수의 영상화 만으로는 화학성분을 영상화 하기 힘든 경우가 대부분이다. 따라서 최근 들어 CARS 진동 스펙트럼을 각각의 시료표면에

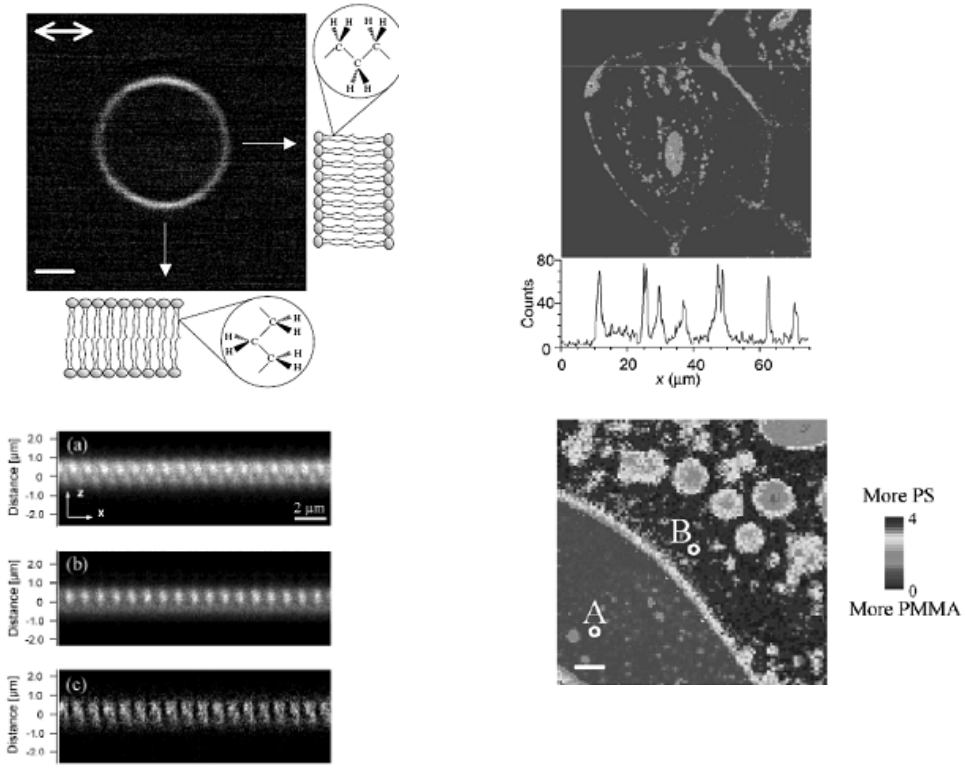


그림 4. (좌상) 인공적으로 생성한 GUV phospholipids vesicle의 CARS 영상, (우상) 인간 epithelial cell의 CARS 영상(좌하) patterned photoresist.[5] (우하) PS/PMMA의 CARS 화학영상.[6]

대하여 구할 수 있는 multiplexed CARS 방법이 연구되기 시작했다. CARS 방법은 실험이 용이하고 보편적으로 응용이 가능하고 상업화 된 CARS 현미경이 5~10년 이내에 시판 될 것으로 예측된다.

4. 근접장 현미경 방법

현대의 근접장 현미경방법은 Betzig과 Pohl에 의해 구축된[2] 주사탐침 방법, 즉 near-field scanning optical microscopy(NSOM) 방법을 일반적으로 쓴다. 초기의 NSOM은 광섬유를 광원 및 탐침으로 쓰는 방식이 주류를 이루었으나 1995년 이후 광섬유를 쓰지 않고 금속탐침의 국소장을 쓰는 무공근접장 현미경(apertureless NSOM, ANSOM)이 광섬유 NSOM의 한계를 극복하는 새로운 방법으로 주목 받고 있다. 더욱 더 구체적인 광섬유 NSOM의 실험적 한계는 무공근접장현미경을 언급할 때 더 자세히 언급하도록 하겠다.

