

第二章 實驗技術

2-1 時間相關單光子計數系統 (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC ; Fluo Time 200, PicoQuant)

本實驗主要利用PicoQuant公司所生產的時間相關單光子計數系統來進行時間-解析螢光光譜 (time-resolved fluorescence spectra) 的測量。其工作原理如圖 2-1 所示，^[1] 茲簡述如下。利用脈衝光源週期性激發樣品以進行單一光子的偵測，精確的紀錄所偵測到的光子訊號與雷射同步觸發訊號 (synchronization trigger, SYNC trigger) 的相對時間，並對單一光子所測得的相對時間進行累計，以重建螢光訊號波形。由於”pile up”的效應，^[2] TCSPC技術所要求的實驗條件為”每個週期所偵測到的光子數目遠小於 1”，在此偵測條件下才可正確地重現實際放光訊號的時間波形 (temporal profile)。

TCSPC之儀器配置如圖 2-2 所示。^[3]所使用之激發光源為脈衝式的二極體雷射 (pulsed diode laser)，其最小半高寬 (full width half maximum, FWHM) 約為 80 ps 的脈衝。當雷射輸出時，由光源本身的控制器 (driver; PDL 800-B, PicoQuant) 送出同步觸發訊號，經由分數式時間鑑別器 (constant fractional discriminator, CFD) 判別訊號有效與否並設定訊號到達時間，再由可調節式延遲器 (variable delay line; 425A, ORTEC) 調整進入 TCSPC 模組 (SPC630, PicoQuant) 的延遲時間。激發光源經由一面反射鏡導向樣品室 (sample chamber)，可經由調整鏡面上的兩個旋鈕控制導向樣品的雷射光方向，反射鏡前具有一光圈 (iris) 可調節進入樣品室的雷射光通量，接著通過一個聚焦透鏡 (focusing lens) 聚焦到樣品上。樣品的放光利用兩面透鏡進行收集，再經由一個光圈調節收集的光通量及一可選擇垂直 (perpendicular)、水平 (horizontal) 或魔術角度 (magic angle) 偏振方向的偏振器 (polarizer)，接著再通過相減式的雙光柵光譜儀

[1] Becker, H. GmbH, Time-Correlated Single Photon Counting Modules Multi SPC Software.

[2] Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Weinheim; Wiley-VCH, New York, 2002; pp175.

[3] web site: [http:// diau08.ac.nctu.edu.tw/tcspc_pop.htm](http://diau08.ac.nctu.edu.tw/tcspc_pop.htm)

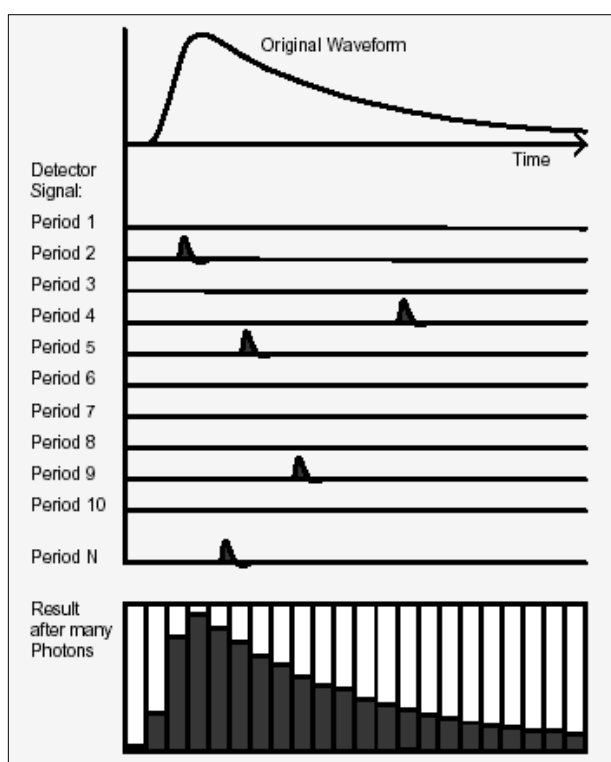


圖 2-1. TCSPC 的工作原理。[1]

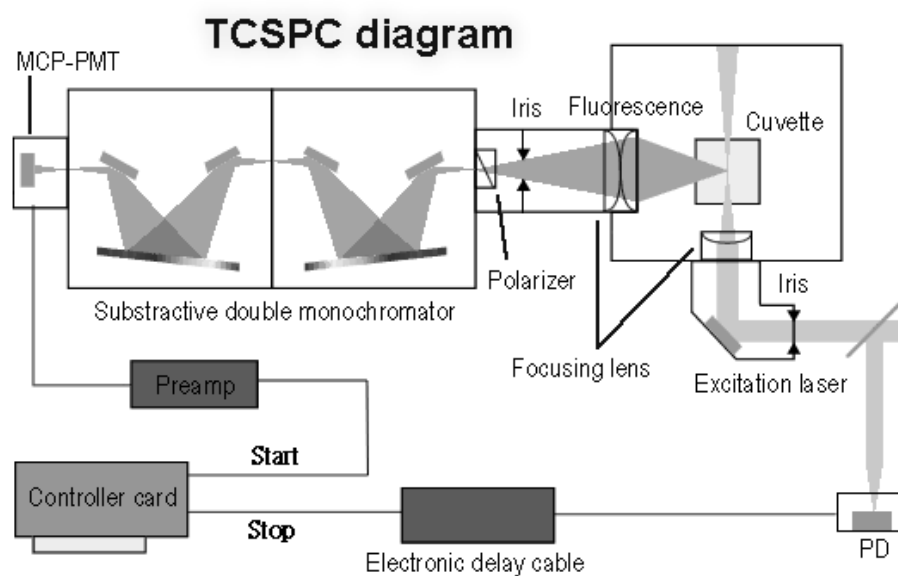


圖 2-2. Fluo Time 200 儀器配置圖。[3]

