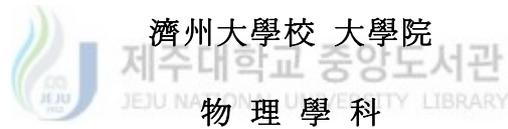


碩士學位論文

공초점 광학 현미경에서 Side-lobe
감소 방안에 대한 연구



金 億 奉

2001 年 12 月

공초점 광학 현미경에서 Side-lobe
감소 방안에 대한 연구

指導教授 金斗哲

金億奉

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2001 年 12 月

 제주대학교 중앙도서관
金億奉의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

2001 年 12 月

A Study on the Effect of Side-lobe on Axial Image of Confocal Microscope

Eok-Bong Kim
(Supervised by professor Doo-Chul Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for
the degree of Master of Science



2001. 12.

This thesis has been examined and approved.

2001. . . .

Department of Physics
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

SUMMARY	I
I. 서 론	1
II . 이 론	3
1. 공초점 광학 현미경의 원리	3
2. side lobe 와 수차	3
3. 개구수와 초점심도	6
4. 레일리 기준(Rayleigh Criterion)	7
5. Sine 조건과 Herschel 조건	7
6. 렌즈왜곡에 의한 경로차	9
7. Fresnel 방정식	12
III. 실험 방법	15
1. 전산기 시늬	15
2. 실험 장치 및 방법	15
III. 결과 및 논의	17
1. 전산기 시늬 결과	17
2. 실험 결과	23
IV. 결 론	38
V. 참고문헌	39



SUMMARY

The effects of side-lobe on the axial response in confocal microscopy have been investigated by computer simulation and experiment. Axial response becomes broad and asymmetric with side-lobes, and the peak intensity of the image was greatly reduced because the Herschel condition was violated. So we found the condition for the minimum of side-lobe with the Herschel condition according to change of optical path altering the distance from sample to objective lens and from objective lens to image. From the results of computer simulation and experiment, we found that the distribution of intensity was shifted from right to left, the peak of intensity was increased and the axial response was symmetric after compensating a phase error according to thickness was increased. From analysis of this results, an optimized axial response can be achieved by minimized side-lobe and the side-lobe can be minimized by compensating phase error.

I. 서 론

현미경은 시료의 미세구조나 천연 구조의 관찰을 위하여 도입된 필수 불가결한 범용의 연구용 기기로 활용되어 오고 있다. 물리학, 전자공학 등의 발전으로 현미경의 개념도 형광 현미경(fluorescent microscope), 주사 전자 현미경(scanning electron microscope : SEM), 투과 전자 현미경(transmission electron microscope : TEM), 주사 탐침 현미경(scanning probe microscope : SPM), 공초점 광학 현미경(confocal microscope) 등으로 세분화되어 가고 있으며, 그 기능도 다양화되어 단순한 형태학적 특성의 관찰이라는 한정된 분야에서 벗어나 시료가 갖는 화학적, 물리적 성질들까지도 정량화 할 수 있게 되었다. 생명과학분야에 대한 연구가 활발해지고 있는 추세에서 살아있는 세포의 2차원 및 3차원 구조를 조사하는 것은 매우 중요하다. 시료의 3차원적인 구조를 보기 위해서는 SEM 과 원자 간력 현미경(atomic force microscope: AFM)등이 사용되고 있지만, 이들은 매우 고가이며 투과성인 막의 아래층을 볼 수가 없다는 단점이 있다. 특히 세포에 전자를 조사하는 경우에는 세포들이 손상을 입기 때문에 살아 있는 세포를 조사하거나 연구하는데는 적절치 못한 방법이다. 이를 극복하기 위하여, 광학적인 방법으로 3차원을 관찰할 수 있는 공초점 광학 현미경이 제안되어, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Fukano 등(2000), Fujita 등(2000), Ilev 등(2000), Ishihara 등(1999), Nutter 등(1998), Schrader 등(1998), Sharma 등(1999), Yang 등(2000)).

공초점 광학 현미경은 광원에서 나온 빛을 집적 렌즈에 의해 시료 표면을 조사하고 시료 표면에서 반사되어 나오는 빛의 변화를 검출기로 검출하여 영상을 구현하는 주사형 현미경이다(Minsky 등(1961), Shotton (1989)). 이러한 공초점 광학 현미경은 기존의 일반 광학 현미경에 비해서 분해능을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 광학적 절편 기법을 이용하여 3차원 관측이 가능하다(Corle 등(1996)). 공초점 광학 현미경은 SEM , AFM에 비해서 분해능은 떨어지나 주사 속도가 빠르고 살아있는 세포를 실시간으로 관측할 수 있다는 장점이 있기 때문에 현재 생물 분야에서 많이 사용되고 있다. 이와 같이 공초점 광학 현미경에서는 분해능이 주로 반사된 신호나 형광된 신호의 반치폭에 의해서 결정되고, 반치폭은 광원의 파장과 집적 렌즈의 개구수

(numerical aperture)에 의해서 결정된다(Cheng 등(1994)). 그러나 입사한 레이저 빛이 렌즈에 의해 물체에 초점이 형성될 경우에는 렌즈의 왜곡 현상에 의한 위상오차의 원인으로 광축상과 평면상에 side-lobe가 발생하게 된다. Side-lobe는 횡 방향(lateral direction)에 대해서는 평면 분해능을 저하시키고 광축 방향(axial direction)에 대해서는 3차원 상을 얻는데 잡음으로 작용하여 분해능을 떨어뜨린다. 이러한 side-lobe를 제거하여 공초점 광학 현미경의 평면 분해능을 높이기 위한 연구가 최근 많이 진행되어 왔다 (Christian 등(1995), Boon (1998), Sheppard 등(1992), Cogswell 등(1991), Sheppard 등(1991), Sheppard (1988), Sheppard 등(1981), Steffen 등(1996), Sheppard 등(1994)). 반면에 광축 방향의 분해능을 높여 선명한 3차원 상을 얻으려는 연구는 많이 진행되고 있지 않다.

본 연구에서는 렌즈의 왜곡과 시료의 특성에 의해 발생하는 광축상의 side-lobe 효과를 Herschel 조건을 이용하여 감쇠 시키는 방법에 대해 전산기 시뮬하였고, 이를 실험에 적용하여 side-lobe의 영향을 비교 분석하였다.



II. 이 론

1. 공초점 광학 현미경의 원리

공초점 광학 현미경의 원리는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 조명과 검출 또는 상의 형성이 시료의 동일 지점에 형성된 초점을 통해 이루어지는데서 유래한다. 빛이 시료의 미세 영역에 조사되면 그 곳으로부터 얻어지는 신호들만을 감지하여 영상으로 재현하고 비 초점 면의 신호들은 검출기 앞의 바늘구멍(pin-hole)이 제거되도록 하는 것이다. 반면에 기존의 광학 현미경은 초점 면과 초점 외의 영역까지 동시에 조사하여 얻어지는 신호들을 영상으로 재현하기 때문에 전체적인 분해능을 크게 감소시켰다.

즉, 일반 광학 현미경은 Fig. 2(a)에서 보는 바와 같이 다 초점(multi focus)을 이용하는 것이다. 그러나 공초점 광학 현미경(Fig. 2(b))은 한 초점(single focus)만을 이용하고 초점 외의 부분은 바늘구멍에 의해 제거되기 때문에 분해능이 향상될 수 있다. 또한 광학적 절편 기법을 이용하여 시료에 손상을 주지 않고 3차원 상을 얻을 수 있다.



2. Side-lobe 와 수차(Aberration)

이상적인 단일 Gaussian 빛이 렌즈를 통과한 후 초점이 형성될 때 빛의 세기분포가 일정하게 증가하거나 감소하는 것을 방해하고 전체적인 빛의 세기를 감소시키는 부분을 통틀어 side-lobe라 한다. 이러한 side-lobe의 가장 큰 원인은 렌즈의 수차이다. 렌즈를 통과한 빛들이 한 초점에 모이지 않고 초점주변에 모여서 상이 변형되거나 뿌옇게 보이고 선명도가 떨어지며 색이 번지는 현상을 수차라 한다. 수차는 렌즈의 제조 과정시 발생하는 결함과 그 밖에 발생하는 다른 결함이 없는 렌즈에서 뿐만 아니라 심지어 양질의 유리로 만들어진 렌즈라 할지라도 렌즈의 고유한 결함에 의해서 발생한다. 몇몇의 수차들은 단색광에서 발생하며 그들을 단색 수차(monochromatic aberration)라고 한다. 그리고 최소한 두 개 이상의 파장을 포함한 빛에서 발생하는 수차를 색 수차(chromatic aberration)라고 한다.

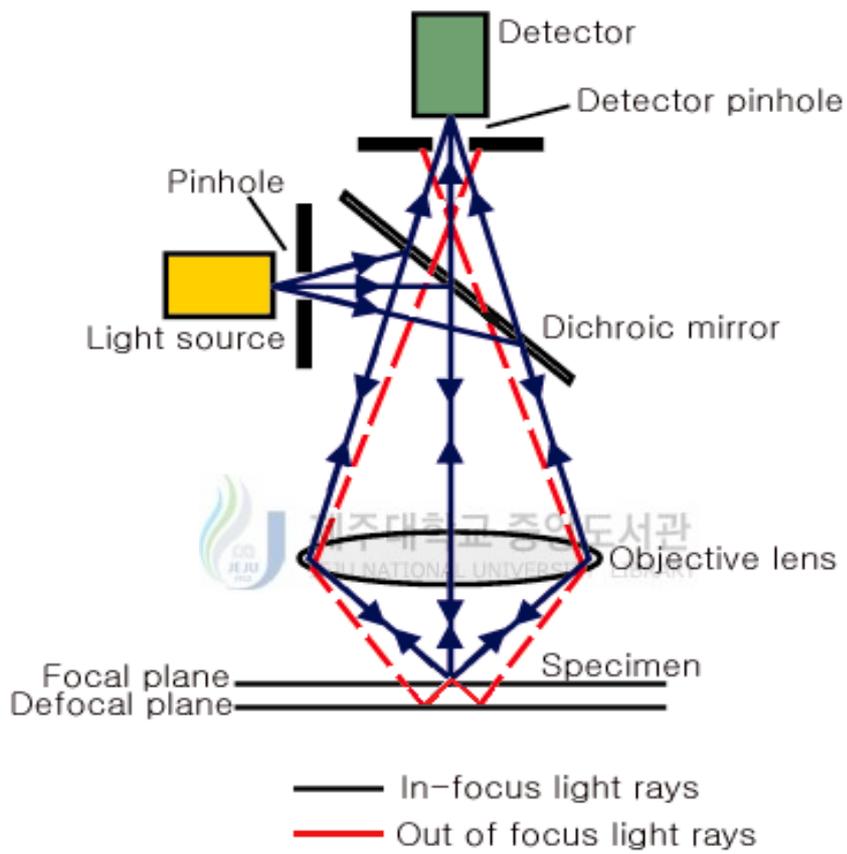
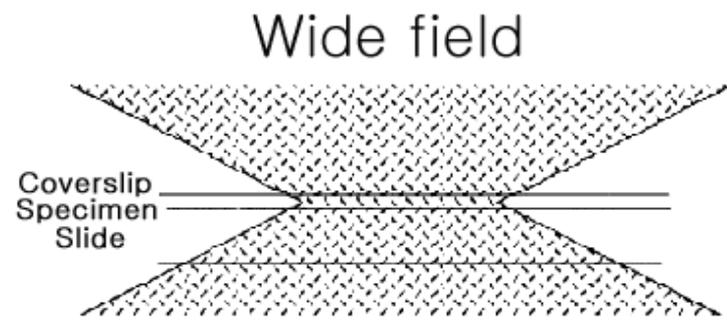
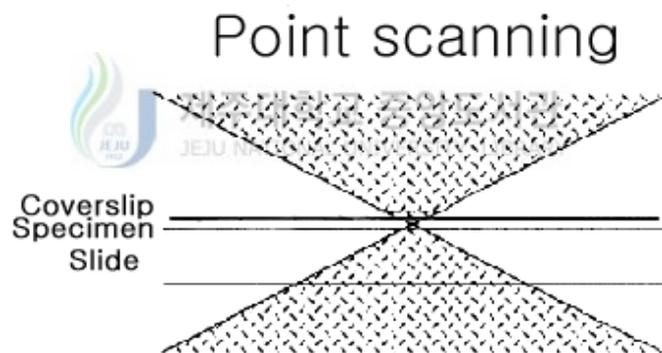


Fig 1. The principle of confocal microscope



(a)



(b)

Fig. 2. A comparison of the illumination experienced by the specimen during (a) full-field illumination in a conventional microscope and (b) single-point illumination in a confocal microscope.

단색수차에서 구면수차를 제외한 코마수차, 비점수차, 상면만곡, 왜곡수차는 입사하는 빛이 광축에서 벗어났을 때 발생한다. 그러므로 입사하는 빛을 광축과 평행하게 만들면 해결되는 수차이다. 그리고 색수차는 입사하는 파장에 따라 초점이 모이는 부분이 달라지므로 단색광을 사용하게 되면 색수차를 해결할 수 있다. 하지만 구면수차는 렌즈 자체의 문제이기 때문에 앞서 제시한 방법으로는 해결할 수 없다.