그림 5는 일반적인 NSOM 실험장치의 구조를 보여준다. NSOM 탐침의 제작은 먼저 Single-mode 광섬유를 화학적으로 에칭 하거나 CO_2 laser로 녹이며 힘을 주어 늘린 tapered optical fiber를 만들고, 100~50 nm의 aperture를 형성한다. 이때 빛이 광섬유의 외부로 빠져나가는 것을 방지하기 위하여 광섬유의 외부에 금속(보통 알루미늄) 코팅처리를 한다(**그림 5**의 하단). 이때 시료와 탐침의 간격을 5~20 nm 정도로 일정하게 유지시키기 위하여 기계적인 되먹임(feedback)을 하게 되는데 시료표면의 평행방향 마찰력인 sheer force를 tuning fork 신호를 이용한다.[2] 광섬유에 레이저광을 조사하고 광섬유 탐침을 시료표면 10~50 nm 상단에 위치하여 시료표

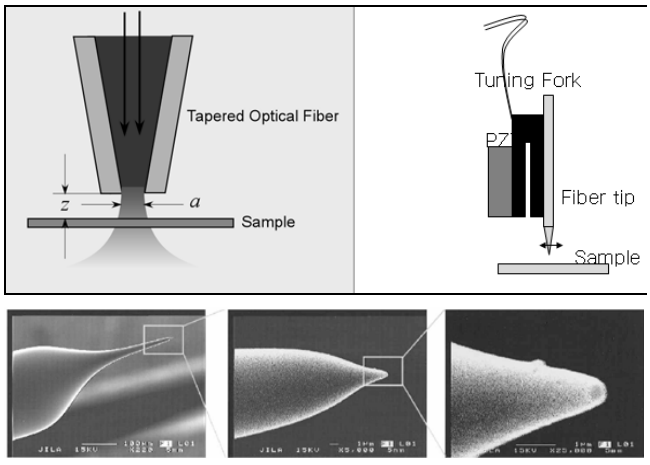
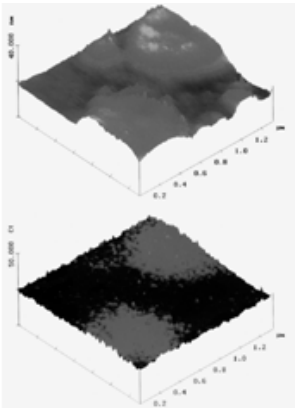
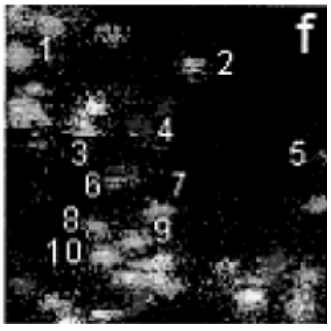


그림 5. (좌상) 광섬유 NSOM의 개략도(우상) 광섬유 NSOM과 시료표면 간의 거리제어방식(하) 일반적인 광섬유 NSOM 탐침의 SEM 이미지의 예.

면의 형광, 산란, 투과등을 시료표면의 위치에 따라 영상화 하게 되면 70~100 nm의 고 분해능 광학영상과 더불어 AFM과 같은 topography 영상을 동시에 얻게 된다. 일반적으로 탐침이 광원이 되는 illumination mode, 탐침이 검출장치가 되는 collection mode가 주로 이용이 되며 가장 좋은 분해능을 얻기 위해서는 illumination mode가 주로 쓰인다. **그림 6**에는 형광 NSOM을 이용하여 얻은 고분해능 형광 영상의 3가지 예를 보여주었다. 상단의 이미지는 Xie 연구팀에서 intact한 photosynthetic membrane의 조각을 형광 NSOM을 이용하여 영상화 한 것이다.[7] 중단의 이미지는 membrane





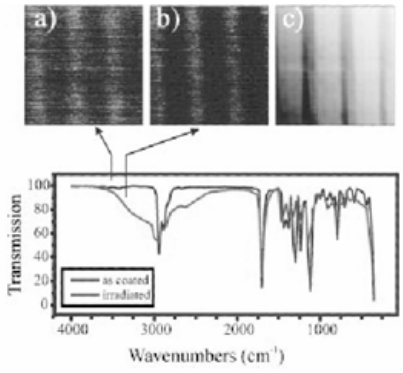


그림 6. (상) photosynthetic membrane 조각의 형광 NSOM영상. 형광은 membrane 내의 LHC II 단백질로부터 기인한다.[7] (중) PMMA 에 도핑된 DiI(carbocyanine, diIC18). 단일 형광분자들의 편광 NSOM 영상.[8] (하) 적외선 NSOM을 이용하여 chemically amplified photoresist의 화학영상화를 얻은 예.[9]