(subtractive double monochromator; 9030DS, Sciencetech)，而進入偵測器。偵測器為微通道光電倍增管 (micro-channel plate photon-multiplier tube, MCP-PMT; R3809U-57, Hamamatsu)，其輸出的電流值經由一個前置放大器 (Pre-Amplifier) 將訊號轉換成正電壓值並放大以達到TCSPC模組可以接受的範圍，接著進入TCSPC模組進行訊號計時的工作。

TCSPC模組進行訊號計時的程序如圖 2-3 所示。^[4] 利用兩個分數式鑑別器 (constant fractional discriminator, CFD) 分別判別螢光及觸發訊號有效與否並決定其所到達的時間，再以標準訊號 (NIM) 送入時間-振幅轉換器 (time-to-amplitude converter, TAC) 中。當TAC收到螢光訊號後，內部的電容便開始充電，直到收到下一發觸發訊號時停止充電，並產生電壓輸出，所輸出的電壓振幅正比於兩訊號輸入TAC的相對時間差。最後以類比-數位轉換器 (analog-to-digital converter, ADC) 將電壓振幅轉換為個別的時間頻道 (channel)，再送入多頻道分析儀 (multi-channel analyzer, MCA) 進行個別時間頻道的累計，完成一次單一光子計時的偵測。針對單一光子持續進行計時並累積，可將螢光隨時間的分佈完整重現。

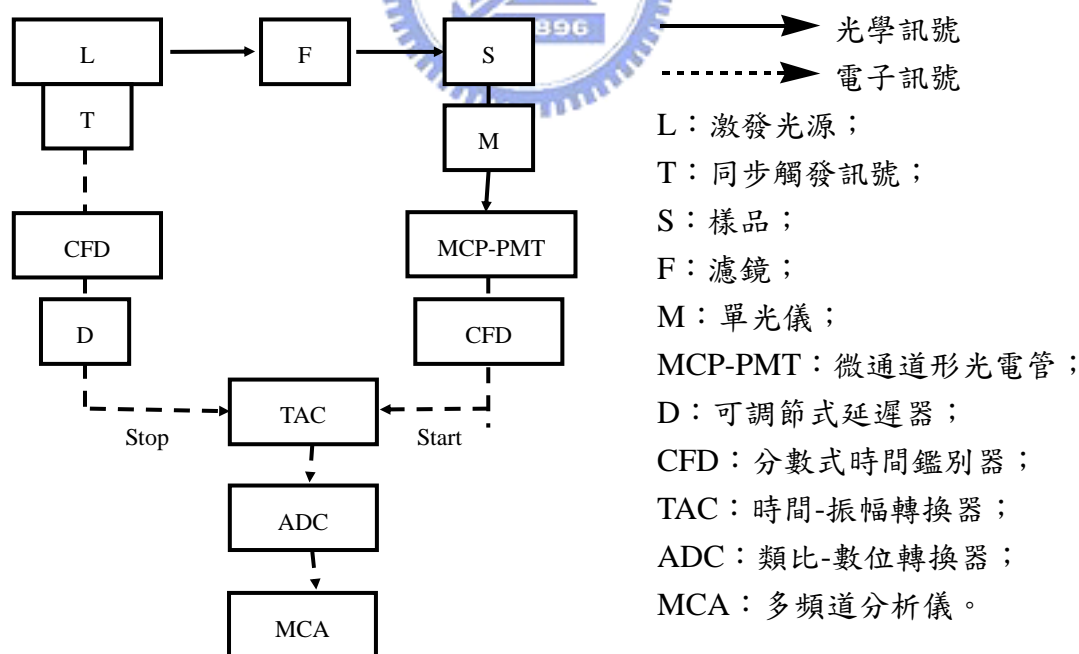


圖 2-3. TCSPC 模組之訊號擷取及計時程序。^[4]

[4] 國立交通大學應用化學所江佳珍碩士論文，民國 94 年。

2-2 電子元件 (electronics)

2-2-1. 分數式時間鑑別器 (constant fractional discriminator, CFD)

時間鑑別器的作用在於辨別訊號是否為有效，並且判定其到達時間。在一般的时间鑑別器中，其判別方式如下所述：設定一特定門檻 (threshold) 的電壓高度，當外來訊號超過此特定之電壓高度時，便可被觸發而認知此訊號。如果輸入鑑別器的訊號低於此特定電壓，則視為電路中的雜訊，此訊號將被完全忽略，如圖 2-4 所示。^[4]

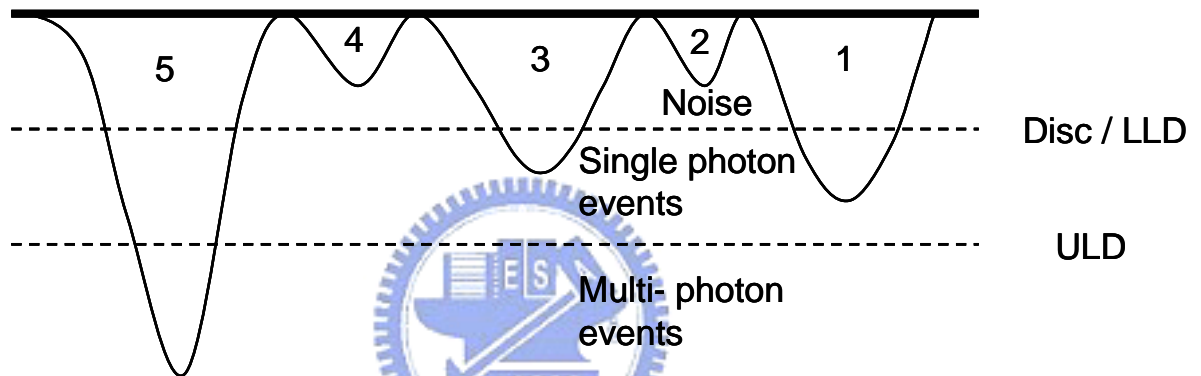


圖 2-4 當輸入鑑別器的訊號低於一特定門檻的電壓高度時，則被分數式時間鑑別器視為雜訊去除。

分數式時間鑑別器判讀訊號到達時間的方式則如下所述：將輸入的脈衝訊號分成兩部分，其中之一的電壓振幅以一固定比例縮小；另一個電壓則以訊號反轉 (invert) 的方式並且延遲 T_d 時間，此時前者的振幅出現在後者前緣相同振幅的位置上，接著再將處理後的訊號加總，將電壓值為零的時間作為原始脈衝的到達時間。

