

시간-상관 단일 광자 계수(Time-Correlated Single Photon Counting; TCSPC) 방법은 모드 동기(mode-locked) 레이저와 같은 극초단의 펄스 레이저가 개발되면서 나노초 범위의 시간 분해 레이저 분광법에서 표준 측정 장비로 자리 매김을 하였다<sup>1-3)</sup>. TCSPC에 의한 형광 소멸 곡선의 계측은 형광 세기의 시간적 변화와 단일 광자의 방출 확률 분포가 동일하게 표현된다는데 근거를 두고 있다. 분자가 여기되는 시점과 광자를 방출하는 시점 사이의 시간 간격( $\Delta t$ )을 계측하며,  $\Delta t$ 의 histogram은 형광 광자의 방출 확률 분포 곡선을 나타낸다. 이 곡선을 분석함으로써 분자의 형광 수명 시간, 분자간 에너지 전이, 분자 회전 등 짧은 시간에 발생하는 미시적인 분자 동역학을 연구 규명할 수 있다.

TAC에서 배출되는 상승 전압은 ADC(analogue-to-digital converter)를 거쳐 수치화되며 컴퓨터의 기억 소자인 MCA(multichannel analyzer)에 저장된다.

형광 소멸 곡선은 다음의 과정을 통해 얻어진다. 시료에서 발생된 형광 신호는 PMT에서 전기 신호로 증폭 변환되며 time filter(constant fraction discriminator)를 거쳐 TAC으로 들어간다. TAC에서는 광자들 중 제일 먼저 들어오는 단 한 개의 단일 광자만을 감지하여 전압 상승을 시작한다. 또한, 광 분리기에 의해 분리된 Trigger 신호는 delay, amplifier, time filter(leading edge discriminator)를 거쳐 TAC으로 들어와 전압 상승을 중지시킨다. 형광 신호와 Trigger 신호에 의해 유도된 TAC의 상승 전압은 그것의 크기에 해당하는 지연 시간(delay time)을 가지고 있으며 ADC를 거쳐 수치화되고 컴퓨터

## 특집 ┃ Femtochemistry II

# 시간 상관 단일 광자 계수법

황인욱\*, 안태규\*, 고다미\*, 김동호\*

### 1. 측정 원리 및 기기 구성

본 연구실에 구성된 TCSPC 장치를 그림 1에 나타내었다. 실험 장치에서 레이저 빔의 경로는 크게 두 가지 경로로 나뉘어진다. 하나는 시료를 통과하여 형광을 내고 monochromator, PMT(photomultiplier tube), amplifier, time filter(constant fraction discriminator)를 거친 후 TAC(time-to-amplitude)으로 들어가는 경로이고, 다른 하나는 레이저 광원에서 광 분리된 후 광 다이오드(photodiode), delay, time filter(leading edge discriminator)를 거친 후에 역시 TAC으로 들어가는 경로이다. TAC은 일종의 축전기(capacitor)로써 첫 번째(전기) 신호가 들어오면 내부의 전압이 상승하기 시작하고 두 번째 신호가 들어오면 전압 상승이 중지되며 두 신호의 시간차에 해당하는 상승 전압이 배출되는 장치이다<sup>1)</sup>.

의 MCA에 있는 특정 기억 장소(channel)에 저장된다. MCA에는 TAC에서 감지되는 상승 전압들의 크기에 해당하는 기억 장소로 512(default)개의 channels가 존재하며 단일 광자들이 TAC에서 측정될 때마다 TAC의 상승 전압에 해당하는 MCA의 특정 channel 에 그 값이 입력된다. MCA의 channel에 신호가 저장되는 방식은 광자 한 개당 숫자 1만쯤씩 입력되며 반복 실험마다 그 합이 얻어지는 방식이다. 이러한 방식으로 단일 광자들이 수 십만 번 반복 측정되면 MCA channels에서는 광자들의 시간적인 밀도 분포가 얻어지고 이 분포는 시료의 형광 소멸 곡선이 된다(그림 2).

