

# 東海大學物理學系

## 碩士論文

論文題目：

(中文) 計算螢光奈米鑽石在石墨外殼影響下的負電氮-空缺  
中心數目

(英文) Measuring the Number of  $NV^-$  Centers in Fluorescent  
Nano-diamonds in the Presence of Graphite Shells

指導教授: 林宗欣

研究生: 陳論鉉

中華民國一百零一年七月二十四日

## 致謝

這兩年來走來，首先要謝謝我的指導教授林宗欣老師。回想當初大學剛畢業都不知道做什麼，只知道要上好的研究所所以一直補習，不知道要維持這種狀況要到幾時，於是找老師談談，老師建議我找一些有興趣的事情做，可以不用花時間在補習上。於是我就想想進了研究所也不知道要做什麼，究竟進去研究所是為了什麼。於是我就回我的母校東海先進去實驗室看看，究竟研究所到底在做什麼。最後嘗試幾間實驗室後，就進入老師的實驗室。而在碩班的生涯中，我一直問問題，老師盡力和有耐心的幫我解答。後來也有許多研究方面的事情找老師討論，有時候能可以溝通但有時候是失敗，但在這過程中我也學到不少東西。所以我的指導教授是老師同時也有點像似哥哥。進入實驗室的第一年，因為沒有學籍所以我邊家教和跟蔡展志學長學習，我還記得我第一次用兩面鏡片條筆直的光路調了三個小時，展志學長問我調得如何。後來實驗室的大小事務展志學長慢慢仔細的教我，雖然他已經畢業了但在此還是要謝謝展志學長而在碩班的期間也參加老師的婚禮，實驗室的聚餐，帶領學弟妹，管理實驗室。其中特別感謝應屆畢業的石舜吉學弟處理實驗室的電路設備和常常陪我處理粗重的工作、應屆畢業的林婕歆學妹常常把玻片洗乾淨且都把交代的工作準時做好、應屆畢業的李淑玲使實驗室聚餐如期舉行且都有帶相機拍

照以做紀念、還有應屆畢業的陳秉輝學弟陪我聊布袋戲的劇情。如今畢業在即，實驗室又有大三升大四學弟妹，這群學弟妹幾乎每周都會找我去吃飯，讓我感到特別溫馨，我只能說在碩二能遇到這群學弟妹，真是為我的碩班畫下一漂亮的句點，我已經心滿意足了。最後要謝謝的是學生諮商中心的林莉芳老師，謝謝她這兩年協助我做自我探索的議題，使我更了解自己的情緒和更能表現出真實的自己，老師描述認識我到畢業前這一段的成長，是從一顆種子到小樹苗的過程，而她是照顧小樹苗的人，說雖然不捨但還是要放手，我也對兩位老師非常不捨得，所以謝謝兩位老師對我這兩年的栽培。

## 中文摘要

光子相干量測法已經廣泛被使用在計算單分子或奈米顆粒的發光體數量。一般在使用時會假設每個發光體發出光子的機率是一樣的。但如果每顆發光體發出光子的機率是不一樣的，就得修改光子相干量測的模型。螢光奈米鑽石的表面石墨殼會對較靠近表面的氮-空缺產生螢光抑制效應，造成氮-空缺的螢光生命週期 (Fluorescence Lifetime) 和量子產額 (Quantum yield) 會隨著越靠近石墨殼而遞減，此時量測到的螢光生命週期會有兩種遞減方式，其中一個是較快遞減是屬於受到螢光抑制效應 (Quenching) 影響的氮-空缺所發出的螢光，另外一個較慢遞減則是屬於沒受到螢光抑制效應影響的氮-空缺所發出的螢光。因為上述的原因，所以螢光奈米鑽石內的氮-空缺發出光子的機率會不一樣，使得我們無法直接利用光子相干量測法計算出實際的氮-空缺的數目。在此工作中，我們提出了一個方法來修正對氮-空缺數目的計算。我們把氮-空缺分成兩種，一種是受到螢光抑制效應影響的氮-空缺，另外一種則是沒受到螢光抑制效應影響的氮-空缺。我們利用時間解析光譜得到兩種氮-空缺的數量以及螢光生命期的比值，並利用此比值來修正光子相干量測所得到的值。我們得到在沒考慮受到螢光抑制效應的 35nm 螢光奈米鑽石氮-空缺的數量其平均值 7.865，經過修改過後其平均數量值為 12.838。

## Abstract

Photon correlation spectroscopy has been widely used to quantify the number of emitters in single molecule or nanoparticles, which equals to the number of (N-V)<sup>-</sup> centers assuming all (N-V)<sup>-</sup> centers are identical. However, the quantification for multiple emitters is often hampered by the heterogeneities of the emitters. The graphite shells can quench efficiently the luminescence of NV centers near the surface and reduce their fluorescent lifetime and quantum yield depending on the distance of the graphite shell. Therefore, the fluorescent decay curves exhibits a fast decay and a slow decay, which are attributed to the quenched and unquenched NV centers, respectively. In this work, we propose a method that can modify the number of NV centers. We approximately categorized (N-V)<sup>-</sup> centers into two species, namely quenched and unquenched centers, with different fluorescence quantum yields and used time-resolved spectroscopy to modified photon correlation measurement. The average number of (N-V)<sup>-</sup> centers in single 35-nm fluorescent nanodiamond were modified from 7.8 to 12.8.

## 目錄

### 第一章 簡介

1.1 螢光奈米鑽石.....	1
1.1.1 螢光奈米鑽石的性質及應用.....	1
1.1.2 合成螢光奈米鑽石.....	3
1.2 石墨殼的形成與影響.....	7
1.2.1 石墨外殼的形成.....	7
1.2.2 螢光抑制效應.....	7
1.2.3 螢光生命週期原理和螢光抑制效應下的螢光生命週期..	9
1.3 量測發光體.....	15
1.3.1 光子相干光譜量測.....	15
1.3.2 計算發光體.....	17

### 第二章 實驗系統原理

2.1 共焦式螢光顯微鏡原理.....	22
2.2 生命週期量測系統原理.....	24
2.3 光子相干量測系統原理.....	26

### 第三章 樣品備製與實驗量測

3.1 螢光奈米鑽石的製備和樣品的備製.....	28
3.1.1 螢光奈米鑽石的製備.....	28

3.1.2 樣品的備制.....	28
3.2 螢光奈米鑽石樣品量測.....	32
3.2.1 螢光奈米鑽石樣品的掃描與螢光量測.....	32
3.2.2 螢光奈米鑽石樣品光子相干量測.....	34
3.2.3 螢光奈米鑽石樣品的生命週期量測.....	35
第四章 實驗結果與討論	
4.1 螢光奈米鑽石樣品掃描圖和光譜圖.....	42
4.2 生命週期量測分析與討論.....	45
4.3 光子相干量測分析與討論.....	47
4.4 修改計算模型.....	50
4.5 螢光奈米鑽石的螢光體修正結果與探討.....	53
第五章結論與展望.....	55
參考文獻.....	58

## 圖表目錄

圖 1.1 鑽石的 NV defect 的結構示意圖.....	4
圖 1.2 螢光奈米鑽石的螢光光譜圖.....	4
圖 1.3 螢光奈米鑽石和染料高分子的比較圖.....	5
圖 1.4 Flavin 的吸收光譜、螢光光譜和螢光奈米鑽石的螢光光譜的比較.....	5
圖 1.5 奈米鑽石表面羥基化後再連接蛋白質於表面上之示意圖...	6
圖 1.6 用 TEM 觀察奈米鑽石的結構.....	13
圖 1.7 螢光分子的電子躍遷示意圖.....	13
圖 1.8 $(N-V)^-$ centers 在奈米鑽石薄膜的螢光衰減曲線.....	14
圖 1.9 受到石墨殼所影響的 $(N-V)^-$ 和沒有被影響的 $(N-V)^-$ .....	14
圖 1.10 Hanbury-Brown and Twisse 的實驗架構.....	20
圖 1.11 光子相干量測結果示意圖.....	20
圖 1.12 獨立的雙能階量子示意圖.....	21
圖 1.13 光子相干量測圖.....	21
圖 2.1 共焦式螢光顯微鏡原理示意圖.....	23
圖 2.2 生命週期量測示意圖.....	25
圖 2.3 生命週期訊號所累積出來的統計圖.....	25
圖 2.4 光子相干量測示意圖.....	27



圖 3.1	黑罩.....	30
圖 3.2	黑罩黏在蓋玻片上與示意圖.....	30
圖 3.3	把做好的樣品架設樣品平台上.....	31
圖 3.4	共焦掃描顯微鏡系統裝置示意圖.....	37
圖 3.5	HQ 535/30 M 濾片的穿透光譜圖.....	37
圖 3.6	分光鏡 Z 532 RDC 的穿透光譜圖.....	38
圖 3.7	LP03-532RS-25 濾片的穿透光譜圖.....	38
圖 3.8	光譜儀光路示意圖.....	39
圖 3.9	光子相干量測裝置示意圖.....	39
圖 3.10	Time-Correlated Single Photon Counting Modules.....	40
圖 3.11	用 Pulse 雷射掃描 35nm 螢光奈米鑽石樣品的 20 $\mu\text{m}$ $\times$ 20 $\mu\text{m}$ 掃描圖.....	40
圖 3.12	用 CW 雷射掃描 35nm 螢光奈米鑽石樣品的 20 $\mu\text{m}$ $\times$ 20 $\mu\text{m}$ 掃描圖.....	40
圖 3.13	生命週期量測實驗裝置示意圖.....	41
圖 4.1	共焦式顯微鏡掃描 35nm 螢光奈米鑽石樣品的螢光強度分佈圖.....	43
圖 4.2	螢光奈米鑽石隨著時間增加其螢光強度的變化.....	43
圖 4.3	發光點量測到的螢光奈米鑽石光譜.....	44

圖 4.4	35nm 螢光奈米鑽石的螢光衰減曲線.....	46
圖 4.5	35nm 螢光奈米鑽石光子相干量測.....	49
圖 4.6	兩顆 35nm 螢光奈米鑽石的生命週期量測.....	54
圖 4.7	(N-V) <sup>-</sup> center 的數量修改前和修改後的統計分佈圖.....	54
圖 5.1	35nm 螢光奈米鑽石的 $\frac{n_u}{n_{total}}$ 比例分佈圖.....	57

## 第一章 簡介

### 1.1 螢光奈米鑽石

鑽石會發出螢光因為含有雜質和缺陷(defect)所產生，如圖 1.1 是一個鑽石晶格[1]，有一個雜質氮(Nitrogen)和一個空缺(Vacancy)相遇產生的鍵結，則鑽石就會發螢光[2]。而氮-空缺(N-V)只是鑽石結構中的一種缺陷，另外還有很多其他的缺陷也會發螢光，例如鎳和空缺所導致的缺陷[3]及矽和空缺所導致的缺陷[4]，不同的缺陷所發出來的螢光都不一樣。(N-V)主要吸收波長在 532nm 附近的波段，由(N-V)所發出來的螢光光譜圖 1.2 中分佈在 575nm 到 750nm，(N-V)的螢光光譜可以看到兩個特徵峰[5]，分別為 575nm 零聲子線一(ZPL 1)和 637nm 零聲子線二(ZPL 2)。ZPL 1 是不帶電的(N-V)<sup>0</sup>的零聲子線，ZPL 2 為帶負電的(N-V)<sup>-</sup>的零聲子線，本研究主要探討螢光奈米鑽石的(N-V)<sup>-</sup>所發出來的螢光。

#### 1.1.1 螢光奈米鑽石的性質及應用

有機螢光分子常被應用在生物標記上，其最主要的缺點為有光漂白(photobleaching)和光閃爍(photoblinking)的現象，而螢光奈米鑽石則沒有光漂白和光閃爍，具有穩定的光物理性質[6]，由圖 1.3 看其螢光奈米鑽石和染料高分子的比較[6]，會發現到有機螢光分子有光閃爍(圖 1.3 紅色箭頭)和光漂白(圖 1.3 綠色箭頭)，而螢光奈米鑽石沒有

這兩種缺點。此外，螢光奈米鑽石具有高度的生物相容性[7]，而其表面容易作化學處理，能攜帶特殊的官能基[8]，所以螢光奈米鑽石是很適合當生物標記使用。此外，其螢光生命週期(Fluorescence Lifetime)超過十奈秒。由於大部分的生物的自發螢光的生命週期都遠低於十奈秒，因此把奈米鑽石放入生物體內，就可以利用時間閘控(Time-gated)的方式把自發螢光濾掉，此時就只剩下螢光奈米鑽石所發出來的訊號。所以可用來提高生物細胞的自發螢光和螢光奈米鑽石螢光訊號的對比[9,10]。Flavin、nicotinamide adenine dinucleotides、collagens、和 porphyrins 都為生物細胞內在的物質，這些物質都會有自發螢光。如果所用的螢光標記的螢光光譜分佈，剛好與這些物質自發螢光的光譜分佈重疊，這樣一來就很難分辨是誰的訊號。若使用螢光奈米鑽石沒有此問題，因為其螢光光譜分佈在偏紅光的部分。如圖 1.4 以 Flavin 為例，Flavin 所發出來的螢光分佈圖為圖中橘色的線，而紅色的線為螢光奈米鑽石的螢光分佈圖[6]。可以發現螢光奈米鑽石的螢光光譜和 Flavin 的自發螢光光譜沒有互相重疊，所以可以利用濾波片將螢光奈米鑽石與 Flavin 的螢光分出來。另外，螢光奈米鑽石的螢光光譜波段為偏紅光，其螢光較容易穿透生物細胞。由上述螢光奈米鑽石的優點可知，螢光奈米鑽石可作為一良好的生物標記[6]。

### 1.1.2 合成螢光奈米鑽石

要製作含有(N-V)<sup>-</sup>的螢光奈米鑽石，首先要製造奈米大小尺寸的鑽石(鑽石必須要有許多氮雜質)。一般會用炸裂天然鑽石的方式[11]、高溫高壓合成[12]和利用化學氣相沉積得到奈米鑽石[13]。接下來再用高能質子束把奈米鑽石轟出空缺，然後把鑽石拿去高溫退火(annealing)在 800°C，讓鑽石裡面的雜質氮(N)和空缺(V)相遇而產生鍵結。因為螢光奈米鑽石很容易團聚(aggregate)在一起，以化學酸洗(硝酸和硫酸混合)和把含有螢光奈米鑽石的溶液稀釋到一定的程度，這樣一來就可以得到單一顆的螢光奈米鑽石，探討其基本性質。酸洗可以讓螢光奈米鑽石表面帶同電荷，讓其互相排斥所以不易團聚在一起，而稀釋溶液則是要減少溶液的單位體積內螢光奈米鑽石的數目量。另外經由酸洗後奈米鑽石表面會有化學官能基(羥基，Carboxylic acid group，-COOH)。表面羥基化後，蛋白質就可以銜接上去，如圖 1.5[14]。

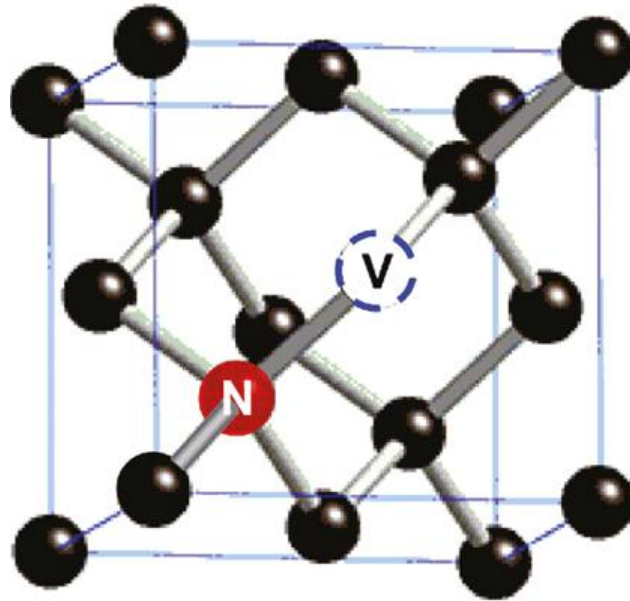


圖 1.1 鑽石的 NV defect 的結構示意圖[1]

