

國立臺灣大學工學院材料科學與工程學研究所

碩士論文

Department of Material Science and Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

以 C_{60}^+ -Ar⁺共濺射與動態二次離子質譜術

平行偵測與定量胜肽分子

Parallel Detection and Quantification of Thin-Film Peptides
with Dynamic-Secondary Ion Mass Spectrometry (D-SIMS)

Excited by C_{60}^+ -Ar⁺ Co-Sputtering

學生：張几人

Chi-Jen Chang

指導教授：薛景中 博士

Advisor : Jing-Jong Shyue, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

論文中文題目：以 C_{60}^+ -Ar⁺共濺射與動態二次離子質譜術平行偵測與定量胜肽分子

論文英文題目：Parallel Detection and Quantification of Thin-Film Peptides with Dynamic-Secondary Ion Mass Spectrometry (D-SIMS) Excited by C_{60}^+ -Ar⁺ Co-Sputtering.

本論文係張凡人(R98527069)在國立臺灣大學材料科學與工程學系、所完成之碩士學位論文，於民國 100 年 7 月 19 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：薛景中 薛景中
(指導教授)

張哲政 張哲政

虞邦英 虞邦英

康佳正 康佳正

系主任、所長 高振宏 高振宏 (簽名)

致謝

本論文首要感謝薛景中教授無私的指導與建議，以及實驗室成員：華揚學長、Myra、薰勻、偉倫、國誌、孟宏、芝潔、小捲、鈞浩和丁丁眾多的協助。此外，也感謝眾位口試委員在論文審查與口試上的指教及建言。感謝求學路上曾幫助我的所有人，謹以本論文作為學生時代的完結。



中文摘要

以簇離子(cluster ions)作為濺射離子源的時間飛行二次離子質譜儀(TOF-SIMS)已被證明是分析生物樣本之頗具發展潛力的一項技術，其中碳簇離子(C_{60}^+)已引起廣大的研究興趣。隨著高質量的分子離子飛濺而出，可在不預先分離或同位素標記情況下同時偵測多種分子。目前多數研究是使用靜態二次離子質譜儀作分析，但其在縱深分佈分析上步驟較為複雜且偵測極限較差，因此本研究主要使用動態二次離子質譜儀分析技術。摻雜勝肽的海藻糖基質試片，被用作檢視平行偵測和定量分析生物性樣品時相關參數的模型。海藻糖基質同時混合不同種類與濃度的勝肽，經由實驗發現，於海藻糖分子中勝肽分子的二次離子訊號相對強度是直接正比於其在基質中的濃度。因此，透過繪製各勝肽存在於海藻糖基質的比例對比於其二次離子的相對強度圖，即可得到各種勝肽相對於基質的校正曲線。實驗證實利用這些曲線，即可達成各勝肽在基質中的平行檢測、識別及定量分析。另外，為了抑制高能量 C_{60}^+ 離子濺射造成並因而限制後續濺射分析的碳沉積，同時使用低能量 Ar^+ 離子共同濺射摻雜勝肽之海藻糖試片。其顯示共同濺射的技術較單獨使用 C_{60}^+ 離子濺射可產生較為穩定的分子離子訊號，依此特性，共同濺射技術更適用於分析厚度較大的樣品。此外實驗亦發現，負責產生分子離子的主要仍為 C_{60}^+ 離子，輔助濺射的 Ar^+ 離子其電流設定並不影響定量分析中校正曲線數值。

關鍵字：表面分析、動態二次離子質譜儀、 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射、縱深分佈分析、生物偵測

Abstract

Using pulsed primary cluster ions, especially for C_{60}^+ cluster ion, time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) has been shown to be a promising technique for analyzing biological specimens. With molecular secondary ions of high mass, multiple molecules can be identified at the same time without prior separation or isotope labeling. While current reports are based on static-SIMS that makes depth profile more complicated, a dynamic-SIMS based technique is reported in this work. Mixed trehalose and peptides were used as a model for evaluating the parameters that lead to parallel detection and quantification of biomaterials. Trehalose is mixed with different peptides separately with varied concentrations of peptides. It is found that the normalized secondary ion intensity of peptide as respect to trehalose is direct proportional to its concentration in the matrix. Therefore, by plotting the percentages of peptides exist in trehalose versus their normalized SIMS intensities, calibration curves of each peptide are obtained. Using these curves, it is shown that parallel detection, identification, and quantification of multiple peptides in the matrix can be achieved. To suppress the associated carbon deposition with high energy C_{60}^+ bombardment that leads to suppressed ion intensity in prolonged profiling, a low energy Ar^+ is used to co-sputter the peptide-doped trehalose thin film. It is shown that the co-sputtering technique yields more steady molecular ion intensity than single C_{60}^+ beam. In other words, the co-sputtering is more suitable for analyzing thick specimens. Furthermore, because the C_{60}^+ is responsible for generating the molecular ions, it is found that the does of the auxiliary Ar^+ does not change calibration curve for quantification.

Keywords: surface analysis, dynamic-SIMS, C_{60}^+ - Ar^+ co-sputter, depth-profile, biological detection

目錄

口試委員會審定書.....	I
致謝.....	II
中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
圖目錄.....	VII
表目錄.....	X
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
2.1 質譜儀於解析生物及有機分子之應用.....	3
2.2 二次離子質譜儀於解析生物及有機分子之議題.....	7
2.2.1 簇離子與多原子離子應用於二次離子質譜儀的演進.....	9
2.2.2 簇離子與多原子離子濺射機制.....	10
2.3 C_{60}^+ 離子濺射源於二次離子質譜儀的應用	12
2.3.1 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 二次離子產率提高.....	12
2.3.2 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 損傷機率低.....	13
2.3.3 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 有利縱深分佈分析.....	13
2.3.4 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 有助於影像建立.....	15
2.4 C_{60}^+ 離子濺射中以基質(matrix)協助之分析物縱深分佈分析	19
2.5 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源之應用.....	20
2.5.1 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源濺射機制.....	20
2.5.2 Ar^+ 輔助濺射離子源之控制.....	21
2.5.3 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源成效與特性 — 縱深分佈分析.....	22
2.5.4 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源成效與特性 — 協助影像建立.....	23
第三章 實驗.....	26
3.1 藥品與基材.....	26
3.2 實驗儀器簡介.....	27
3.2.1 二次離子質譜儀.....	27
3.2.2 橢圓儀.....	31
3.2.3 X光光電子光譜術.....	33
3.3 實驗步驟.....	35
3.3.1 試片清洗與製備.....	35
3.3.1.1 試片製備—塊材.....	35
3.3.1.2 試片製備—薄膜.....	35
3.3.2 薄膜厚度量測.....	36
3.3.3 SIMS 量測.....	36
3.3.4 XPS 量測.....	37