의 모양을 나타내는 topography이고 하단의 이미지는 membrane 내의 LHC II 단백질에서 나오는 형광 NSOM 영상이다. 이 영상으로부터 membrane 내의 LHC II 단백질 분자들이 군집해 있음을 밝혔다. 상단 우측의 영상은 PMMA 막에 도핑된 DiI(carbocyanine, diIC18) 단일분자들의 편광형광(polarized fluorescence) 이미지이다.[8] 각각의 분자의 배향(orientation)이 바뀌면 emission transition dipole의 공간상 방향이 바뀌며 따라서 형광의 편광방향은 단일분자의 배향을 나타내는 신호가 된다. 단일분자형광의 편광방향을 조사함으로써 개별적인 분자의 배향을 알아낼 수 있다. 광섬유 NSOM 방법은 가시광선뿐 아니라 적외선영역(IR)까지 적용될 수 있다. Leone 연구팀은 3.0 μm 파장대에서 패터닝된 chemically amplified photoresist 시료의 적외선 흡수 이미징을 시도한 바 있다.[9] **그림 6**의 패턴은 PTBMA(poly(tert-butyl methacrylate))와 PMAA(poly(methyl acrylate acid)) 이루어져 있으며, 이 두가지 화학종은 O-H stretching spectrum의 차이를 보인다. 적외선의 파장을 O-H 영역에서 변화시켰을때 PTBMA와 PMAA의 적외선 흡수 차이로 인하여 NSOM 영상화를 얻을 수 있었다.

광섬유 NSOM은 이미 상업화된 장치가 존재하며 여기서 소개된 외에도 많은 응용이 되고 있다. 하지만 유감스럽게도 광섬유 NSOM은 광섬유 탐침의 낮은 효율에 의하여 더욱 더 일반적인 응용이 제한되고 있다. 일반적인 광섬유 탐침의 효율은 약 10^{-4}-10^{-5} 정도에 머무르며 이 또한 aperture size가 작아짐에 따라 급격히 감소한다. 또한, 광섬유탐침 끝에 있는 금속막의 heating으로 인해 광섬유 내에 입사시킬 수 있는 레이저광의 에너지 또한 제한적이라 할 수 있다. 따라서 이론적인 광섬유 NSOM의 공간분해능은 제한이 없지만 실질적인 공간분해능은 광섬유 탐침이 효율적으로 작동할 수 있는 aperture 크기인 100 nm 정도이다. 이와 더불어 mid-IR 영역과 같이 화학적으로 흥미 있는 파장영역대의 광섬유 탐침을 제작하기가 용이하지 않다.

이러한 광섬유 NSOM의 약점을 보완하는 전혀 다른 방식의 근접장 현미경기술이 1995년에 Keilmann 연구단에 의하여 처음으로 실현되었다.[10] 이 새로운 NSOM 기술은 aperture가 없다는 뜻으로 apertureless NSOM(ANSOM)으로 불리운다. 기본적인 원리는 다음과 같다. 날카로운 금속탐침(AFM 이나 STM 탐침)에 외부에서 레이저 광원을 쪼여주게 되면 탐침 말단 10~20 nm 영역에 빛이 모이게 된다. 이 현상을 장증강 현상(field enhancement effect) 이라 하며 이때 국소화된 빛을 광원으로 사용하면 시료의 표면을 고해상도로 영상화 할 수 있다. **그림 7**은 금속탐침(Au, Ag) 말단에서 일어나는 장증강현상을 이론적으로 전산모사한 것을 보여준다.[11] 장증강현상은 탐침끝의 기하학적인 모양에서 기인하는 피뢰침 효과(lightning rod effect)와 금속의 dielectric property에 따라 변하는 국소표면 플라스몬(localized surface plasmon effect) 효과에 기인한다고 알려져 있다. 현재 무공근접장 현미경기술은 크게 (1) 탐침과 시료의 dipole-image dipole 상호작용을 이용하는 산란형 ANSOM, (2) 증강된 국소장을 이용한 탐침증강라만산란(tip-enhanced Raman scattering, TERS) 그리고 (3) 증강된 국소장을 이용한 탐침증강 형광영상화, tip-enhanced fluorescence로 크게 나뉜다.

독일의 Keilmann 연구단에 의하여 처음으로 실현된 이 방법은[10]

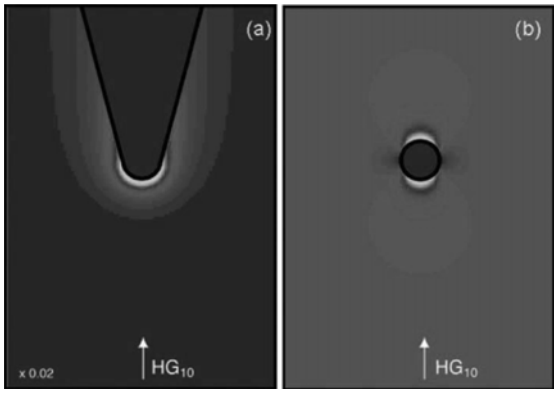


그림 7. 금속탐침 말단의 장증강 현상의 전산모사 결과.[11]