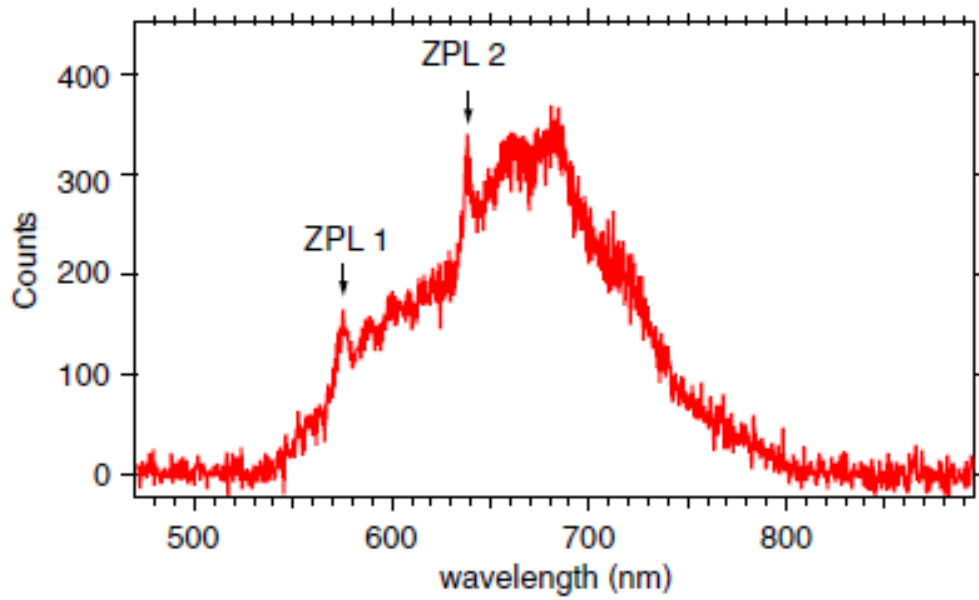


圖 1.2 螢光奈米鑽石的螢光光譜圖[5]

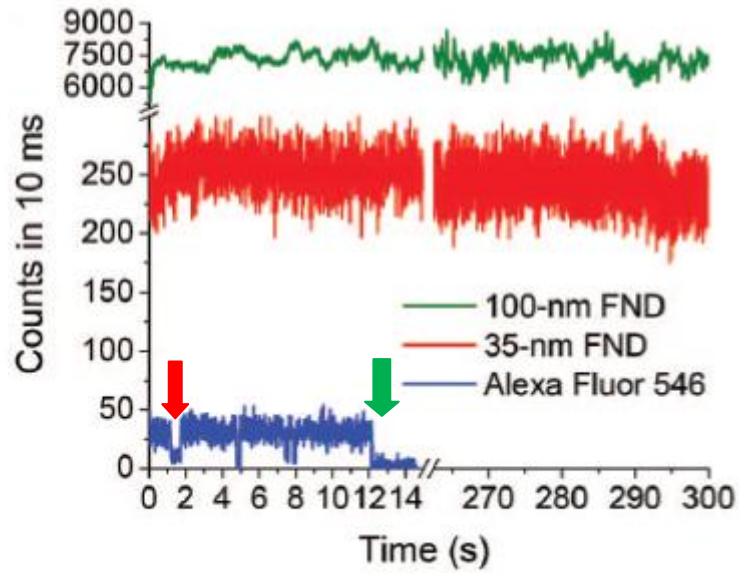


圖 1.3 螢光奈米鑽石和染料高分子的比較圖[6]

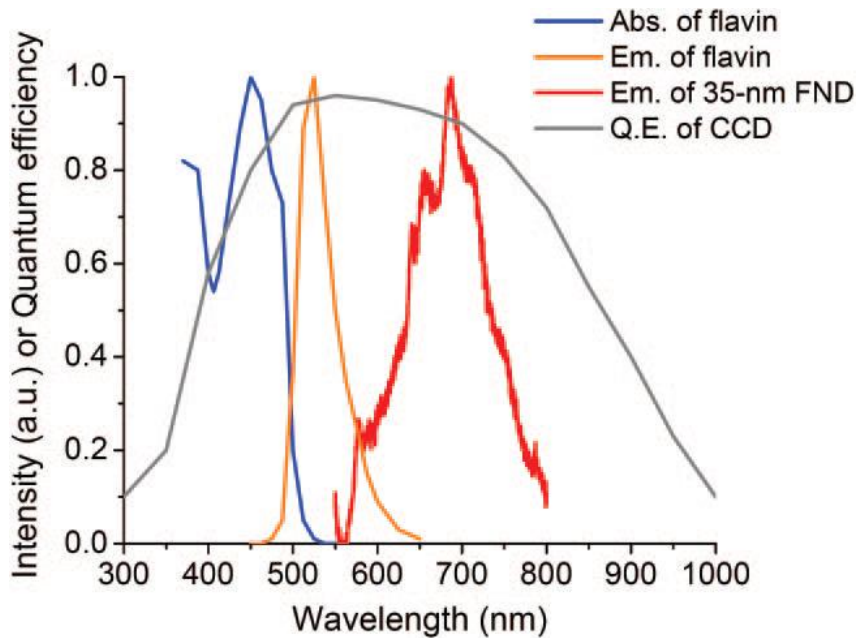


圖 1.4 Flavin 的吸收光譜、螢光光譜和螢光奈米鑽石的螢光光譜的比較[6]

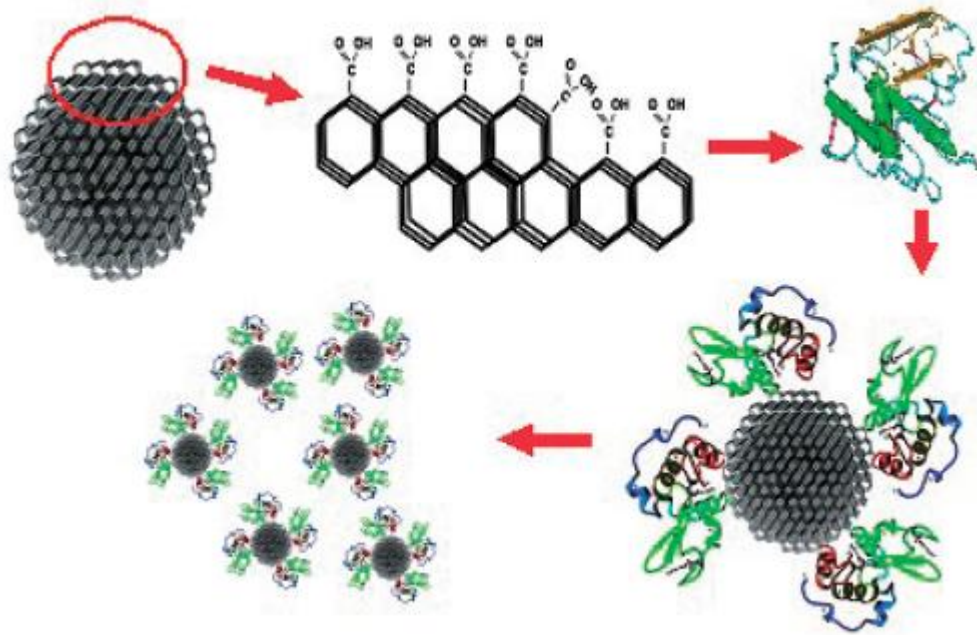


圖 1.5 奈米鑽石表面羥基化後再連接蛋白質於表面上之示意圖[14]



## 1.2 石墨殼的形成與影響

### 1.2.1 石墨外殼的形成

在製造螢光奈米鑽石的高溫退火過程中，其表面會產生非結晶碳 (disordered carbon) 和石墨殼 (shell of graphite)，利用拉曼光譜分析螢光奈米鑽石會出現鑽石的鍵結的訊號 ( $1325\text{cm}^{-1}$ ) 也會有石墨鍵結的訊號 ( $1600\text{cm}^{-1}$ ) [15]。甚至在高溫退火處理前的奈米鑽石的表面就已經存在非結晶碳和石墨殼 [16]，由圖 1.6 穿透式電子顯微鏡 (TEM) 觀察單一顆奈米鑽石在高溫退火之前 [15]，可以看到白色虛線圓圈內有明顯的鑽石結構，而虛線外則是非結晶碳和石墨殼。而這些在奈米鑽石表面非結晶碳和石墨殼可以利用化學酸洗去除掉一些 [6]。另外一個方法就是把奈米鑽石在一般的大氣壓力中加溫到  $400^{\circ}\text{C}$  到  $430^{\circ}\text{C}$ ，此處理可以把碳鍵結的  $\text{sp}^2$  (石墨結構) 轉換成  $\text{sp}^3$  (鑽石結構) [17]。

### 1.2.2 螢光抑制效應

這些非結晶碳和石墨殼，會導致螢光奈米鑽石裡的螢光體 (N-V) 的螢光被抑制 (quenching)。當一個偶極矩 (也就是一個螢光體) 距離導體表面少於 20 nm 的時候，導體表面電漿會開始和偶極矩產生共振效應。故當一個偶極矩接近導體時，會發生振動能量轉移，部分能量以非輻射的方式傳遞給導體表面。螢光體能量傳遞速率  $k$ ，和螢光體到導體表面距離  $d$  的數學式可表示成 [18]:

$$k = \frac{k_r \lambda^3}{32\pi^3 \epsilon_1^{3/2} d^3} \operatorname{Im} \left[ \frac{(\epsilon_2 - \epsilon_1)}{(\epsilon_2 + \epsilon_1)} \right] \quad (1)$$

其中  $k_r$  為發光體的輻射率常數(radiative rate constant)， $\epsilon_1$  為偶極矩所在空間的介電常數， $\epsilon_2$  為導體的介電常數， $\lambda$  則為發光體放射波長。

故發光體的螢光生命期  $\tau_f$  可表示成：

$$\tau_f = \frac{1}{k} = \frac{32\pi^3 \epsilon_1^{3/2} d^3}{k_r \lambda^3} \left\{ \operatorname{Im} \left[ \frac{(\epsilon_2 - \epsilon_1)}{(\epsilon_2 + \epsilon_1)} \right] \right\}^{-1} \quad (2)$$

原本螢光體的能量大部分都是以輻射傳遞，現今因為螢光體接近導體所以有部分能量傳給導體表面(能量轉換率  $k$  包含螢光體輻射速率常數  $k_r$  和螢光體以非輻射方式傳遞的非輻射速率常數 non-radiative rate constant  $k_{nr}$ )。另外還會影響發光體的量子產額，發光體的量子產額 (Quantum yield) 的物理意義為螢光體發出光子的數目與螢光體吸收光子的總數的比率，例如一個會發螢光的  $(N-V)^-$  center，激發光激發  $(N-V)^-$  center 時， $(N-V)^-$  center 總共吸收十個光子， $(N-V)^-$  center 只放出七個螢光光子，這個  $(N-V)^-$  center 的量子產額為 70%。量子產額  $Q$  的定義為  $Q = k_r/k$ ，當螢光體越靠近導體表面時，量子產額可表示如下：

$$Q \equiv \frac{k_r}{k} = k_r \tau_f = \frac{32\pi^3 \epsilon_1^{3/2} d^3}{\lambda^3} \left\{ \operatorname{Im} \left[ \frac{(\epsilon_2 - \epsilon_1)}{(\epsilon_2 + \epsilon_1)} \right] \right\}^{-1} \quad (3)$$

由(3)式可知當螢光體與導體表面距離  $d$  越小，則螢光體的生命期和

量子產額一起跟著遞減，所以當螢光分子靠近導體表面時會有螢光抑制效應發生。有研究團隊把染料分子放在用化學氣相沉積合成的奈米鑽石薄膜上，也有發現螢光抑制效應存在[19]。所以當螢光奈米鑽石被石墨殼所包圍著，外圍的石墨外殼對(N-V)<sup>-</sup> centers 也會有螢光抑制效應的發生。

### 1.2.3 螢光生命週期原理和螢光抑制效應下的螢光生命週期

因為石墨殼對(N-V)<sup>-</sup> centers 有螢光抑制效應產生，因而造成(N-V)<sup>-</sup> centers 的螢光生命期(fluorescence lifetime)的改變。所以在此節中，我們先簡述一下生命週期的原理，接著再討論在螢光抑制效應的影響下，螢光生命期如何變化。螢光分子的螢光生命週期常被拿來研究分子的結構和其分子跟分子之間的交互作用。當一個物質和光子交互作用，原子或分子吸收光子後，如示意圖 1.7，電子從基態被激發到激發態，而之後電子會先掉到較穩定的激發態，其過程能量是以非輻射的方式釋放出去。然後電子會自發地從激發態的最低能階掉到基態，並以輻射的方式將能量放出，這就是產生螢光[20]。其電子待在激發態的機率分佈會隨著時間呈現單一指數遞減， $P(t)=A*exp(-t/\tau)$ 其中  $\tau$  就定義成生命週期。把電子在上述過程所經歷的時間給記錄下來，累積訊號並製成統計圖，就可以建構電子在激發態的機率分佈，然後透過分析就可以得知生命週期。其中電子從基態被激發到激發

態，和電子會先掉到較穩定的激發態，這兩個過程是非常快速的。所以生命週期量測到的主要是從激發態的最低能階掉到基態的時間。

圖 1.8 是量測(N-V)<sup>-</sup> centers 在奈米鑽石薄膜的螢光衰減曲線 (fluorescence decay curve)[15]，此圖可用兩個指數函數去擬合(Fitting)數據圖，而分析出來的數據中較短的生命週期是受到螢光抑制效應的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出來的訊號，較長的生命週期是原本的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出來的訊號。如示意圖 1.9 中，較靠近石墨殼的(N-V)<sup>-</sup> centers 會有螢光抑制效應發生。(N-V)<sup>-</sup> centers 被雷射光激發後，能量除了發螢光還會以非輻射的方式傳給石墨殼，所以其在激發態的數量隨著時間遞減而回到基態，速率方程式可表示成：

$$\frac{dN_q}{dt} = -k_r N_q - k_{nr} N_q \quad (4)$$

其中  $N_q$  為受螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量， $k_r$  為輻射速率(以螢光的形式散發能量)， $k_{nr}$  為非輻射速率(以熱或振動散發能量)。在示意圖 1.9，在鑽石結構中心的(N-V)<sup>-</sup> centers 是沒有螢光抑制效應發生。被雷射光激發後，能量只以螢光的方式散發，其激發態的數量隨著時間遞減而回到基態，速率方程式可表示成：

$$\frac{dN_u}{dt} = -k_r N_u \quad (5)$$

其中  $N_u$  為不受螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量，上面兩個

速率方程式(4)和(5)的解分別如下

$$N_q(t) = N_{0q} e^{-(k_r+k_{nr})t} \quad (6)$$

$$N_u(t) = N_{0u} e^{-k_r t} \quad (7)$$

量測到的螢光強度  $I$  跟 (N-V)<sup>-</sup> centers 的數量  $N$  有關， $I \propto N$ 。受到螢光抑制效影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 發出來的螢光強度  $I_q$  會正比於受到螢光抑制影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量  $N_q$ ，而沒受到螢光抑制效影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 發出來的螢光強度  $I_u$  會正比於沒受到螢光抑制影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量  $N_u$ ，所以上式(6)和(7)可以表示如下

$$I_q(t) \propto N_{0q} e^{-(k_r+k_{nr})t} \propto I_{0q} e^{-\frac{t}{\tau_q}} \quad (8)$$

$$I_u(t) \propto N_{0u} e^{-k_r t} \propto I_{0u} e^{-\frac{t}{\tau_u}} \quad (9)$$

而總螢光強度  $I_{\text{total}}(t) = I_q(t) + I_u(t) = I_{0q} e^{-\frac{t}{\tau_q}} + I_{0u} e^{-\frac{t}{\tau_u}}$ 。所以由上式(8)和(9)可以得知

$$\frac{I_{0q}}{I_{0u}} = \frac{N_{0q}}{N_{0u}} ; \frac{\tau_q}{\tau_u} = \frac{1}{\frac{1}{k_r + k_{nr}}} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (10)$$

所以分析數據出來有兩種機制，其中較短的生命週期( $\tau_q$ )是有螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出來的訊號，且其對應到的螢光強度是  $I_{0q}$ ，較長的生命週期( $\tau_u$ )是原本的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出來的訊

號，其對應到的螢光強度是  $I_{0u}$ 。由式(11)可看到受到螢光抑制效應的  $(N-V)^-$  centers 的螢光強度和沒受到螢光抑制效應的  $(N-V)^-$  centers 的螢光強度的比值，會等於受到螢光抑制效應的  $(N-V)^-$  centers 的數量和沒受到螢光抑制效應的  $(N-V)^-$  centers 的數量的比值。