### 1.1 LED와 CFD

형광 소멸 곡선의 신호 대 잡음 비를 향상시키기 위해

\* 연세대학교 화학과 초고속광물성제어연구단

## 시간 상관 단일 광자 계수법

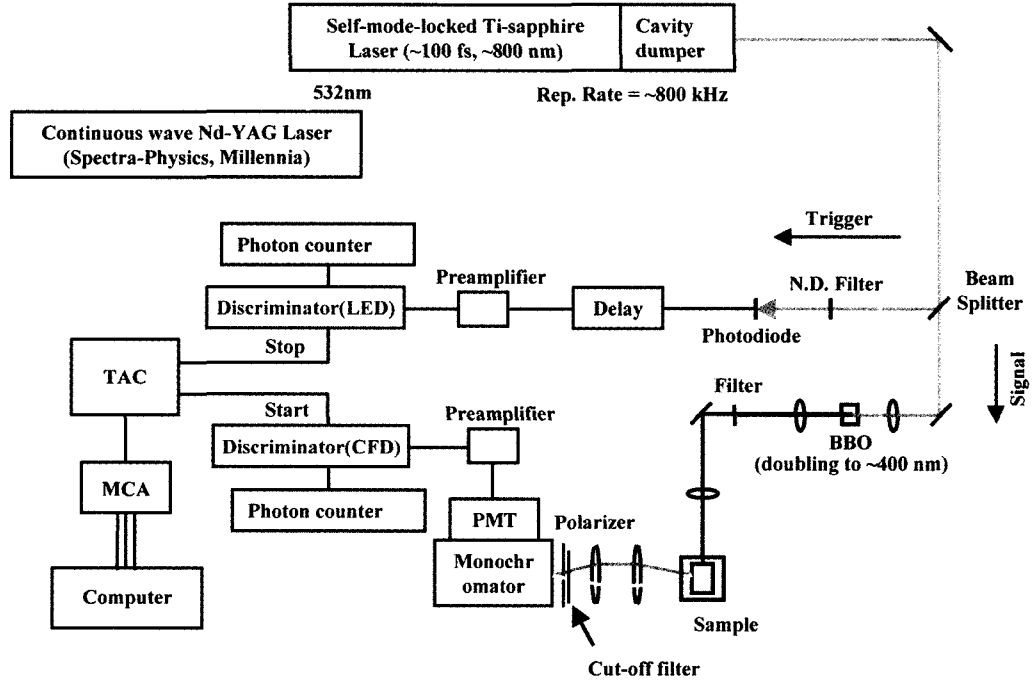


그림 1. 시간-상관 단일 광자 계수 장치

leading edge discriminator(LED)와 constant fraction discriminator(CFD)를 사용한다<sup>[1]</sup>. 이러한 discriminators는 신호 대 잡음 비 뿐만 아니라 특유의 방식을 이용하여 timing errors를 최소화시킨다(그림 3). TCSPC 방식에서 timing error의 주된 원인은 들뜸 펄스의 불안정성(fluctuation)이다. LED 방식에서는 낮은 threshold에서 timing error가 최소화되기 때문에 LED를 포화(saturation) 시키는 것이 유리하다(그림 3(a)). CFD 방식에서는 펄스의 특정 분율을 취하여 기준 시간을 정하기 때문에 펄스의 불안정성에 덜 민감한 장점이 있다(그림 3(b)). 그러나 실제 TCSPC 장치에서는 신호의 세기 때문에 Trigger 신호에서는 LED 방식을, 형광 신호에서는 CFD 방식을 사용한다. 따라서, 장비의 최적화(optimization) 과정에서 Trigger 신호를 포화시키는 것은 필수적이다.

### 1.2 Biased Amplifier와 TCSPC의 시간 분해능

Biased amplifier는 TAC의 시간 분해능을 향상시키기 위해 사용한다. Biased amplifier를 사용하지 않

을 경우 TAC의 시간 분해능은 100 ps 정도이지만 biased amplifier의 gain을 15배로 가할 경우 시간 분해능은 6.67 ps로 향상된다. Biased amplifier는 전압을 증폭하여 출력 전압을 증가시킴으로써 미세한 전압 변화 즉 시간 변화를 측정하게 한다(그림 4). TCSPC의 시간 분해능은 MCA channel의 개수를 512(default)에서 8192로 증가시킬 경우 0.4 피코초 까지 증가시킬 수 있다.