第四章 實驗結果與討論.....	38
4.1 海藻糖及各勝肽之定性分析.....	38
4.1.1 以 Ar^+ 離子源單獨濺射.....	38
4.1.2 以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射.....	38
4.1.3 以 $\text{C}_{60}^+ - \text{Ar}^+$ 離子源共同濺射.....	41
4.2 用於定量之分子量訊號穩定性.....	52
4.3 濺射離子源對訊號穩定性之比較.....	54
4.3.1 $\text{C}_{60}^+ - \text{Ar}^+$ 離子源共同濺射與單獨以 C_{60}^+ 離子源濺射對塊材訊號 穩定性的比較.....	54
4.3.2 Ar^+ 離子源之電流對訊號穩定度的影響.....	55
4.4 海藻糖及各類勝肽之塊材定量分析.....	57
4.4.1 勝肽摻雜之海藻糖塊材定量分析測試.....	58
4.4.2 Ar^+ 輔助濺射離子源於共同濺射時的角色定位.....	60
4.4.3 Ar^+ 離子源於濺射塊材時對定量分析穩定性的影響.....	61
4.5 勝肽-海藻糖薄膜的測定.....	62
4.5.1 使用掃描閘道(raster gating)對薄膜縱深分佈分析的影響	62
4.5.2 $\text{C}_{60}^+ - \text{Ar}^+$ 離子源共同濺射與單獨以 C_{60}^+ 離子源濺射對薄膜訊號 穩定性的比較.....	64
4.5.3 薄膜組成元素分析.....	68
4.5.4 薄膜厚度與濺射速率測定.....	69
4.5.5 Ar^+ 離子源於濺射薄膜時對定量分析穩定性的影響.....	70
4.5.6 勝肽摻雜之海藻糖薄膜定量分析測試.....	71
第五章 結論.....	73
參考文獻.....	75

圖 目 錄

圖2.1 FD游離機制示意圖

圖2.2 ESI游離機制及裝置示意圖

圖2.3 Ag{111}表面承受15 keV之C₆₀與Ga離子源濺射各階段之截面動態模擬圖

圖2.4 星細胞(astrocyte)於海藻糖/甘油基質中之正離子SIMS影像圖

圖2.5 卵母細胞於分子量540~650範圍內特徵分子的三維空間分佈影像

圖2.6 XPS收集之OLED元件元素縱深分佈分析圖

圖2.7 PVK與FIRpic在不同條件下於FMM影像中明暗對比示意圖

圖2.8 PET於不同濺射條件下之表面形貌圖

圖3.1 SIMS架構圖

圖3.2 時間飛行質量分析儀示意圖

圖3.3 磁場偏折質量分析儀示意圖

圖3.4 四極質量分析儀示意圖

圖3.5 橢圓儀結構示意圖

圖3.6 p、s偏極光示意圖

圖3.7 離子源、X光光源與分析儀配置圖

圖4.1 Ar⁺離子於各條件下濺射1 mol%胜肽-海藻糖塊材之質譜

圖4.2 以C₆₀⁺離子源濺射1 mol%胜肽-海藻糖塊材所得 (a)正離子質譜 (b)負離子質譜

圖4.3 以C₆₀⁺-Ar⁺離子源共同濺射海藻糖塊材之(a)正離子質譜 (b)負離子質譜

圖4.4 海藻糖分子結構式(左)及其他分子破片(右)

圖4.5 以C₆₀⁺-Ar⁺離子源共同濺射1 mol% Peptide P-海藻糖塊材(a)正離子質譜 (b)負離子質譜

圖4.6 Peptide P分子結構式

圖4.7 以C₆₀⁺-Ar⁺離子源共同濺射1 mol% Peptide G-海藻糖塊材(a)正離子質譜

(b)負離子質譜

圖 4.8 Peptide G 分子結構式

圖 4.9 以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射 1 mol% Peptide L-海藻糖塊材(a)正離子質譜

(b)負離子質譜

圖 4.10 Peptide L 分子結構式(左)及其他分子破片(右)

圖 4.11 以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射 1 mol%胜肽-海藻糖塊材(a)正離子質譜 (b)

負離子質譜

圖 4.12 以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射下各分子量訊號於 30 分鐘內隨時間變化趨勢圖

(a)海藻糖 (b)Peptide P (c)Peptide G (d)Peptide L 之分子訊號

圖 4.13 以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射下各分子量訊號於 30 分鐘內隨時間變化趨勢

圖(a)海藻糖 (b)Peptide P (c)Peptide G (d)Peptide L 之分子訊號

圖 4.14 濺射 1 mol%胜肽-海藻糖所得各分子量訊號於 2 小時內隨時間變化趨勢

圖(a)以 C_{60}^+ -0.2 kV, 300 nA 之 Ar^+ 離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

圖 4.15 各分子量訊號於 2 小時內衰減幅度變化圖(a)以 C_{60}^+ -0.2 kV, 300 nA 之 Ar^+ 離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

圖 4.16 C_{60}^+ 離子源輔以各電流之 Ar^+ 離子源濺射 1 mol%胜肽-海藻糖所得訊號於 2 小時內隨時間變化趨勢圖

圖 4.17 0.01~2.5 mol%之各類胜肽-海藻糖的校正曲線圖(a)Peptide P (b)Peptide G (c)Peptide L

圖 4.18 1 mol%及 0.1 mol%胜肽-海藻糖塊材之測試樣品所得訊號強度比值與 (a)Peptide P (b)Peptide G (c)Peptide L 之校正曲線的比較圖

圖 4.19 各離子源濺射 1 mol%的胜肽-海藻糖塊材得各胜肽相對於海藻糖的訊號強度比值變化圖

圖 4.20 濟射 1 mol%胜肽-海藻糖塊材 2 小時內所得各胜肽相對於海藻糖之訊號強度比值趨勢圖(a)以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

圖 4.21 84 nm 之 0.5 mol%胜肽-海藻糖薄膜之縱深分佈分析圖(a)使用掃描閘道
(b)未使用掃描閘道

圖 4.22 504 nm 之 0.1 mol%胜肽-海藻糖薄膜之縱深分佈分析圖(a)使用掃描閘道
(b)未使用掃描閘道

圖 4.23 0.5 mol%胜肽-海藻糖之 94 nm 薄膜縱深分佈分析圖(經標準化處理)
(a)以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

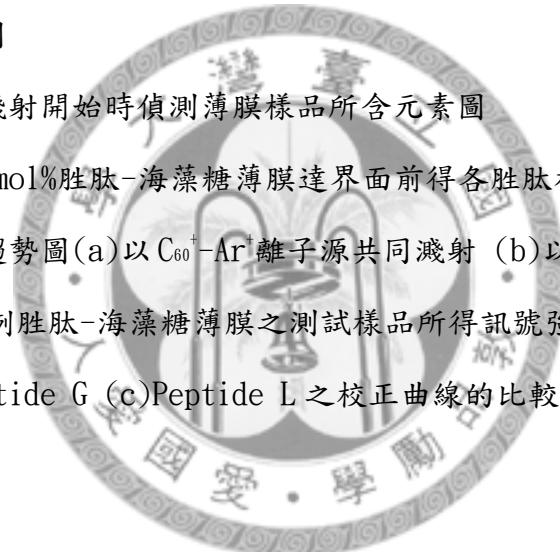
圖 4.24 0.1 mol%胜肽-海藻糖之 460 nm 薄膜縱深分佈分析圖(經標準化處理)
(a)以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