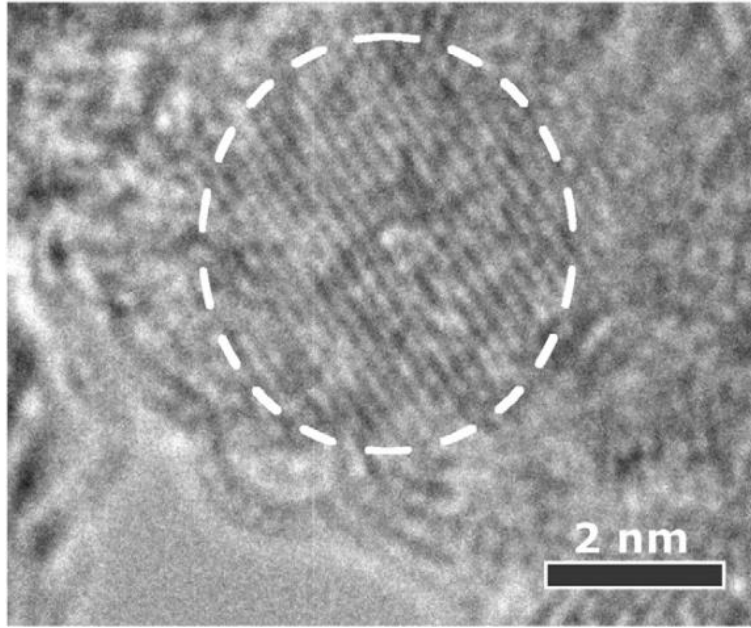


圖 1.6 用 TEM 觀察奈米鑽石的結構[20]

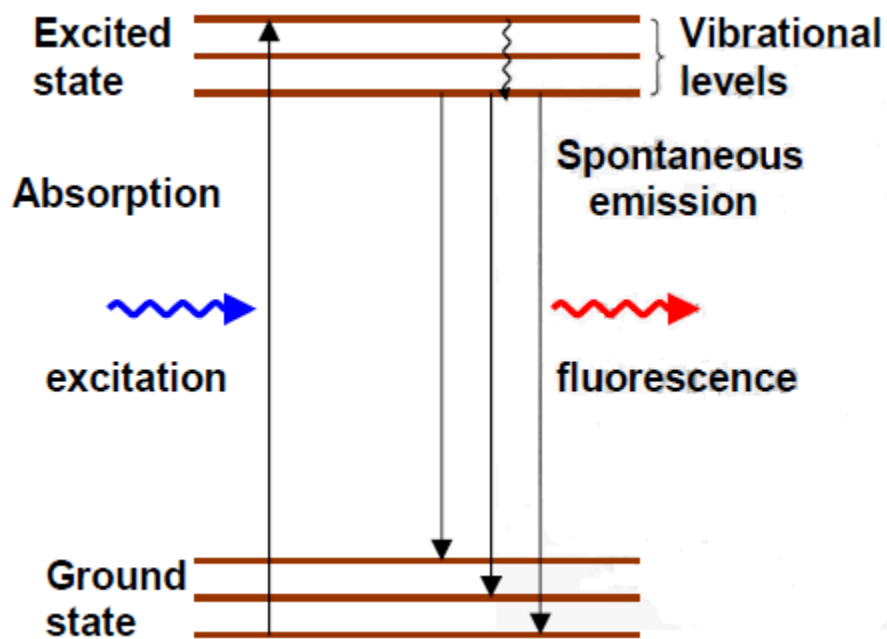


圖 1.7 螢光分子的電子躍遷示意圖[20]

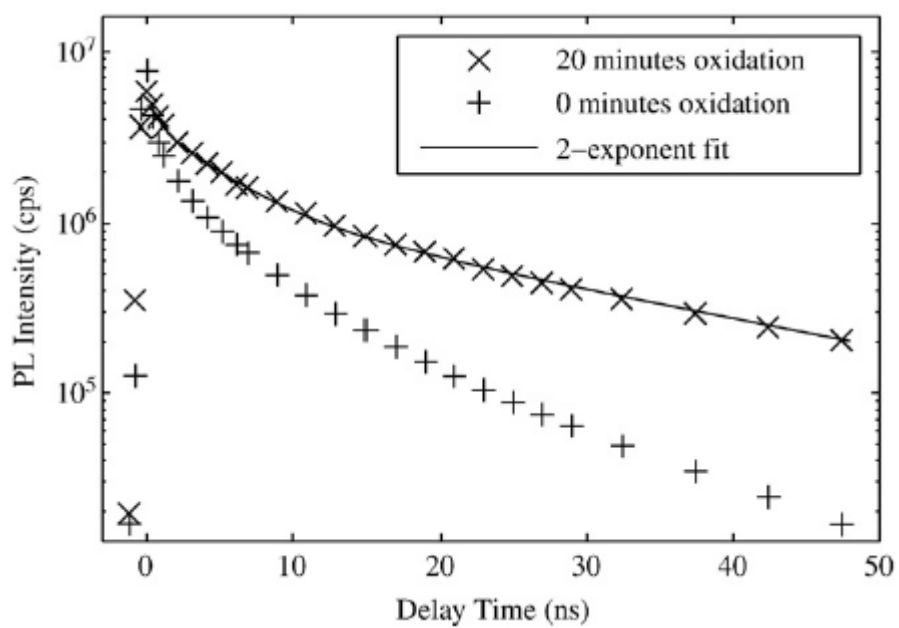


圖 1.8  $(N-V)^-$  centers 在奈米鑽石薄膜的螢光衰減曲線 [15]

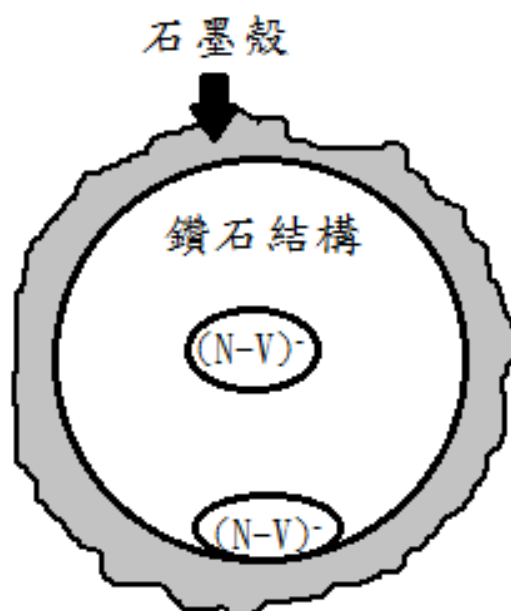


圖 1.9 受到石墨殼所影響的 $(N-V)^-$ 和沒有被影響的 $(N-V)^-$



### 1.3 量測發光體

螢光奈米鑽石為了廣泛應用在生物上，而越做越小顆。此時把 (N-V)<sup>-</sup> centers 植入奈米鑽石裡就更難做到，但是還是有團隊做到一顆 5nm 大小的螢光奈米鑽石[21]。為了製造更亮的螢光奈米鑽石，也有許多團隊致力於在一顆的奈米鑽石裡植入更多的 (N-V)<sup>-</sup> centers (一個 (N-V)<sup>-</sup> center 是一個螢光體也就是一個發光體)，也可以說在相同的體積內放入更多的發光體，讓其更能廣泛應用在生物標記中。因此定量一顆螢光奈米鑽石裡面含有多少個螢光體是很重要的。一般在鑽石塊材 (Bulk) 如果要量測 (N-V)<sup>-</sup> 的數量，可以利用吸收光譜的強度變化來算出 (N-V)<sup>-</sup> 的數量。但是如果鑽石的尺寸到達奈米等級，當入射光打到奈米鑽石時，表面結構會散射入射光，導致最後量測的光強度會不準，所以吸收光譜就不太適合拿來量測奈米鑽石的 (N-V)<sup>-</sup> 的數量。

#### 1.3.1 光子相干光譜量測

另外一種方法量測發光體的數量是用光子相干量測。常用的實驗架構為 Hanbury-Brown and Twisse 的架構[22]，如圖 1.10 可以看到入射光打到 Beam-splitter 變成兩道光源，然後用兩個偵測器去偵測訊號，同時把這兩個訊號一段時間差  $T$  去看自相干程度 (autocorrelation)，其數學式可以表示如下：

$$g^{(2)}(T) = \frac{\langle I(t)I(t+T) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (11)$$

由圖 1.11 相干性的結果可以看到，其為當  $g^{(2)}(0) > 1$  為聚束現象，具有高度的相干性，表示發出來的光為一般的熱光源，例如汞燈、日光燈。因為熱光源發光體的數量是非常多的，當溫度高時會同時一起發光，而溫度低時則就沒有光。當  $g^{(2)}(0) = 1$  為同調現象，不具任何相干性。例如雷射光，因為雷射光為穩定光源，並不受到時間所影響光強度，故其任何時間都不具有相關。當  $g^{(2)}(0) < 1$  為反聚束現象，則是一邊偵測器量到訊號，另外一邊偵測器則量到訊號的機率很低，此為量子光源才會有的現象。其主要的成因為一個發光體不會同時輻射出兩個以上的光子。以圖 1.12 所示的雙能階系統為例[22]，其包含一基態以及一個激發態。當電子在基態受到光的激發後，可躍遷至激發態，接著經由自發性輻射（spontaneous emission）而回到基態。由於電子是費米子，當其佔據激發態而尚未產生自發性輻射時，並無法激發下一個電子至同一個激發態。電子佔據激發態的時間與自發性輻射的生命期有關，因此在這段時間內，即使不停的對此系統激發，仍然並不會有光子產生。由此可知，一個獨立的雙能階系統將無法同時產生兩個以上的光子，所以構成一個量子光源。所以可以利用反聚束現象來判斷發光體是否為一個。

### 1.3.2 計算發光體

光子相干光譜通常被用來量測發光體的數目，在考慮雙能階系統的情況下光子相干函數  $g^{(2)}(T)$  可以寫成下列數學式[23]:

$$g^{(2)}(T) = \left(1 - \frac{1}{N} \exp(-|T|/t)\right) \quad (12)$$

$t = \frac{1}{(k_1 + k_2)}$ ， $k_1$  為激發速率， $k_2$  為在激發態的自發輻射數率。一般做

光子相干量測大部分都採用 coincidence 量測方法，其原理是一顆光子進入第一個偵測器，到下一顆光子進入第二個偵測器的時間差所累積而成的統計圖。而統計圖會和光子相干結果相差一個常數  $c$ ，其可寫成下列數學式:

$$C(T) = c g^2(T) = c \left(1 - \frac{1}{N} \exp(-|T|/t)\right) \quad (13)$$

$c$  為比例常數。當  $T=0$  時，可得到值  $C(0) = c[(N-1)/N]$ 。當  $T = \infty$  時，可得到值  $C(\infty) = c$ 。而我們定義  $C_0 \equiv C(0)$ ， $C_\infty \equiv C(\infty)$ ，故可得  $C_0/C_\infty = (N-1)/N$ 。另外，我們也可以以下列方法討論在  $T=0$  與  $T = \infty$  時，兩個偵測器量測到螢光體發出光子的機率。假設在一團螢光體內有不同的發光體  $n$  個，而  $i$  和  $j$  代表所有的發光體  $1...n$  個。 $p_i$  是發光體  $i$  發出一顆光子的機率。 $p_j$  是發光體  $j$  發出一顆光子的機率。而發光體發出光子還要被偵測器所量到，故偵測器 A 偵測到第  $i$  個發光子所發出的光的機率為  $F_i$ ，偵測器 B 偵測到第  $i$  個發光子所發出的光的機率

為 $(1-F_i)$ 。從發光體  $i$  發出光子被偵測器 A 所量到的機率可以寫成  $(F)_i p_i$ ，而偵測器 B 量到發光體  $i$  發出光子的機率 $(1-F_i)p_i$ 。同理  $j$  也相同。所以  $F_i p_i (1-F_j) p_j$  則為偵測器 A 偵測到第  $i$  個發光體的螢光而偵測器 B 偵測到第  $j$  個發光體的螢光的機率。當  $T=0$  時，同一時間同一個發光體只會發出一個光子，如果另外一個偵測器也有量到光子，一定不是同一個發光體所發出來的光子，故此時  $i \neq j$ 。考慮所有的發光子，然後把偵測器所有可能偵測到的結果加起來，其總機率為 [24]:

$$f_0 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n (F)_i (1-(F)_j) p_i p_j \quad (14)$$

當  $T \gg t$  時，激發態的電子掉回基態，再重新被激發上去，系統量測到有可能為同一個發光體所發出來的光子，故把  $i \neq j$  移除，則總機率變為

$$f_\infty = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (F)_i (1-(F)_j) p_i p_j \quad (15)$$

若我們將兩個偵測器所偵測到的光強度調成一樣，則  $F=50\%$ ， $1-F=50\%$ 。 $f_0/f_\infty$ 相除之後 $(F)_i(1-(F)_j)$ 可以相消。

$$\frac{f_0}{f_\infty} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n (F)_i (1-(F)_j) p_i p_j}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (F)_i (1-(F)_j) p_i p_j} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n p_i p_j}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n p_i p_j} \quad (16)$$

另外對於相同的發光體  $n$ ，每個發光子發出光的機率相等， $p_i = p_j =$

$p$ ，所以  $f_0/f_\infty$  比值為

$$\frac{f_0}{f_\infty} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n p_i p_j}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n p_i p_j} = \frac{(np)^2 - np^2}{(np)^2} = \frac{n-1}{n} \quad (17)$$

$C_0$  為  $\tau=0$  時，兩個偵測器同時量測到螢光體發出光子的數量。 $f_0$  為  $\tau=0$  時，兩個偵測器同時量測到螢光體發出光子的機率。同理  $C_\infty$  和  $f_\infty$  為  $\tau=\infty$  的時候，所以  $C_0/C_\infty$  和  $f_0/f_\infty$  相等。我們可以寫成一個式子如下：

$$R = \frac{N-1}{N} = \frac{C_0}{C_\infty} = \frac{f_0}{f_\infty} = \frac{n-1}{n} \quad (18)$$

所以我們可以用數學式(13)去擬合實驗數據找出  $N$ ，然後由(18)式可得知  $N=n$ ，即可求出有幾個發光體，而許多團隊也利用此方法來計算發光體的數量[25]。如圖 1.13 為一光子相干量測數據圖[26]，當  $T=0$  ns 時、 $g^{(2)}(0)=0.2$ 、為上述的  $C_0$ 。當  $T=80$  ns 時、 $g^{(2)}(80)=1.2$ 、為上述的  $C_\infty$ 。 $C_0/C_\infty \approx 0.166$ 。由上述討論知道發光體為一個時其比值為 0，而發光體為兩個時其比值為 0.5。故此團隊量到的發光體為單一個發光體。

值得一提的事，每個螢光體發出一顆光子機率可以不一樣。如果螢光體發出光子的機率不一樣話，對針對不同的發光體的發光機率做探討，其  $p_i$  就必須得符合物理條件加以修改，而發光體  $n$  的數量也得重新計算，而本論文後續將會探討如何修改。

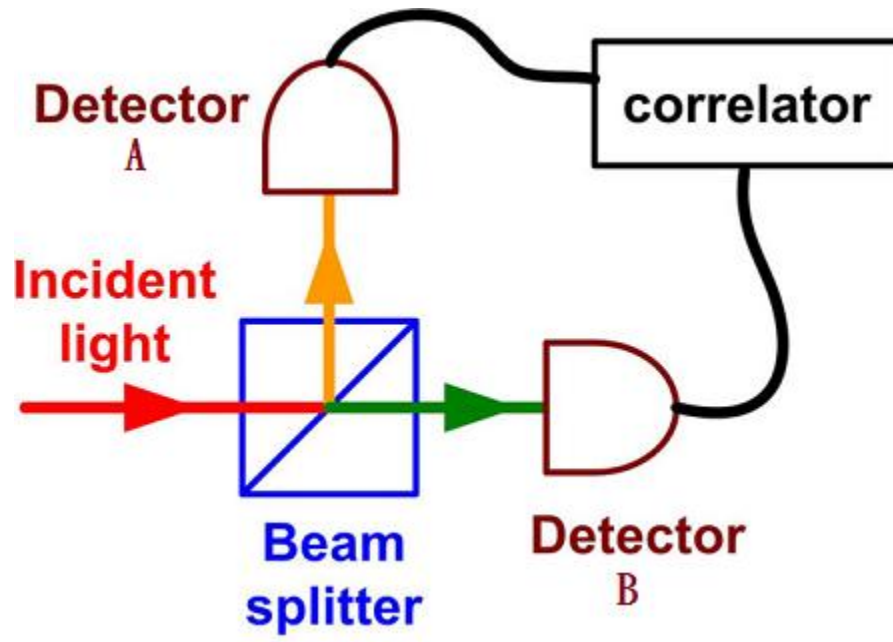


圖 1.10 Hanbury-Brown and Twisse 的實驗架構[22]