## 2. 결과 처리 및 해석

### 2.1 Convolution과 Deconvolution

레이저 펄스가 무한대로 좁고 검출계의 감응 시간이 무한대로 빠르다면 TCSPC를 사용하여 측정된 지수 함수는 시료의 형광 소멸 곡선과 일치한다. 이러한 경우를 true decay 또는  $\delta$ -pulse response라 하며 기호로는  $G(t)$ 로 나타낸다. 그러나 실제 실험에서는 레이저의 펄스 폭과 검출기의 감응 시간에 의존하여 true decay에서 약간은 일그러진 소멸 곡선이 측정된다. 이러한 일그러



짐을 convolution이란 용어를 사용하여 나타낸다<sup>(1-3)</sup>. 그림 5는 레이저 펄스에 의한 convolution을 나타낸다. 임의의 시간  $t'$ 에서 광원 펄스의 세기를  $E(t')$ 라 하면 시간  $t'$ 에서 들뜬 분자들의 수는  $E(t')$ 에 비례한다.  $t'$  이후의 시간  $x-t'$ 에서 들뜬 분자들의 수를 고려하면 들뜸 펄스의 앞쪽 부분에 의해 들뜸다가 바닥 상태로 전이된 후 다시 들뜨게 되는 분자들과 들뜸 펄스의 뒤쪽 부분에 의해 새롭게 들뜨게 되는 분자들의 합이 되므로  $E(t')G(x-t')$ 에 비례하며 일그러지게 된다. 검출기의 convolution 현상은 주로 PMT의 dinode plates에서 광전자들의 다른 transit lengths or times에 의해 나타난다. 레이저의 펄스 폭과 검출기의 감응 시간을 모두 고려하여 측정되는 (convoluted) 형광 소멸 곡선을 수식으로 나타내면 다음과 같다<sup>(1-3)</sup>.

$$I(t) = \int_0^t P(t')G(t - t')dt' \quad (1)$$

$I(t)$ : Observed decay,

$P(t)$ : Instrument response function,

$G(t)$ : True decay

수식 1에서  $P(t)$ 는 레이저의 펄스 폭 및 검출계의 감응 시간을 반영하는 요소로서 기기 감응 함수(IRF)라는 용어로 정의한다.  $P(t)$ 는 산란 요소(뭉은 커피 크림 또는 Quartz plate)에 레이저 펄스를 조사하여 측정된 광원 펄스의 모양이다. 실제 실험에서는 형광 소멸 곡선  $I(t)$ 와 기기 감응 함수  $P(t)$ 를 측정하고 수식 1의 convolution integral을 풀어 우리가 얻고자 하는 형광 소멸 곡선  $\delta$ -pulse response  $G(t)$ 를 구하게 된다. 이러한 과정을 deconvolution이라 하며 컴퓨터 프로그램을 이용하여 수행된다.

## 2.2 형광 수명 시간과 상대적 형광 세기

실험에서 측정되는 형광 소멸 곡선은 시간에 대한 지수 함수 모양을 그리는데 이것은 형광 현상이 반응 속도론으로 일차 반응에 속하기 때문이다. 얻어진 소멸 곡선은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 지수 함수 수식으로 표현하게 되는데 이러한 과정을 지수 함수 최적화(exponential fitting) 과정이라 한다. 최적화의 결과로써 우리는 두 중