탐침과 시료표면간의 dipole− image dipole 상호작용을 영상화 메커니즘을 바탕으로 시료표면의 국소적인 유전상수(dielectric constant), 플라스몬 장, 그리고 나아가서 분자진동의 영상화를 이루는 방법이다. **그림 8**에 장치의 개략을 보여주었다.[12] 태핑모드 AFM 금속탐침(gold 혹은 platinum)에 레이져광(HeNe, CO_2 등)을 쪼이고 여기서 산란되는 빛을 호모다인(homodyne) 혹은 헤테로다인(heterodyne) 증폭방법을 이용하여 검출한다. 탐침말단에 생성된 dipole은 시료표면에 image dipole을 형성하고 이 두 dipole 간의 상호작용은 탐침에서 산란되는 빛의 세기와 위상을 바꾼다. 산란되는 빛의 세기와 위상을 간섭계(interferometer)로 분석하면 시료표면의 광학적인 정보를 얻을 수 있다. 개발 초기에 문제점으로 인식된 약한 근접장 신호와 topography artifact는 헤테로다인 혹은 호모다인증폭으로 극복이 가능하다. **그림 9**에 산란형 ANSOM 영상화의 예를 보여주었다.

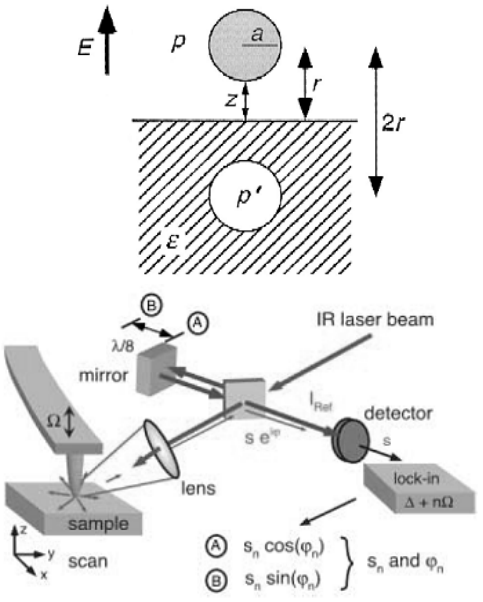


그림 8. (상) 탐침 dipole과 시료 image dipole의 관계, (하) homodyne amplified apertureless NSOM의 개략도.

좌측상단의 이미지는 gold, silicon, 그리고 polystyrene이 공존하고 있는 나노구조의 topography와 ANSOM 이미지를 보여준다.[12] 유전상수가 가장 큰 Au가 가장 밝게, 그리고 유전상수가 가장 낮은 polystyrene이 가장 어둡게 영상화 되어 topography로 구분이 가지 않는 나노구조를 10 nm의 공간 분해능으로 분석할 수 있음을 보여준다. 산란형 ANSOM 방법은 가시광 영역뿐 아니라 분자진동을 측정할 수 있는 적외선 영역에도 높은 공간 분해능으로 영상화가 가능하다. **그림 9**의 상단우측에 보여준 영상은 polystyrene/PMMA의 구조를 적외선의 파장을 바꿔가며 영상화 한 것으로 PMMA와 PS를 분자진동 파장에 따라 10 nm 공간 분해능으로 화학선택성 영상화를 할 수 있음을 보여준다.[13]

산란형 ANSOM은 시료의 국소적인 유전상수를 영상화 할 뿐 아니라 금속나노입자 주변의 plasmon field의 영상화, 그리고 극성고체표면의 phonon polariton의 고분해능 영상화 또한 가능하다. **그림 9**의 좌측 하단에 보인 영상은 탄소선 탐침과 633 nm 가시광선을 이용하여 기록한 판형구조의 금나노구조에서 형성되는 플라스몬장의 이미지이다.[14] 간섭계를 이용한 산란형 ANSOM 방법은 현재 플라스몬장의 영상화를 위상에 따라 영상화할 수 있는 유일한 방법으로서 나노광학(nano−optics)에서 중요시 되는 photonic 구