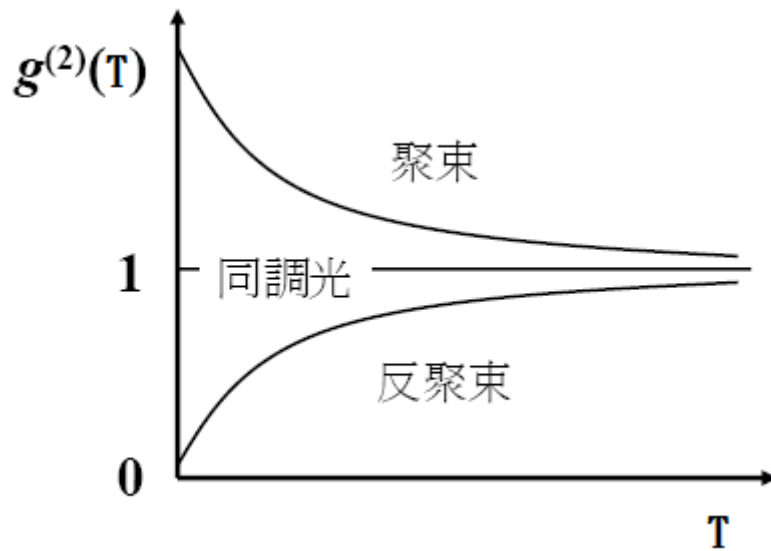


圖 1.11 光子相干量測結果示意圖

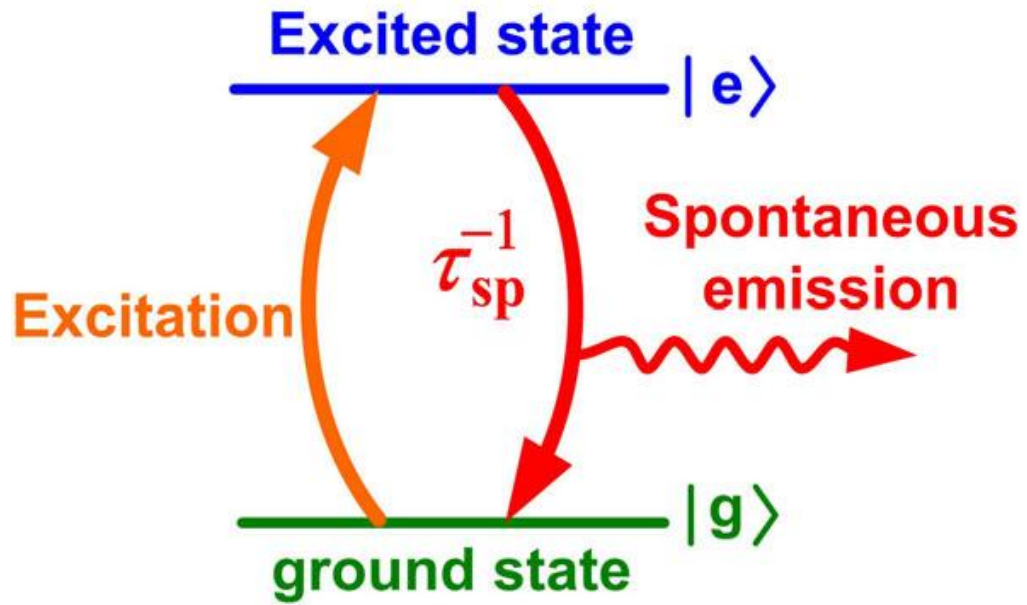


圖 1.12 獨立的雙能階量子示意圖[22]

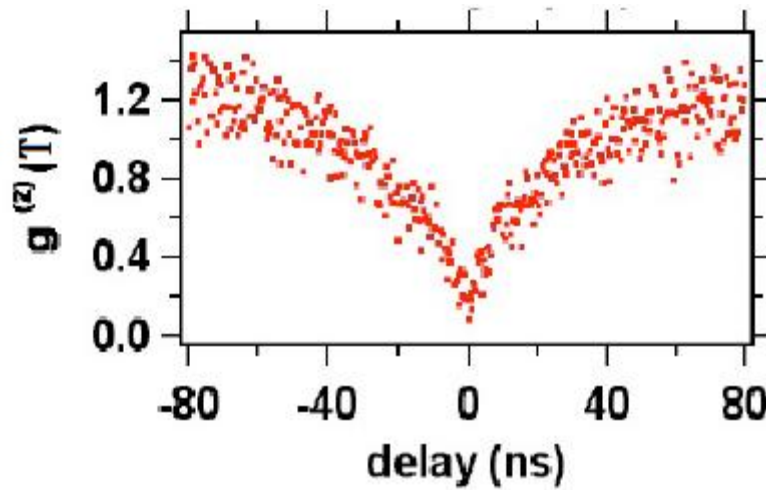


圖 1.13 光子相干量測圖[26]

## 第二章 實驗系統原理

本研究以共焦式螢光顯微鏡系統量測單一顆螢光奈米鑽石的螢光生命期及光子相干光譜。本章將針對共焦式螢光顯微鏡測系統，螢光生命期量測及光子相干量測之原理做一簡介。

### 2.1 共焦式螢光顯微鏡原理

共焦式螢光顯微鏡的運作原理如圖 2.1 所示，當激發光平行經過物鏡(objective)聚焦在樣品上激發樣品，被激發的樣品的點所散發出的螢光、反射光和散射光經由物鏡收集之後打在分光鏡(beam splitter)上面，此分光鏡只能讓短波長的光通過，長波長的光反射。螢光經由分光鏡反射打入濾片(filter)，此濾片只讓螢光的波段通過，螢光經由聚光鏡(focusing lens)聚集起來進入針孔，最後由偵測器量測其螢光訊號。所謂共焦是指顯微鏡的物鏡焦點與聚光鏡焦點位置相互對稱，也就是說螢光點與偵測點在光學成像上共軛，兩鏡的焦點同時落在觀察樣品的表面。如示意圖 2.1 只有黑色焦平面(focusing plane)的螢光訊號的可以通過針孔，被偵測器量測到，此時就代表這系統在共焦的狀態。而較深的平面(藍綠色)和較淺的平面(紅色)所發出的螢光則會被針孔擋住。非焦平面(圖中的 Z 軸)的螢光訊號非常弱，故此在就會有良好的螢光訊號對比。因為具有良好的螢光訊號對比，是探討訊號微弱的螢光物質的理想設備。



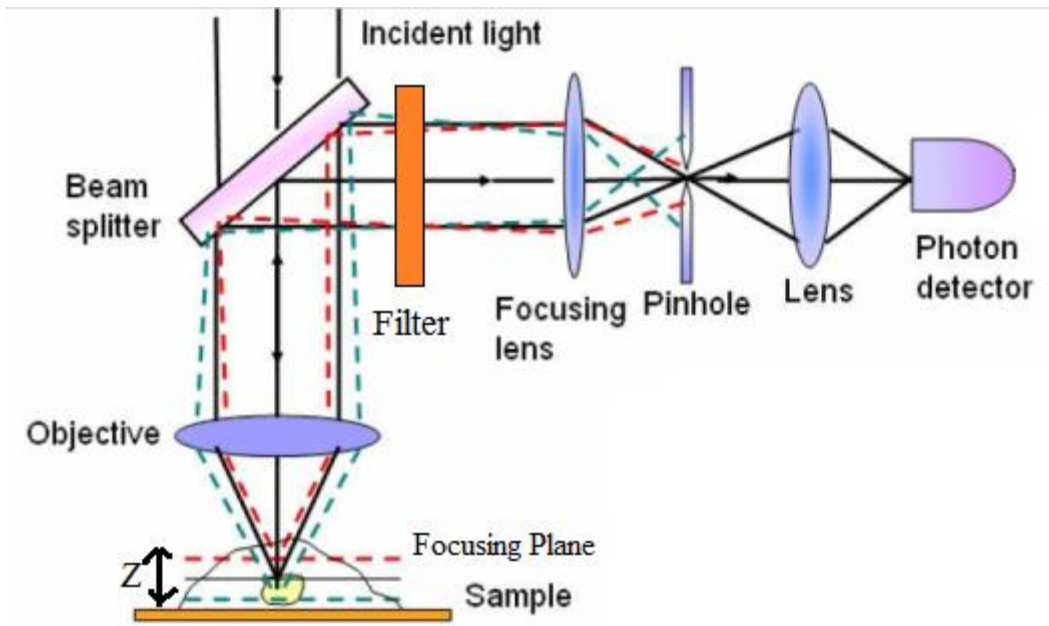


圖 2.1 共焦式螢光顯微鏡原理示意圖[27]

## 2.2 生命週期量測系統原理

做生命週期量測必須利用到脈衝(Pulse)雷射激發螢光樣品。如示意圖 2.2，在雷射打到分光鏡，一部分的雷射光進入偵測器 A 當作時間  $T_1$ ，此為螢光樣品的電子從基態被激發到激發態的時間。另一部分的雷射光去激發樣品發出螢光，螢光進入偵測器 B 當作時間  $T_2$ ，此時為螢光樣品的電子自發性地從激發態掉到基態的時間。然後把兩時間相減 $\Delta T$ ，其為螢光樣品電子在激發態所待的時間。累積所有的 $\Delta T$ ，並把所有訊號累積起來做成統計圖，如圖 2.3。之後用指數函數去擬合曲線即可得到螢光分子的生命週期。要注意雷射脈衝的間距必須大於螢光樣品的生命週期，以免一次紀錄兩個以上時間差訊號導致訊號重疊。

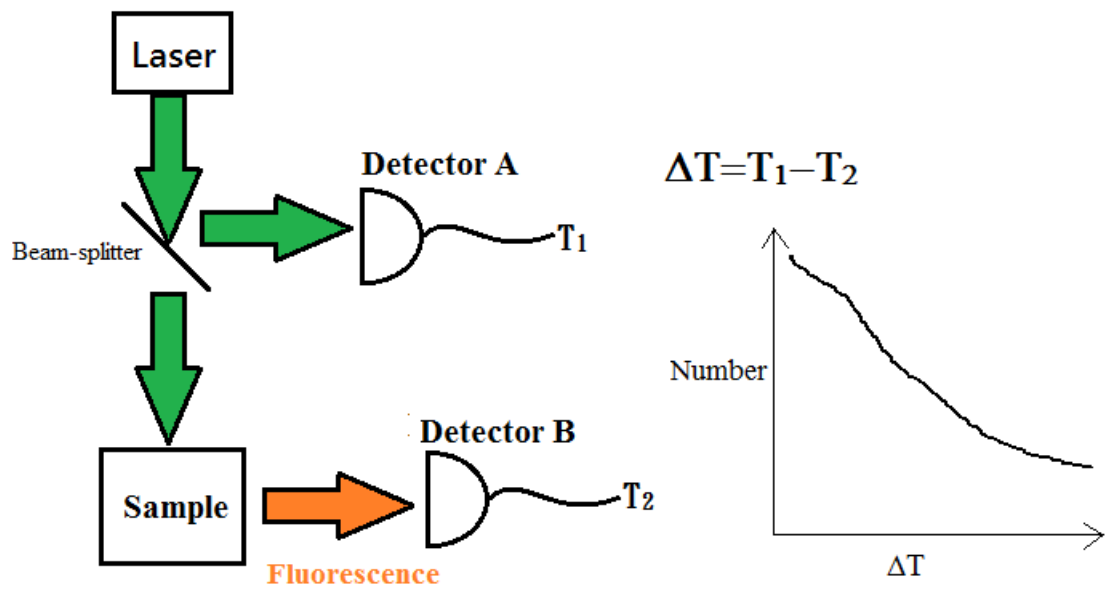


圖 2.2 生命週期量測示意圖

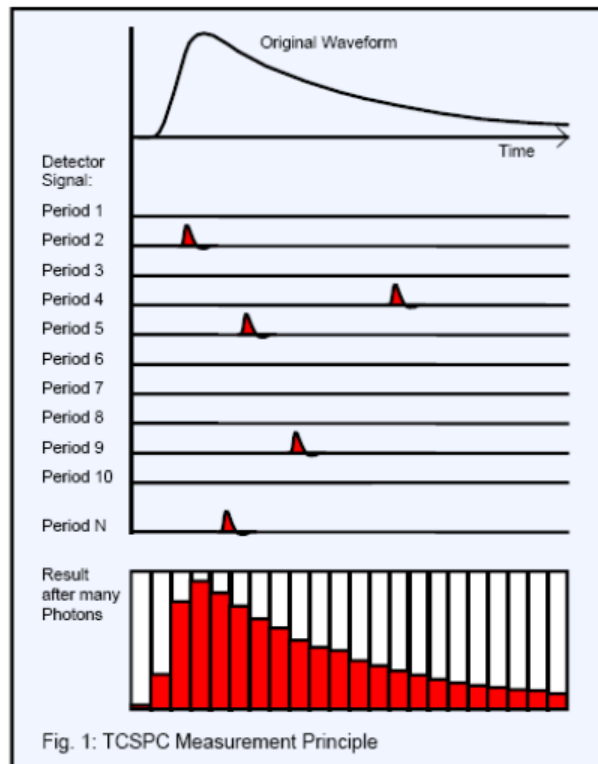


圖 2.3 生命週期訊號所累積出來的統計圖[28]

### 2.3 光子相干量測系統原理

做光子相干所需要的激發光源可以是 CW 雷射或是 Pulse 雷射。如示意圖 2.4，當激發光螢光樣品時，螢光樣品發出螢光打到 Beam-splitter，分成兩道螢光。一部分的螢光進入偵測器 A 當作時間  $T_1$ ，開始計時等到偵測器 B 有接收到螢光分子。當另一部分的螢光進入偵測器 B 當作為時間  $T_2$ ，結束等待時間。並把兩時間( $\Delta T$ )相減為一個訊號，然後持續累積訊號所形成的統計圖，此實驗架構稱為 coincidence 實驗系統。如果實驗結果有反聚束現象出現，則表示為量子光源的現象。

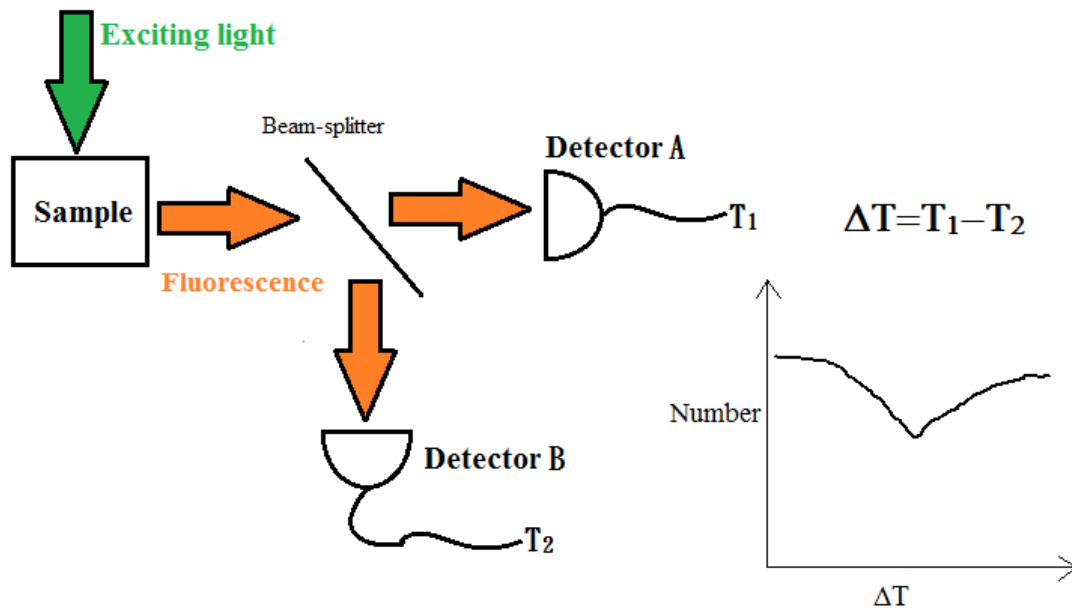


圖 2.4 光子相干量測示意圖

### 第三章 樣品備製與實驗量測

#### 3.1 螢光奈米鑽石的製備和樣品的備製

##### 3.1.1 螢光奈米鑽石的製備

我們使用的奈米鑽石是用合成出來的 Ib 種類的鑽石(含有較多的氮雜質)，其顆粒大小為 35 nm。用能量 3MeV 的質子束每平方公分  $1 \times 10^{16}$  離子轟擊奈米鑽石把鑽石結構的碳給打掉變成空缺，接著放在真空的環境下退火在 700°C 兩小時，讓鑽石內的氮原子與空缺結合形成(N-V)<sup>-</sup> centers。之後為了使其螢光奈米鑽石各顆分離和去除表面的石墨，故浸泡在硫酸與硝酸(9:1,vol/vol)的混合液，溫度為 75°C，時間為兩天。稀釋出來以後，以去離子水做為溶液保存。

##### 3.1.2 樣品的備製

為了要搭配我們的系統使用，我們把螢光奈米鑽石的溶液和蓋玻片事先處理。

蓋玻片處理步驟:

1. 把買來的蓋玻片浸泡在硫酸與雙氧水(3:1,vol/vol)的混合液，並且放在超音波洗淨器三小時。
2. 把蓋玻片取出來用去離子水洗乾淨，用氮氣吹乾後再浸泡在去離子水裡面，放在超音波洗淨器三小時，要使用時用去離子水清洗並用氮氣吹乾。