圖 4.25 以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射，0.5 mol%胜肽-海藻糖之 94 nm 薄膜深度分佈分析原圖

圖 4.26 以 XPS 於濺射開始時偵測薄膜樣品所含元素圖

圖 4.27 濺射 0.5 mol%胜肽-海藻糖薄膜達界面前得各胜肽相對於海藻糖之訊號強度比值趨勢圖(a)以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

圖 4.28 各濃度比例胜肽-海藻糖薄膜之測試樣品所得訊號強度比值(a)Peptide P (b)Peptide G (c)Peptide L 之校正曲線的比較圖



表目錄

表 2.1 10 keV 之各簇離子濺射源之濺射特性

表2.2 濺射薄膜(PEDOT:PSS)時以10 kV，10 nA的C₆₀⁺離子搭配各組電流電壓的Ar⁺離子源

表 4.1 0.01~2.5 mol%之各胜肽-海藻糖的校正點及其標準差(S. D.)

表 4.2 實驗所得各薄膜厚度及濺射速率一覽表



第一章 緒論

在各種表面分析技術中，二次離子質譜儀 (secondary ion mass spectrometry, SIMS) 以極高的偵測靈敏度為優勢而佔有一席之地。SIMS 可協助解析各類材料，不論是無機材料中的金屬或是有機聚合物材料，皆可利用 SIMS 進行表面分析。近年來，生物科技蓬勃發展，眾多研究團隊皆期望能以 SIMS 具備的特點進行生物性分子的偵測與分析並擴展其應用範疇。

但 SIMS 於解析生物性分子時有一極大的缺點，大部分生物性分子皆為高分子量物質，但傳統的 SIMS 對於高分子量的分子之二次離子產率極低，主要是由於傳統上使用原子型離子濺射源，其濺射至分析物表面後穿透深度過深，使得分散給表面層的濺射能量過少，能飛濺出而被偵測到的二次離子亦減少，另外也易造成次表面層分子化學結構的損傷，影響後續分析。

因此，提升 SIMS 中二次離子的產率便成為分析生物性樣品時的當務之急，尤其是在促進高分子量之二次離子方面，更是決定能否成功分析的關鍵要素。在一般質譜儀分析中有許多方法可用來使分析物游離化，並收集游離化的分子進行質量分析。其中以基質協助之雷射脫附與游離 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 為最被廣泛使用的技術之一 [1, 2, 3]，其利用易游離且易吸光的酸性基質於雷射照射下提供電荷給分析物分子，使分析物亦隨之產生游離反應；尤其因 MALDI 在高分子量之離子產率頗高，於分析有機大分子時相當成功與適用。此相似的概念亦可應用於 SIMS 中，可促使生物性分析物分子游離數目增加，二次離子產率亦隨之提高。但 MALDI 的基質選擇限制較多，也形成額外的材料耗費，且酸性的基質亦有造成分析物表面汙染的可能性。此外，因分析物表面吸收光並游離的區域過大，進而抑制其解析度，因此 MALDI 技術並不適用於空間解析度在次微米等級的表面分析。

除了 MALDI 外亦有其他技術逐漸發展，以期望能增進質譜儀中分析物游離化

或提升其離子產率。而在SIMS當中最為有效的辦法為使用多原子分子的離子或簇離子(cluster ion)作為濺射離子源，與傳統的原子型離子相比，簇離子在承受相同的轟擊能量下撞擊分析物表面後即破裂成多個原子，能量平均分散，分配能量較小的原子穿透深度淺，可停留在表面而使表面飛濺出的二次離子增多，尤其對於高分子量分子提升效果更為明顯，亦不易造成次表面層的結構損傷，因此簇離子濺射源於SIMS分析中相當具有發展潛力。

簇離子濺射源的發展從早期的 $SF_6^{-/0}$ 與 ReO_4^- 等離子源[4]，陸續有其他簇離子源被應用於SIMS中，如： SF_5^+ 、 Bi_n^+ 、 Au_n^+ 及 C_{60}^+ [5, 6, 7]等。其中， C_{60}^+ 離子具有濺射速率高於損傷累積速率的特性，使得其在分析物縱深分佈分析的應用中最具成效。但 C_{60}^+ 離子在縱深分佈分析中最大的缺失在於其濺射的同時亦會沉積碳，當濺射速率與碳沉積速率達成平衡時，即無法繼續濺射分析。

為解決 C_{60}^+ 離子濺射時碳沉積的問題，近年來本實驗室薛景中教授及其他成員致力於發展新的濺射源系統，即 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源[8, 9]，利用低能量的 Ar^+ 離子協助濺射來降低 C_{60}^+ 離子碳沉積的效應；共同濺射之 Ar^+ 離子可抑制並逐漸清除 C_{60}^+ 離子形成的碳沉積，因此可快達成穩定的濺射狀態及速率，是進行縱深分佈分析時十分有利的要素。 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射的效果不論是在無機物質或是有機聚合物中皆獲得應證。過去，本實驗室大多以X光光電子光譜術(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)觀察濺射殘留的分析物，分析其受 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射的影響。而最近亦開始使用二次離子質譜儀，針對受 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射而飛濺出的分子離子進行研究，期盼能拓展 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源的應用領域。

本研究使用二次離子質譜儀偵測醣類基質中多種胜肽分子，藉由質量分析進行定性研究，且由各胜肽二次離子訊號強度對醣類基質的比值製出校正曲線，以平行偵測進行定量分析。另一方面，著眼於上述特性而選用 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源，並搭配使用動態二次離子質譜儀進行縱深分佈分析，並與單獨使用 C_{60}^+ 離子濺射作為比較，檢測 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射進行生物樣品分析時是否依然具有優勢。

第二章 文獻回顧

2.1 質譜儀於解析生物及有機分子之應用

分子量的量測是欲解析生物分子結構或辨識生物分子之基本方法之一，而欲得知分子量的最直接方式，即利用質譜儀進行測量。

傳統質譜儀的量測是先使分析物中部分中性分子揮發後，再利用電子衝擊或化學游離使之游離化的技術進行測量。其大致可分為以下三種方式：

(1) Electron ionization (EI)[10]