2-2-2. 時間-振幅轉換器 (time-to-amplitude converter, TAC)

TAC 是一電容裝置，功能類似精確的碼錶，利用 TAC 可精確得知雷射脈衝激發樣品後，產生之單一光子的時間。其作用機制為：接收到「開始的訊號」時開始充電，直到

接收到「停止的訊號」時停止，並產生一類比輸出電壓，此電壓振幅正比於兩訊號的輸出時間差，如圖 2-5 所示。^[4]

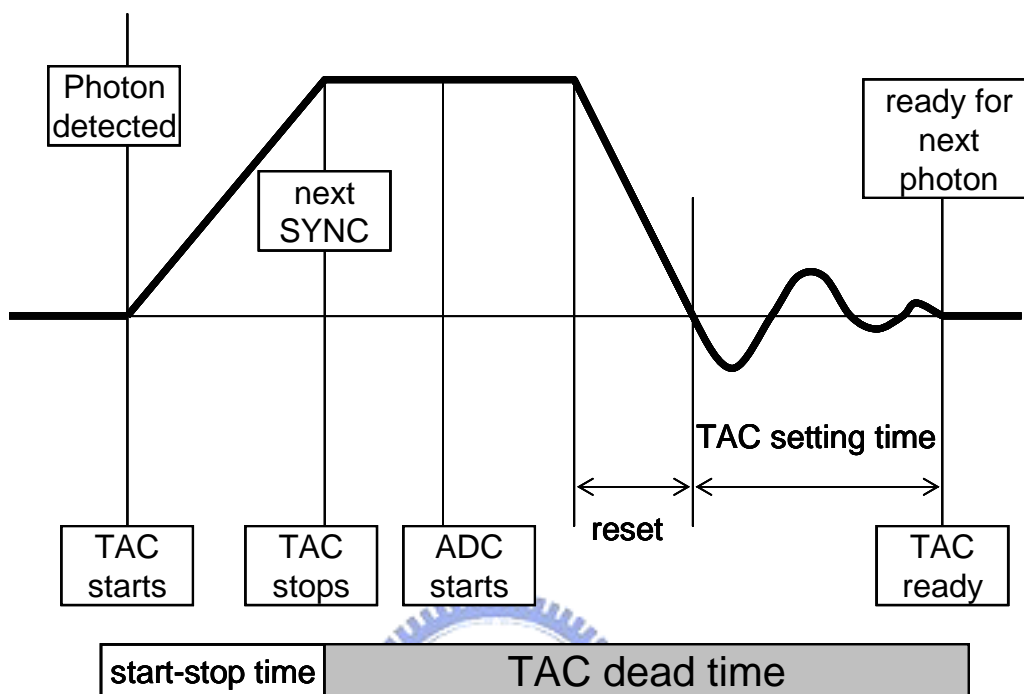


圖 2-5 TAC 偵測單一光子的計時機制。

在單一個脈衝週期中，若 TAC 同時接收到兩個螢光光子，此時 TAC 在針對第一顆光子進行充電時，對進來的第二顆光子形同「blind」，因此時間較慢的光子將被忽略使得光譜的形狀變形，造成所得到的螢光訊號比真實的螢光訊號更快的衰減，為了避免此現象，必須確定每個激發脈衝所產生的螢光光子被偵測器偵測到的機率遠小於一，如此可避免 TAC 在同一個週期中接收到兩個光子。因此，TCSPC 之實驗條件則需要螢光光子數必須小於脈衝重複頻率的 1/100，可藉由控制雷射光的強度及光圈 (iris) 大小來調整。

TAC 有兩種充電模式：一為正常的開始-結束模式 (normal start-stop mode)，以同步觸發訊號為開始的訊號，螢光訊號為停止的訊號；另一種則為反轉的開始-結束模式 (reverse start-stop mode)，此時以螢光訊號為開始的訊號，同步觸發訊號作為結束。為

了取得真實的訊號必須降低每週期收到螢光的機率，而TAC若以正常的開始-結束模式運作，則在大部分週期內無法接收到光子，使得整個系統不斷地空轉。本系統採用相反的TAC充電模式，如此可保證TAC每次充電皆可收到結束的訊號，減少dead time（等待系統回到可進行下一回偵測所需的時間）及提高讀取訊號的速率。

2-2-3. 類比-數位轉換器（analog-to-digital converter，ADC）

由 TAC 所產生的電壓後，進入類比-數位轉換器，此類比-數位轉換器之功能為將電壓振幅轉換成相對應的時間頻道。

2-2-4. 多頻道分析儀（multi-channel analyzer, MCA）

MCA 將每次螢光時間偵測結果紀錄在個別的時間頻道中，藉著重複螢光時間偵測取樣，可將其螢光產生的時間分佈完整再現。時間頻道數目包括 4096、1024、256、64 個頻道，可經由軟體調變，選擇最適合的頻道數目。



2-2-5. 可調節式延遲器（variable delay line）

TAC 所輸出電壓會經由類比-數位轉換器轉換成所對應的時間頻道並進入多頻道分析儀儲存累計。各個頻道代表了不同的電壓值（時間差），但由於頻道的數目有限，所以需要利用延遲器調節觸發訊號送入 TAC 的時間來改變其輸出電壓值，如此可在螢幕上呈現完整的衰減訊號。

2-2-6 雙光柵光譜儀

當系統所要求的時間解析度達到數十皮秒時，此時則需考慮光路徑所造成的影響，其中影響最大的即為單光儀，簡述如下：當一平行光束打在光柵不同位置時，其產生的繞射光將因行經不同的光程而造成時間上的差異，為此利用兩個相對的光柵藉由相對轉動對光行進時間上的偏差進行補償。光柵適用光譜範圍為 350-900 nm，可選擇寬度為

0.5、1.0 及 2.0 毫米 (millimeter, mm) 的狹縫進行實驗，提供光譜頻寬 (spectral bandwidth) 為 4、8、及 16 nm。