螢光奈米鑽石樣品的備製步驟:

1. 把純螢光奈米鑽石溶液稀釋一些出來和去離子水混合(1:9, vol/vol)。
2. 把稀釋過的螢光奈米鑽石溶液拿去超音波洗淨器震盪(42 kHz)兩小時,讓溶液中團聚在一起的螢光奈米鑽石因為受到震盪而分離。
3. 把處理過後的螢光奈米鑽石溶液滴在處理過後的蓋玻片正中央,並且置放在旋轉塗佈機,第一段轉速為 800 rpm 經過時間為 10 秒,第二段轉速為 2000 rpm 經過時間為 5 秒。
4. 經過兩分鐘後蓋玻片角落的溶液乾掉後,把黑罩(圖 3.1)緣塗上指甲油黏在蓋玻片的正中央。如圖 3.2,螢光奈米鑽石就在黑罩的空的部分。之後放置在防潮櫃一天。經過一天後就可以把樣品架設在共焦式顯微鏡的樣品平台上,如圖 3.3。



圖 3.1 黑罩



圖 3.2 黑罩黏在蓋玻片上與示意圖



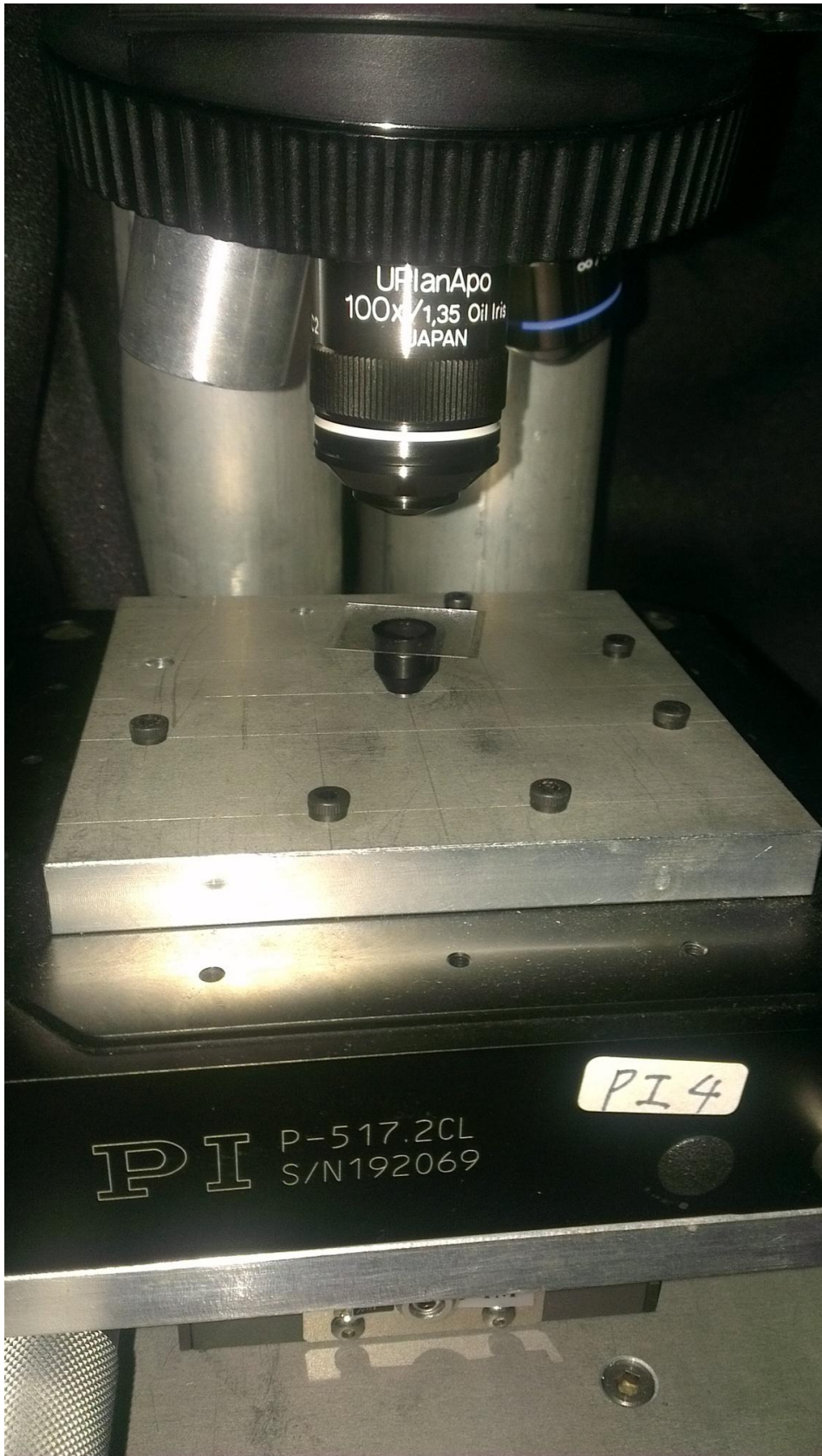


圖 3.3 把做好的樣品架設樣品平台上

## 3.2 螢光奈米鑽石樣品量測

### 3.2.1 螢光奈米鑽石樣品的掃描與螢光量測

首先我們利用共焦式螢光顯微鏡系統尋找在蓋玻片上的螢光奈米鑽石。我們使用的雷射是 532 nm (CW)，如裝置示意圖 3.4。雷射光打入空間濾波器(Spatial filter)，其功用可以讓把空間高頻的光給濾掉。而光路上的 ND filter(可以把雷射光減弱)可以調適我們所要的雷射光強度，接著雷射光打入 Narrow band filter (Chroma ; HQ 535/30 M)，其穿透光譜如圖 3.5，其功用可以從圖 3.5 中看到只有 532nm 附近波長的光才可以經過此濾片，這樣一來就可防止固態雷射所產生的其他波長和光路上的螢光進入顯微鏡系統中。在經過幾次反覆的實驗，先把進入顯微鏡系統的雷射光強度調到 100  $\mu$ W，此為系統基準激發光強度值。接著打到分光鏡(Dichroic mirror) (Chroma ; Z 532 RDC) 上面，其穿透光譜如圖 3.6。此分光鏡可以把短波長(532nm 以下)的光反射，長波長(大於 532nm)的光則可以穿透，如裝置示意圖 3.4，把較短波長的綠色雷射光反射在物鏡上，較長波長的紅色螢光穿透。雷射光經過物鏡上聚焦在螢光奈米鑽石上，而我們使用的物鏡為油鏡 (Olympus ; UplanApo 100x, 1.35 N.A.)。螢光奈米鑽石發出螢光穿透分光鏡，由於穿透分光鏡的效果有限，故加放只讓螢光通過的濾片 Long pass filter (Semrock ; LP03-532RS-25)，穿透光譜如圖 3.7，可以

從圖 3.7 看到此濾片只能讓長波長(536nm 以上)的光通過此濾片。而螢光經由聚光鏡(Condenser lenses)以光纖接收頭代替針孔，並且把螢光導入雪崩式光電二極體(Avalanche Photodiode, APD)(PerkinElmer; SPCM-AQR-15-FC)。利用 Labview 軟體控制顯微鏡樣品座的壓電平台掃描樣品。而我們的使用的樣品座平台(Physik Instrument; P-517.2CL)具有具有奈米等級移動的功能，其最大的掃描圖為  $100\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ 。利用共焦螢光顯微鏡系統掃描樣品，看掃描的區域裡面是否有發螢光並且是否有呈現發光點是分離的情形。

接下來我們把掃描到的亮點固定在雷射聚焦點下，利用 Labview 軟體控制顯微鏡樣品座的壓電平台。開啟 Labview 軟體進行螢光強度的量測。若需要量測單一亮點的光譜，我們可以把共焦式螢光顯微鏡系統中接到 APD 的光纖換接到光譜儀(Princeton Instrument; Acton SP2156)。由圖 3.8 可以看到光纖打入的光打到光柵分光後經由凹面鏡反射到 EMCCD(Princeton Instrument; Cascade 1K)。用電腦中光譜儀的軟體去量測光譜圖，接著再去與文獻上的光譜做比較

### 3.2.2 螢光奈米鑽石樣品光子相干量測

光子相干量測系統如裝置示意圖 3.9，雷射光源經過光路系統後打入顯微鏡系統，接著激發螢光奈米鑽石產生螢光，經過濾片後打到 Beam-splitter 50/50，使得 APD1 和 APD2 都有接收到螢光，接著我們使用的 Labview 軟體可以同時看到兩邊偵測器所偵測到螢光強度，調整兩邊的光纖讓兩邊所接收到的螢光強度大約相等。然後把 APD1 的輸出訊號接在 TCSPC 卡上的 SYNC，把 APD2 的輸出訊號接在 TCSPC 卡上的 CFD，開啟 TCSPC 用的電腦軟體 SPCM，開始光子相干量測。當螢光光子打入連接著 SYNC 的 APD1 並啟動-開啟，所以 TCSPC 開始等待 CFD 的結束訊號。當下一顆螢光光子進入連接 CFD 的 APD2 並啟動-結束，TCSPC 則就計算這段開啟到結束的時間差，當作一個訊號，然後累積訊號形成一個統計圖。我們所用如圖 3.10 的 TCSPC 為 Time-Correlated Single Photon Counting Modules(Becker & Hickl GmbH; SPC-600)。

在光子相干量測時，掃瞄到的螢光強度較亮的光點量測出來的結果會沒有反聚束現象出現，原因是螢光奈米鑽石團聚在一起，光點內有許多發光體。所以要去尋找螢光強度較弱的光點才有反聚束的現象。經過多次試驗後，在我們的系統下雷射光強度用  $100\mu\text{W}$  激發單一顆 35 nm 螢光奈米鑽石，而螢光強度約在 1000~3000 counts/10ms

幾乎都可以量測到光子反聚束的現象。所以我們依此設置下去量測每一顆螢光奈米鑽石的光子相干量測。然後把得到的光子相干量測數據圖用第一章的數學式(6)去分析擬合。

### 3.2.3 螢光奈米鑽石樣品的生命週期量測

量測螢光奈米鑽石樣品的生命週期，我們使用的 Pulse 雷射是 532nm 的 Q-switched 倍頻二極體激發式固態雷射(Laser diode pumped solid-state laser)，其脈衝間隔為 27.2  $\mu$ s 遠大於螢光奈米鑽石的生命週期。因為把 CW 雷射換成 Pulse 雷射打入顯微鏡，所以不同的光路所以必須要做光纖校正和焦平面的調整。然後掃瞄剛剛 CW 雷射掃瞄的區域，因為我們必須確認生命週期量測的螢光奈米鑽石是和光子相干量測為同一顆鑽石，所以我們用 Pulse 雷射掃瞄螢光奈米鑽石樣品的掃描圖，如圖 3.11。去比較用 CW 雷射掃瞄螢光奈米鑽石樣品的掃描圖，如圖 3.12。如兩張圖中紅色箭頭都為同一顆螢光奈米鑽石。如裝置示意圖 3.13，雷射打到分光鏡上，我們用玻片當分光鏡，因為玻片可以穿透也可以反射，反射光打在光子偵測器 Photon detector (EOT；ET-2030)上，而此偵測器接到 TCSPC 的 CFD，此功用可以把偵測到的雷射光進來時當作一個時間  $T_1$ ，並且啟用 Start 開始等待 SYNC 的訊號。而穿透玻片的雷射光，經過光路系統和顯微鏡系統打在螢光奈米鑽石上，發出螢光訊號打到接在 SYNC 的 CFD，此功用

可以叫 TCSPC 結束等待 Stop，並作時間紀錄  $T_2$ 。 $T_2$  和  $T_1$  相減包含了系統反應時間和電子在激發態到基態所消耗的時間。一次脈衝雷射打入樣品，系統就只量測一個螢光體的訊號。脈衝雷射光持續的進來，TCSPC 把訊號累積起來，即可得到螢光衰減曲線圖。然後把得到的螢光衰減曲線的數據圖用下式數學式去擬合，即可得到生命週期。

$$y = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{x}{\tau_i}} \quad (19)$$