구면수차와 색수차는 각각 그 자체의 특성에 의해서 종(축상) 변화와 횡(측면) 변화를 가진다. 구면을 통과하는 빛의 굴절은 스넬의 법칙 $n \sin \theta = n' \sin \theta'$ 이 적용되며, 입사각이 매우 작은 근축 광선의 경우에는 경우 근사적으로 $n\theta = n'\theta'$ 이 성립된다. 광선이 광축과 이루는 각 θ 의 sine 함수를 급수로 나타내면

$$\sin \theta = \theta - \frac{\theta^3}{3!} + \frac{\theta^5}{5!} - \dots \quad (1)$$

로 주어진다. 만약 첫 번째 항만을 사용하면 (즉 $\sin \theta \cong \theta$ 라고 가정하면), 1차 광학(first-order optics) 또는 가우스광학(Gaussian optics)이라 한다. 두 번째 항까지 포함하면, $\sin \theta = \theta - \frac{\theta^3}{3!}$ 이 되어 3차 광학(third-order optics)을 다루게 된다. 이러한 종류의 수차를 사이델 수차(Seidel aberration)라고 한다(Juren (1995)).



3. 개구수(Numerical aperture)와 초점 심도(Depth of focus)

대물렌즈로 들어오는 광선이 광축과 이루는 각의 최대값을 θ , 대물렌즈와 관찰할 시료 사이의 매질에 굴절률을 n (공기일 때는 $n=1$)이라 하면, 개구수(numerical aperture)는 $N.A. = n \sin \theta$ 의 값으로 정의된다. 현미경으로 분별할 수 있는 최소의 길이는 개구수에 역비례 한다. 즉, 개구수가 클수록 보다 많은 광선속이 이용되어 상이 더 밝아지며, 근접한 두 점을 식별하는 분해능도 커져 매우 작은 물체라도 볼 수가 있다. 그리고 현미경의 초점 심도(depth of focus)는 시료를 현미경으로 볼 때 선명하게 보이는 시료의 거리범위, 또는 현미경 사진을 찍었을 때 선명하게 찍을 수 있는 시료의 깊이의 범위이다(Juren (1995)).

4. 레일리 기준(Rayleigh Criterion)

모든 광학기구는 분해능의 한계가 있고 그 한계는 크게 두 가지 요인에 기인한다. 앞에서 언급한 여러 수차에 따른 한계와 빛의 회절에 의한 한계이다. Fig. 3에서 보는 것처럼 천체 망원경을 통해 보이는 두 별 S_1, S_2 를 관찰한다고 하면, 이 두 별은 각각 Airy 원판과 회절무늬를 형성한다. 두 별 사이의 각도가 θ 일 때, $\theta > \theta_{\min}$ 이면 (a)에서와 같이 두 개의 Airy 원판은 완전히 분리되어 보인다. 만일 $\theta = \theta_{\min}$ 이면 (b)에서와 같이 간신히 식별할 수 있는 정도로 겨우 분리되어 있고 $\theta < \theta_{\min}$ 이면 (c)에서와 같이 두 개의 Airy 원판이 서로 겹쳐지기 때문에 식별이 불가능하다. 이러한 회절무늬의 식별한계를 레일리 기준(Rayleigh criterion)이라고 하며, 간신히 분해되어 보이는 두 물체에 대한 점 사이의 한계 분리각 θ_{\min} 는

$$\theta_{\min} \equiv 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad (2)$$

이다. 여기서, D 는 렌즈의 직경이고 λ 는 빛의 파장이다. θ_{\min} 이 작을수록 회절무늬의 중앙 원반이 상대적으로 작아지며 물체의 세부구조가 보다 뚜렷하게 분해되어 보인다. 즉 θ_{\min} 이 작을수록 렌즈의 분해능(resolving power)이 크다(Beiser (1991)).

5. Sine 조건과 Herschel 조건

실제 광학계에서는 렌즈를 통과한 빛이 렌즈의 왜곡 때문에 한 초점에 맺히지 않는다. 만약, Fig. 4와 같이 렌즈의 왜곡이 없다면, 임의의 한 점이 렌즈를 통과하여 그 형태 그대로 상이 형성되는 sine 조건을 만족해야 한다. sine 조건은

$$n_1 y_1 \sin \gamma_1 = n_2 y_2 \sin \gamma_2 \quad (3)$$

로 표현된다. 여기서 n_1 는 물체가 놓여 있는 곳의 굴절률, n_2 는 이미지 공간에서의

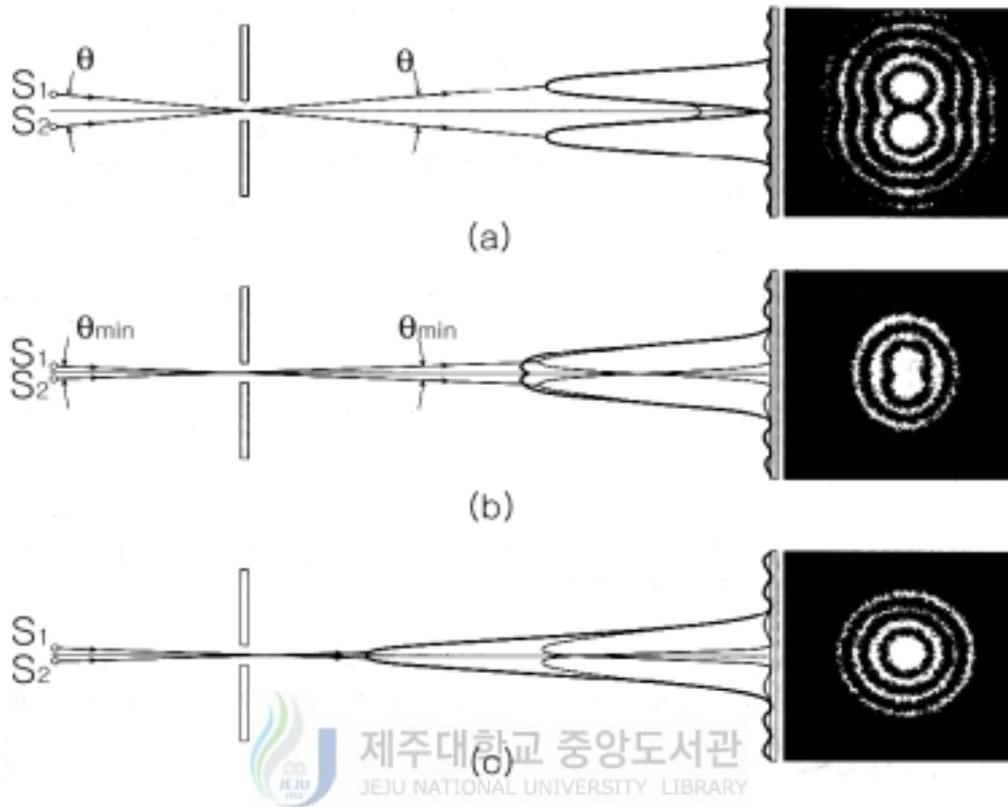


Fig. 3. Rayleigh Criterion for resolvability

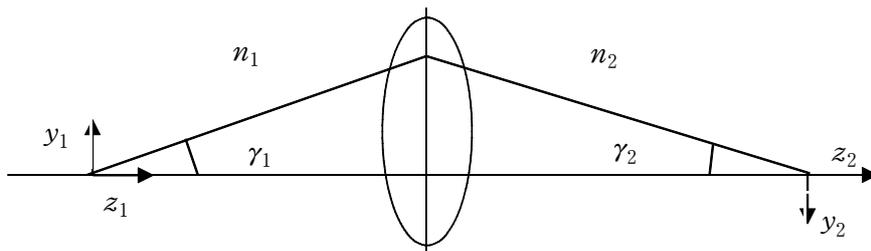


Fig. 4. Illustrating the sine condition and the Herschel condition

굴절률, y_1, y_2 는 각각 물체와 이미지, γ_1, γ_2 는 광축을 이루는 각이다. sine 조건을 만족시키지 못하면 렌즈를 통과한 빛이 한 초점에 형성되지 못하고 퍼지게 된다. 마찬가지로 완전한 영상을 형성하기 위해서는 임의의 한 면이 렌즈를 통과하여 그 형태 그대로 상이 형성되는 Herschel 조건을 만족해야 한다. Herschel 조건은

$$n_1 z_1 \sin^2\left(\frac{\gamma_1}{2}\right) = n_2 z_2 \sin^2\left(\frac{\gamma_2}{2}\right) \quad (4)$$

로 주어진다(Born 등 (1999)). 식(4)의 조건을 만족시키지 못할 경우 초점은 광축 상에 퍼지게 되어 정확한 영상을 얻을 수 없다. 식(4)를 이용하여 sine 조건을 다시 쓰면

$$n_1 z_1 \sin^2 \gamma_1 = n_2 z_2 \sin^2 \gamma_2 \quad (5)$$

가 된다. 일반적인 경우 식(3)과 식(4)을 동시에 만족시킬 수 없기 때문에 광학 현미경에서는 두 값의 차가 최소가 되도록 광학계를 설계한다. 즉, 일반적인 광학 현미경에서는 먼저 sine 조건을 만족하도록 계를 설계하여 영상이 공액면들 사이에 들어오게 함으로써 식(3)과 식(4)의 차이가 최소가 되게 한다. 이러한 이유로 최적의 영상을 얻기 위하여 광학계의 광경로를 조절하는 것이다. 공초점 광학 현미경에서는 바늘구멍에 의해 초점 외의 상은 모두 제거되기 때문에 sine 조건을 고려할 필요가 없고 Herschel 조건만 만족하면 된다. Herschel 조건을 만족시키기 위해서는 위상오차를 최소화 해주어야 한다. 즉 대물렌즈에서 시료까지의 거리와 대물렌즈에서 검출기까지의 거리를 변화시켜 Herschel 조건을 만족시킨다.

6. 렌즈왜곡에 의한 경로차

Fig. 5와 같이 광축의 L 점이 두꺼운 렌즈를 통과하여 광축의 D 점에 초점이 형성된다고 하자. 여기서, 광축으로 부터 렌즈의 높이가 h , L 점에서 렌즈까지의 거리 l , 렌즈에서 D 점까지의 거리 d , 렌즈와 시료 사이의 굴절률 n , k ($k = \frac{2\pi}{\lambda}$)는 파수이다. 이 때 Herschel 조건을 만족시키지 못할 경우 위상오차는

$$\phi = k(l - \sqrt{l^2 + h^2} + nd - n\sqrt{d^2 + h^2}) \quad (6)$$

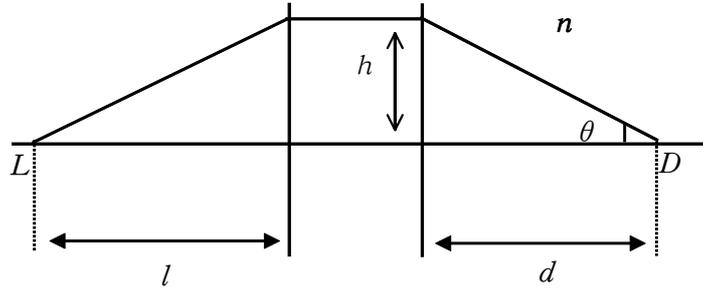


Fig. 5. Geometry of focusing by a lens.

로 주어진다(Sheppard 등(1991)). 만약 $\frac{1}{l}$ 과 d 의 값의 변화에 따라서 경로차가 발생하면 식(6)은

$$\nabla \phi = -k \left[l^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right) - \frac{l^3}{\sqrt{h^2 + l^2}} \nabla \left(\frac{1}{l} \right) - n \nabla d + \frac{nd \nabla d}{\sqrt{d^2 + h^2}} \right] \quad (7)$$

이 된다. 식(7)에서 $\tan \theta = \frac{h}{d}$ 이고, 배율은 $M = \frac{l}{d}$ 이므로

$$\begin{aligned} \nabla \phi &= -k \left[\left(M^2 d^2 - \frac{M^3 d^3}{\sqrt{h^2 + M^2 d^2}} \right) \nabla \left(\frac{1}{l} \right) - n \nabla d \left(1 - \frac{\frac{l}{M}}{\sqrt{\left(\frac{l}{M} \right)^2 + \left(\frac{l}{M} \right)^2 \tan^2 \theta}} \right) \right] \\ &= -k \left[\left(M^2 d^2 - \frac{M^3 d^3}{\sqrt{h^2 + M^2 d^2}} \right) \nabla \left(\frac{1}{l} \right) - n \nabla d \left(1 - \frac{1}{\sqrt{1 + \tan^2 \theta}} \right) \right] \\ &= -k \left[\left(M^2 d^2 - \frac{M^3 d^3}{\sqrt{h^2 + M^2 d^2}} \right) \nabla \left(\frac{1}{l} \right) - n \nabla d (1 - \cos \theta) \right] \end{aligned} \quad (8)$$

로 주어진다. 식(8)에서 M 값이 매우 클 때 이항정리를 이용하여

$$\left(M^2 d^2 - \frac{M^3 d^3}{\sqrt{h^2 + M^2 d^2}} \right) \text{을 다시 정리하면}$$

$$\begin{aligned}
(M^2 d^2 - \frac{M^3 d^3}{\sqrt{h^2 + M^2 d^2}}) &= (M^2 d^2 - \frac{M^2 d^2}{\sqrt{\frac{h^2}{M^2 d^2} + 1}}) \\
&= M^2 d^2 (1 - \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{M^2 d^2} + 1}}) \\
&= M^2 d^2 (1 - (1 - \frac{h^2}{2M^2 d^2} + \dots)) \\
&= \frac{1}{2} h^2
\end{aligned}$$

이 된다. 따라서 식(8)을 다시 쓰면

$$\phi = -\frac{1}{2} k d^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right) \tan^2 \theta + k n \nabla d (1 - \cos \theta) \quad (9)$$

이 된다. 식(9)의 마지막 부분은 θ 가 매우 작을 때 $\cos \theta \approx 1$ 로 전체 값이 영이 되므로 무시할 수 있다(Sheppard 등(1991)). 따라서

$$\phi \approx -\frac{1}{2} k d^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right) \tan^2 \theta = B \tan^2 \theta \quad (B = -\frac{1}{2} k d^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right)) \quad (10)$$

이며, 렌즈의 수차에 의한 위상오차를 나타낸 것이다. 그러므로 위상오차를 줄이기 위해서는 대물렌즈와 시료까지의 거리(d) 그리고 대물렌즈에서 상까지의 거리(l)를 조절하여 경로차를 최소화하여야 한다.