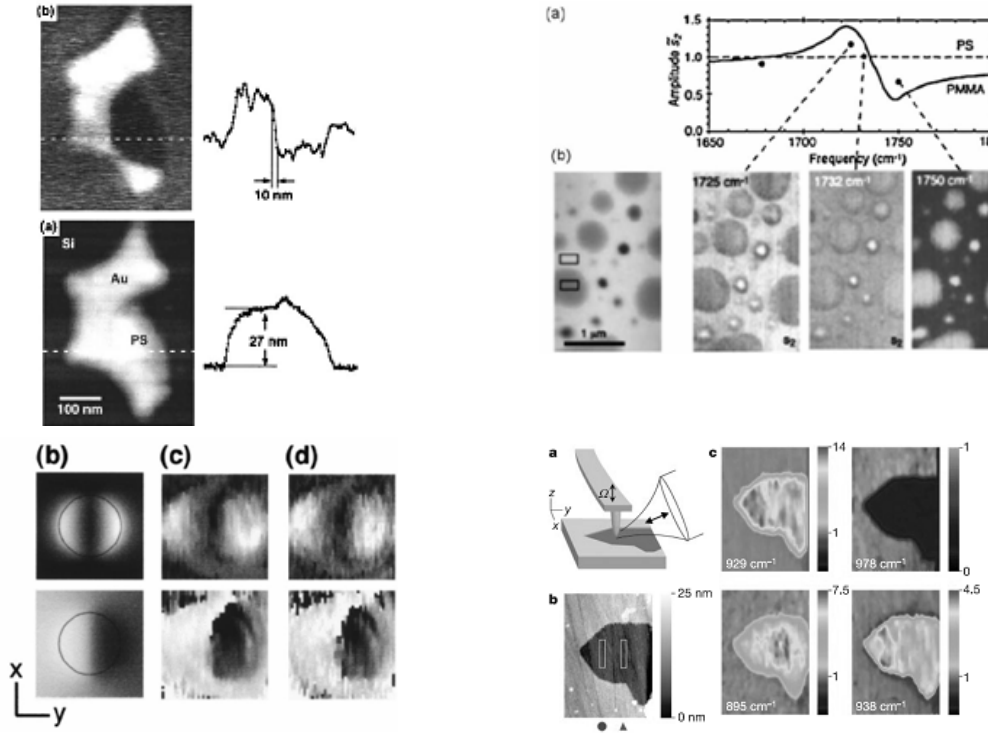


그림 9. (좌상) Au, PS, Si 나노구조의 dielectric 영상화(파장=633 nm).[12] (우상) 적외선 ANSOM을 이용한 PS/PMMA의 화학선택성 이미징 영상.[13] (좌하) 탄소선탐침과 가시광선을 이용하여 금나노구조의 플라스몬장을 영상화[14] 한 결과와 전산모사결과(우하) Silicon Carbide 나노구조의 포논공명 ANSOM 이미지.[15]

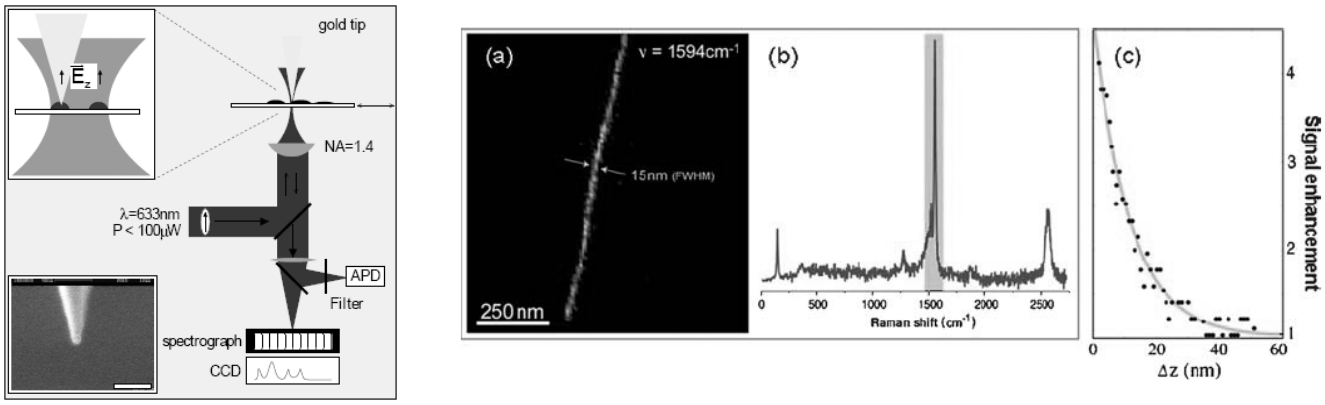


그림 10. (좌) TERS 장치의 개념도, (우) (a) SWNT 1500 cm^{-1} 진동분광 TERS 영상화,[11] (b) TERS spectrum, (c) 탐침−분자의 거리에 따른 TERS 신호의 세기.[11]

조를 비롯한 금속나노광학소자의 발전에 많은 기여를 할 것으로 기대된다. 또한 최근에는 금속나노구조의 가시광선 프라스몬과 유사하게 적외선 영역에서도 포논영상화를 할 수 있다는 것을 Keilmann 연구단에서 발표하였다.[15]