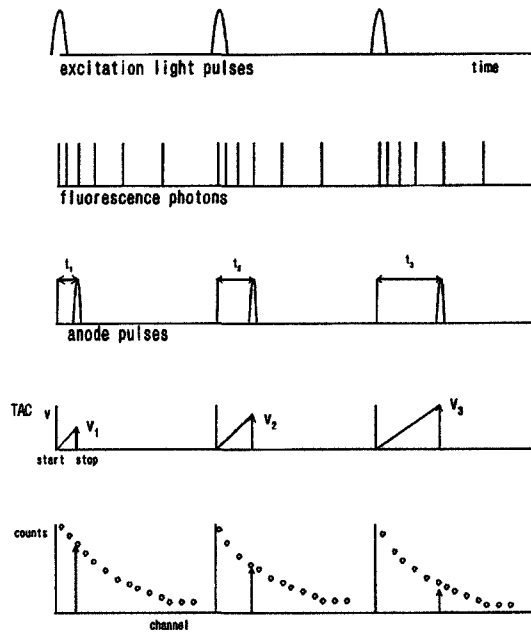


그림 2. 시간-상관 단일 광자 계수의 원리

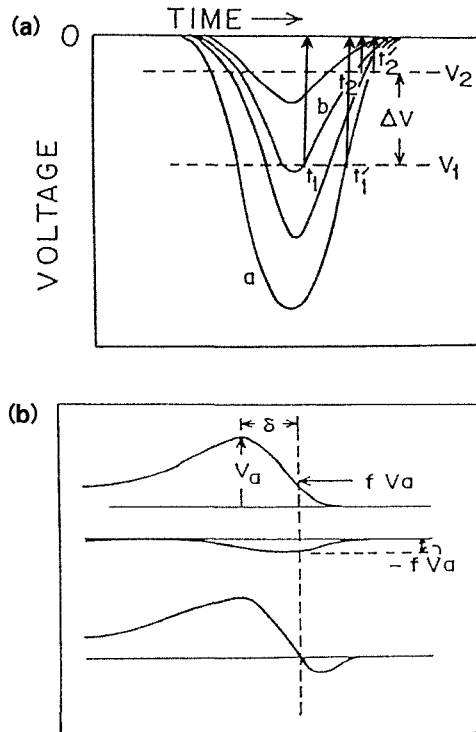


그림 3. (a) Leading Edge Discriminator와 (b) Constant Fraction Discriminator의 원리

## 시간 상관 단일 광자 계수법

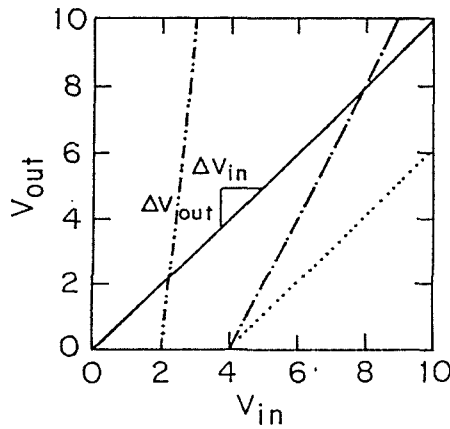


그림 4. Biased Amplification과 TAC의 시간 분해능

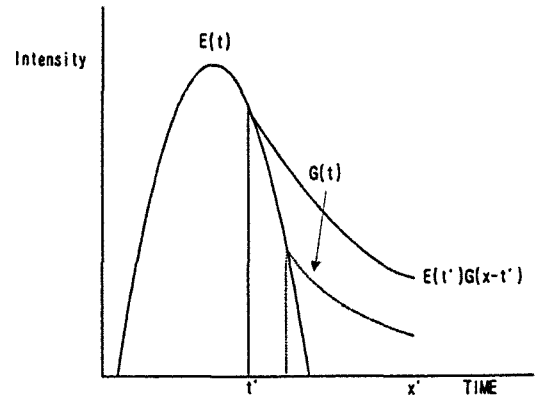


그림 5. 펄스 폭에 의한 Convolution

류의 수치(parameter)를 얻게 된다. 즉, 시료의 형광 수명 시간(fluorescence lifetime)과 상대적인 형광 세기(amplitude)의 값을 얻게 된다. 만약, 시료의 형광 준위가 한 개가 아니고 여러 개인 경우 각 형광 준위에 해당되는 지수 함수들이 합쳐져서 복잡한 소멸 곡선을 그리게 되는데 이러한 곡선은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 일차 지수 함수들의 선형적 합의 형태로 최적화하게 된다. 세 개의 형광 준위가 관여된 경우 지수 함수 수식의 선형적 합은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$G(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_3 \exp(-t/\tau_3) \quad (2)$$

$G(t)$ : 시간에 따른 형광 세기,  $A$ : 상대적 세기,  
 $\tau$ : 형광 수명 시간

이러한 수식으로부터 각 요소의 형광 수명 시간과 상대적인 형광 세기를 수치화한 후 시료의 복잡한 분자 동역학을 규명하게 된다.