공초점 광학 현미경에서 시료에서 반사되어 검출기에 도달하는 빛의 세기는

$$I(z) = \left| \int_0^\alpha R(\theta_1) P^2(\theta_1) \exp(2ikzn_1 \cos \theta_1) \sin \theta_1 \cos \theta_1 d\theta_1 \right|^2 \quad (11)$$

로 주어진다(Sheppard 등(1981)). 여기서, z 는 시료가 광축 방향으로 이동한 거리, α 는 광축과 렌즈를 통해 들어오는 빛 사이의 각, $P(\theta_1)$ 는 Pupil 함수이고 $R(\theta_1)$ 는 반사 계수이다. 이때 $P(\theta_1)$ 는 구면수차 효과에 의해 $P(\theta_1) = \exp(i\phi)$ 로 표현할 수 있으며, $R(\theta_1)$ 은 거울을 사용하게 되면 $R(\theta_1) \cong 1$ 이 된다. 따라서 식(11)을 다시 정리하면

$$I(z) = \left| \int_0^\alpha \exp[2i(\phi + kz \cos \theta)] \sin \theta \cos \theta d\theta \right|^2 \quad (12)$$

이 된다. 식(12)는 구면수차에 의한 위상오차가 광축 방향의 빛의 세기 변화에 중요한

부분을 차지하고 있음을 보여주고 있다. 또한 시료의 위치에 따라 검출기의 빛의 세기가 민감하게 반응함을 알 수 있다. 식(12)를 다시 쓰면

$$I(z) = \left| \int_{\cos \alpha}^1 \exp[2iB \left(\frac{1}{c^2} - 1\right) + 2ikzc] cdc \right|^2 \quad (13)$$

이다. 여기서, $c = \cos \theta$, $B = -\frac{1}{2} k d^2 \nabla \left(\frac{1}{l}\right)$ 이다.

7. Fresnel 방정식

Fresnel 방정식에 의해서 입사되는 빛의 전기장이 입사면에 수직인 경우와 수평인 경우에 대한 반사계수는 다르게 된다. 즉 전기장 \vec{E} 가 입사면에 수직인 경우의 반사계수(r_{\perp})는

$$r_{\perp} = \frac{n_i \cos \theta_i - n_t \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (14)$$

이고, 전기장 \vec{E} 가 입사면에 평행한 경우의 반사계수(r_{\parallel})는

$$r_{\parallel} = \frac{n_t \cos \theta_i - n_i \cos \theta_t}{n_i \cos \theta_i + n_t \cos \theta_t} \quad (15)$$

이 된다(Hecht (1998)).

Fig. 6과 같이 거울(mirror)위에 물이 있고 그 위에 덮게 유리(cover-glass)가 놓여있는 3중층 구조에 빛이 입사하였을 경우 전체 반사계수는

$$r = \frac{r_{12} + r_{23} \exp(2i\beta)}{1 + r_{12} r_{23} \exp(2i\beta)} \quad (16)$$

로 주어진다(Born 등 (1999)). 여기서 $\beta = k n_2 t \cos \theta_2$, r_{12} 는 덮게 유리와 물사이의 반사계수이고 r_{23} 는 물과 거울사이의 반사계수 이다. 3번째 층이 거울(mirror)인 경우에는 $r_{23} \cong 1$ 이다. 그리고 $n = \frac{n_1}{n_2}$, $c = \cos \theta_1$ 라 하면, 식(14)를 적용한

입사 빛의 전기장 성분이 입사 면에 수직인 전자기파의 전체 반사계수는

$$r_{\perp} = \exp(2i\phi_{\perp}) \quad (17)$$

이 된다.

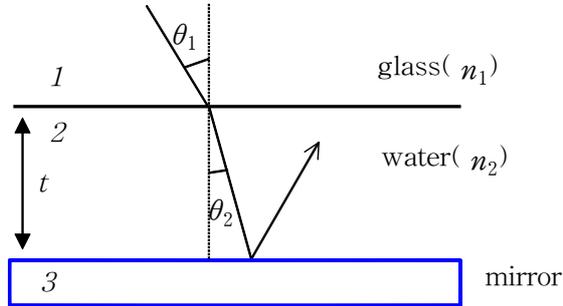


Fig. 6. Light reflection from a perfect reflector with a water layer.

그리고, 식(15)를 적용하여 입사 빛의 전기장 성분이 입사면에 평행한 전자기파의 전체 반사계수는

$$r_{\parallel} = \exp(2i\phi_{\parallel}) \quad (18)$$

이다.

이 때, $\phi_{\perp} = \tan^{-1}\left(\frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \tan\beta\right)$, $\phi_{\parallel} = \tan^{-1}\left(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}} \tan\beta\right)$

이다. 식(17)과 (18)은 위상오차 함수에 의한 전체 반사계수를 보여주고 있으며, 위상 오차가 시료의 두께와 굴절률에 비례하고 있음을 알 수 있다.

렌즈에 의해 빛이 한 초점에 형성된다고 할 때, 반사되는 빛의 평균 반사계수(averaged reflection coefficient) $R(\theta)$ 는

$$\vec{R}(\theta) = \frac{(r_{\parallel} + r_{\perp})}{2} \quad (19)$$

로 표현된다(Sheppard 등(1992)). 렌즈의 왜곡이 없을 때 pupil 함수 $P(\theta_1) = 1$ 과 식(19)를 식(11)에 대입하여 다시 정리하면

$$I(z) = \frac{1}{4} \left| \int_{\cos \alpha}^1 \left[\exp(2i(\tan^{-1}(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}) \times \tan(g\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + kzn_1c) + \exp(2i(\tan^{-1}(\frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \times \tan(g\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + kzn_1c) \right] c dc \right|^2 \quad (20)$$

로 표현되며, 여기서 $c = \cos \theta_1$, $n = \frac{n_1}{n_2}$, $g = kn_2t$ 이고 t 는 시료의 두께이다.

식(20)은 렌즈의 왜곡이 없을 경우에도 시료의 두께와 굴절률에 의해서 위상오차가 발생한다는 것을 보여주고 있으며, 이로 인한 위상오차가 광축방향의 빛의 세기 변화에 많은 영향을 미치고 있음도 볼 수 있다.

식(20)의 side-lobe 영향을 최소화하기 위해서는 광경로를 조절하여 위상차(ϕ)를 보정하여 주어야 한다. 그러므로 식(10)을 식(20)에 적용한 빛의 세기는

$$I(z) = \frac{1}{4} \left| \int_{\cos \alpha}^1 \left[\exp(2i(\tan^{-1}(\frac{c}{n\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}) \times \tan(g\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + B(\frac{1}{c} - 1) + kzn_1c) + \exp(2i(\tan^{-1}(\frac{\sqrt{1-n^2(1-c^2)}}{nc} \times \tan(g\sqrt{1-n^2(1-c^2)})) + B(\frac{1}{c} - 1) + kzn_1c) \right] c dc \right|^2 \quad (21)$$

으로 표현할 수 있다(Sheppard 등(1992)).

III. 실험 방법

1. 전산기 시늬

렌즈의 왜곡에 의한 광축방향의 빛의 세기 변화를 알아보기 위하여 메스메티카 프로그램을 이용하여 식(13)의 $B = -\frac{1}{2}kd^2\nabla\left(\frac{1}{l}\right)$ 값을 일정하게 고정시킨 후 kz 의 값을 변화시키면서 광축방향에 대한 빛의 세기 변화를 전산기 시늬를 하였다. 그리고 시료의 두께에 따른 빛의 세기변화는 식(20)의 두께(t)를 일정하게 고정시킨 후 kz 의 값과 B 의 값을 변화시키면서 전산기 시늬하였다.

2. 실험 장치 및 방법

렌즈의 왜곡과 시료의 특성 따른 side-lobe를 최소화할 수 있는 지점을 찾기 위한 실험 개략도는 Fig. 7과 같다. 광원으로는 파장이 633nm인 He-Ne 레이저(Melles Griot)를 사용하였고, 대물렌즈는 배율이 20x, 40x인 것을 사용하였다. 빛 넓히개(Beam expander)는 렌즈에 빛이 입사할 때 입사하는 영역을 넓혀 분해능을 향상시키기 위하여 사용되었고, 초점거리가 약 2.75cm 와 20cm인 렌즈를 사용하여 빛의 넓이를 약 10배 확대하였다. 시료가 놓여 있는 스테이지는 컴퓨터 제어를 통해 스텝 모터가 z방향으로 2.5 μ m씩 일정하게 이동하도록 하였다. 검출기 앞에 있는 바늘구멍은 초점 외의 상을 제거하기 위하여 사용된 것이며 20 μ m를 사용하였다. 검출기 앞의 렌즈는 바늘구멍을 통과한 빛을 모으기 위한 것으로 초점거리가 약 3cm인 렌즈를 사용하였다. 실험은 He-Ne 레이저에서 나온 빛이 빛 넓히개에 의해 확대되고 반투과 거울을 지나 스텝모터 위에 놓여진 시료에 조사된다. 시료에서 반사된 빛은 바늘구멍을 지나 검출기에 검출되고 이 때의 신호는 컴퓨터에 의해 아날로그 신호가 디지털화 되어 저장된다. 스텝모터를 z축 방향으로 2.5 μ m씩 움직이면서 대물렌즈에서 시료까지의 거리 그리고 대물렌즈에서 검출기까지의 거리를 일정하게 변화시키면서 반복 실험하여 반사된 빛의 세기를 측정하였다.

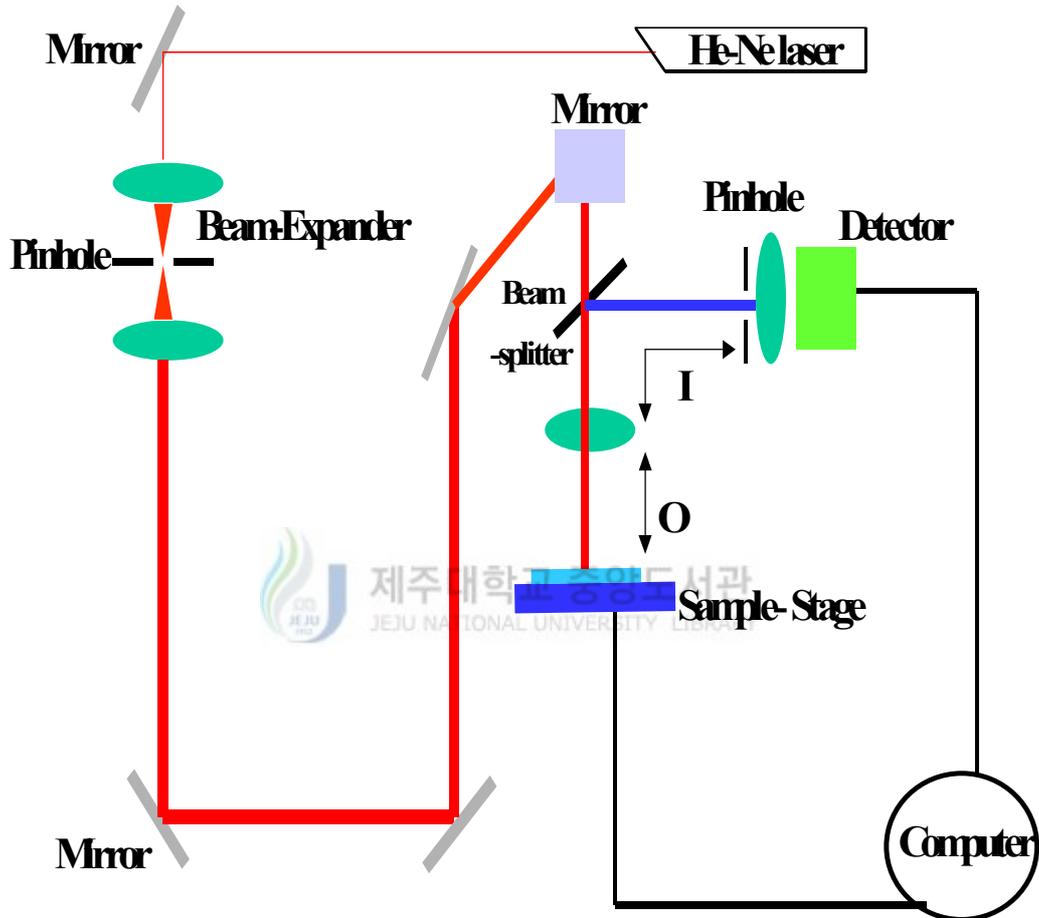


Fig. 7. Schematic diagram of confocal microscope.