以具能量的電子束轟擊氣態的原子或分子，使分析物形成帶正電之陽離子，又以70 eV 加速電壓的電子束對有機分子的游離化效率最高。此技術可產生大量正離子分子破片，其繁複的質譜分析可用於分子種類辨識；但另一方面，在某些案例中發現此技術易形成破斷化(fragmentation)的結果也對分子造成破壞，反而不利於分析物結構與分子量分析。另一限制在於使分析物揮發時，其中某些成分可能發生熱衰退(thermal degradation)，分子結構因而改變。

(2) Field ionization (FI)[11]

在一陽極的尖端施加高電壓(10~20 kV)，使其周圍產生高電場，氣態的分析物擴散進入該高電場區時，藉由量子穿隧機制，陽極的尖端可抽取出分析物的電子，而使分析物發生游離。此技術相較於 EI 而言，不容易產生破碎的小分子離子，游離物質主要以該分子離子或 $[M+H]^+$ 的形式存在。其缺點為偵測靈敏度較差，約較 EI 差十倍以上。

(3) Chemical ionization (CI)[12]

反應器中除了分析物外，另使其充滿其餘試劑(reagent)氣體，常用的氣體如甲烷，先使電子轟擊此氣體而形成氣體正離子，氣體分析物再與該正離子碰撞，藉由質子交換而使分析物游離。氣體分析物與試劑氣體的比值約為 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ ，因此電子大部分皆先與試劑氣體產生碰撞。此技術亦不容易產生破碎的小分子片段，

游離物質主要以 $[M+H]^+$ 與 $[M-H]^+$ 的形式存在。偵測靈敏度較FI為高，甚至可高於EI。

以上三種傳統質譜儀常用技術分析，其樣品須限制為氣態或揮發性高的物質。但在生物樣品測試中最大的問題在於，大部分生物或有機分子的分子量皆很大，且為非揮發性並對熱不穩定的物質，而無法如上述傳統質譜儀量測中先使部份分析物揮發後，再以電學或化學游離化的技術進行測量。因此高分子量的生物或有機分子很難於傳統質譜儀中進行偵測。

近幾十年來，已發展許多技術來克服此限制，例如：

(1) Field desorption (FD)[13]

將分析物置於施加高電壓之強電場的放射器上，藉由放射器內的電流流通而使放射器開始緩慢加熱，最終分析物內低蒸氣壓之物質便可脫附而使之游離化，如圖2.1所示。其優點為不易產生細碎的分子破片，游離物質以 M^+ 或 $[M+H]^+$ 的形式存在。目前已漸被其他游離技術取代，主要用於碳氫化合物之混合物分析，此外也可用於低揮發性的蛋白質分析[14]。

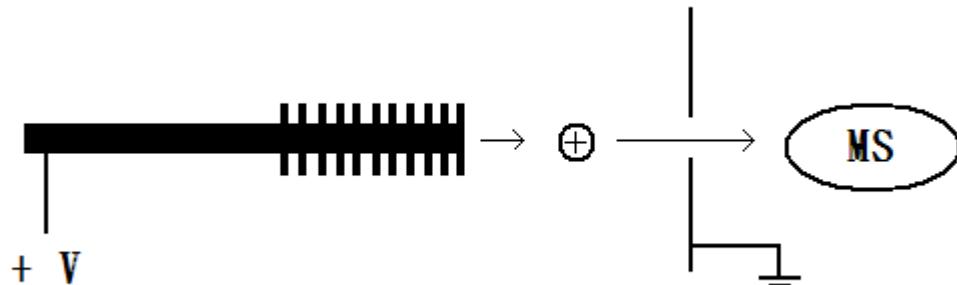


圖2.1 FD游離機制示意圖

(2) Electrospray ionization (ESI)[15]

如圖2.2所示，將含有分析物的溶劑施以電噴霧(electrospray)使之形成氣溶膠(aerosol)，為有利於後續溶劑揮發，溶劑通常為水與揮發性的有機化合物之混合物。將氣溶膠以毛細管送入質譜儀的真空區，毛細管可加熱以協助溶劑揮發至剩餘的液滴變形並釋出帶電荷物質，稱為Coulomb fission，在此分裂中，液滴將損失部分質量及電荷，最終形成氣態的離子。其優點為游離時不易產生細碎的分子破片，游離物質以 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 、 $[M+Na]^+$ 及 $[M+nH]^{n+}$ 等形式存在。其缺點為分析物有可能發生電化學反應，以致在質譜上產生位移。另外，根據蛋白質分析物在ESI中產生的電荷狀態分佈，可得知其於水溶液中的摺疊狀態，緊密摺疊的蛋白質較未折疊者，易呈現低電荷狀態，因此此技術亦可作為蛋白質摺疊結構的分析[16]。

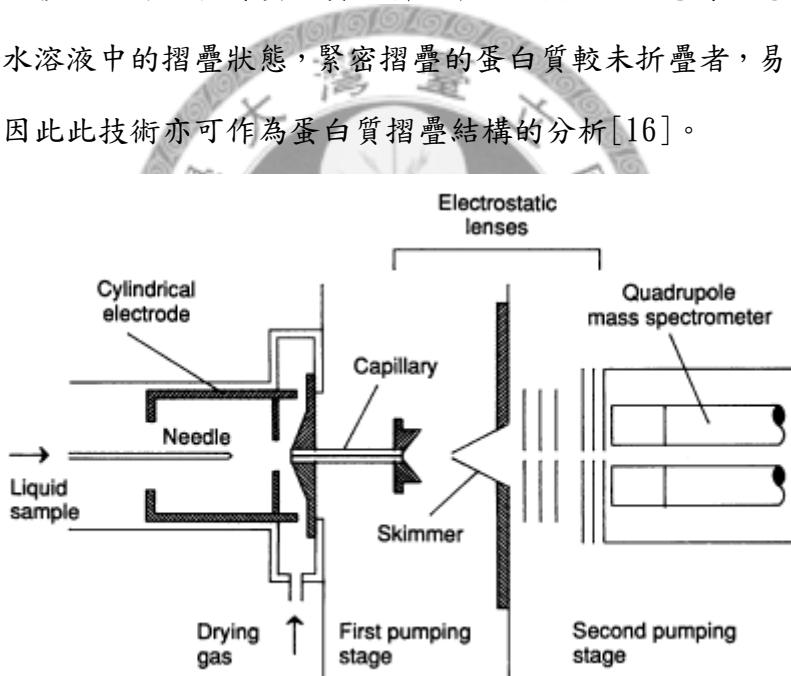


圖2.2 ESI游離機制及裝置示意圖[15]

(3) Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)[2]

分析物先與適當基質(matrix)混合，基質為酸類結晶物與純水及有機溶劑的混合物。基質的選擇通常有幾項特點：如分子量小易揮發、酸性以提供分析物游離時的質子來源、對紅外光與紫外光有強烈吸收度以接收雷射及具有極性官能基以溶於水溶液中。待基質中溶劑揮發後，留下散佈於基質結晶的分