산란형 ANSOM 개발과 유사한 시기에 개발이 시작된 탐침증강 라만영상화(tip−enhanced Raman scattering) 방법은 ANSOM 탐침 말단에 국소증강된 빛으로 국소적인 라만산란증강을 유발하고 이를 이용하여 시료표면분자의 진동분광 영상화를 하는 방법이다. 원리적으로는 표면 증강라만산란(surface−enhanced Raman scattering, SERS)과 동일하며 여기서 SERS를 일으키는 금속표면이 시료상에 있는 대신 탐침표면이 SERS를 일으키는 금속이 된다. Zenobi, Novotny, Kawata 연구단에서 각각 독립적으로 시도하여[16−18] 성공한 이 테크닉은 산란형 ANSOM과 실험장치는 유사하며 특히 높은 국소장 증강을 위하여 금 혹은 은으로 도금된 탐침말단을 고배율(100 x, 1.4 NA)의 대물렌즈를 이용하여 레이저를 조사시키고 탐침−시료분자에서 나오는 증강된 라만산란을 분광기 혹은 APD(avalanche photodiode)를 이용하여 측정한다(**그림 10**).[11] Novotny 연구단과 Kawata 연구단은 이 TERS 방법을 이용하여 단일분자의 단일벽탄소선(single−walled carbon nanotube) radial breathing mode의 진동을 바탕으로 한 10 nm 진동분광 영상을 얻는데 성공하였다.[17,18] TERS 실험에서 나오는 라만스펙트럼은 기존의 bulk 라만스펙트럼과 비교하였을 때 미묘한 차이를 보이는데 이것은 (1) 탐침표면의 증강장에서 일어나는 라만현상의 선택법칙(selection rule)이 다르고 또한 (2) 탐침이 시료분자에 기계적인 섭동을 미치기 때문이다. 이 차이에 대한 더욱더 자세한 분광학적, 나노광학적 연구는 단일분자와 플라스몬장의 상호작용에 대한 자세한 정보를 줄 것으로 생각된다. 현재 탄소선외의 다른 일반적인 시료분자를 영상화 하기 위해서는 탐침말단의 장증강의 최적화가 이루어져야 하는데 이를 위한 이론적, 실험적인 노력이 진행되고 있다.

탐침 국소증강을 이용하는 형광 ANSOM은 산란형 ANSOM이나 TERS 보다는 연구가 많이 진행되지 않은 분야이다. 형광 ANSOM은 탐침에 따른 형광의 증강과 더불어 금속탐침표면에 의한 강한 형광 quenching 현상이 일어나게 되며 특히 금속 탐침의 경우 이 현상이 두드러지게 나타나서 실험조건에 따라 탐침에 의하여 형광이 증가되기도 하고 감소되기도 한다. 이러한 이유로 형광 ANSOM은 개발초기단계부터 실현성에 대한 많은 논란이 되어왔으나 점차

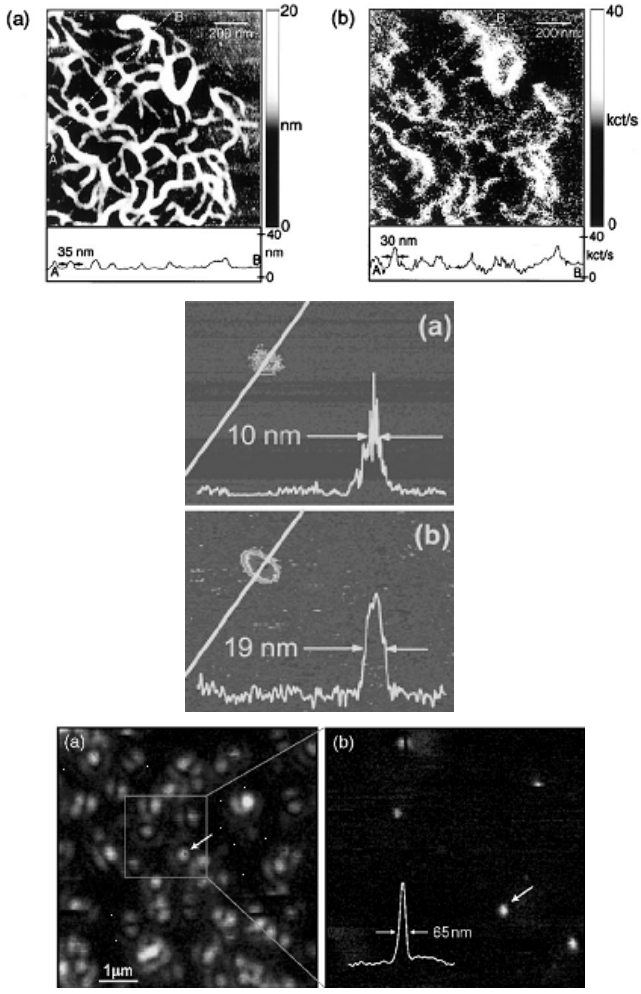


그림 11. (상) PICI 분자 J−aggregate의 이광자형광 ANSOM 영상,[19] (중) CdSe 양자점 형광 ANSOM 영상.[20] (하) gold nanosphere 탐침을 이용하여 얻은 단일 terrylene 분자의 형광ANSOM영상.[21]