2-3 雷射光源 (Laser source)

本實驗使用 PicoQuant 公司所生產的脈衝式二極體雷射 LDH-P-C 400、LDH-P-C 435，其激發波長分別為 405 及 435nm，半高寬為 80 ps，如圖 2-6 (A)及(B)所示，可由控制器選擇脈衝的重複率 (2.5 MHz ~ 40 MHz) 及調整雷射輸出的能量。

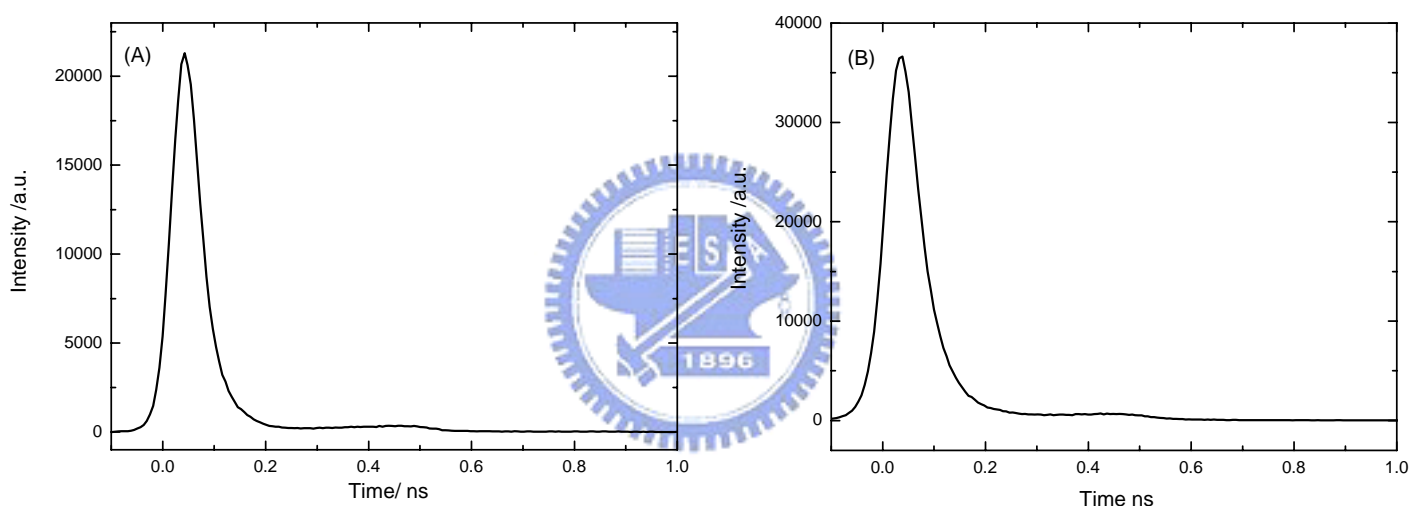


圖 2-6 (A) LDH-P-C 400 (B) LDH-P-C 435 的儀器相關函數。
脈衝重複頻率為 40 MHz，半高寬為 80 ps。

2-4 時間—解析螢光非等向性 (Time-resolved fluorescence anisotropy) 光譜技術

TCSPC 除了可以測量瞬態螢光光譜外，還可藉由改變光的偏極性及偏振器之偏振方向來得到樣品之時間—解析螢光非等向性光譜，以下簡單介紹此技術的原理及實驗方法。

當一偏極化雷射光激發樣品後，受激發的分子會產生有方向性的躍遷力矩 (transition moment)，因為這些發光團 (fluorophores) 的分佈為非等向性的 (anisotropy)，所以其放射之螢光也是非等向性的。在激發態的生命期當中，躍遷力矩的改變會造成此非等向性的減少，即使得螢光去偏極化 (depolarization)，而造成螢光去偏極化的原因有以下四種：吸收的躍遷力矩和放光的躍遷力矩不同、分子結構扭曲震動 (torsional vibrations)、布朗運動 (Brownian motion) 以及分子間的能量轉移 (resonant energy transfer)。^[5] 螢光極化的測量可以提供一些資訊，例如分子變動性 (molecular mobility)、大小、形狀及彈性 (flexibility) 等。

實驗上的作法為藉由偏極性的雷射激發樣品，在另一側的方向上收集不同偏極方向的瞬態光譜，如圖 2-7 所示。公式 2-1 定義非等向性 (anisotropy)，

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (\text{公式 2-1})$$

$r(t)$ 表示非等向性， I 是螢光強度，下標 \parallel 表示螢光的偏極方向和激發光的偏極方向平行，下標 \perp 表示螢光的偏極方向和激發光的偏極方向垂直，螢光之總強度為：

$$I(t) = I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t) \quad (\text{公式 2-2})$$

由公式 2-1 及 2-2 可以推導出公式 2-3 及 2-4：

$$I_{\parallel}(t) = \frac{I(t)}{3} [1 + 2r(t)] \quad (\text{公式 2-3})$$

$$I_{\perp}(t) = \frac{I(t)}{3} [1 - r(t)] \quad (\text{公式 2-4})$$

[5] Valeur, B., Molecular Fluorescence: Principles and Applications; Weinheim; Wiley-VCH, New York, 2002; pp126-132

首先，我們將雷射的偏極方向藉由偏振器調成垂直方向 (vertical)，收集兩組偏極方向的螢光，分別是垂直 (vertical)及水平 (horizontal)；而後，將雷射的偏極方向改為水平，再收集垂直和水平方向的偏極螢光。由於單光儀對於不同偏振方向的光會有不同的效率，我們需定義一個數值來校正單光儀，此數值稱為 G factor，計算方法如公式 2-5 所示。

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (\text{公式 2-5})$$

再經由公式 2-6 的計算可得出具有時間解析的螢光非等向性光譜：

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - GI_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2GI_{VH}(t)} \quad (\text{公式 2-6})$$