IV. 결과 및 논의

1. 전산기 시뮬 결과

식(13)을 이용하여 위상오차($B = -\frac{1}{2}kd^2 \nabla \left(\frac{1}{l}\right)$)의 변화에 따라 빛의 세기가 변화하는 모습을 전산기 시뮬을 하였으며 그 결과를 나타낸 것이 Fig. 8이다. 광원의 파장은 633 nm, 시료는 거울이며, 대물렌즈는 20배 ($\alpha = 23^\circ$, $N.A.-0.4$)렌즈를 사용했을 경우이다. 가로축은 렌즈의 초점거리에서 벗어난 길이를 파장으로 규격화한 값으로 무차원이다. 파장으로 규격화한 이유는 시료가 광축 방향으로 일정하게 움직이고 있음을 보여주기 위함이다. 세로축은 거리 변화에 따른 빛의 세기이다. (a)는 $B = 0$ 인 경우로 위상오차에 의해 발생하는 경로차가 없는 경우에 거리 변화에 따른 빛의 세기를 나타낸다. (b)는 $B = 100$ 인 경우로 $B = 0$ 인 경우와 비교해 볼 때 빛의 최대 세기의 분포가 원점에서 오른쪽으로 이동하였고, side-lobe의 크기가 커지고 있다. (c)는 B 의 값이 (b)에 비해 2배정도 증가한 것으로 (a)에 비해 빛의 최대 세기의 분포가 오른쪽으로 약 450kz정도 이동했으며, 반치폭도 넓어지고 있다. 또한 빛의 최대 세기도 0.0035로 작아지고 있다. (d)는 $B = 300$ 일 때 빛의 세기 분포가 (a)~(c)에 비해 오른쪽으로 많이 이동하였고, 빛의 최대 세기 값을 $B = 0$ 일 때와 비교해 볼 때 반 이상 낮다. 또한, side-lobe의 크기도 급격하게 증가하였다. 그리고 (a)에서는 빛의 최대 세기가 있는 부분을 중심으로 대칭 형태를 이루었지만 (d)는 비대칭의 형태를 보이고 있다. 이와 같은 결과는 side-lobe의 크기와 반치폭의 넓이가 광경로에 의존하고 있음을 보여주고 있으며, 경로차가 클수록 분해능이 떨어진다는 것을 알 수 있다.

같은 방법으로, Fig. 9는 40배($\alpha = 40^\circ$, $N.A.-0.65$) 대물렌즈를 사용하였을 경우에 전산기 시뮬 결과이다. (a)는 위상오차가 없는 경우에 side-lobe의 크기가 매우 작음을 나타내고 있다. (b)는 빛의 세기 분포가 (a)에 비해 오른쪽으로 이동하였고, 빛의 최대 세기도 반정도 낮아졌음을 볼 수 있다. (c)에서는 side-lobe의 크기가 급격하게 증가하였으며 반치폭의 넓이도 상당히 증가하였다. (d)는 B 의 값이 (c)에 비해 2배정도 증가한 것으로 side-lobe의 크기를 빛의 최대 세기와 비교해볼 때 거의 차이가 없으며, 반치폭의 크기도 (a)에 비해 약 6배정도 넓어졌다. 이 상태에서 광축 방향으로

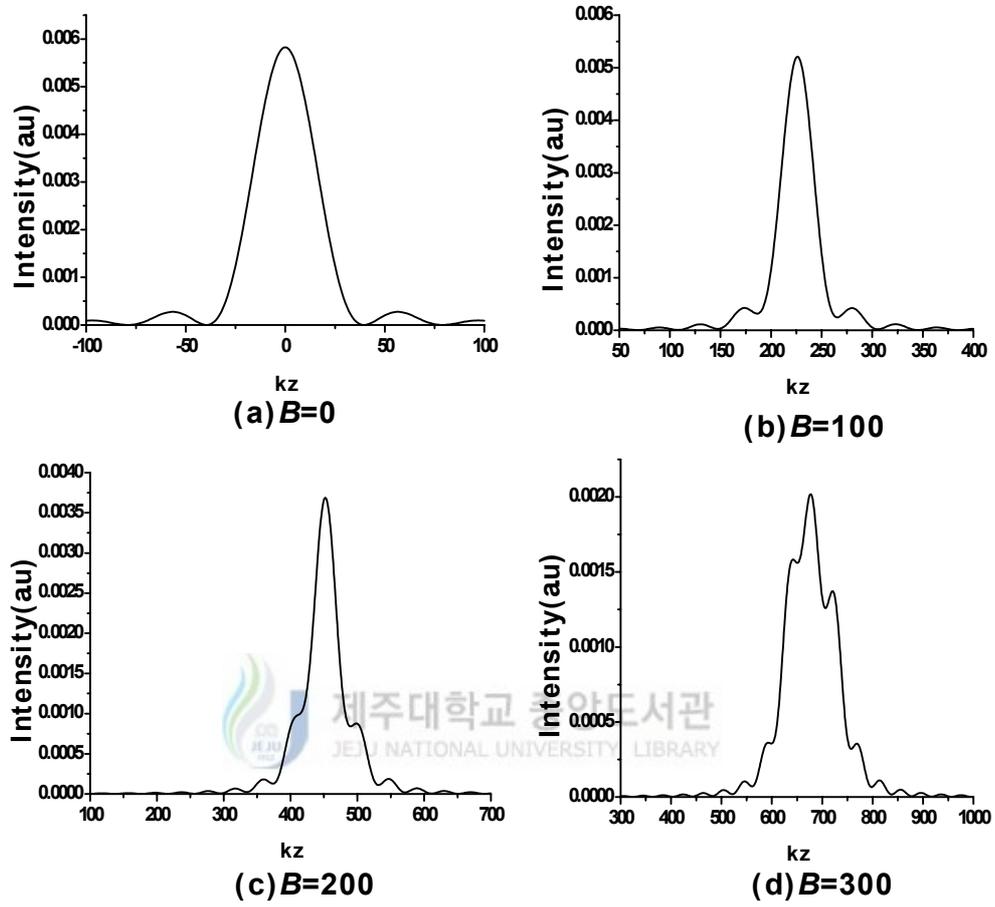


Fig. 8. Axial responses with 20x lens when $B=0, 100, 200, 300$.

$$\left(B = -\frac{1}{2} k d^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right), d : \text{distance from objective to sample}, \right.$$

$$\left. l : \text{distance from objective to image} \right)$$

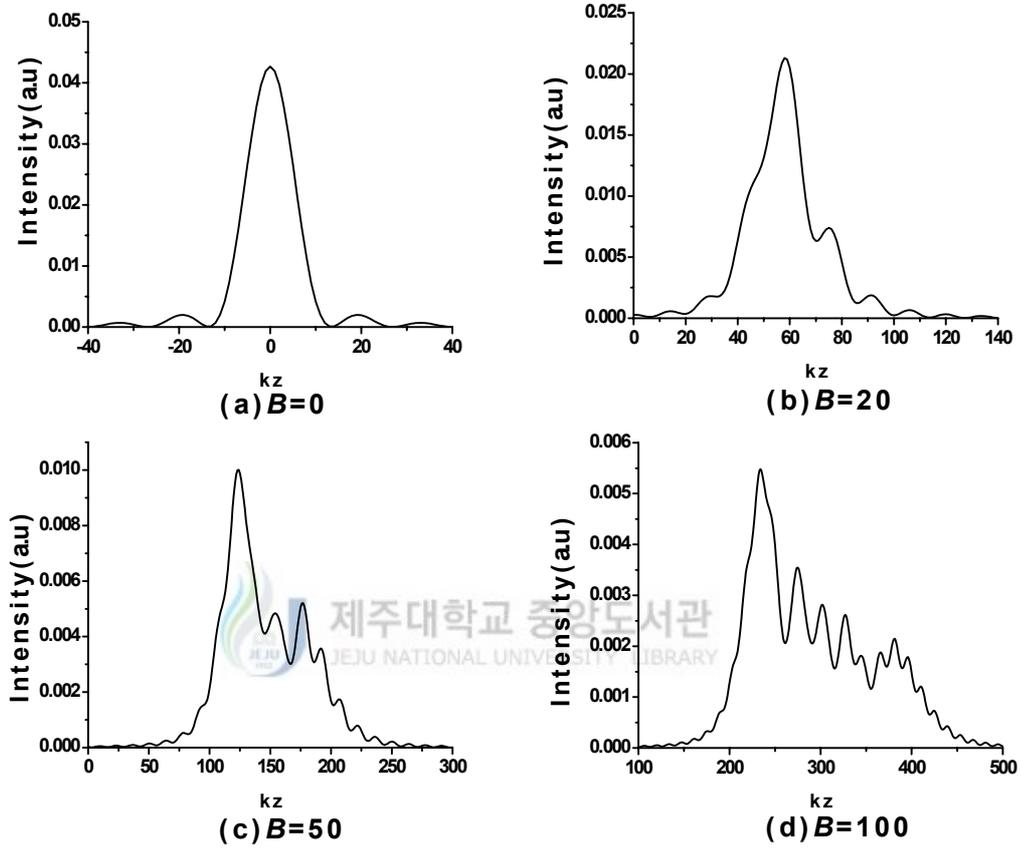


Fig. 9. Axial responses with 40x lens when $B=0, 20, 50, 100$.

$$\left(B = -\frac{1}{2} kd^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right), \quad d : \text{distance from objective to sample}, \right.$$

$$\left. \quad \quad \quad l : \text{distance from objective to image} \right)$$

시료를 측정할 경우 시료의 형태를 거의 구분할 수 없다. 위의 결과에서 렌즈의 왜곡에 의해 발생하는 side-lobe의 영향이 커질수록 반치폭의 크기는 점점 증가하며, 빛의 세기 또한 감소하고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 빛의 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 대칭 형태에서 비대칭 형태로 바뀌었고 렌즈의 개구수(numerical aperture)값이 클수록 경로차의 변화에 민감하게 반응함을 알 수 있었다.

식(20)을 이용하여 시료의 두께에 따른 빛의 세기 변화를 전산기 시뮬한 결과를 나타낸 것이 Fig. 10이다. (a)는 시료(물)가 없는 경우, 거울과 덮개 유리(cover-glass)만 있는 경우로 빛의 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 대칭 형태를 이루고 있음을 볼 수 있고 side-lobe도 나타나고 있지 않고 있다. (b)는 시료의 두께가 $19\mu\text{m}$ 인 경우로 빛의 세기 분포가 왼쪽으로 이동하였는데 이는 공기보다 물의 굴절률이 크기 때문에 유효 광경로(effective optical length)가 짧아져서 초점이 음의 방향으로 이동했기 때문이다. 또한, side-lobe의 영향으로 선폭도 더 넓어졌음을 관찰 할 수 있다. (c)는 시료의 두께가 $27\mu\text{m}$ 인 경우로 빛의 최대 세기도 낮아졌으며 side-lobe도 증가하였고 비대칭 형태를 이루고 있음을 볼 수 있다. (d)는 시료의 두께가 $33\mu\text{m}$ 인 경우로 side-lobe의 크기가 많이 증가하였으며 빛의 최대 세기도 낮아졌음을 볼 수 있다. (a)~(d)에서 보듯이 시료의 두께가 증가함에 따라 위상오차가 발생하게 되고 이로 인한 side-lobe의 크기가 급격히 증가하는 현상을 보였다.

식(21)을 이용하여 광경로차 조절에 의한 반사광의 세기 변화에 따른 전산기 시뮬 결과가 Fig. 11과 Fig. 12 이다. Fig. 11은 시료의 두께가 $19\mu\text{m}$ 와 $33\mu\text{m}$ 일 때 광경로 변화값 B 를 변화시킬 때 빛의 세기 변화를 나타낸 것이다. 시료의 두께(t)가 $19\mu\text{m}$ 일 때는 B 의 값이 변함에 따라서 빛이 세기도 증가하다가 $B=16$ 부근에서 빛의 세기가 가장 크게 나타나고 이보다 큰 값에서는 감소하고 있다. 이 결과는 광경로의 변화 값이 16일 때에 위상오차가 보정되어 빛의 세기가 가장 크게 나타난 것을 알 수 있다. 또한 시료의 두께(t)가 $33\mu\text{m}$ 인 경우는 B 의 값이 약 28일 때에 빛이 세기가 가장 크게 나타나고 있다.