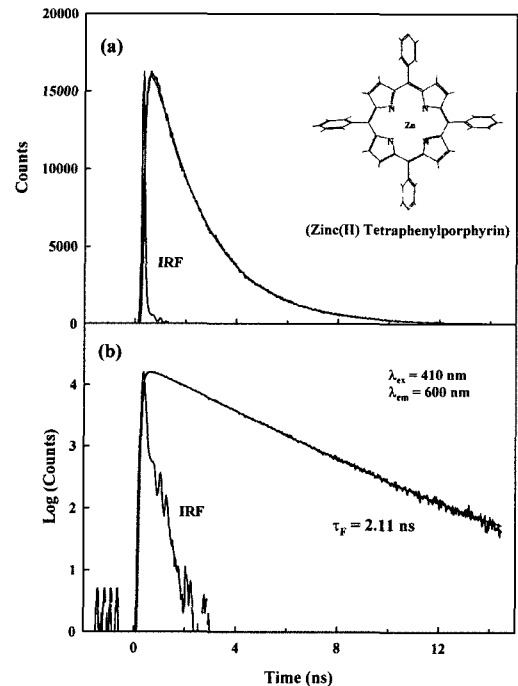


그림 6. (a) Liner 및 (b) Log Scale로 나타난 Zinc(II) Tetraphenylporphyrin의 형광 소멸 곡선 및 기기 감응 함수

### 3. 실험 예(Zinc(II) Tetraphenylporphyrin)

#### 3.1 형광 소멸 곡선

본 연구실의 TCSPC 장비를 이용하여 비교적 형광이 잘 나오는 chlorophyll의 모형 분자인 zinc(II) tetraphenylporphyrin(ZnTPP)의 형광 소멸 곡선을

tetrahydrofuran(THF) 용매에서 측정하였다. 측정 결과로써 형광 소멸 곡선은 지수 함수 소멸 곡선을 나타내었고(그림 6(a)), 이것에 대한 로그 plot 또한 하나의 직선으로 표현되었다(그림 6(b)). 측정된 기기 감응 함수(IRF)를 이용하여 deconvolution 및 지수 함수 최적화한 결과 상은, THF 용매에서 ZnTPP의 형광 수명 시간이 2.11 ns로 얻어졌다. 따라서 이 시간이 ZnTPP 분자의

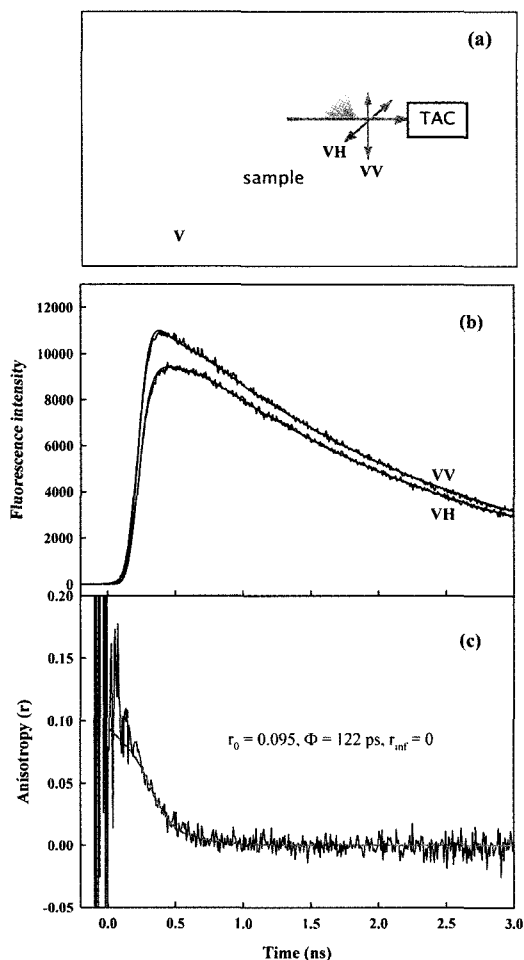


그림 7. (a) 시간 분해 형광 비등방성 측정 장치, (b) 편광된 형광 소멸 곡선, (c) 계산된 시간 분해 형광 비등방성

electronically excited  $S_1$  준위의 수명 시간을 나타낸다. 이러한 측정을 통하여 여러 분자의 전자적 여기 상태의 소멸 시간을 비교적 정확하고 간편하게 측정할 수 있다.