將 $r(t)$ 以一個或多個指數函數擬合，可得到螢光去極化過程之時間常數。

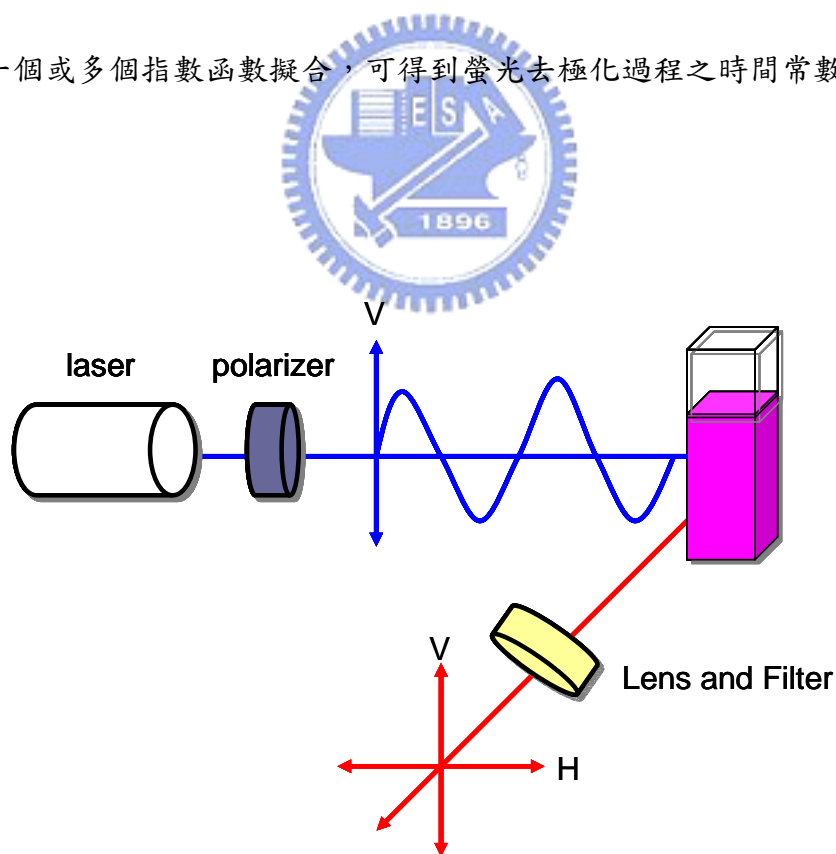


圖 2-7 測量螢光非等向性光譜之實驗示意圖。

2-5 紫外-可見光光譜儀 (UV-Vis spectrometer)

本實驗之吸收光譜量測方法主要有兩部分，一部份為液態樣品的量測；一部份則為固態樣品的量測，以下分別論述。

溶液樣品的吸收光譜之測量是使用 Varian 公司，型號為 Cary50 的紫外-可見光光譜儀。使用光源為氙燈，其光區範圍為 190 ~ 1100 nm，實驗所使用的掃描速率為每秒 1200 nm，光譜解析度為 0.25 nm。

固態樣品之量測，由於樣品不透光，所採用的方式為反射式，如圖 2-8 所示，所使用的光源為氘/鎢/鹵素燈 (deuterium/ tungsten/ halogen Lamp, DH2000, Ocean Optics)，利用光纖 (Y 型，R600-UV, Ocean Optics) 將訊號導入 CCD 光譜儀 (HR4000-UV-NIR, Ocean Optics)，其偵測範圍為 200-1100 nm，入射孔徑 (entrance aperture) 為 5 μm ，解析度為 0.5 nm，偵檢器為 3648-要素線性 CCD 陣列 (3648-element linear CCD array)。

測量方式：第一，設計和試片同樣厚度的鋁箔紙，記錄其反射的強度 $I_0(\lambda)$ 可得到能量光譜；第二，測量試片的空白片之能量光譜，記錄為 $I_r(\lambda)$ ；第三，測量樣品之能量光譜，紀錄為 $I_s(\lambda)$ ；第四，算反射率 $R_s(\lambda) = I_s(\lambda) / I_0(\lambda)$ ；第五，將沒有訊號的波長範圍之 R 當作此試片之原有的反射率，假設反射率的減少均來自於樣品的吸收，我們可計算 $\Delta R(\lambda) = R - R_s(\lambda)$ ；第六，因為所有的試片之 R 不一樣，因此將 $\Delta R(\lambda)$ 除以原本試片之反射率 R ，得到 $\Delta R(\lambda) / R$ 光譜，如此可間接測量樣品的吸收度。

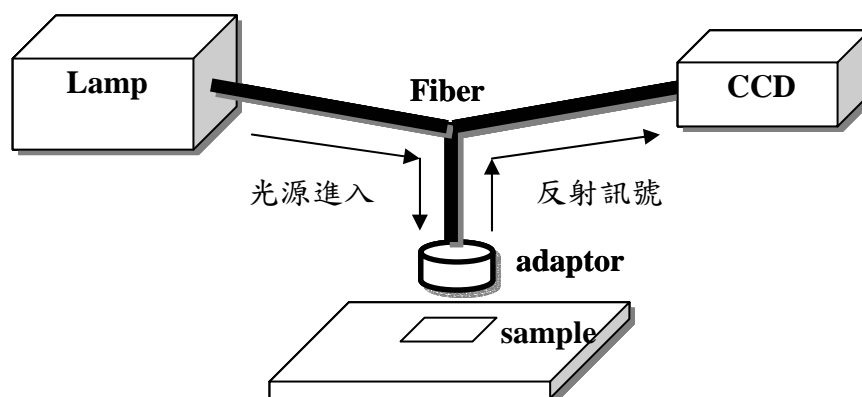


圖 2-8 反射式吸收光譜之儀器裝置圖。

2-5-1 電荷偶和裝置 (Charge-Coupled Device, CCD)

本實驗所使用之 CCD 光譜儀，購買自 Ocean Optics，圖 2-9 所示為其內部結構的示意圖，以下簡單介紹每一個元件 (標號為 1-10) 的功能：^[6]