Fig. 12는 시료의 두께의 변화에 따른 위상오차를 광경로 변화값 B 에 의해 위상 보정을 해주지 않았을 때(a)와 보정을 해주었을 때(b)의 빛의 세기 변화를 보여주고 있다. 위상 보정을 해주지 않았을 때는 시료의 두께가 증가함에 따라 위상오차가 점점 커지고 이로 인해 side-lobe가 증가하여 전체적인 빛의 세기가 점점 감소하고 있음을 보

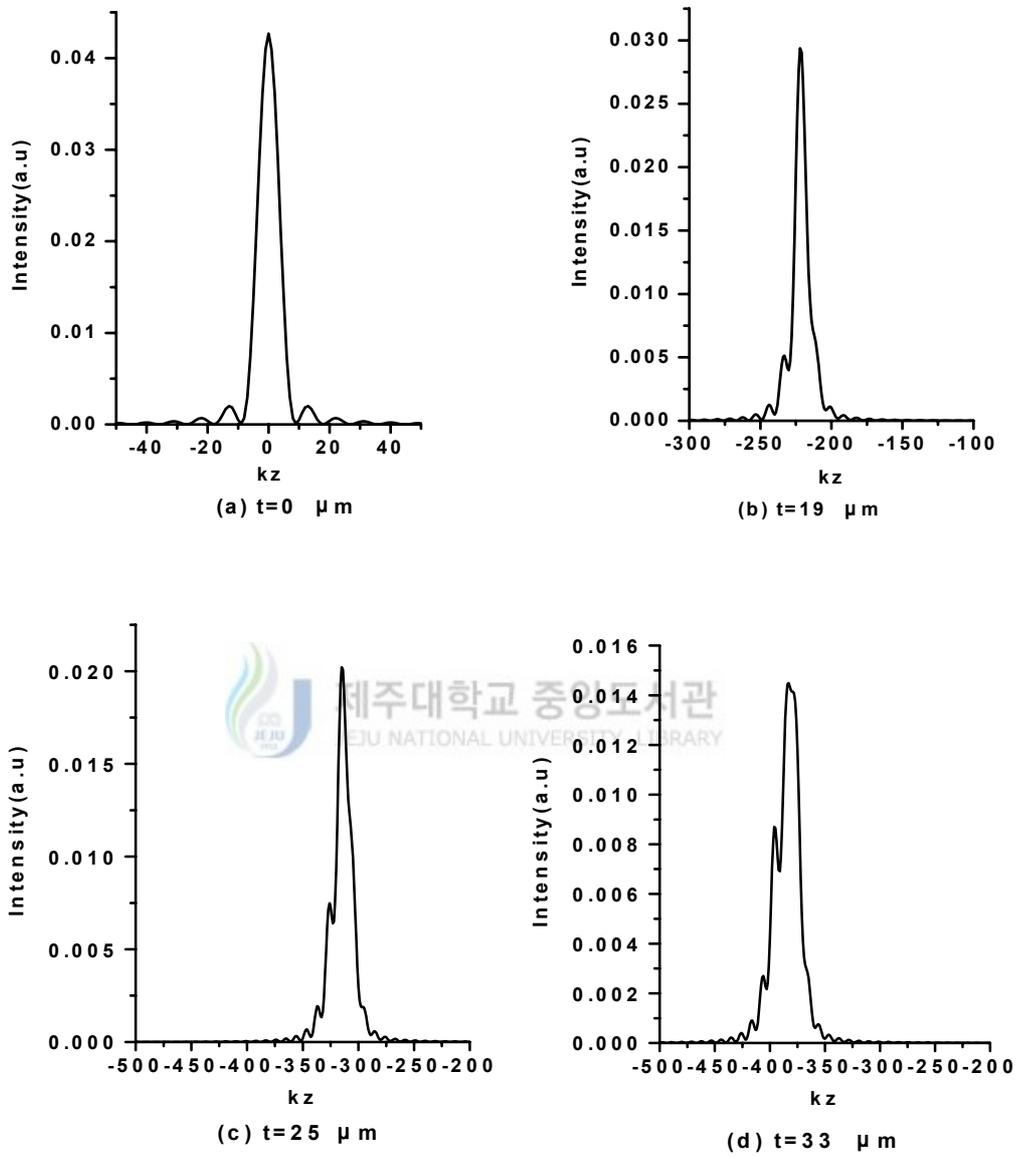


Fig 10. Effect of side-lobe with thickness(t : thickness).

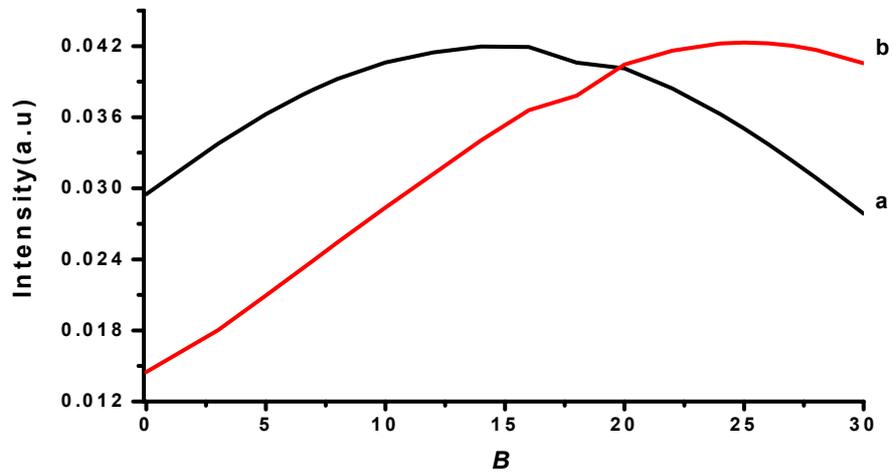


Fig. 11. Intensity for various values of coefficient B with sample thickness $a=19\mu\text{m}$, $b=33\mu\text{m}$.

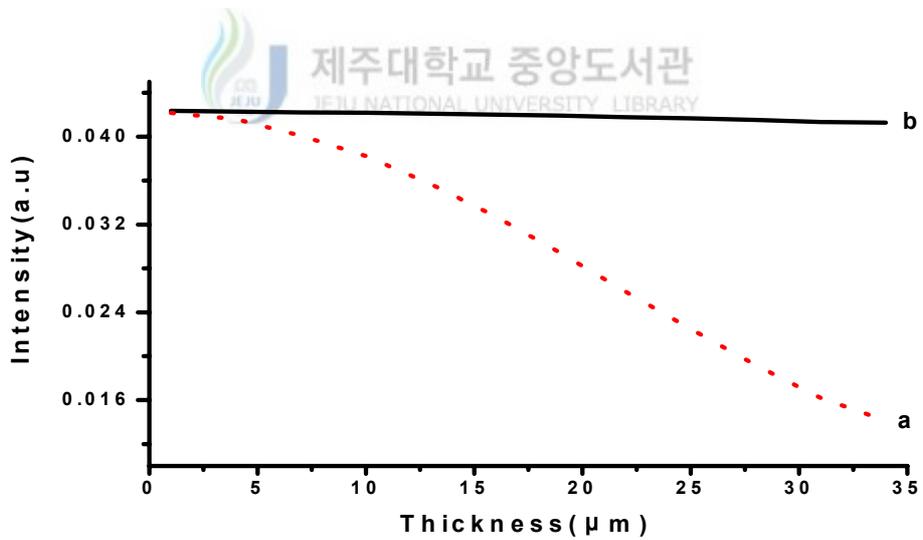


Fig. 12. The variations of intensity by not phase compensation(a) and phase compensation(b).

여주고 있다. 반면에 위상오차를 보정해 주었을 경우는 시료의 두께가 변화더라도 빛의 세기는 거의 일정하게 나타나고 있음을 알 수 있다.

Fig. 13과 Fig. 14는 시료(물)의 두께가 $19\mu\text{m}$, $33\mu\text{m}$ 일 때에 위상 보정 전·후의 광축 방향에 대한 빛의 세기 변화를 보여주고 있다. Fig. 13에서 (a)는 위상 보정 전의 상황이며 (b)는 위상 보정 후의 상태이다. Fig. 11의 전산기 시뮬 결과에서 시료의 두께가 $19\mu\text{m}$ 일 때 빛의 세기가 가장 크게 나타내었던 $B=16$ 을 대입하여 Fig. 10(b)의 위상 보정 전의 side-lobe의 영향을 최소화 시켰다. 즉 위상 보정치 $B=16$ 을 적용함으로써 빛의 최대 세기는 증가하였고, 빛의 세기 분포가 빛의 최대 세기 값을 중심으로 대칭형태로 바뀌었다. Fig. 14는 시료의 두께가 $33\mu\text{m}$ 인 경우 $B=28$ 의 값을 적용하여 위상 보정 전의 전산기 시뮬 결과인 Fig. 10(d)의 side-lobe 영향을 감소시켰다.

이와 같은 결과에서 알 수 있듯이 시료의 두께에 따른 위상오차를 보정하여 광축 방향의 side-lobe의 영향을 최소화 할 수 있다. 즉, 시료의 3차원 상을 형성할 때 중요한 요소로 작용하는 광축 방향의 분해능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

2. 실험 결과

Fig. 15는 20배 대물렌즈($\alpha=23^\circ$, $N.A=0.4$)를 사용하였을 때의 실험 결과이다. 가로축은 시료가 광축 방향으로 이동한 거리를 나타낸 것이며, 세로축은 거리의 변화 따른 빛의 세기를 나타낸 것이다. 시료는 거울을 사용하였고, 시료에서 대물렌즈까지의 거리(O)를 일정한 범위 내에서 광축 방향으로 $2.5\mu\text{m}$ 씩 이동하고, 대물렌즈에서 상까지의 거리(I)를 5cm 씩 변화시키면서 빛의 세기가 변화하는 것을 측정하였다. (a)는 $I = 25.5\text{cm}$, $O = 2000\mu\text{m}$ 인 경우로 side-lobe의 크기가 매우 크고 반치폭 또한 넓게 분포하고 있다. 그리고 빛의 세기의 최대값은 작게 나타남을 볼 수 있다. 이에 반해 (b)는 $I = 20.5\text{cm}$, $O = 2045\mu\text{m}$ 상태로 side-lobe의 크기가 최소화되었으며 빛의 세기의 최대 크기도 증가하였다. 또한, 빛이 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 대칭 형태를 보이고 있다. 이는 경로차가 없는 경우의 전산기 시뮬결과인 Fig. 8(a)에 가장 유사한 결과이다. 즉, 이 부분이 경로차가 최소화되는 지점으로 볼 수 있다. (c)와 (d)의 경우는 반치폭의 넓고, side-lobe의 크기도 빛의 세기 최대값과 비교해볼 때 무시 할

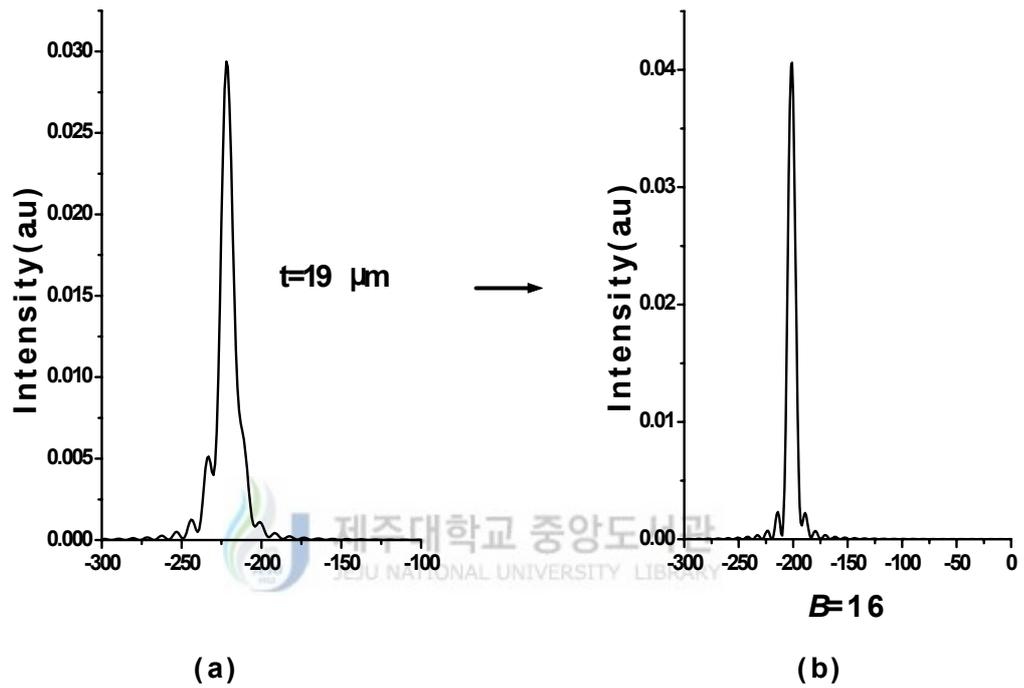


Fig. 13. Axial response intensity for various values of coefficient B .

(t : sample thickness, $B = -\frac{1}{2} kd^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right)$, d : distance from objective to sample, l : distance from objective to image, a : Before phase compensation, b : after phase compensation)

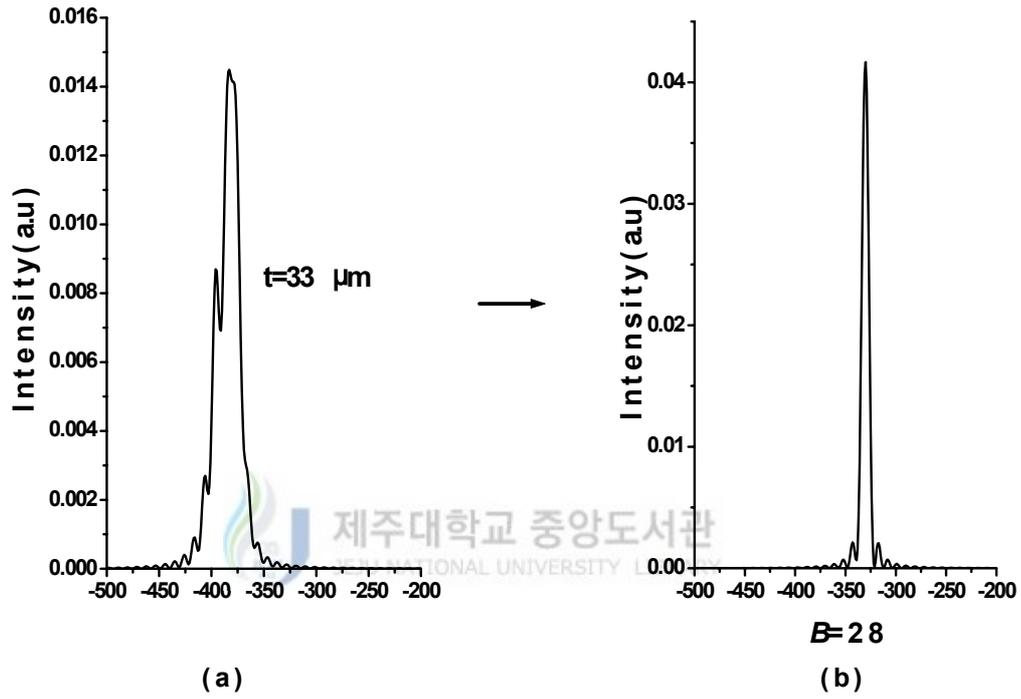


Fig. 14. Axial response intensity for various values of coefficient B .