析物，將其以雷射光照射，基質吸收雷射能量先產生游離，而後再將部分電荷轉移至分析物使之亦產生游離化反應，同時基質可保護分析物免受雷射能量的干擾。游離物質以 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 、 $[M+Na]^+$ 及 $[M+nH]^{n+}$ 等形式存在。MALDI 於有機及生物化學分析上用途十分廣泛，持續有研究團隊針對不同的雷射光源波長與基質種類進行開發及改良[17, 18, 19]。

(4) Fast atom bombardment (FAB)[20, 21]

樣品準備及游離機制皆與MALDI相似，但改以高能量的惰性氣體原子束如Ar 及Xe等進行濺射。其濺射使分析物游離時不易產生細碎的分子離子，游離物質大多以 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 等形式存在。此技術可偵測質量達數萬 g/mol的分子，也可獲得分子量約數千 g/mol聚合物分子的詳細結構資訊，十分適用於有機或生物聚合物的分析。

(5) Plasma desorption (PD)[22]

以適當核素，通常為鉢(Cf)的同位素 ^{252}Cf 之核分裂產生的重離子或中性原子作為濺射源使分析物游離[23]。可偵測質量高達數萬 g/mole的蛋白質分子。特別是使用硝化纖維素(nitrocellulose)膜作為樣品吸附支撐物(backing)的實驗中，可獲得更為強化的分子離子產率。持續有研究團隊致力於研究此技術的離子濺射動態機制及離子飛濺過程。

(6) Secondary ion mass spectrometry (SIMS)[24]

以離子束作為濺射源轟擊分析物表面，並收集飛濺出物質中的二次離子進入質譜儀中進行分析。

2.2 二次離子質譜儀於解析生物及有機分子之議題

其中，二次離子質譜儀(Secondary ion mass spectrometry, SIMS)是一種效用高的表面分析工具，與其他質譜儀相比，靈敏度極高，依據儀器種類不同，偵測極限可達每立方公分 10^{12} 至 10^{16} 個原子。根據作為濺射之離子源通量不同，SIMS 可區分為動態(dynamic SIMS, D-SIMS)及靜態(static SIMS, S-SIMS)兩類別：傳統上，動態二次離子質譜儀其濺射離子源通量較高($\sim 10^{14}$ atoms/cm²)，濺射速率快，靈敏度可達 ppm 至 ppb 等級，主要做為縱深分佈分析(depth profile)之用，但也因濺射速率過大，易打斷分子間鍵結，而只能產生元素及小分子片段的離子，使其分析大多侷限於元素偵測；靜態二次離子質譜儀其濺射離子源通量較低(10^{12} ~ 10^{13} atoms/cm²)，濺射速率慢，靈敏度約在 ppm 等級，不易打斷分子間鍵結，因此可同時進行元素及分子的偵測。

但即使使用靜態二次離子質譜儀，其高分子量的二次離子產率仍舊偏低，因此在分析高分子量的生物及有機樣品時，如何提升其高分子量的二次離子產率，完整保留高分子量訊號，以便成功解析該分子，便成為一急需解決的重要課題。

以下為幾種於量測中常見的提高高分子量之二次離子產率的 SIMS 種類：

(1) Matrix-enhanced secondary ion mass spectrometry (ME-SIMS)[25]

樣品準備如同 MALDI-MS，將分析物與適當的基質混合，其結合了與 MALDI 及 FAB 相似之使分析物游離化的技術，以及 SIMS 自身高表面靈敏度的優勢。可偵測高分子量的胜肽、蛋白質及核酸等分子，此外偵測極限也可進一步降低至更小等級，於某些案例中亦發現，與未和基質混合的分析物相較下，其較能偵測出分析物之特徵高分子量離子[26]。

(2) Metal deposition-enhanced secondary ion mass spectrometry

若使分子沾附於銀(Ag)基材表面，在游離化的過程中易形成 $(M+Ag)^+$ 之正電離子，因此可獲得相對較高的分子離子產率[27]。Nygren等人於2002年的一項研究中，將細胞中的生物分子轉移沾附至銀片上，利用銀易與分析物分子形成正離子的特性，成功地以ToF-SIMS將生物分子解析成像[28]。

(3) post-ionization of secondary neutrals

又可分為photoionization與electron-impact ionization兩類。以離子束濺射樣品表面後，飛濺出的物質中，實際帶有電荷的二次離子所佔比例極低(<0.1%)，大部分仍為中性分子。在本技術中，在濺射後的樣品表面以雷射脈衝或電子轟擊使這些中性物質產生游離，使最終進入質量分析儀的二次離子增加，達到提高其產率的目的。其研究主要以雷射脈衝之photoionization為大宗[29]。

(4) cluster or polyatomic ion bombardment

選擇簇離子或多原子離子作為濺射離子源，在相同加速電壓下濺射能量平均分散，且集中於分析物表面，可使表面飛濺出之二次離子產率增加，高分子量之二次離子產率增加的效果也較原子型濺射源更為明顯；此外亦不容易造成次表面層損傷。此部份將於章節2.2.2深入探討。

其中，(1)、(2)種方式在樣品準備上手續較為繁複或材料選擇限制較多，第(3)種方式的缺點則為分析物游離後易形成細碎的小分子片段，不利於大分子之偵測分析。而第(4)種方式因其樣品準備簡易，不易形成小片段分子，因此，開發潛能大，有關此技術的研究也較多。

2.2.1 簇離子與多原子離子應用於二次離子質譜儀的演進

早在1970年代就陸續有實驗研究證明多原子的濺射離子源對於二次離子濺射產率，會隨著整體離子源質量的增加而有非線性的強化作用[30, 31, 32]。

1989年，Blain等人分別以 Cs^+ 及其簇離子 $(\text{CsI})_n\text{Cs}^+$ 、coronene($\text{C}_{24}\text{H}_{12}$)的單體(monomer)及其二聚物(dimer)、phenylalanine($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$)的單體及其二聚物作為三組濺射離子源，分別比較各組內離子單體和二聚物對二次離子產率的影響，發現不論是對於有機物或金屬分析物，以簇離子或二聚物作為濺射離子源，其分析物的二次離子產率均較單體來得高，且不只隨離子源質量而增加，也與離子源的速率的平方成正比，即可推論二次離子產率與濺射離子源的動能成正比。此外，也發現分子的二次離子產率增強效應也較原子明顯[33]。