- (1) 為 SMA 905 連接器 (connector)，連接光纖和 CCD，使光可以精確地進入 CCD。
- (2) 為固定的狹縫 (slit)，固定光通量。
- (3) 為吸收濾鏡 (absorbance filter)，其功用為阻擋二級 (second order) 或三級反射的入射光，及色彩平衡。
- (4) 為準直鏡 (collimating mirror)，原本發散的入射光經過此鏡反射後成為準直的光束進入光柵。
- (5) 為光柵 (grating)，其功能為分散入射光。
- (6) 為聚焦鏡 (focus mirror)，將第一級反射的入射光聚焦後在反射至偵檢器 (detector)。
- (7) 為 L2 偵檢器收集透鏡 (L2 detector collection lens)，其功能為增加光的收集效率。
- (8) 為 OFLV 濾鏡，避免二級或三級反射光進入偵檢器。
- (9) 為 UV2 偵檢升級器 (UV2 detector upgrade)，增加光譜儀的偵測範圍。
- (10) 為偵檢器，由一線性的 CCD 陣列 (array) 組成。

當我們的偵測訊號經由光纖進入 CCD 後，光依序由標號 1 至標號 10 的路徑到達偵檢器，最後由電腦取得光譜。

[6] Product Catalog (Ocean Optics).

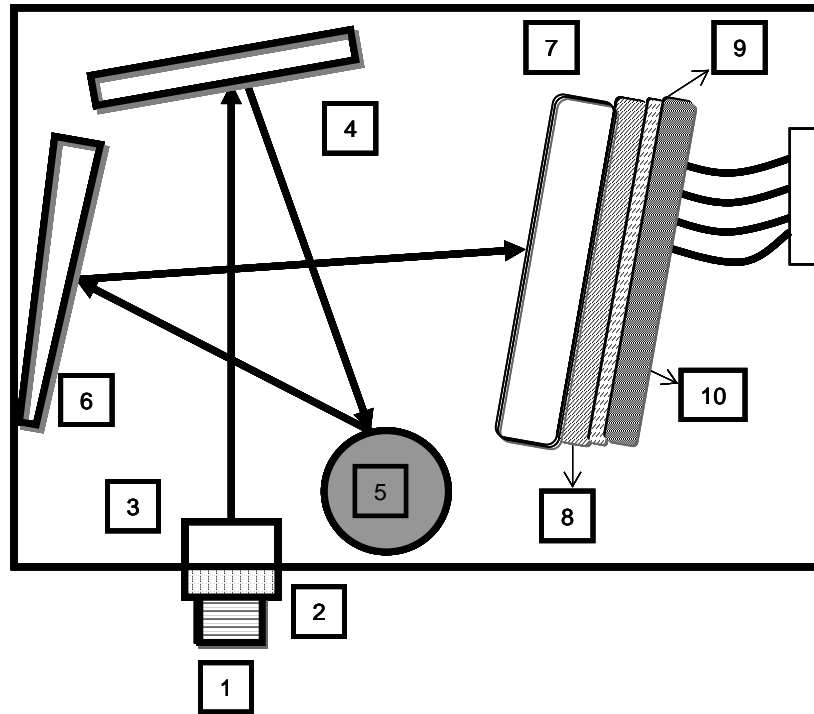


圖 2-9 CCD 之內部結構示意圖。

2-6 螢光光譜儀 (Fluorescence spectrometer)

本實驗螢光光譜的測量利用脈衝式二極體雷射為激發光源，經由光纖打入樣品，在 90° 方向上以光纖收集樣品的放光並傳送到 CCD 光譜儀 (USB2000-FLG, Ocean Optics) 進行光譜的偵測。偵測波長範圍 378-1050 nm，入射孔徑為 200 μm ，解析度為 10 nm，偵測器為 2048-要素線性 CCD 列陣。

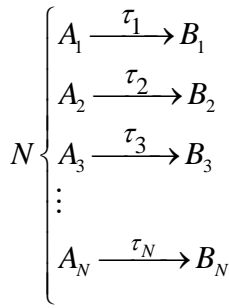
2-7 資料分析(Data analysis)

利用 TCSPC 所取得的光譜，可提供我們瞭解螢光生命期的資訊，藉由了解螢光生命期以得知樣品與周遭環境的光物理及光化學性質。本實驗利用 FloFit，一種軟體可將我們所取得的數據進行分析進而獲得生命期。

由於激發脈衝本身具有時間的分佈且經由儀器造成色散的結果，因此我們觀測到的螢光衰減曲線 $S(t)$ 為儀器相關函數 (Instrument Response Function, IRF) $K(t')$ 及分子相關函數 $X(t-t')$ 的迴旋積分 (convolution)，如式 2-7 所示：

$$S(t) = \int_{-\infty}^t K(t') X(t-t') dt' \quad (\text{公式 2-7})$$

分子相關函數可分為平行模型 (parallel model) 及連續模型 (consecutive model)。FluoFit 軟體利用平行模型進行擬合，最多提供四個指數函數的加總來針對螢光衰減曲線進行擬合，而平行模型的意思為：分子被激發後，電子由 A_i 能階經由 N 個輻射或非輻射方式緩解到 B_i 能階，其生命期為 τ_i ，此 N 個緩解途徑為平行過程，其反應式由 $A_i \xrightarrow{\tau_i} B_i$ 表示，此時 $i=1, 2, \dots, N$ ，各代表不同的緩解途徑。



此時，分子相關函數如式 2-8 所示。

$$X_{tot}(t) = \sum_{i=1}^N X_{A_i}(t) = \sum_{i=1}^N X_{A_i} \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{公式 2-8})$$

此時， $X_{A_i}(t)$ 為第 i 個指數組成的螢光時間表現； X_{A_i} 為第 i 個指數組成的振幅 (amplitude)，即其時間零點的螢光強度； τ_i 為第 i 個指數組成的衰減時間常數 (decay time coefficient)。

2-8 樣品處理 (Sample handling)

本實驗所研究的紫質衍生物為 Protoporphyrin(IX) Zinc(II) (ZnPP，圖 1-1)，購買自 Strem Chemicals，純度大於 95%。溶液部分，我們將 ZnPP 溶於四氫呋喃 (tetrahydrofuran，THF，光譜級)，購買自友和 (Sigma-Aldrich) 公司；固態樣品部分，將氧化鋁奈米管浸泡至 ZnPP/THF 溶液，靜置浸泡一段時間後，將試片從溶液中拿起來，再以 THF 潤洗