(t : sample thickness, $B = -\frac{1}{2} kd^2 \nabla \left(\frac{1}{l} \right)$, d : distance from objective to sample, l : distance from objective to image
a : Before phase compensation, b : after phase compensation)

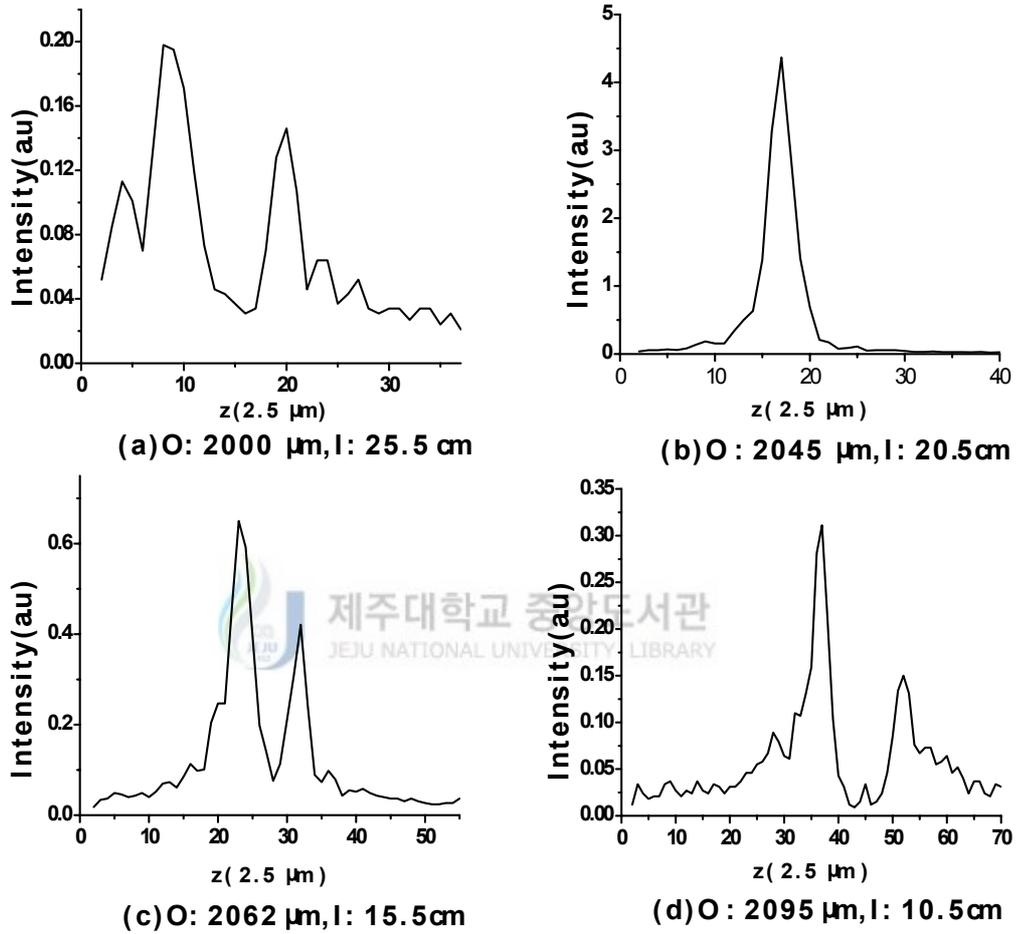


Fig. 15. Axial response for 20x objective lens. (O : distance from objective to sample, I : distance from objective to image)

수 없을 정도로 크다. 그리고 빛의 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 반대칭의 형태를 이루고 있다.

40배의 대물렌즈($\alpha=40^\circ$, $N.A.=0.65$)를 사용하여 같은 방법으로 빛의 세기를 측정 한 실험 결과가 Fig. 16이다. (a)는 위상오차에 의한 side-lobe의 영향으로 반치폭이 넓고, 빛의 최대 세기도 작다. (b)는 반치폭은 좁아졌으며 빛의 세기의 최대 크기는 증가하였다. 그리고 빛의 세기 분포도 (a)에 비해 오른쪽으로 이동하였음을 볼 수 있었다. 이것은 (a)와 비교해 경로차가 감소하였기 때문에 나타난 현상이다. (c)에서는 side-lobe의 크기가 빛의 세기 최대값과 비교해 매우 작아졌으며 반치폭도 매우 좁아졌으며, 빛의 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 대칭 형태에 근접함을 확인할 수 있었다. 그러므로 이 부분이 Herschel 조건을 가장 잘 만족하는 부분이며, 경로차가 없는 경우에 전산기 시뮬 결과인 Fig. 9(a)에 가장 근접한 것으로 볼 수 있다. Fig. 15와 Fig. 16의 실험 결과에서 보듯이 위상오차를 최소화 할 경우 side-lobe의 크기는 매우 작고, 빛의 세기는 크게 나타났다. 그리고 빛의 세기가 가장 큰 부분을 중심으로 빛의 세기 분포가 대칭 형태를 이루고 있음을 확인할 수 있다. 또한 렌즈의 개구수 (numerical aperture)가 클수록 반치폭의 점점 좁아짐으로써 분해능이 좋아진다는 사실도 알 수 있었다.

렌즈의 왜곡에 의해 발생하는 side-lobe가 광축 방향의 분해능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Fig. 17과 같은 형태의 시료를 초점 심도를 이용하여 측정하였다. 시료는 덮게 유리(cover glass)를 50% 불산 처리 후 증발(evaporation)증착법을 이용하여 알루미늄을 증착 하였다.

Fig. 18은 초점 심도를 이용하여 시료를 측정한 것으로 위상 보정을 하지 않았을 때의 실험 결과이다. 검출기 앞의 바늘구멍을 $20\mu\text{m}$ 로 사용했을 경우에 초점 심도가 $2.5\mu\text{m}$ 인 40배 대물렌즈를 사용하였다. 가로축은 x방향으로 시료를 $2.5\mu\text{m}$ 씩 이동한 거리를 나타내며, 세로축은 빛의 세기를 나타낸다. 우변의 z는 광축 방향으로 시료를 $1.25\mu\text{m}$ 씩 이동한 거리를 표시한 것이다. (a)는 시료를 광축 방향으로 이동시켜 시료의 중간 부분에 초점이 형성되도록 하여 측정한 결과이다. z3 부분에서 빛이 세기가 가장 크게 측정되었다. 이것은 시료 표면에서 시료 중간까지의 깊이가 $3.75\mu\text{m}$ 임을 뜻한다. 하지만 실제 시료의 깊이는 $6.5\mu\text{m}$ 로 측정 결과와 다르게 나타났다. (b)는

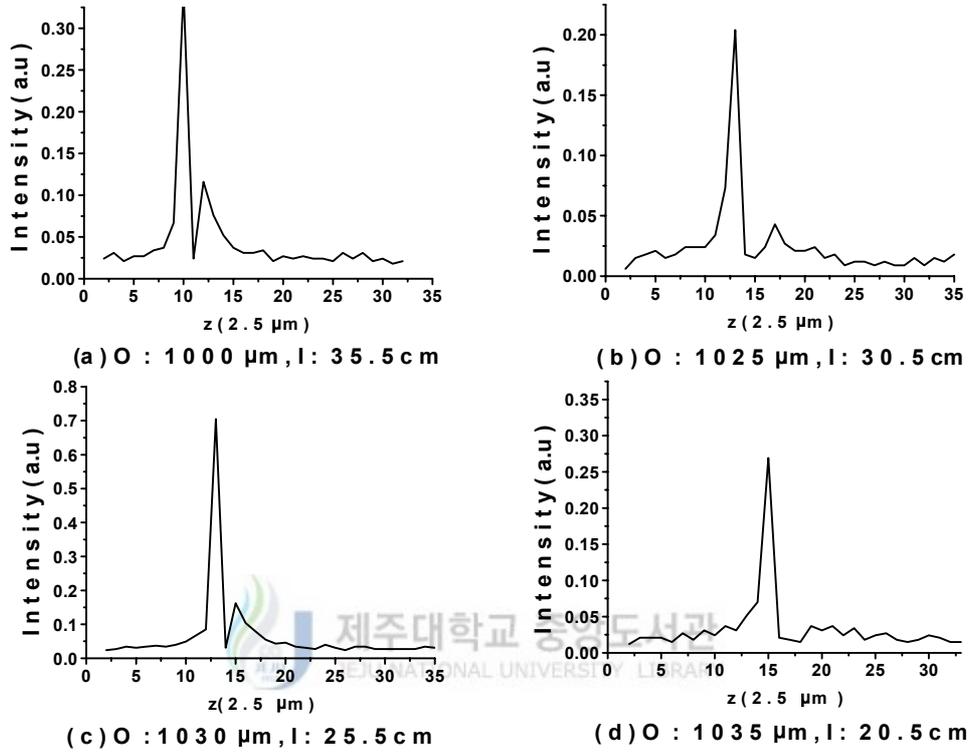


Fig. 16. Axial response for 40x objective lens.(O : distance from objective to sample, I : distance from objective to image)

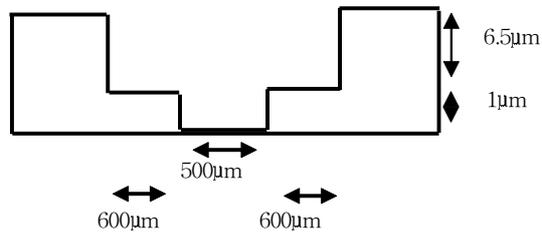
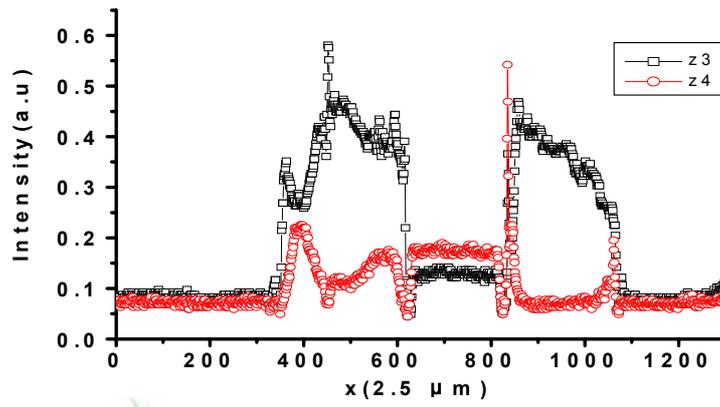
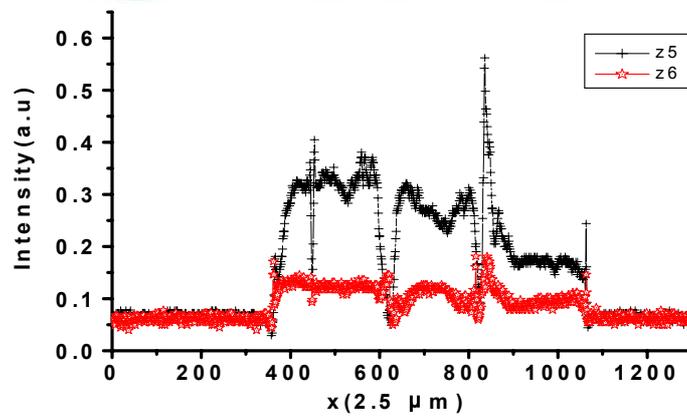
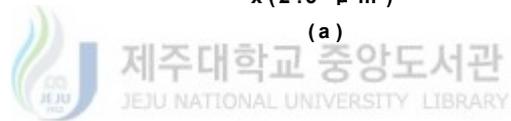


Fig. 17. Sample pattern



(a)



(b)

Fig. 18. Effect of side-lobe with aberration in lens.

시료의 가장 밑 부분에 초점이 형성되었을 때에 빛의 세기를 표시한 것으로 시료의 위치가 광축 방향에 대해 z_4 , z_5 , z_6 로 변화하면서 빛의 세기가 밑 부분의 중간 영역을 제외하고는 계속하여 감소하여야 하지만 z_6 에서 볼 수 있듯이 빛의 세기가 감소하지 않고 증가함을 관찰할 수 있었다. 이것은 side-lobe의 영향으로 시료의 정확한 형태를 알 수 없으며, 또한 시료의 깊이에 대한 정보도 정확히 알 수 없음을 보여주고 있다. 따라서 위상오차에 의해 발생하는 side-lobe가 3차원 상을 형성하는데 중요한 역할을 하는 광축 방향의 분해능에 막대한 영향을 주고 있는 것을 알 수 있었다.

Fig. 19는 Herschel 조건을 만족하도록 광경로를 조절한 후(위상을 보정한 후)에 시료에서 반사된 빛의 세기를 측정된 실험 결과이다. (a)와 (b)는 각각 초점이 시료의 중간 부분과 가장 밑 부분에 형성되도록 시료를 광축 방향으로 이동하여 빛의 세기를 측정된 것이다. (a)에서 보듯이 z_6 일 경우에 빛이 세기가 가장 크게 나타났다. 이는 시료의 중간 깊이가 약 $6.25\mu\text{m}$ 임을 나타내는 것으로 실제 시료의 깊이와 거의 일치한다. 또한, Fig. 18에서 side-lobe의 영향으로 시료에 대한 정보가 부정확했던 것을 광경로의 조절을 통해 수정되었음을 확인할 수 있었다. 또한 (b)를 Fig. 18(b)와 비교하여 보면 Fig. 18(b)에서는 구분할 수 없었던 시료의 가장 밑 부분의 형태를 (b)에서는 빛의 세기 차이를 이용하여 구별할 수 있음을 볼 수 있다.