Kötter及Benninghoven於1997年的研究比較了 Ar^+ 、 Xe^+ 及 SF_5^+ 三組濺射離子源對一系列有機聚合物，如PET、PP、PS及PMMA等分析物之二次離子產率的影響[5]。如同先前的研究顯示，不論分析物是薄膜或塊材(bulk)的形式，使用簇離子 SF_5^+ 對於聚合物分子質量範圍的二次離子產率皆較單離子源有顯著的提升(至多可達千倍)。此外亦發現，相對於如此高的二次離子產率，對於損傷機率(damage cross section)卻僅有小幅度的增加(至多為6倍)。損傷機率(σ)的定義如下：

$$\sigma = N_{\text{des}}/N_0 \quad (2.1)$$

N_{des} ：為受濺射離子源衝擊下，分析物表面分子物質M飛濺離開每單位面積之表面的平均數目

N_0 ：為在原分析物最表層每單位面積(1 cm^2)的總分子數目

此兩項效應於高分子質量範圍更為明顯。由於產率大幅提高，損傷機率卻未隨之成比例增加，因此二次離子產生效率(efficiency, E)亦可有所提升(約5到50倍)，其定義如下：

$$E = Y/\sigma \quad (2.2)$$

Y(yield)：為二次離子產率，定義為收集到之二次離子數對總濺射離子數之比值

σ ：為損傷機率

除了 SF_5^+ 外，各類簇離子濺射源也陸續被應用於SIMS分析中，如原子之簇離子 Au_n^+ 、 Bi_n^+ 及 C_{60}^+ 等。其中多種離子源也被證實具有造成較小損傷機率的特性。

2.2.2 簇離子與多原子離子濺射機制

單原子離子濺射源因入射能量集中，在轟擊過程中自分析物表面進入時，傾向穿透樣品至較深的深度，而僅傳遞小部分濺射能量至樣品表面，因此能飛濺出的分析物二次離子極少，二次離子產率極低。此外，因離子源穿透深度大，次表面層分子受到轟擊擾動，也造成次表面層的化學結構破壞與損傷。

不同於單原子離子，簇離子與多原子離子濺射源，當受轟擊至表面時易破裂形成多個組成原子，每個原子所受轟擊能量等同於總轟擊能量平均分散給各原子，因各原子僅具有相對低的能量，因此穿透深度小，可集中於樣品表面，且因受到多個原子濺射，雖然原子之個別能量低，但因各原子在小區域內發生一連串非線性碰撞，其總和仍可於表面形成高能量密度，因此可飛濺出的分析物二次離子相對較多，二次離子產率也可提高。另一優點為因離子穿透深度小，次表面層幾乎未受濺射影響，仍保留完整分子化學結構資訊，損傷範圍相對減小。

Postawa等人分別以 C_{60} 與Ga兩離子源對 $Ag\{111\}$ 之樣品濺射，並針對濺射各階段的樣品化學結構變化進行模擬，如圖2.3所示[34, 35]。圖中清楚顯現原子型之Ga離子穿透深度大，對次表面層的化學結構擾動十分劇烈；另一方面， C_{60} 簇離子源濺射集中於表面，且濺射速率快，可迅速將損傷層移除，而可使次表面層之化學結構完整保存。

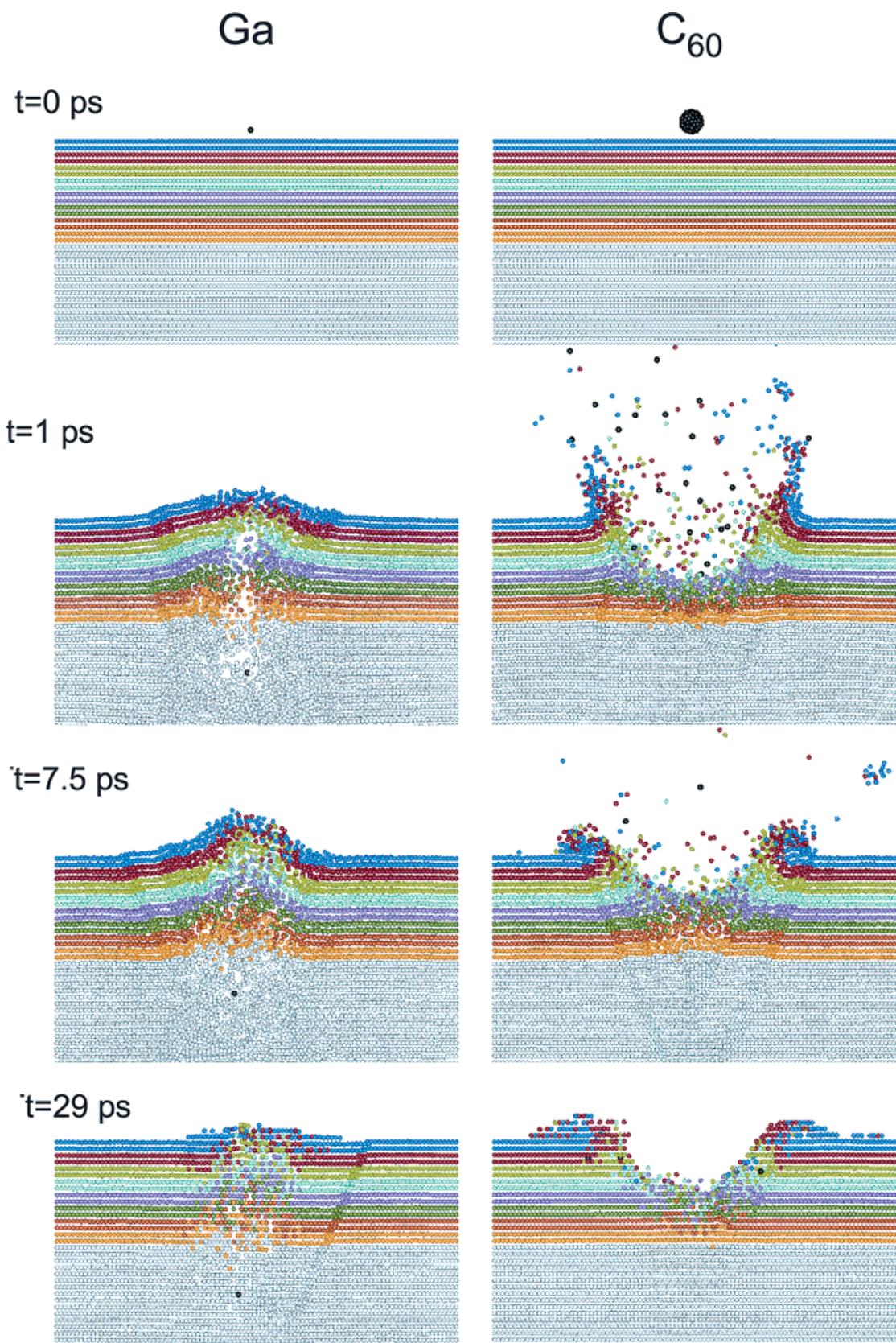


圖2.3 Ag{111}表面承受15 keV之C₆₀與Ga離子源濺射各階段之截面動態模擬圖[34]