數次，目的為除去 ZnPP 以物理吸附的方式吸附在奈米管表面，最後至於通風櫥中自然風乾。氧化鋁奈米管方面，由本校材料所林金雄學長所製備，以下簡單介紹其製成方法。

2-8-1 氧化鋁奈米管的製成

奈米材料的合成方法，主要有兩種：模板法及非模板法，其中模板法包括硬模板法及軟模板法，而我們所使用的氧化鋁奈米管材料之製成方法即為硬模板法中的陽極處理氧化鋁膜(Anodized Aluminum Oxide)，AAO 具有垂直於基板且排列有序的孔洞，此孔洞可以電化學技術來控制其大小，並且具耐高溫、硬度佳等極佳機械性質，所以適合用於製備奈米線材。

AAO 的製備流程如圖 2-10，首先準備純度為 99.9% 的鋁箔片，在溫度為 500°C 下熱處理 5 小時，目的為使試片更平整，隨後再浸泡於酒精溶液中，以去除表面雜質，利用離子水洗淨後，再進行電解拋光使試片得到光亮平整之表面，電解拋光時將鋁箔置於酸性電解液中之陽極處，陰極的電極則為石墨或白金，接下來的步驟為陽極處理，利用鋁容易形成硬質的氧化膜特性，藉電化學方法控制氧化層的生成方式與速率，經過一段時間的陽極處理後，則形成多孔性氧化鋁膜，但通常第一次所長的 AAO 孔洞較不均勻，因此採用二段式陽極處理，即在第一次陽極處理後，使用化學蝕刻法將 AAO 溶解，只剩下鋁基材上因生長 AAO 所殘留下的基底，接著再做一次陽極處理以生長孔洞較規則的 AAO。

圖 2-11 為 AAO 在上述處理步驟中所記錄下來的 SEM 圖，其中(a)、(b)及(c)圖之 AAO 奈米管孔徑的平均大小為 15 nm，陽極處理時所使用之溶劑為硫酸 (sulfuric acid)，化學蝕刻法所使用之溶劑為磷酸 (phosphoric acid)；(d)、(e)及(f)圖之 AAO 奈米管孔徑的平均大小為 70 nm，陽極處理時所使用之溶劑為草酸 (oxalic acid)，化學蝕刻法所使用之溶劑為鉻酸 (chromic acid)，圖 2-12 為最後完成的 AAO 奈米管之 SEM 圖，即為本實驗主要使用的試片。