이 문제는 극복되고 있다. Xie 연구팀은 peudoisocyanine(PICI) 분자 J−aggregate의 고분해능 ANSOM 형광이미지를 1999년에 처음으로 시도하였으며[19] 이 영상으로부터 약 30 nm의 광학분해능을 실현하였다. Quake 연구팀은 time−stamping 기술을 이용하는 형광 ANSOM 기술을 발전시켜 CdSe 단일양자점을 10 nm 공간분해

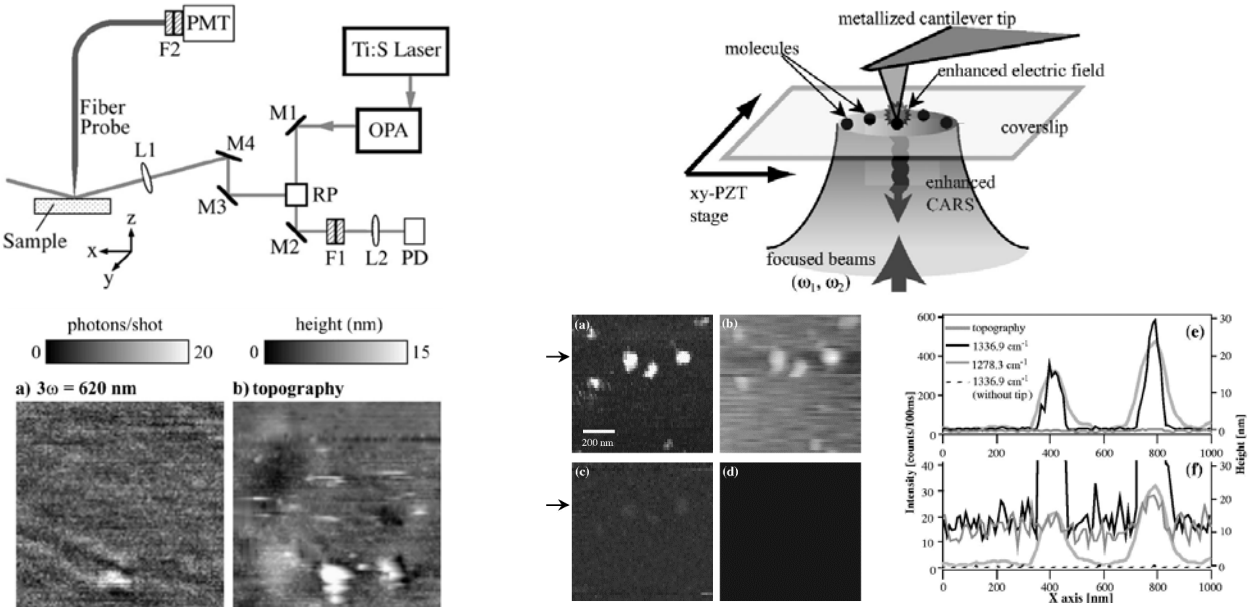


그림 12. (좌) third-harmonic generation (THG) NSOM을 이용한 MEH-PPV의 영상화[22], (우) 탐침증강 CARS를 이용한 아데닌나노입자의 분자진동 영상.[23]

능으로 형광영상화 하는데 성공하였다.[20] 그리고 가장 최근인 2006년에는 Novotny 연구단에서 단일 금나노입자를 금속탐침으로 이용하여 terrylene 단분자의 형광을 약 60 nm 공간분해능으로 영상화 하는데 성공하였다.[21] 현재 형광 ANSOM 방법은 더 많은 연구가 필요한 분야이며 머지않아 단일 생체분자를 생체조건(수용액상)에서 10 nm 공간 분해능으로 영상화 할 수 있을 것이다.