2.3 C_{60}^+ 離子濺射源於二次離子質譜儀的應用[36]

自從1985年 C_{60} 分子被Kroto等人[37]發現以來，有愈來愈多針對此分子的特性的研究發表，在本論文中僅討論以 C_{60} 分子作為濺射離子源的相關研究及結果，以下將探討 C_{60} 分子作為SIMS之濺射離子源的特色及優勢。

2.3.1 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 二次離子產率提高

如同章節2.2.2所述， C_{60}^+ 離子與其他簇離子或多原子離子濺射機制相似，當 C_{60}^+ 離子受轟擊接觸分析物表面時即分裂成60個碳原子，每個原子僅具有1/60之原轟擊能量，因此穿透深度淺，且因濺射能量集中於表面，分析物表面飛濺出的二次離子數增多，產率提高。

Van Stipdonk等人於1996年率先發表以 C_{60}^+ 離子與其他SIMS常用的濺射離子源，如 $(CsI)_nCs^+$ 、 Cs^+ 及 Ga^+ 等，分別比較其對於二次離子產率的影響。一如其他簇離子的實驗結果，不論是對無機物(CsI)或有機物(phenylalanine)樣品，在相同濺射能量下 C_{60}^+ 離子可較其餘原子型離子提高5至80倍的二次離子產率[38]。

由Wong等人於2003年以首次裝設於ToF-SIMS的 C_{60}^+ 離子槍相關實驗設定之研究，也為 C_{60}^+ 離子於SIMS濺射離子源之應用奠定基礎[39]。本研究同時比較於大分子之poly(ethyleneterephthalate)(PET)與gramicidin D(一種小胜肽)質譜分析中，分別以 C_{60}^+ 離子與 Ga^+ 離子為濺射離子源對二次離子產率的影響。除了如上所述 C_{60}^+ 離子有較高二次離子產率外，另外還發現其對於高質量分子之二次離子產率強化效果更為明顯。

概括而言， C_{60}^+ 離子大致與其他簇離子在提升二次離子產率方面，尤其是高分子量的生物及有機分子方面，其機制與功效大致類似，只是依據個別樣品及濺射離子源種類不同，提升效果各有差異。

2.3.2 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 損傷機率低

如同章節2.2.2所述，簇離子濺射源因穿透深度淺，不易對次表面層造成損傷，可保留其完整化學結構資訊。

Weibel等人於2003年分別比較一系列有機物質於 C_{60}^+ 離子及 Ga^+ 離子濺射下的損傷機率[40]。以分析物質譜中特有質量訊號消逝程度作為比較損傷機率的基準，發現對於單層原子層的有機物質薄膜而言，兩種離子濺射源造成的損傷機率相差不大；但相對而言，對於厚度較大的多層分析物， C_{60}^+ 離子造成的損傷機率卻可較 Ga^+ 離子小百倍。此研究結果間接證實 C_{60}^+ 離子相對一般單原子離子濺射源，不易破壞分析物次表面層，其濺射損傷主要集中於表面。

Sanada等人於同年以X光光電子光譜術(X-ray photoelectron spectroscopy)對有機物質(如PTTE)受 C_{60}^+ 離子濺射前後的表面進行元素分析，以評估其損傷機率[41]。實驗發現，於5 kV之 C_{60}^+ 離子濺射前後，分析物在XPS光譜中其主要元素的束縛能(Binding energy)之訊號位置與強度幾乎維持不變，僅有少數元素訊號會隨濺射深度增加而下降，顯示 C_{60}^+ 離子濺射僅對分析物造成微量的化學結構損害。

綜觀而言， C_{60}^+ 離子大致與其他簇離子在降低損傷機率方面的機制與功效大致類似，只是依據個別樣品及濺射離子源種類不同，降低效果各有差異。

2.3.3 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 有利縱深分佈分析(Depth profile)

當欲進行縱深分布分析時，濺射離子源的濺射速率與造成的損傷範圍是為兩關鍵要素。離子源濺射造成的分析物損傷區域若未能及時移除，將導致後續濺射而出的二次離子或分子為來自分析物化學結構損傷區域，因而造成後續分析失準，偵測到的二次離子並非真正代表該分析物分子結構，在此種狀況下，分析物的縱深分佈分析將完全錯亂失序。若使離子源的濺射速率與其造成的損傷累積速

率達成平衡或甚至大於其損傷累積速率，即損傷結構形成後可被立即清除，則濺射而出的二次離子將完全來自未被破壞的分析物分子，可順利偵測其真實的結構，後續的縱深分佈分析也將完全符合實際結構分布。

表2.1比較幾種常見的簇離子濺射源的濺射特性。可發現 C_{60}^+ 離子即具備上述特點，其濺射速率大於損傷累積速率，因此損傷形成後即可迅速被移除，可保留真實結構以待後續深度分析；與 Au_{400}^+ 離子相比，雖然 Au_{400}^+ 離子的濺射產率較高，但其濺射速率明顯小於損傷累積速率，而無法有效清除損傷區域，不利於後續縱深分佈分析。由此可知， C_{60}^+ 離子濺射源十分有利於縱深分佈分析，在其應用方面也深具發展潛力。

10 keV	relative yield (Ga=1)	σ_d (cm ²)	range (nm)	removed depth (nm)
SF_5	100	5×10^{-13}	9.8	0.06
Au_3	1000	1×10^{-12}	19	0.3
C_{60}	2000	2×10^{-13}	2.6	3.3
Au_{400}	20000	2×10^{-13}	6.6	3.4

表2.1 10 keV之各簇離子濺射源之濺射特性[42, 43]

以 C_{60}^+ 離子作為SIMS濺射離子源進行分析物之縱深分佈分析時，依據使用的SIMS是為靜態或動態的不同，而有不同的操作方式與偵測特性。

靜態二次離子質譜儀如章節2.2所述，濺射離子源通量低，一般皆小於所謂的靜態極限(static limit)，約為 10^{13} ions/cm²，因此分析範圍只侷限於表面幾

層原子層內，無法進行厚分析物的縱深分佈分析，且亦不易產生高分子量的二次離子。但若使用簇離子為濺射離子源，二次離子產生效率大幅提升，高分子量的二次離子產率亦提高；因其離子源尚未達到動態通量範圍，為促進分析深度提升，大部分的研究是採用雙離子源(dual beam)間隔濺射的方式，即以高通量離子源進行濺射以清除分析物並形成凹槽(crater)，在不同濺射深度以低通量離子源濺射收集二次離子並送進質譜儀進行分析。以此種方式並搭配簇離子濺射源，即可以靜態二次離子質譜儀達成高分子量之生物或有機分析物的縱深分布分析。至今為止，已有多篇以 C_{60}^+ 離子濺射源在靜態二次離子質譜儀中進行有機或無機物質的縱深分佈分析的研究報告發表[44, 45]。