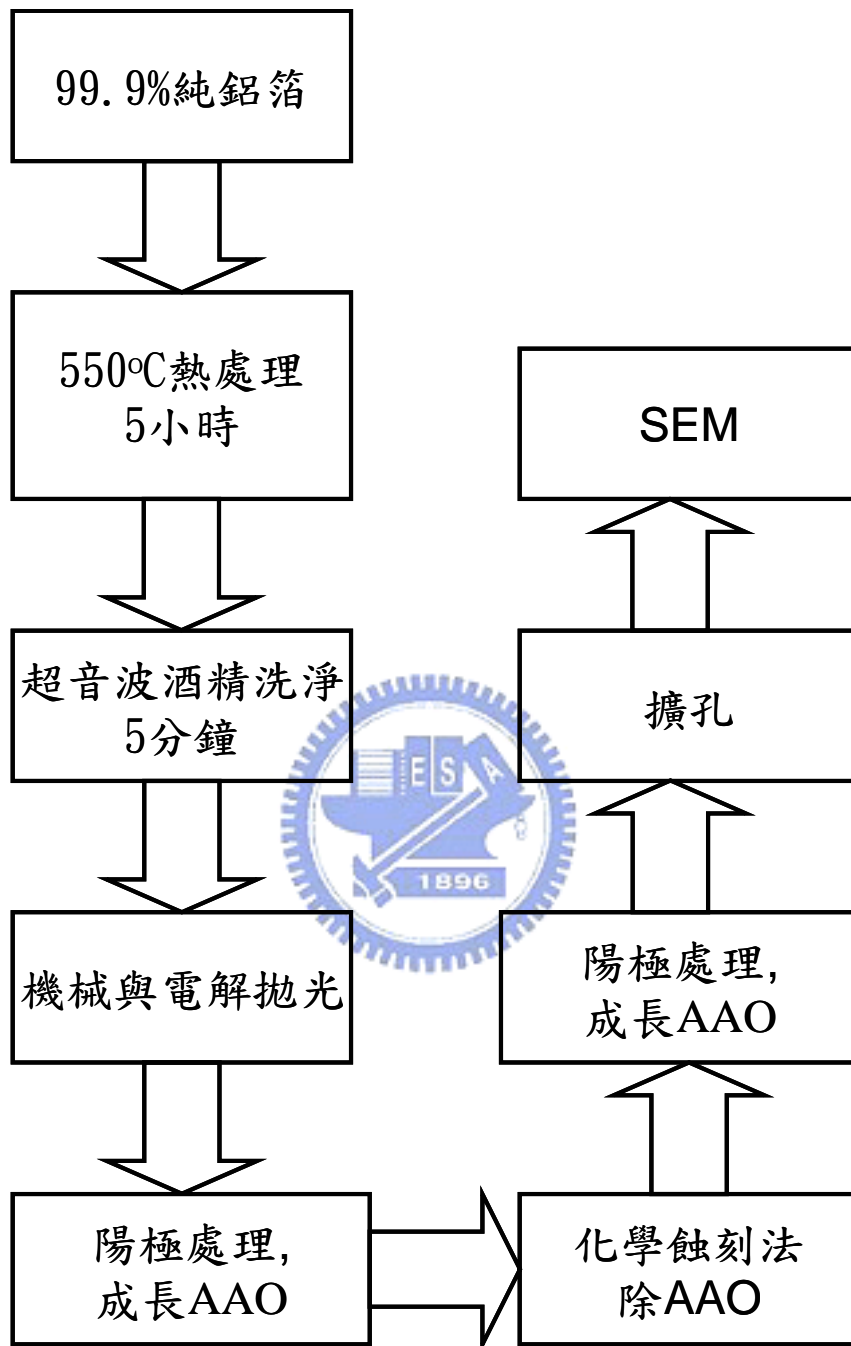


圖 2-10 AAO 試片之製成流程圖。

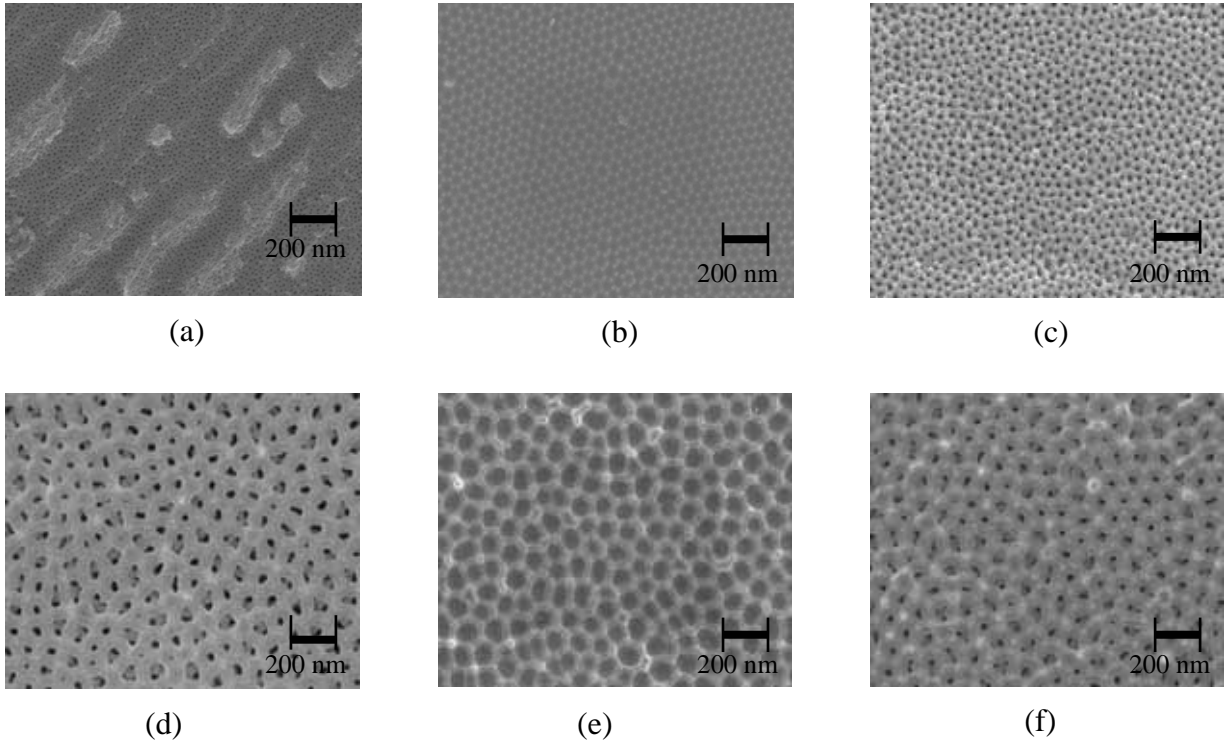


圖 2-11 AAO 試片在製備過程中的 SEM 圖，過程分別是：(1)做完第一次陽極處理之試片表面，所使用的電解液分別為(a)硫酸及(d)草酸；(2)利用化學蝕刻法除去 AAO 後之試片表面，所使用的溶劑分別為(b)磷酸及(e)鉻酸；(3)做完第二次陽極處理之 AAO 試片表面，AAO 奈米管孔徑之平均大小分別為(c) 15 nm (f) 70 nm。

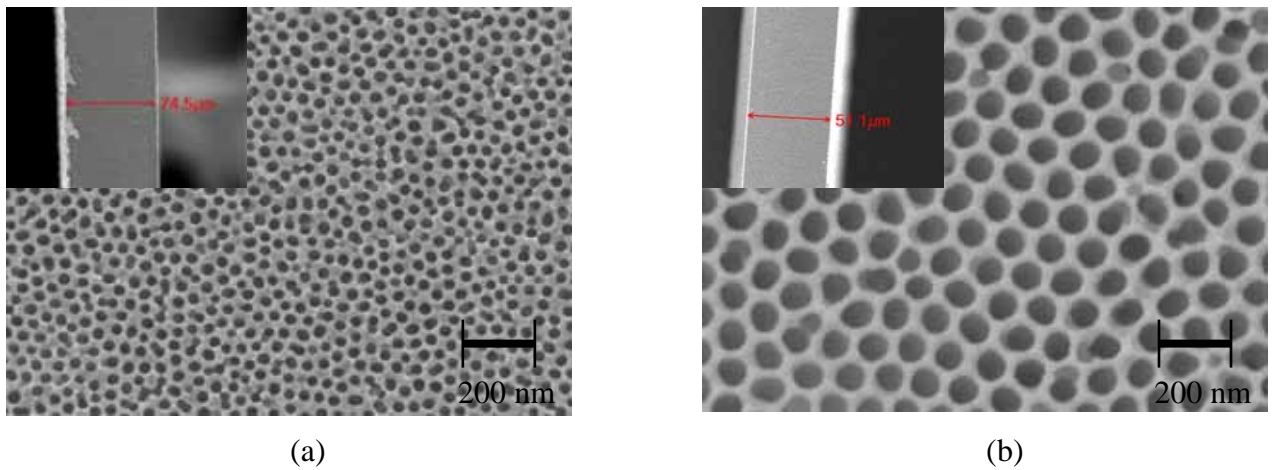


圖 2-12 經過兩次陽極處理及擴孔後所完成之 AAO 試片的 SEM 圖，插圖為 AAO 奈米管的深度，AAO 奈米管孔徑之平均大小分別為 (a) 15 nm 及 (b) 70 nm，AAO 奈米管之深度分別為 (a) 74.5 μm 及 (b) 51.1 μm 。