其中， $\tau_i$  為第  $i$  個螢光生命期而  $A_i$  為其所對應的螢光強度。

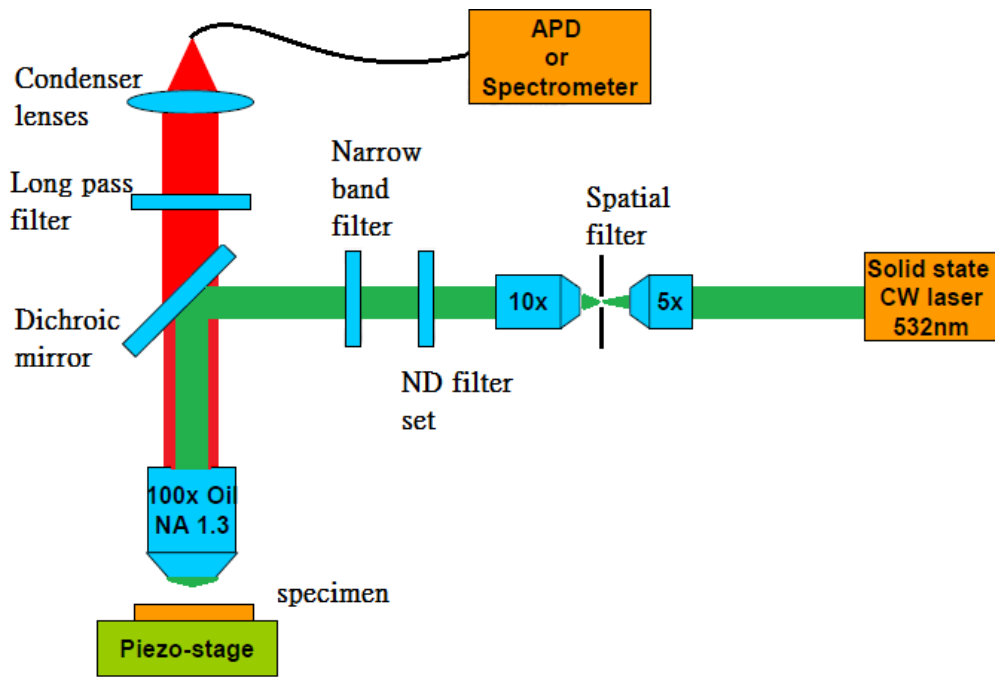


圖 3.4 共焦掃描顯微鏡系統裝置示意圖

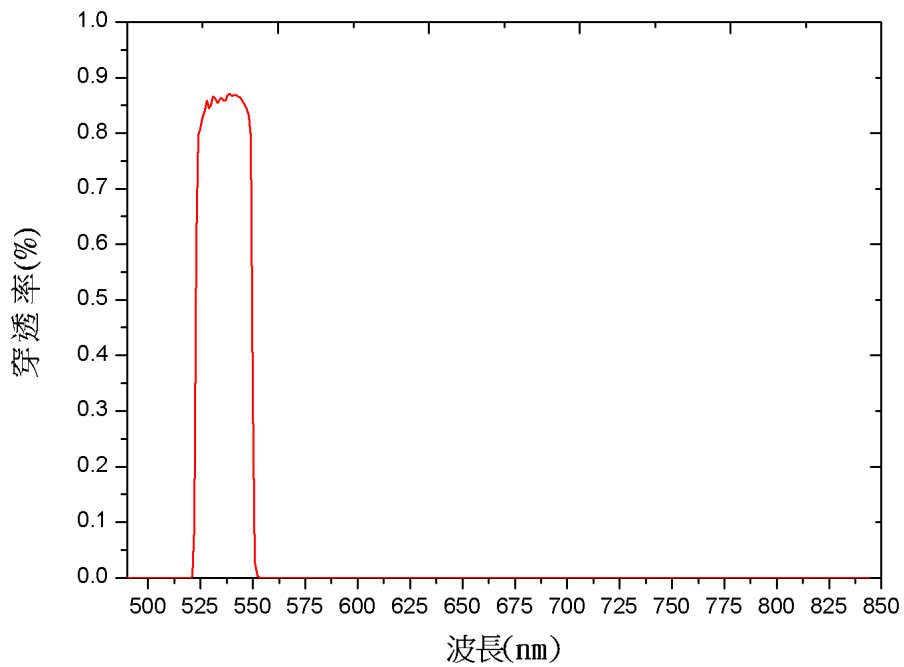


圖 3.5 HQ 535/30 M 濾片的穿透光譜圖

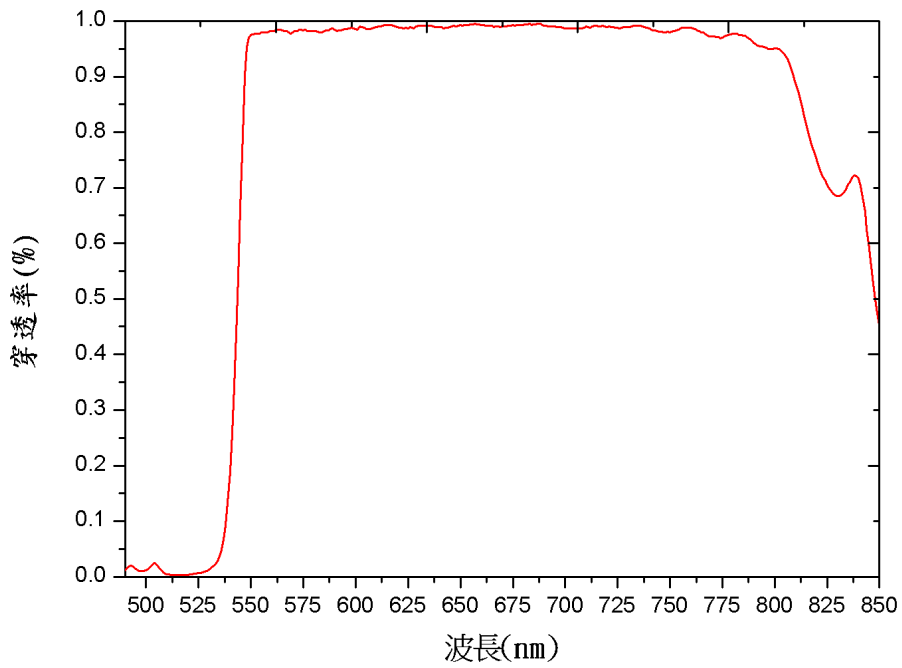


圖 3.6 分光鏡 Z 532 RDC 的穿透光譜圖

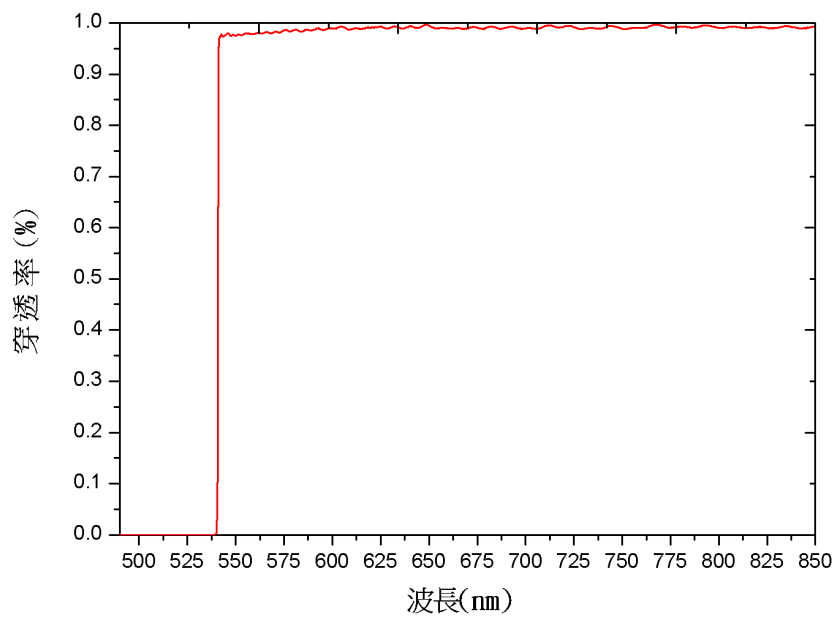


圖 3.7 LP03-532RS-25 濾片的穿透光譜圖



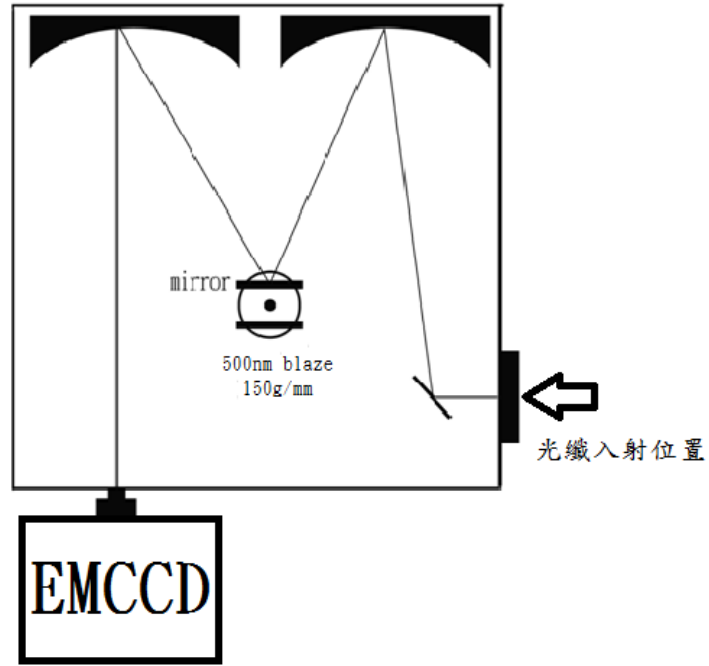


圖 3.8 光譜儀光路示意圖

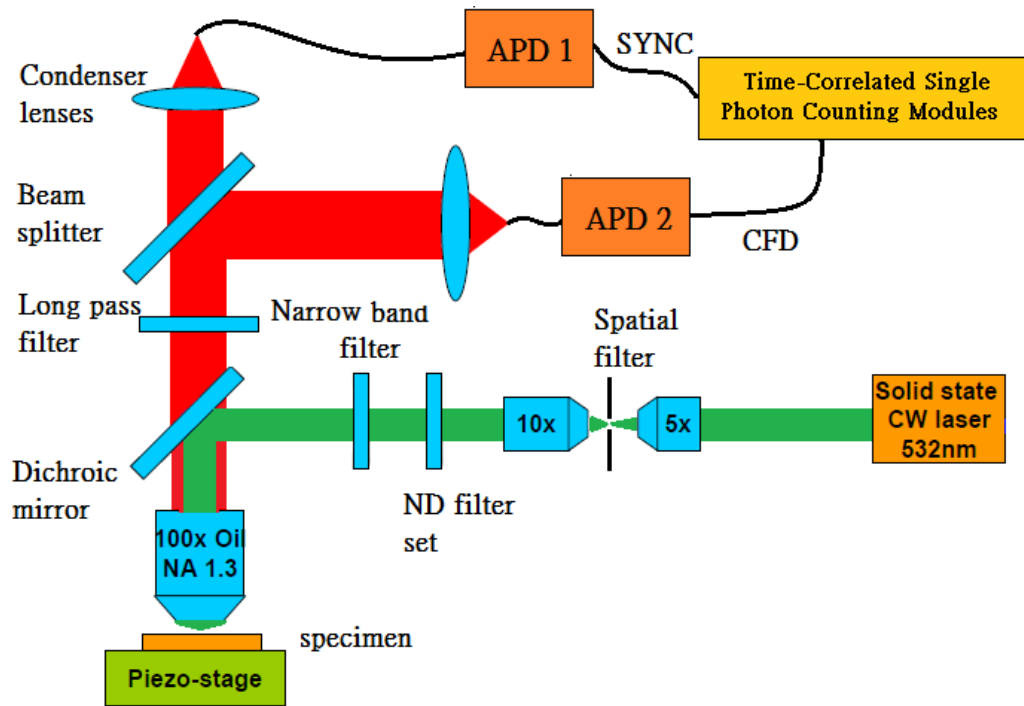


圖 3.9 光子相干量測裝置示意圖

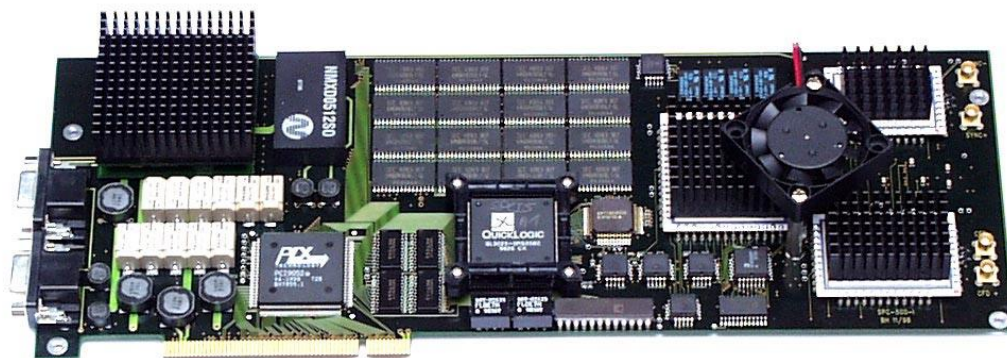


圖 3.10 Time-Correlated Single Photon Counting Modules

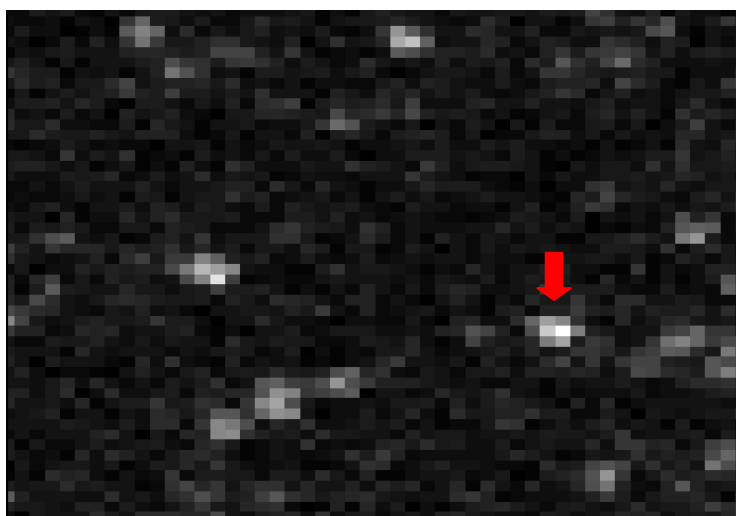


圖 3.11 用 Pulse 雷射掃瞄 35nm 螢光奈米鑽石樣品的 20 μm×20 μm 掃描圖

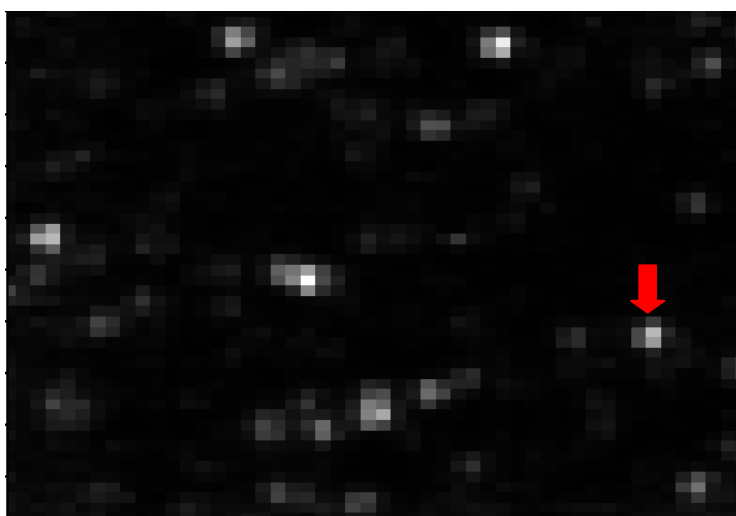


圖 3.12 用 CW 雷射掃瞄 35nm 螢光奈米鑽石樣品的 20 μm×20 μm 掃描

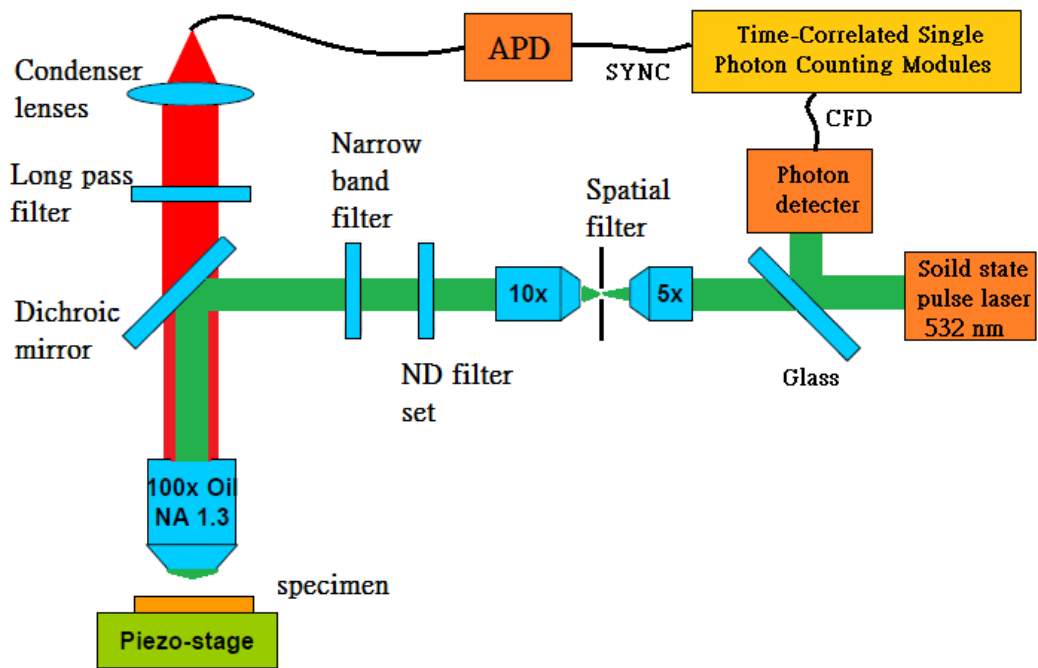


圖 3.13 生命週期量測實驗裝置示意圖

## 第四章 實驗結果與討論

### 4.1 螢光奈米鑽石樣品掃瞄圖和光譜圖

我們用共焦式顯微鏡系統掃瞄 35nm 螢光奈米鑽石樣品，並讀取數據圖用繪圖軟體畫出來如圖 4.1。可以明顯的看到發光點是分離的發著螢光，我們挑選了其中一顆做為量測分析，如圖 4.1 中的黑色箭頭。我們持續觀察此發光點隨著時間增加螢光強度的變化。如圖 4.2，可以發現到螢光強度大約保持在 3000 counts/10ms。由第 1.1.1 節的討論可知，螢光奈米鑽石有很穩定的光物理性質，其螢光沒有光閃爍的現象，也不容易被光漂白。此亮點所發出的螢光非常的穩定，因此極有可能是螢光奈米鑽石。除此之外，我們還可以透過螢光光譜的量測，做進一步的確認。我們量測此發光點 (圖 4.1 的黑色箭頭) 的光譜如圖 4.3，在第一章的圖 1.2 可以看到螢光奈米鑽石光譜圖。明顯地看到我們的光譜圖有 ZPL 1 和 ZPL 2，還有看到螢光光譜分佈的位置是在 570nm~750nm，由這兩個判斷得知我們量到的螢光體是螢光奈米鑽石。