### 3.2 분자 회전 시간

빛의 편광성(polarization) 및 TCSPC 장치의 시간 분해능을 이용하여 분자의 용매 내에서의 diffusional 회전 시간을 측정할 수 있다. 편광된 빛은 특정 방향으로 배열되어 있는 분자들을 들뜨게 하며, 들뜬 분자에서 발생하는 형광 또한 편광성을 유지한다. 형광의 편광성이 변화되는 원인으로는 에너지 전이와 분자 회전을 들 수 있으며, TCSPC로 측정할 수 있는 나노초의 느린 시간 영역

에서는 주로 분자의 회전이 형광의 편광성을 변화시킨다. 형광의 편광성을 정량화시키기 위해 형광 비등방성( $r$ )을 사용한다.

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - GI_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2GI_{VH}(t)} \quad (3)$$

수식 (3)에서 첨자 V 또는 H는 빛의 성분 중 기준 평면에 수직(vertical) 또는 수평(horizontal)인 성분을 나타내며(그림 7(a)), G는 단색화 장치의 편광 감응비를 나타낸다. 그림 7(b)는 ZnTPP의 편광 형광( $I_{VV}$  또는  $I_{VH}$ )을 나타내고 있으며, 그림 7(c)는 그림 7(b)와 수식 (3)에 의해 계산된 시간 분해 형광 비등방성을 나타낸다. Deconvolution 및 지수 함수 최적화 과정을 통해 상온, THF 용매에서 ZnTPP 분자의 diffusional 회전 시간은 122 ps로 얻어졌다. 이와 같은 분자의 diffusional 회전 시간은 분자의 전체적인 모양과 크기와 사용된 용매의 viscosity에 따라 민감하게 변하게 된다. 즉 분자가 커질수록 그리고 용매의 점도가 클수록 분자의 diffusional 회전 시간은 느려지게 된다. 이러한 측정을 통하여 분자의 용매에서의 운동 및 분자의 구조에 대한 정보를 얻을 수 있다.

## 4. TCSPC의 장 단점

TCSPC 장치는 비교적 쉬운 방법을 통해 S/N 비가 높은 데이터를 빨리 측정할 뿐만 아니라, 광원의 안정성에 비교적 덜 의존하며 가격이 저렴하다는 장점이 있다. 반면, 펨토초와 같은 빠른 시간 분해능을 얻을 수 없으며, 원리적으로 반복율(repetition rate)이 높은 레이저 펄스를 요구하는 단점이 있다.

## 참고문헌

- (1) D. V. O' Connor, and D. Phillips "Time-Correlated Single Photon Counting" Academic Press, New York, (1984).
- (2) C. Lewis, W. R. Ware, L. J. Doerny, and T. L. Nemzek *Rev. Sci. Instrum.* **44**, 107 (1973).
- (3) U. P. Wild, A. R. Holzwarth, and H. P. Good *Rev. Sci. Instrum.* **48**, 1621 (1977).

## 시간 상관 단일 광자 계수법

### 약 력



**황인욱**

2002년 - 현재 : 연세대학교 창의사업(초고속광물성제어연구단), 연구원  
2002년 : 연세대학교 화학과, 이학박사  
1997년 : 연세대학교 화학과, 이학석사  
1995년 : 단국대학교 화학과, 이학사



**안태규**

2001년 - 현재 : 연세대학교 창의사업(초고속광물성제어연구단), 연구원  
1995년 - 현재 : 서울대학교 화학부 박사과정  
1995년 : 서울대학교 화학과, 이학석사  
1993년 : 서울대학교 화학과, 이학사



**고다미**

2003년 - 현재 : 연세대학교 화학과, 석사 과정  
2003년 - 현재 : 창의사업 (초고속광물성제어연구단), 연구원  
2003년 : 연세대학교 화학과, 이학사



**김동호**

2000년 - 현재 : 연세대학교 이과대 화학과, 교수  
1997년 - 현재 : 창의사업 (초고속광물성제어연구단), 단장  
1997년 : Washington University, 방문교수  
1986년 - 2000년 : 한국표준과학연구원 분광연구그룹, 그룹리더  
1984-1985년 : Princeton University Postdoctoral Fellow  
1984년 : Washington University, 이학박사  
1980년 : 서울대 자연대 화학과, 이학사