Fig. 18과 Fig. 19의 결과에서 렌즈 왜곡에 의한 위상오차를 광경로의 조절을 통해 위상오차를 최소화함으로써 광축 방향의 분해능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

시료의 두께와 굴절에 따른 위상오차의 영향을 알아보기 위해 시료는 깊이가 $19\mu\text{m}$, $33\mu\text{m}$ 이며 물, 식염수 등을 채워 놓을 수 있도록 제작한 형태가 Fig. 20 이다.

시료에 물을 채워놓고 광축 방향으로 변화시키면서 빛의 세기변화를 측정된 결과가 Fig. 21 이다. (a)는 대물렌즈에서 시료까지의 거리(O)가 $980.0\mu\text{m}$ 이고 대물렌즈에서 시료까지의 거리(I)가 20cm 로서 광경로의 차로 인한 side-lobe의 영향으로 전체적인 선폭이 넓게 분포하고 있고 빛의 최대 세기를 중심으로 비대칭 형태를 이루고 있다. (b)는 O가 $987.5\mu\text{m}$ 이고 I가 25cm 인 경우로 선폭이 많이 좁아 졌으며 빛의 세기도 증가하였고, 또한 빛의 최대 세기를 중심으로 대칭형태를 이루고 있다. (c)는 O가 $992.5\mu\text{m}$ 이고 I가 30cm 인 경우로 빛의 세기가 (b)와 비교해 많이 낮아졌고 선폭도 side-lobe의 영향으로 커지는 경향을 볼 수 있으며 O와 I를 더 증가시킨 (d)의 경우는 빛의 최대 세기가 더 감소하였고 선폭도 더 넓어 졌음을 알 수 있다. 이 결과에서 O

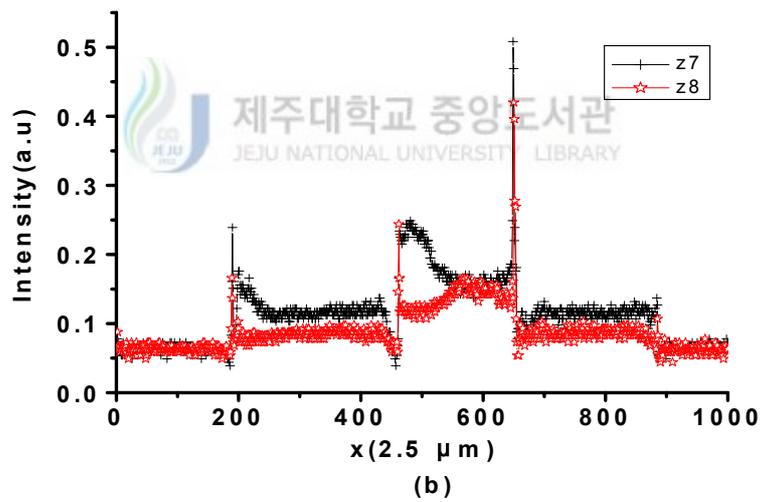
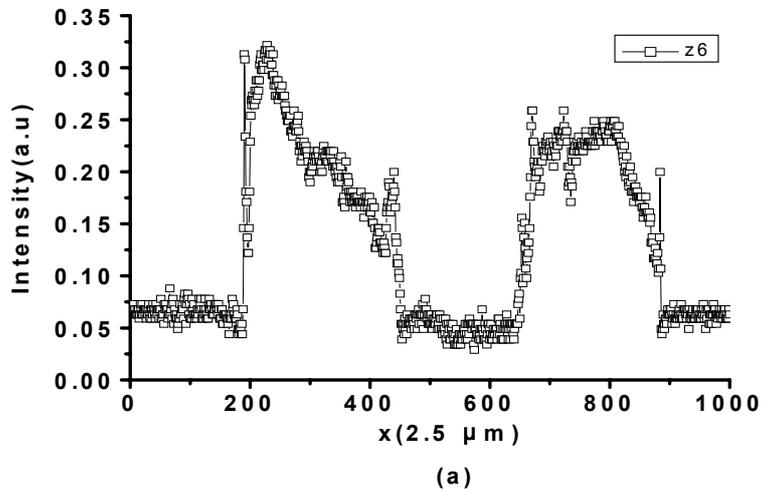


Fig. 19. Minimum of side-lobe.



Fig. 20. Sample pattern ($19\mu\text{m}$, $33\mu\text{m}$).

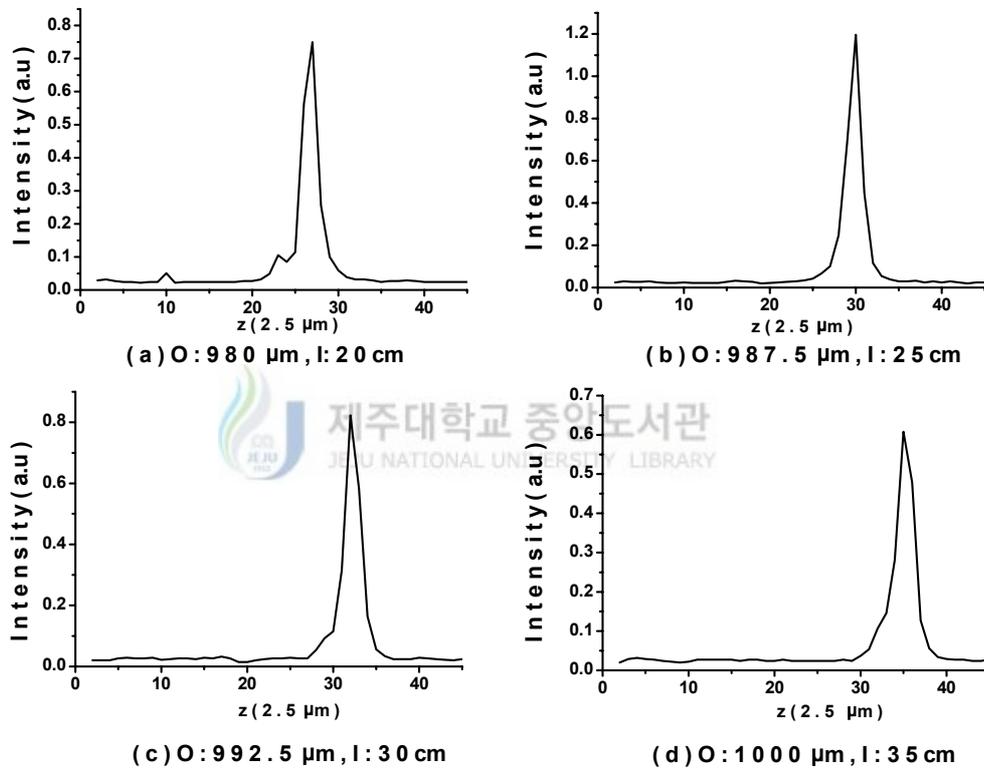


Fig 21. Axial response for sample thickness is $19\mu\text{m}$ with a water.
(O : distance from objective to sample, I : distance from objective to image)

가 $987.5\mu\text{m}$ 이고 I가 25cm인 경우에 전체적인 특징이 Fig. 13(b)의 전산기 시뮬 결과와 가장 유사하므로 이 부분이 위상오차로 인해 발생하는 side-lobe의 영향을 최소화한 지점으로 볼 수 있다.

같은 방법으로 시료(물)의 두께가 $33\mu\text{m}$ 일 때의 실험결과를 나타낸 것이 Fig. 22이다. (a)는 O가 $975.0\mu\text{m}$, I가 20cm인 경우로 선폭의 넓이가 side-lobe의 영향으로 넓게 분포되어 있으며 비대칭이다. 반면에 (b)는 O가 $987.0\mu\text{m}$ 이고 I가 25cm인 경우로 빛의 세기가 가장 크게 나타나고 있고, 빛의 세기분포도 대칭형태로 측정되었다. (c)와 (d)는 O와 I를 더 증가시키면서 측정한 결과로서 반치폭의 크기가 더 넓어졌으며 빛의 최대 세기도 낮아졌다. 결과적으로 (b)는 Fig. 14(b)의 전산기 시뮬 결과에 가장 근접한 특징을 가지고 있고, 특히 시료(물)의 두께가 $19\mu\text{m}$ 인 실험 결과와 비교해 볼 때 빛의 세기의 분포가 더 왼쪽으로 이동하였음을 확인할 수 있다. 이는 Fig. 10에서 시료의 두께가 증가할수록 빛의 세기 분포가 왼쪽으로 이동하는 모습을 보여준 전산기 시뮬 결과와 일치하는 것이다. 또한 Fig. 12의 전산기 시뮬 결과와 같이 위상 보정이 되었을 때는 두께에 상관없이 빛의 세기가 일정하게 나타나고 있음을 관찰할 수 있었다.

Fig. 23은 실제 생물세포에 근접한 실험을 하기 위하여 시료를 물 대신 생체식염수를 사용하였을 경우 깊이가 $19\mu\text{m}$ 인 시료를 가지고 실험한 실험 결과이다. (a)는 빛의 최대 세기를 중심으로 대칭 형태를 이루고 있고 (b),(c),(d)와 비교해 볼 때 빛의 최대 세기도 가장 크게 나타나고 있었다. 특히, 물을 사용하였을 때의 실험 결과인 Fig. 15, Fig. 16과 비교해 볼 때 빛의 세기분포가 왼쪽으로 이동하여 나타나고 있다. 이는 물 보다 생체식염수의 굴절률이 크기 때문에 유효 광경로(effective optical length)가 짧아져서 초점이 음의 방향으로 이동했기 때문이라 사료된다. 이러한 결과는 Fig. 8과 Fig. 9 그리고 Fig. 13, Fig 14의 전산기 시뮬 결과와 일치하는 것이다. (b)는 광경로 차에 의해 발생하는 side-lobe의 영향으로 (a)와 비교해 선폭이 증가하고 있으며 빛의 최대 세기 또한 감소하고 있다. (c),(d)의 경우도 Herschel 조건을 만족시키지 못함으로써 빛의 최대 세기도 감소하는 양상을 보여 주고 있다.

Fig. 25는 시료(생체 식염수)의 깊이가 $33\mu\text{m}$ 인 경우에 광축 방향으로 시료를 이동하면서 빛의 세기를 측정한 것이다. (a)를 (b),(c),(d)와 비교해 볼 때 side-lobe의 영향도 가장 적고 빛의 최대 세기도 가장 크게 나타났다. 또한 시료의 깊이가 $19\mu\text{m}$ 인 실

험 결과와 비교해 볼 때 빛의 세기 분포가 왼쪽에 치우쳐 있음을 볼 수 있었다. 이는 Fig 13와 Fig 14에서 보였던 전산기 시뮬 결과와 일치한다. 따라서 (a)의 결과가 side-lobe의 영향이 가장 적은 부분임을 알 수 있다.



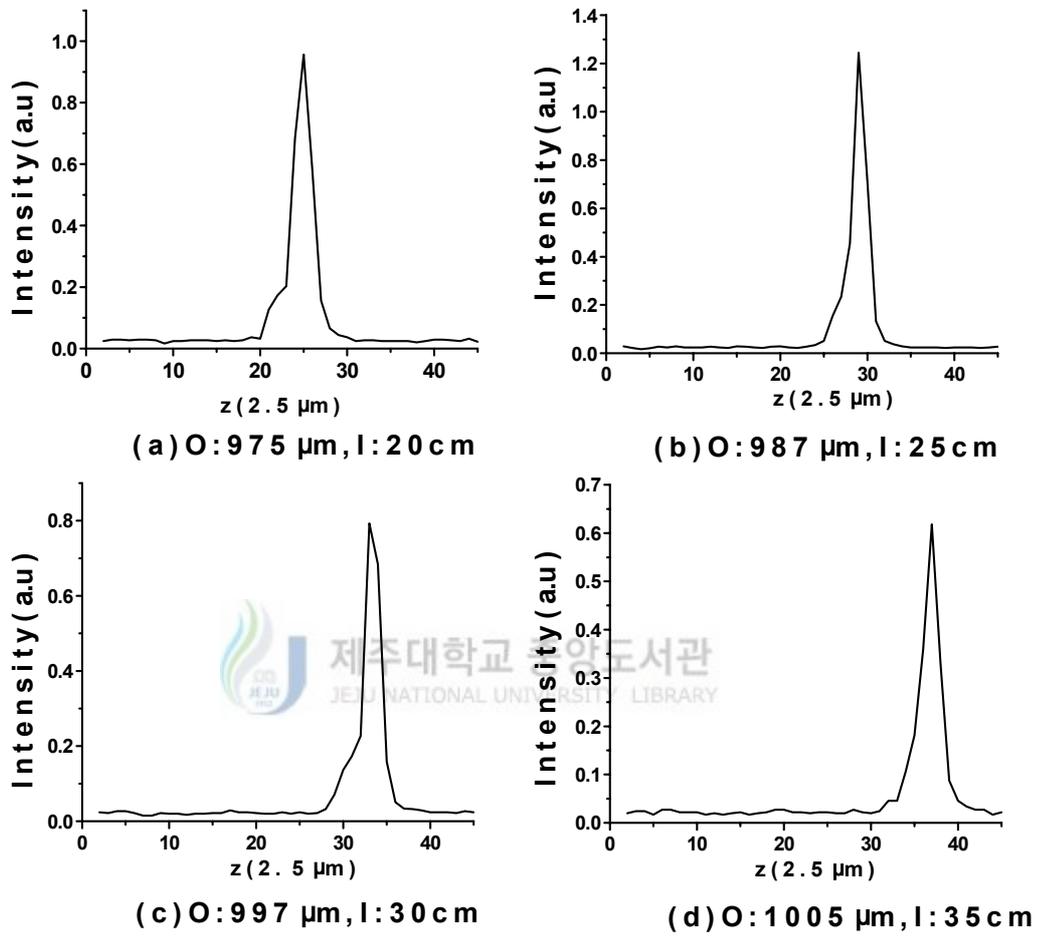


Fig 22. Axial response for sample thickness is 33μm with a water.