앞서 간략히 언급된 CARS 방법의 장점과 같이 비선형분광법(nonlinear spectroscopy)은 선형분광학이 제공하지 못하는 많은 장점을 가지고 있어서 생체분자 및 나노구조의 나노 영상화방법에의 응용가능성이 높다. 특히 여기서는 비선형 분광법이 근접장영상화와 성공적으로 결부된 두가지 예를 간략히 소개하도록 하겠다. Saykallay 연구팀은 3 차조화주파수 생성(harmonic generation)을 광섬유 NSOM에 적용하여 3차조화주파수가 시료분자의 전자공명조건을 바탕으로 하는 THG-NSOM 방법을 개발하였다.[22] **그림 12**에 보여진 영상은 MEH-PPV interchain aggregate의 도메인 형성과 이에 따른 THG 영상을 보여준다. Kawata 연구팀은[23] 최근 CARS 진동분광법과 무공근접장 방법을 결합한 TE-CARS방법을 개발하였다. TE-CARS 방법은 TERS방법에 비하여 더욱더 증강된 신호를 보이는 10 nm 공간분해능 영상화 방법이다. **그림 11**에서 보여진 바와 같이 Pump와 Stokes 레이저 빛의 주파수가 아데닌분자의 진동주파수와 공명하였을때 매우 강한 이미지 contrast를 보여주는 반면에 이 주파수를 비공명 조건으로 바꾸었을 때 영상이 없어지는 것을 확인하였다. TE-CARS외에도 유사한 종류의 탐침증강 비선형분광 영상화는 충분히 가능하리라 예측된다.

5. 결론

본 총설에서는 현재 연구 되고 있는 화학선택성 고분해능 영상화 기술에 대하여 간략히 소개를 하였다. 여기서 보인 바와 같이 제한적이나마 분자분광학에 근거한 나노미터 스케일에서의 시료분자의 영상화는 실험적으로 가능하며 현재의 근접장 영상화 기술 및 비선형분광학의 기술이 발전함에 따라 적용 가능한 영역은 확대될 것이다. 특히 생체조건에서의 근접장 영상화연구와 근접장 현미경에서의 탐침으로 인한 시료분자 섭동연구는 나노영상화의 응용가능성 확대에 있어서 해결해야 할 가장 중요한 연구과제라고 생각된다.

참고문헌

1. E. H. Synge, *Phil. Mag.,* **6**, 356 (1928).
2. M. A. Paesler and P. J. Moyer, *Near-field Optics,* John Wiley & Sons (1996).
3. M. Ohtsu and K. Kobayashi, *Optical Near Fields,* Springer (2003).
4. J-. X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B,* **105**, 1 (2001).
5. E. O. Potma, X. S. Xie, L. Muntean, J. Preusser, D. Jone, J. Ye, S. R. Leone, W. D. Hinsberg, and W. Shade, *J. Phys. Chem. B,* **108**, 1296 (2004).
6. S. H. Lim, A. G. Caster, O. Nicolet, and S. R. Leone, *J. Phys. Chem. B,* **110**, 5196 (2006).
7. R. C. Dunn *et al., J. Phys. Chem.,* **98**, 3094 (1994).
8. A. G. T. Ruiter, J. A. Veerman, M. F. Garcia-Parajo, and N. F. van Hulst, *J. Phys. Chem. A,* **101**, 7318 (1997).
9. B. Dragnea and S. R. Leone, *Int'l Rev. Phys. Chem.,* **20**, 59 (2001).
10. B. Knoll and F. Keilmann, *Nature*, **399**, 134 (1995).
11. L. Novotny and S. J. Stranick, *Ann. Rev. Phys. Chem.,* **57,** 303 (2006).
12. T. Taubner, R. Hillenbrand, and F. Keilmann, *J. Microsc.,* **210,**

311 (2003).
13. T. Taubner, R. Hillenbrand, and F. Keilmann, *Appl. Phys. Lett.,* **85**, 5064 (2004).
14. R. Hillenbrand, F. Keilmann, P. Hanarp, D. S. Sutherl, and J. Aizpurua, *Appl. Phys. Lett.,* **83**, 368 (2003).
15. R. Hillenbrand, T. Taubner, and F. Keilmann, *Nature,* **418**, 159 (2002).
16. R. M. Stockle RM, Y. D. Suh, V. Deckert, and R. Zenobi, *Chem. Phys. Lett.,* **318**, 131 (2000).
17. A. Hartschuh, E. J. Sanchez, X. S. Xie, and L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.,* **90**, 95503 (2003).
18. N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata, *J. Chem. Phys.,* **117**, 1296 (2002).
19. E. J. Sanchez *et al., Phys. Rev. Lett.,* **82**, 4014 (1999).
20. J. M. Gerton *et al., Phys. Rev. Lett.,* **93**,180801 (2004).
21. P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.,* **96**, 113002 (2006).
22. R.D. Schaller *et al., J. Chem. Phys.,* **117**, 6688 (2002).
23. T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, S. Kawata, *Phys. Rev. Lett.,* **92**, 220801 (2004).