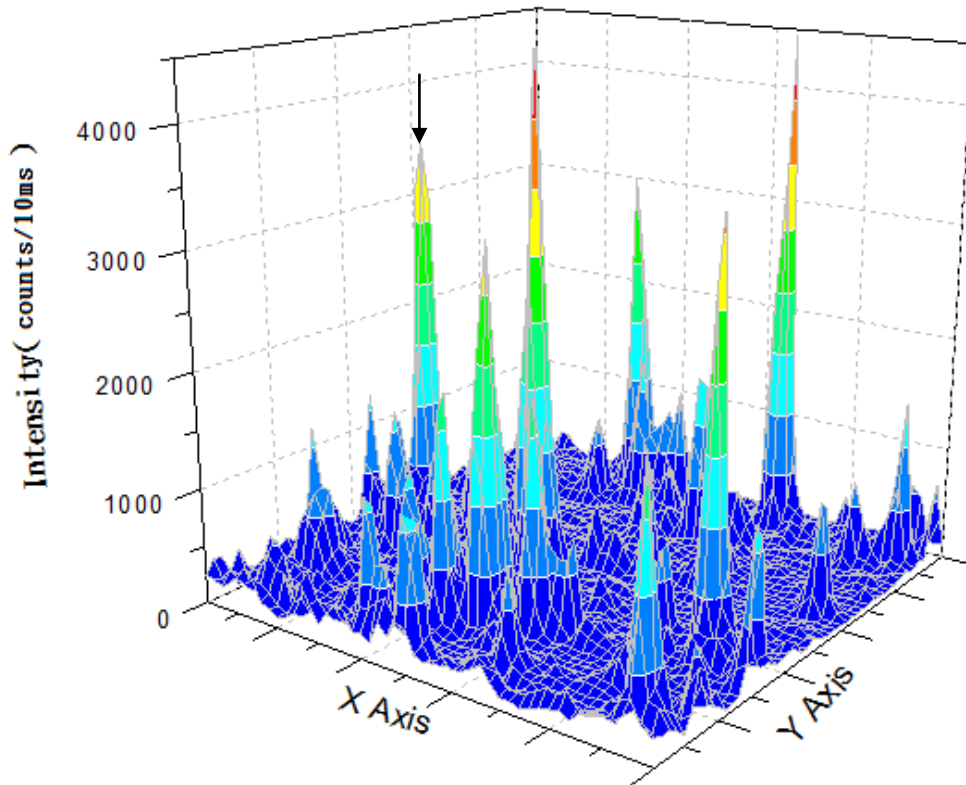


圖 4.1 共焦式顯微鏡掃瞄 35 nm 螢光奈米鑽石樣品的螢光強度分佈圖

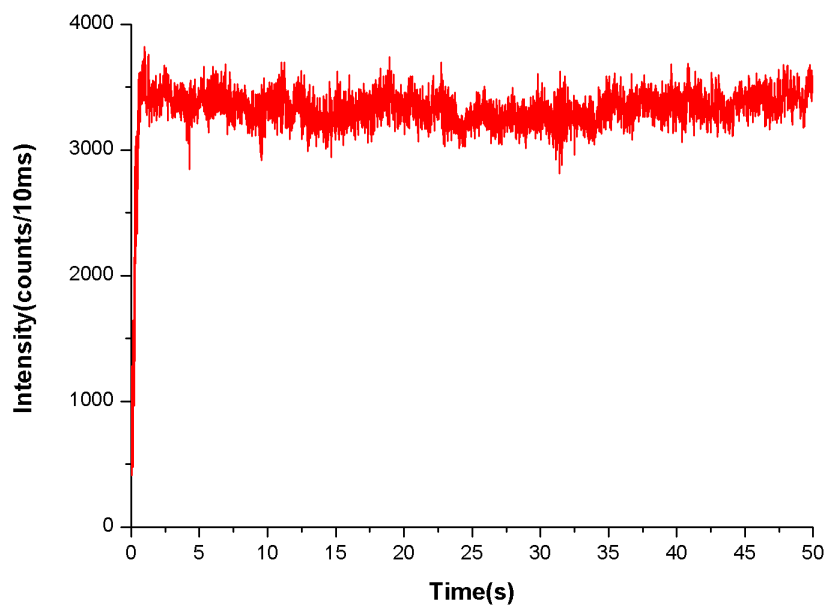


圖 4.2 螢光奈米鑽石隨著時間增加其螢光強度的變化

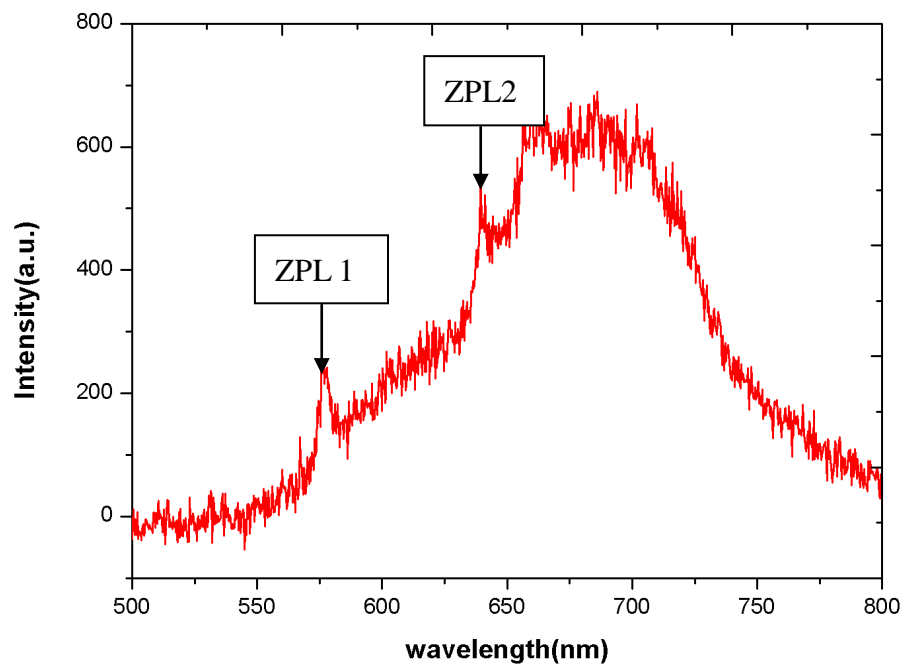


圖 4.3 發光點量測到的螢光奈米鑽石光譜

## 4.2 生命週期量測分析與討論

圖 4.4 是我們量測到單一顆螢光奈米鑽石的螢光衰減曲線 (fluorescence decay curve)，可以看到此曲線中同時含有快的衰減及慢的衰減。表示其並不是由單一動力學機制所造成的。而經由第一章節討論，螢光奈米鑽石中的(N-V)<sup>-</sup> centers 其中一種是受到螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers，另外一種則原本的是(N-V)<sup>-</sup> centers。所以我們試著用兩個指數衰減函數去對此衰減曲線做擬合(fitting)，我們發現兩個指數衰減函數即可得到相當好的擬合結果，可見在螢光奈米鑽石中的(N-V)<sup>-</sup> centers 主要確實是受到上述的兩個機制所影響。我們得到兩個生命週期分別為  $\tau_q=1.931\text{ns}$  和  $\tau_u=22.795\text{ ns}$ ，且分別對應到的強度為  $A_1=2423$  和  $A_2=709$ 。我們系統反應時間約為  $0.6\text{ns}$ ，而  $\tau_q$  已經大於我們系統反應時間，並且接近  $2\text{ ns}$ ，根據文獻[15]去比較， $\tau_q$  為螢光抑制效應的(N-V)<sup>-</sup> centers 的生命週期。而  $\tau_u$  值則接近螢光奈米鑽石的生命週期約為  $20\text{ns}$  [15]，故  $\tau_u$  為(N-V)<sup>-</sup> centers 不受螢光抑制效應影響下的生命週期。所以量測到訊號並分析出來較短的生命週期值  $\tau_q$  是在螢光抑制效應影響下的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出來的訊號，較長的生命週期值  $\tau_u$  則是原本的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出來的訊號。

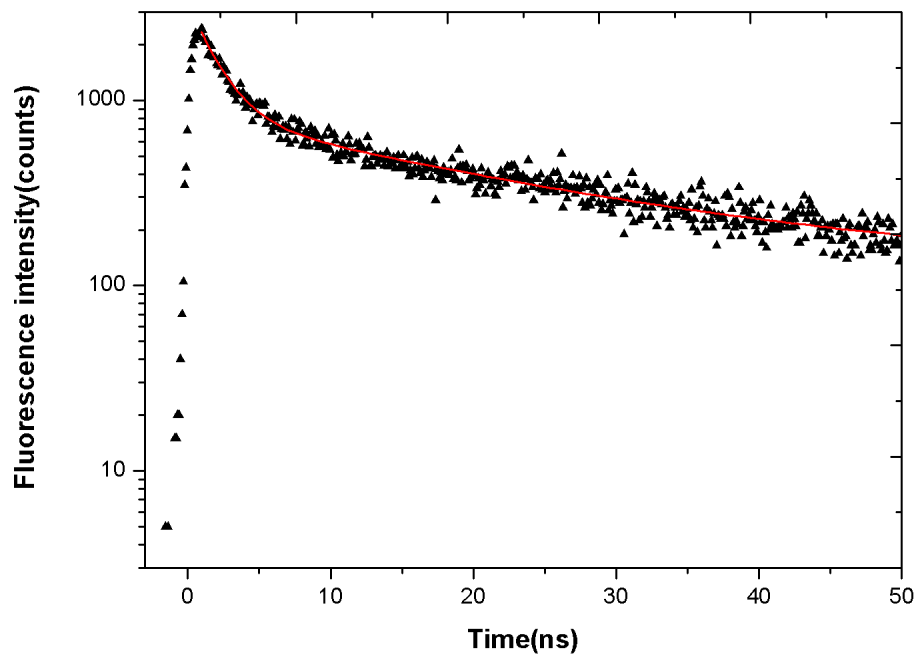


圖 4.4 35nm 螢光奈米鑽石的螢光衰減曲線



### 4.3 光子相干量測分析與討論

圖 4.5 是我們用光子相干光譜量測單一顆螢光奈米鑽石，可以看到有反聚束的現象發生，我就可以利用此數據計算螢光體的數量。我們利用第一章數學式(13)去做擬合，得到  $N = 2.996$ 。若以傳統的光子相干量測方式  $N = n$ ，此圖所對應的 (N-V)<sup>-</sup> centers 數目約為 2~3 個。

然而在此模型假設了每一個 (N-V)<sup>-</sup> centers 發出來的光子並被偵測到的機率是一樣的。而螢光體發出光子的機率  $p$  和以下三項成正比關係: 激發光強度( $I$ )、吸收截面積( $\sigma$ )和量子產額 ( $\eta$ )。因為激發雷射光斑(直徑~300 nm)遠大於奈米鑽石，雷射光均勻照射在整顆奈米鑽石上，所以兩種(N-V)<sup>-</sup> centers 接收激發光強度是一樣的。而吸收截面積是不一樣的物質才有不同的值，螢光抑制效應只在激發態時才會發生作用，所以兩種(N-V)<sup>-</sup> centers 吸收截面積是相同。量子產額( $\eta$ )的定義為  $\frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$ ，因此有受螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的量子產額  $\eta_q$ ，和沒受到螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的量子產額  $\eta_u$  其比值如下

$$\frac{\eta_q}{\eta_u} = \frac{\frac{k_r}{k_r + k_{nr}}}{\frac{k_r}{k_r}} = \frac{1}{\frac{k_r + k_{nr}}{k_r}} = \frac{\tau_q}{\tau_u} \quad (20)$$

與生命週期成正比關係。所以螢光抑制效應會影響(N-V)<sup>-</sup> centers 發出

子的機率，有不同類的(N-V)<sup>-</sup> centers 發出光子並被量測到的機率並不一樣，所以我們要修改光子相干計算發光體數量的模型，才能夠得到正確的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量。

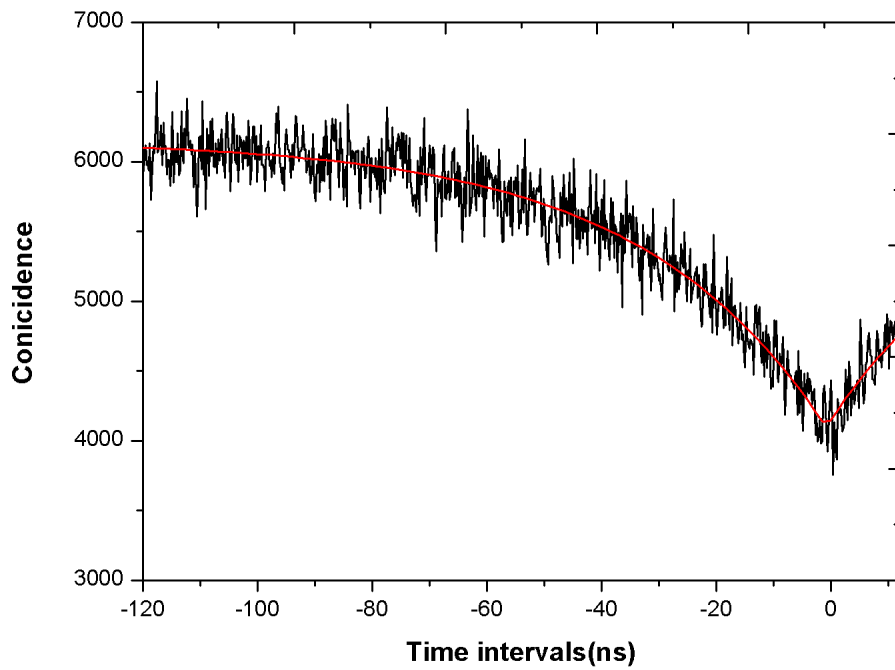


圖 4.5 35 nm 螢光奈米鑽石光子相干量測

#### 4.4 修改計算模型

因為量子產額不一樣，導致螢光抑制效應和原本的 (N-V)<sup>-</sup> centers 所發出螢光光子的機率是不相等的 ( $p_i \neq p_j$ )，因此我們修改計算模型。由第 4.2 節螢光衰減訊號的擬合得知，螢光訊號主要是由兩種螢光體所發出來的，所以我們假設有兩種螢光體發出光子的機率，分別是有螢光抑制效應影響的 (N-V)<sup>-</sup> centers，及不受螢光抑制效應影響的 (N-V)<sup>-</sup> centers 的發出光子的機率， $p_q$  和  $p_u$ 。而我們也假設在這兩種 (N-V)<sup>-</sup> centers 的數量分別為  $n_q$  及  $n_u$ 。我們可以把第一章式(17)修改成如下

$$R = \frac{\sum_i^{n_q+n_u} \sum_{j, j \neq i}^{n_q+n_u} p_i p_j}{\sum_i^{n_q+n_u} \sum_j^{n_q+n_u} p_i p_j} = \frac{(n_q p_q + n_u p_u)^2 - n_q p_q^2 - n_u p_u^2}{(n_q p_q + n_u p_u)^2} \quad (21)$$

並以實驗可得到的值和一些代數變換來得到  $n_q$  和  $n_u$ 。我們把  $n_q$  代成  $n_u$  而  $p_q$  和  $p_u$  則代  $\tau_q$  和  $\tau_u$  的形式，然後用得到的實驗值，來解出  $n_q$  和  $n_u$ 。我們來整理已知的條件如下：

1. 螢光體發出光子的機率與量子產額成正比，而量子產額和生命週期成正比，其表示如下：

$$\frac{p_q}{p_u} = \frac{\eta_q}{\eta_u} = \frac{\tau_q}{\tau_u} \quad (22)$$

2.當發光體的數量越多，發出的螢光就越強。可表示如下：

$$\frac{I_{0q}}{I_{0u}} = \frac{n_q}{n_u} ; \quad n_q = \frac{I_{0q}}{I_{0u}} n_u \quad (23)$$

3. $R$  值可藉由光子相干量測擬合得到。

我們把關係式(22)、(23)代入方程式(21)，可以寫成如下

$$\frac{n_u^2 \left( \frac{I_{0q} \tau_q}{I_{0u} \tau_u} + 1 \right)^2 - \frac{I_{0q}}{I_{0u}} \left( \frac{\tau_q}{\tau_u} \right)^2 n_u - n_u}{n_u^2 \left( \frac{I_{0q} \tau_q}{I_{0u} \tau_u} + 1 \right)^2} = R \quad (24)$$

將此式整理成  $n_u$  的二次方程式

$$n_u^2 (1-R) \left( \frac{I_{0q} \tau_q}{I_{0u} \tau_u} + 1 \right)^2 - n_u \left[ \frac{I_{0q}}{I_{0u}} \left( \frac{\tau_q}{\tau_u} \right)^2 n_u + 1 \right] = 0 \quad (25)$$

解此方程式可以得到  $n_u$  的解為

$$n_u = 0 \quad \text{及} \quad n_u = \frac{\frac{I_{0q}}{I_{0u}} \left( \frac{\tau_q}{\tau_u} \right)^2 n_u + 1}{\left( \frac{I_{0q} \tau_q}{I_{0u} \tau_u} + 1 \right)^2 (1-R)} \quad (26)$$

接著由關係式(23)和已得知的  $n_u$  可以得到  $n_q$  如下

$$n_q = \frac{I_{0q}}{I_{0u}} n_u \quad (27)$$

在式(24)中  $I_{0q}/I_{0u}$  的比值可藉由螢光生命週期分析所對應到的螢光強度  $A_1/A_2$  代入，而  $\tau_q/\tau_u$  則藉由分析生命週期而代入。故我們在 4.3.1 節利用反聚束系統量測 35 nm 螢光奈米鑽石得到  $N = 2.996$ ，其所對應的  $R = (N-1)/N = 0.666$ 。在章節 4.2 量測到的生命週期為  $\tau_q = 1.931$  ns 和  $\tau_u = 22.795$  ns，其所對應的  $A_1 = 2423(I_{0q})$  和  $A_2 = 709(I_{0u})$ 。代入上式(26) 以及(27)可以得  $n_q = 6.268$ ， $n_u = 1.834$ 。而修改過後的總螢光體數量為  $n_{total} = n_q + n_u = 8.102$ ，此顆螢光奈米鑽石約有八個的  $(N-V)^-$  centers。我們利用此方法把  $(N-V)^-$  centers 的數量從約為三個發光體修正到為八個發光體。修改幅度為 2.6 倍，屬於大幅度的修改。