(O : distance from objective to sample, I : distance from objective to image)

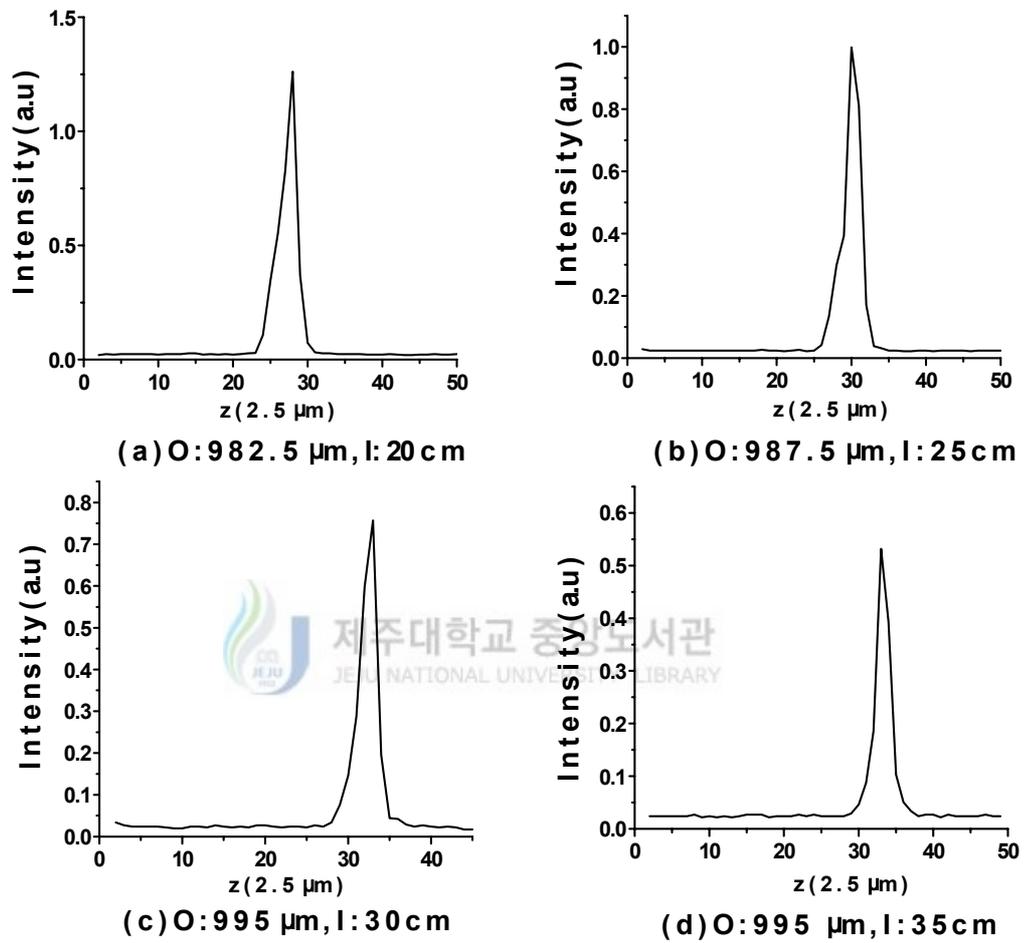


Fig 23. Axial response for sample thickness is 19μm with a solution of salt. (O : distance from objective to sample, I : distance from objective to image)

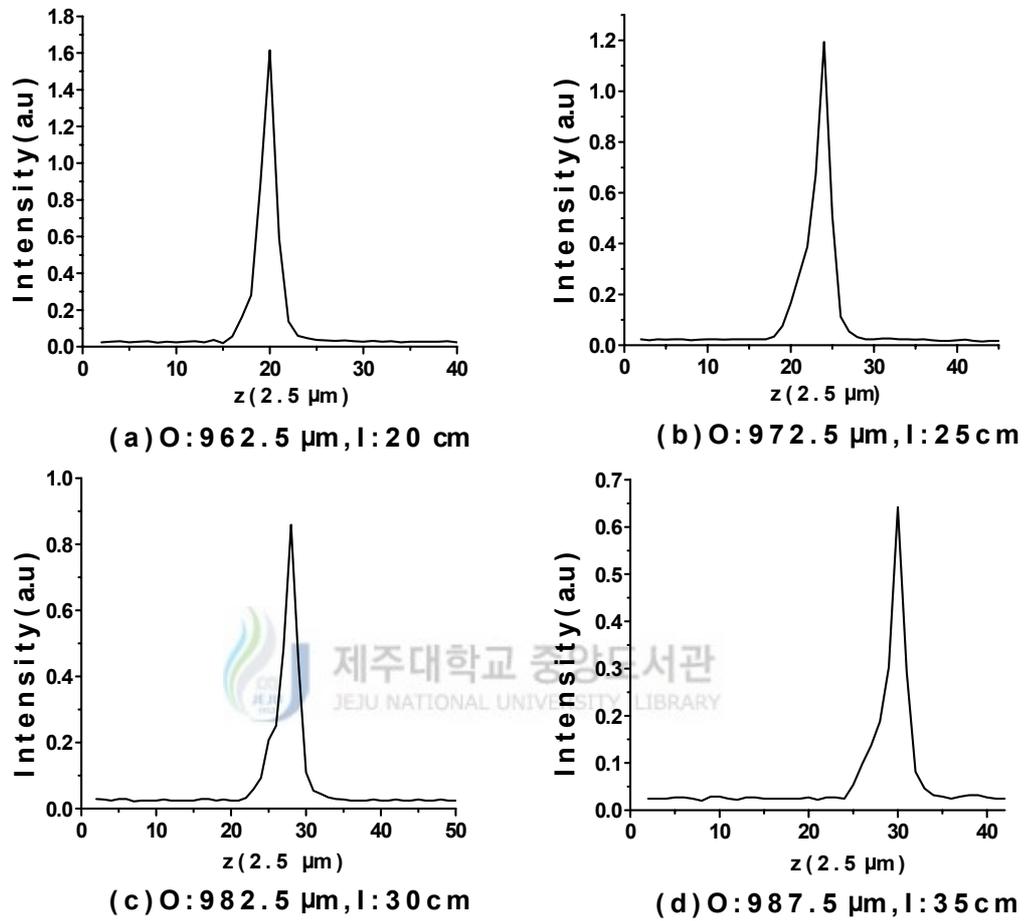


Fig 24. Axial response for sample thickness is $33\mu\text{m}$ with a solution of salt. (O : distance from objective to sample, I : distance from objective to image)

IV. 결 론

본 연구에서는 공초점 현미경에서 완전한 상을 구현하는데 잡음으로 작용하는 광축 방향의 side-lobe를 감소시키는 방법에 대하여 전산기 시뮬과 실험을 통해 조사하였다. Side-lobe가 완전한 상을 얻는데 잡음으로 작용하게 되므로 이를 최소화하기 위해서는 Herschel 조건을 만족시켜야 한다. 본 연구에서는 side-lobe가 최소화되는 조건을 찾기 위하여 대물렌즈와 시료까지의 거리 그리고 대물렌즈와 상까지의 거리를 조절하여 광경로 차에 의한 위상오차를 보정하였다.

렌즈의 왜곡이 있는 경우에 경로차의 변화에 따른 빛의 세기의 변화와 렌즈의 왜곡이 없는 경우에 시료의 특성에 따른 빛의 세기 변화를 전산기 시뮬을 통해 관찰하였다. 그 결과 시료의 두께가 $19\mu\text{m}$ 인 경우에는 광경로 변화값 $B = 16$ 을 적용하여 위상오차를 보정하였고, 시료의 두께가 $33\mu\text{m}$ 일 때는 $B = 28$ 을 적용하여 side-lobe의 영향을 최소화됨을 확인할 수 있었다. 이를 실험에 적용하여 렌즈의 왜곡에 의해 위상오차가 발생할 경우에 배율이 20배와 40배인 대물렌즈를 사용하여 광경로 변화에 따른 side-lobe의 변화를 측정하였으며, $O = 2045\ \mu\text{m}$, $I = 20.5\text{cm}$ (20배)와 $O = 1030\ \mu\text{m}$, $I = 25.5\text{cm}$ (40배)인 지점이 경로차가 없는 경우의 전산기 시뮬 결과와 비교해 유사한 지점이므로 이 부분이 side-lobe의 영향이 가장 적은 부분임을 알 수 있었다. 그리고 시료의 특성에 따라 위상오차가 발생할 경우는 시료의 두께가 $19\mu\text{m}$ 인 경우 O 가 $987.5\mu\text{m}$ 이고 I 가 25cm 일 때, $33\mu\text{m}$ 인 경우에는 O 가 $987.0\mu\text{m}$ 이고 I 가 25cm 인 경우에 side-lobe의 영향이 가장 작은 지점임을 알았다. 전산기 시뮬과 실험결과를 비교해볼 때 시료의 두께가 두꺼워질수록 빛의 세기 분포가 오른쪽에서 왼쪽으로 이동하였고, 위상 보정 후의 빛의 세기는 보정전 보다 증가하였고, 빛의 세기분포도 대칭 형태를 이루고 있음을 알 수 있었다. 이것은 렌즈의 왜곡과 시료의 특성에 의해 발생하는 위상오차를 Herschel 조건을 이용하여 보정하여 줌으로써 광축 방향의 분해능을 높일 수 있으며, 분해능이 향상된 3차원 이미지를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

V. 참고 문헌

- Beiser, 1991, Physics, Addison wesley, Chapter 24.
- Boone G., 1998, Signal processing using optics, Oxford press, New York, pp.106-111.
- Born M. and Wolf E., 1999, Principles of Optics, Cambridge, Chapter 1,4.
- Cheng P. C., T. H. Lin., W. L. Wu., and J. L. Wu. , 1994, Multidimensional Microscopy, Springer-Verlag New York Inc, pp.1-31.
- Christian K. Sieracki, Christopher G. Levey, and Eric W.hansen, 1995. Simple binary optical elements for aberration correction in confocal microscope, Opt. Lett, 20(10), 1213.
- Cogswell C. J. and Sheppard C. J. R., 1991. Effect of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties, Optik, 87(1), 34-38.
- Corle T. R. and Kino G. S., 1994, Confocal scanning optical microscopy and related imaging system, Academic press, New York, Chapter 3.
- Fukano T. and Yamaguchi I. , 2000. Geometrical cross-sectional imaging by a heterodyne wavelength-scanning interference confocal microscope, Opt. Lett, 25(8), 548-550.
- Fujita K, Nakamura O., Kaneko T., Oyamada M., Takamatsu T., Kawata S., 2000. Confocal multipoint multiphoton excitation microscope with microlens and pinhole arrays, Opt. Comm, 174(1-4), 7-12.
- Ilev I. K. and Waynant R. W., 2000. A simple submicron confocal microscope with a fiber optic output. Review of Scientific Instruments, 71(11), 4161-4164.
- Jurgen R. Meyer-Arendt, 1995, Introduction to classical and modern optics, New jersey, Chapter 5, 6.

- Nutter P. W., Wright C. D., 1998. Resolution issues in confocal magneto-optic scanning laser microscopy, *Japan. J. Appl. Phys.*, 37(4B), 2245-2254.
- Minsky M., 1991, *Microscopy apparatus.*, U.S. Patent.
- Yang L. S. and Wang G. Y., Wang J.G., 2000. Surface profilometry with a fiber optical confocal scanning microscope. *Measurement Science & Technology*, 11(12), 1786-1791.
- Schrader M., Hell S. W., Vandervoort HTM, 1998. Three-dimensional super-resolution with a 4pi-confocal microscope using image restoration, *J. Appl. Phys.*, 84(8), 4033-4042.
- Ishihara M. and Sasaki H., 1999. High-speed surface measurement using a non-scanning multiple-beam confocal microscope, *Opt. Eng.*, 38(6), 1035-1040.
- Sharma M. D. and Sheppard C. J. R., 1999. Effects of system geometry on the axial response of the fiber optical confocal microscope, *J. Mod. Opt.*, 46(4), 60-62.
- Shotton, D. M., 1989. Confocal scanning optical microscopy and its application for biological specimens, *J. Cell Sci.* 94, 175-206.
- Sheppard C. J. R. and Min Gu., 1992. Axial imaging through an aberrating layer of water in confocal microscopy, *Opt. Comm.*, 88(2), 180-190.
- Sheppard C. J. R. and Min Gu., 1991. Aberration compensation in confocal microscopy, *Appl. Opt.*, 30(25), 3563-3568.
- Sheppard C. J. R., 1988. Aberrations in high aperture conventional and confocal imaging systems, *Appl. Opt.*, 27(22), 4782-4786.
- Sheppard C. J. R. and T. Wilson., 1981. Effect of high angles of convergence on $V(Z)$ in the scanning acoustic microscope, *Appl. Phys. Lett.*, 38(11), 858-859.
- Steffen Lindek, Christoph Cremer, and Ernst H. K. Stelzer, 1996. Confocal theta fluorescence microscopy with annular apertures, *Appl. Opt.*, 35(1), 126-130.
- Sheppard C. J. R., Min Gu., Keith Brain and Hao Zhou, 1994. Influence of spherical aberration on axial imaging of confocal reflection microscopy, *Appl. Opt.*, 33(4), 616-624.