#### 4.5 螢光奈米鑽石的螢光體修正結果與探討

我們總共量測了 42 顆不同的 35nm 螢光奈米鑽石，並依據螢光衰減曲線來判斷是否要修改螢光體的數量。從圖 4.6 可以看到兩顆不同的螢光鑽石的螢光衰減曲線，而其中 FND 1 只有一個生命週期為 38 ns，我們的解釋是(N-V)<sup>-</sup> centers 在鑽石結構附近沒有靠近石墨殼，或者是石墨殼非常稀少，所以沒有螢光抑制效應。所以用光子相干量測到的螢光體數量不需要修改。然而此現象並不多在我們量測 42 顆中只有 2 顆不用修改，機率非常的低。而 FND 2 則有兩個生命週期，所以用光子相干量測到的螢光體數量需要做修改。上述兩個例子也在說明(N-V)<sup>-</sup> centers 有些是靠近石墨殼，有些則是在鑽石結構中。

另外我們把 40 顆的螢光奈米鑽石修改前和修改後的(N-V)<sup>-</sup> centers 數量做統計分佈圖。如圖 4.7，黑色的長條圖 是一般光子相干量測 35nm 螢光奈米鑽石的(N-V)<sup>-</sup> centers 數量分佈圖，紅色的長條圖是我們提出的修改方式所量測到的(N-V)<sup>-</sup> centers 分佈圖，其修改前平均量測數量為 7.865，而修改後平均數量為 12.838。其平均修改幅度為 1.6 倍。其以總體上是相當大幅度的修改螢光體的數量。

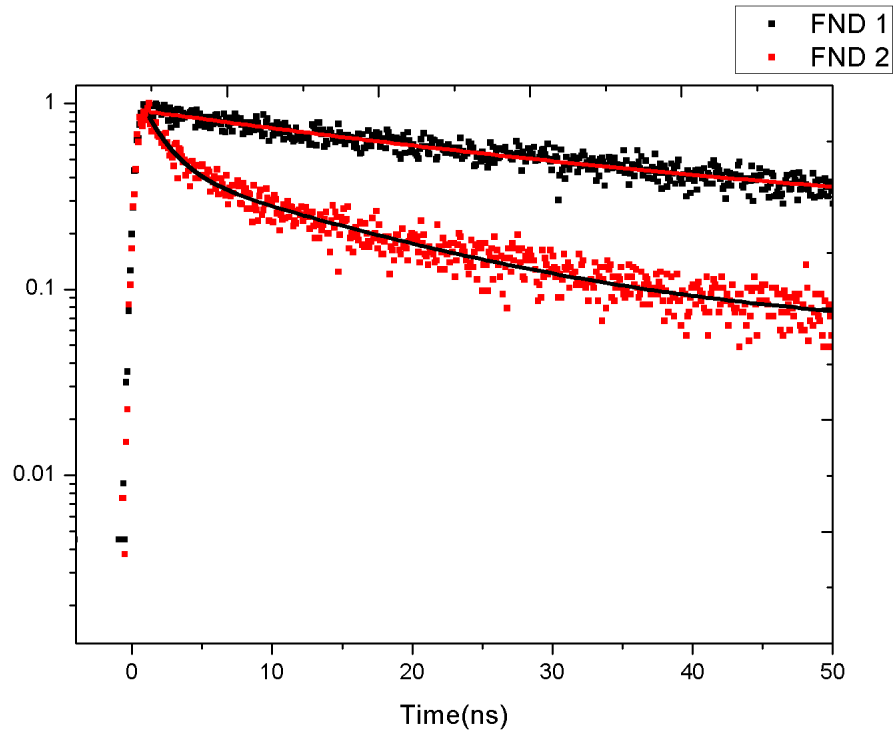


圖 4.6 兩顆 35nm 螢光奈米鑽石的生命週期量測

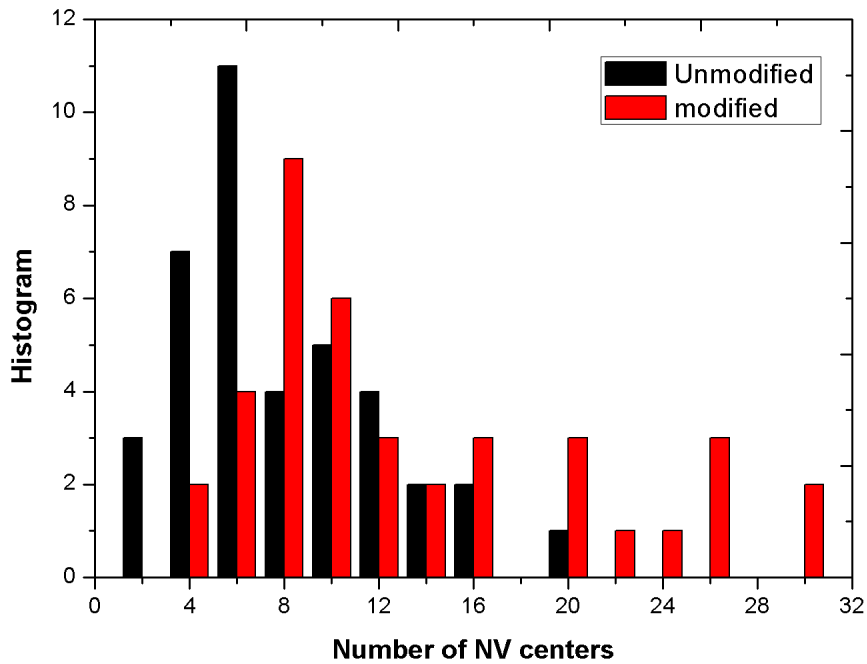


圖 4.7 (N-V) centers 的數量修改前和修改後的統計分佈圖



## 第五章結論與展望

螢光奈米鑽石的表面石墨殼會對氮-缺(N-V)<sup>-</sup> centers 產生螢光抑制效應，當(N-V)<sup>-</sup> centers 越靠近表面石墨殼時，其螢光生命期(Fluorescence Lifetime)和量子產額(Quantum yield)會隨之遞減，而此時螢光會呈現非單一指數衰減。我們將螢光衰減曲線的衰減趨勢分成兩種，一種是屬於較快的遞減，一種是屬於較慢的遞減。較快的遞減是受到螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出的螢光，較慢的遞減是沒受到螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 所發出的螢光。而一般用光子相干量測去計算螢光體的數量，都假設每個螢光體發出光子的機率都相等，但在這種情況下(N-V)<sup>-</sup> centers 卻不能適用。因為(N-V)<sup>-</sup> centers 的量子產額受到螢光抑制效應的影響而產生了改變，導致螢光體發出光子的機率不一樣。所以我們提出一種方法，來修正計算(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量的方式。而這個方法結合了時間解析螢光光普及光子相干光譜的量測。我們量測 35 nm 螢光奈米鑽石的(N-V)<sup>-</sup> centers 數量，在修改前平均數量值是 7.865，而經由修改後平均數量值是 12.838，其總體平均修改幅度為 1.6 倍是屬於相當大的修改。

此外我們把這 40 個螢光奈米鑽石中未受螢光抑制效應影響的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量除以所有(N-V)<sup>-</sup> centers 的總數量得到分佈圖。如圖 5.1，可以看到每一顆螢光奈米鑽石不受螢光抑制效應影響的

(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量，占全部數量從 20% 到 80% 都有，其總體平均值為 47.7%，其分布造成的原因可能是由於每顆螢光奈米鑽石的石墨殼的厚度都不一樣，且(N-V)<sup>-</sup> centers 在鑽石結構內的分布也是隨機的，有些是很靠近表面有些則是沒有。

我們未來將利用氧化表面以減少光抑制效應，讓受到螢光抑制效應的(N-V)<sup>-</sup> centers 的數量減少，看其  $n_u/n_{total}$  的總體平均值的變化，看其單一顆的 35nm 螢光奈米鑽石的螢光強度是否有變強，並用來檢驗我們的模型。另外我們的方法也可以用在別的螢光物質上，只要此螢光物質受到螢光抑制效應影響，都可以利用我們的方法去重新計算螢光體的數量。

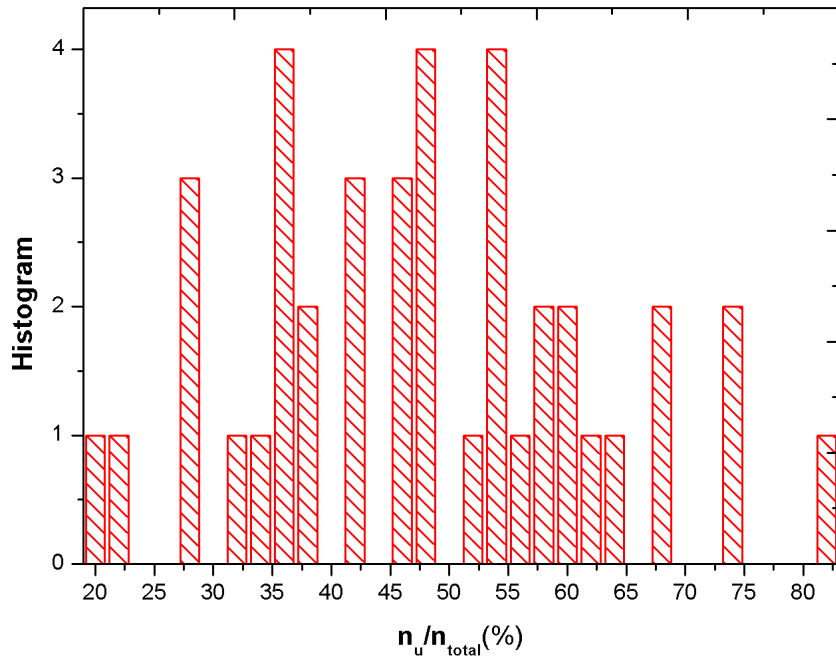


圖 5.1 35nm 螢光奈米鑽石的  $\frac{n_u}{n_{total}}$  比例分布圖

## 參考文獻

1. Y.Y. Hui, Y.R. Chang, N. Mohan, T.S. Lim, Y.Y. Chen, H.C. Chang, *Polarization Modulation Spectroscopy of Single Fluorescent Nanodiamonds with Multiple Nitrogen Vacancy Centers*. J. Phys. Chem. A, 2011. 115:p. 1878-1884
2. A. Gruber, A. Drabenstedt, C. Tietz, L.Fleury,J.Wrachtrup,C. von Borczyskowski, *Scanning Confocal Optical Microscopy and Magnetic Resonance on Single Defect Centers*. Science, 1997. 276: p. 2012-2014.
3. E. Wu, J. R. Rabeau, F. Treussart, H. Zeng, P. Grangier, S. Praver, J.F. Roch, *Room temperature triggered single-photon source in the near infrared*. J. Mod. Opt., 2008. 55:p. 2893–2901.
4. I. I. Vlasov, A. S. Barnard, V. G. Ralchenko, O. I. Lebedev, M. V.Kanzyuba, A. V. Saveliev, V. I. Konov, E. Goovaerts, *Nanodiamond Photoemitters Based on Strong Narrow-Band Luminescence from Silicon-Vacancy Defects*. Adv. Mater., 2009. 21:p. 808-812.
5. F. Treussart, V. Jacques, E. Wu, T. Gacoin, P. Grangier, J.F. Roch, *Photoluminescence of single colour defects in 50nm diamond nanocrystals*. Physica B, 2006. 376(377):p. 926-929.
6. C.C. Fu, H.Y. Lee, K. Chen, T.S. Lim, H.Y. Wu, P.K. Lin, P.K. Wei, P.H. Tsao, H.C. Chang,W. Fann, *Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers*,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2007. 104:p. 727-732.
7. A.M. Schrand, H.J. Huang, C. Carlson, J.J. Schlager, E. Ōsawa, S.M. Hussain, L.M. Dai, *Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic?*. J. Phys. Chem. B, 2007. 111(2) :p. 2-7.
8. K.B. Holt, *Diamond at the nanoscale: applications of diamond nanoparticles*

- from cellular biomarkers to quantum computing*. Phil Trans. R. Soc. A, 2007. 365:p. 2845-2861.
9. R. Pepperkok, A. Squire, S. Geley, P.I. Bastiaens, *Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy*. Current Biology, 1999. 9:p. 269.
  10. M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D.S. Chemla, A.P. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, *Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots*. Opt. Lett. 2001. 26:p. 825-827.
  11. E. D. Eidelman, V. I. Siklitsky, L. V. Sharonova, M. A. Yagovkina, A.Y. Vul, M. Takahashi, M. Inakuma, M. Ozawa, E. Ōsawa, *A stable suspension of single ultrananocrystalline diamond particles*, Diamond and Relat. Mater., 2005. 14:p. 1765-1769.
  12. L. Gou, S. M. Hong, Q. Q. Gou, *Investigation of the process of diamond formation from SiC under high pressure and high temperature*, J. Mater. Sci. 1995. 30:p. 5687-5690.
  13. K.M. C. Fu, C. Santori, P. E. Barclay, R. G. Beausoleil, *Conversion of neutral nitrogen-vacancy centers to negatively charged nitrogen-vacancy centers through selective oxidation*, Appl. Phys. Lett, 2010. 96:p. 121907
  14. 涂誌賢, 鄭嘉良, *奈米導彈-奈米鑽石的生醫應用*, 物理雙月刊, 2010. 32(2):p. 97-104.
  15. Bradley R. Smith, Daniel Gruber, Taras Plakhotnik, *The effects of surface oxidation on luminescence of nano diamonds*. Diamond and Relat. Mater., 2010. 19:p. 314-318.
  16. X. Fang, J. Mao, E.M. Levin, K. Schmidt-Rohr, *Nonaromatic core-shell structure of nanodiamond from solid-state NMR spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc.

2009. 131(4):p 1426-1435.
17. S. Osswald, G. Yushin, V. Mochalin, S.O. Kucheyev, Y. Gogotsi, *Control of  $sp^2/sp^3$  Carbon Ratio and Surface Chemistry of Nanodiamond Powders by Selective Oxidation in Air*. J. Am. Chem. Soc., 2006. 128(35):p 11635-11642.
  18. A. Campion , A.R. Gallo, C.B. Harris, H.J. Robota, P.M. Whitmore, *Electronic-Energy Transfer to Metal-Surfaces - a Test of Classical Image Dipole Theory at Short Distances*. Chem. Phys. Lett., 1980. 73(3):p 447-450.
  19. J. J. Sakon, G. J. Ribeill, J. M. Garguilo, J. Perkins, K. R. Weninger, R. J. Nemanich, *Fluorescence quenching effects of nanocrystalline diamondsurfaces*. Diamond and Relat. Mater., 2009. 18:p 82-87.
  20. 李旭洋, *單顆螢光奈米鑽石:基本光物理性質及生物應用*,國立台灣大學物理研究所碩士論文.
  21. B. R. Smith, D. W. Inglis, B. Sandnes, J. R. Rabeau, A. V. Zvyagin, D. Gruber, C. J. Noble, R. Vogel, E. Ō sawa, T. Plakhotnik, *Five-Nanometer Diamond with Luminescent Nitrogen-Vacancy Defect Centers*. Small, 2009. 5(14):p 1649-1653.
  22. 張文豪,徐子民, *半導體量子光學*.物理雙月刊,2006. 28(5):p 851-856.
  23. A. Beveratos ,B. Rosa, G. Thierry , P.J. Philippe, R. Philippe, *Nonclassical radiation from diamond nanocrystals*. Phys. Rev. A, 2001. 64(6).
  24. K.D. Weston, M. Dyck, P. Tinnefeld, C. Müller, D.P. Herten, M. Sauer, *Measuring the number of independent emitters in single-molecule fluorescence images and trajectories using coincident photons*. Analytical Chemistry, 2002. 74(20): p. 5342-5349
  25. P. Tinnefeld, D. Kenneth, V. Tom, C. Mircea, W. Tanja , H. Johan, M. Klaus, C. Frans, S. De, S. Markus, *Antibunching in the emission of a single tetrachromophoric dendritic system*. Journal of the American Chemical Society,

2002. 124(48): p. 14310-14311.
26. O. Faklaris, D. Garrot, V. Joshi, J.P. Boudou, T. Sauvage, T. Sauvage, P. A. Curmi, F. Treussart, *Comparison of the photoluminescence properties of semiconductor quantum dots and non-blinking diamond nanoparticles. Observation of the diffusion of diamondnanoparticles in living cells*, Journal of the European Optical Society - Rapid Publications, 2009 4(09035).
  27. 洪國川, 共焦拉曼與螢光顯微鏡之發展及其在材料診斷上之應用, 國立中央大學物理研究所碩士論文.
  28. Becker-Hickl GmbH cooperation, *Manual of Time-Correlated Single Photon Counting Modules Multi SPC Software*.