另一方面，動態二次離子質譜儀之濺射離子源通量高，可達 10^{14} ions/cm²，本身即具有清除表面分析物的功能，分析深度可達數十奈米，適用於縱深分佈分析。但傳統的單原子離子濺射源穿透深度深，易破壞次表面層分析物，打斷分子間的原子鍵結，通常僅能產生元素或小分子的二次離子，而不利於大分子的偵測。但若使用簇離子濺射源，尤其是 C_{60}^+ 離子，如上所述，其可促使高分子量的二次產率提高，損傷機率低，濺射速率大於損傷累積速率等特性，皆十分有利於高分子量的生物或有機物質的縱深分佈分析。

但在SIMS中使用 C_{60}^+ 離子作為濺射離子源並進行縱深分佈分析時，不論是在靜態或動態的SIMS，其最大缺失為當使用高通量的 C_{60}^+ 離子於濺射清除分析物的同時，亦會在分析物的表面形成碳沉積[46]，碳沉積會掩蓋欲分析的表面，阻礙後續濺射，若濺射速率與碳沉積速率達成平衡，則原分析物的濺射將會受阻，其縱深分佈分析亦無法達成。

2.3.4 C_{60}^+ 離子濺射源於SIMS中之優勢 — 有助於影像建立

在影像SIMS(image SIMS)的領域中，通常使用液態金屬離子源(liquid metal ion source, LMIS)作為濺射源。過去， Ga^+ 離子源以其較高的空間解析度為優勢，

而被廣泛使用，但如同章節2.2.2中所述，此類原子型濺射源對高分子量物質的二次離子產率過低，因此在成像用之影像SIMS中，為獲得足夠分析樣品之化學特性的離子產率，每像素最小須大於 $1\text{ }\mu\text{m}$ ，此將嚴重限制可達到的空間解析度。為解決此問題，影像SIMS的發展亦走向使用高二次離子產率的簇離子濺射源之途。目前較常使用的有金(Au_n^+)[47]與鉱(Bi_n^+)兩種簇離子濺射源，兩者造成的分析物二次離子產率大致上不相上下，其中鉱簇離子相對於其單原子離子之濺射產率提升效果更為顯著[48]。但這些金屬簇離子濺射源對分析物造成的損傷機率依然遠大於 C_{60}^+ 離子； C_{60}^+ 離子如章節2.3.1及2.3.2所述，同時具備高二次離子產率與低損傷機率的特性，可較原子型及其他簇離子濺射源獲得更多分析物分子之資訊，尤其是在高分子量分子部分。每像素可獲得的訊號強度增加，訊號對雜訊(signal-to-noise)比值有所改善，可偵測低濃度的成分，亦可獲得較清晰的分析物成分分佈影像。另外，相較於傳統濺射離子源只能收集分析物最上層的像素資訊，基於 C_{60}^+ 離子濺射速率高於損傷累積速率，即具有縱深分佈分析能力的特性，可逐層進行分析物的成分影像分析，亦有可能重建生物性分子如組織及細胞的三度空間成分分佈影像，在生物應用上十分具有發展潛力。

ToF-SIMS以較高的徑向解析度、分子量分析範圍與偵測靈敏度，在生物分析上較具優勢，因此在以SIMS建立生物分子影像的研究中，大部分是以ToF-SIMS為主流。目前，以 C_{60}^+ 離子為濺射源的ToF-SIMS在影像上的徑向解析度大多在次微米(10^{-7} m)等級左右。以此解析度，影像之ToF-SIMS可加以應用於傳統以光學顯微鏡為主的研究上，且其可免去生物標記等樣品前處理步驟，為一大優勢。

Parry和Winograd於2005年的研究[49]，以兩種真核的細胞為實驗主體，將細胞置於海藻糖與甘油的基質中，並用以 C_{60}^+ 離子為濺射源的ToF-SIMS，成功地為分析物各特徵分子在二維空間的分佈建立影像，如圖2.4所示。

Fletcher等人於2007年的研究[50]，以卵母細胞為實驗主體，將細胞置於以液態氮冷卻的丙酮中，同樣用以 C_{60}^+ 離子為濺射源的ToF-SIMS，將分析物各特徵

分子之空間分佈成像，甚至更進一步將各深度的影像堆疊，重建其三維空間的特徵分子分佈影像，如圖2.5所示，是第一個使用ToF-SIMS展示生物分子三維影像的成功案例。



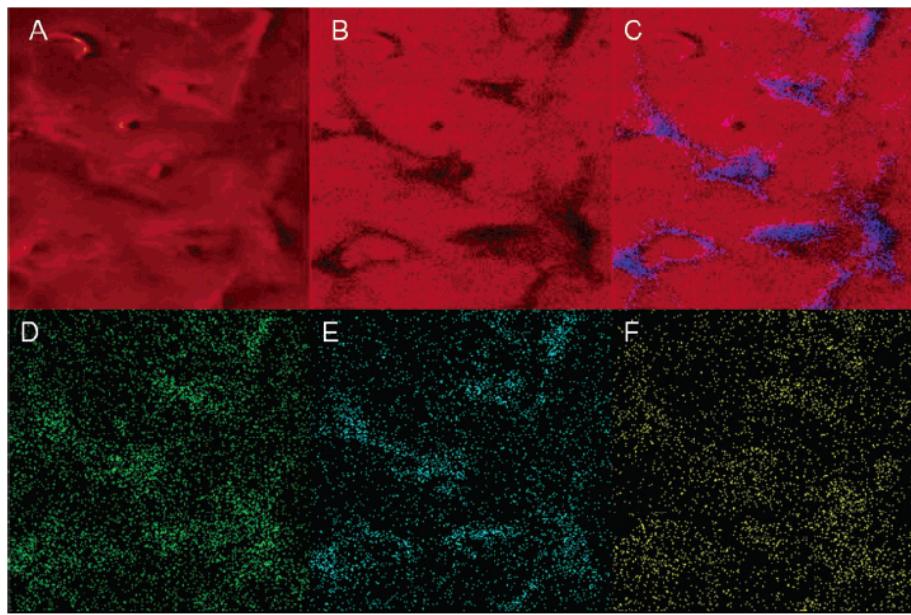


圖2.4 星細胞(astrocyte)於海藻糖/甘油基質中之正離子SIMS影像圖[49]

(256×256 pixels and $615 \mu\text{m}^2$ fov)

A. 全部正離子 B. $\text{Na}^+(\text{m}/\text{Z } 23)$ C. $\text{Na}^+(\text{m}/\text{Z } 23, \text{紅})$ 與 $\text{PC}(\text{m}/\text{Z } 184, \text{藍})$ 重疊

D. PE頭基片段($\text{m}/\text{z } 142, \text{C}_2\text{H}_5\text{NP}_0^+$) E. PE($\text{m}/\text{z } 168$) F. 膽固醇($\text{m}/\text{z } 369, \text{C}_{27}\text{H}_{45}^+$)

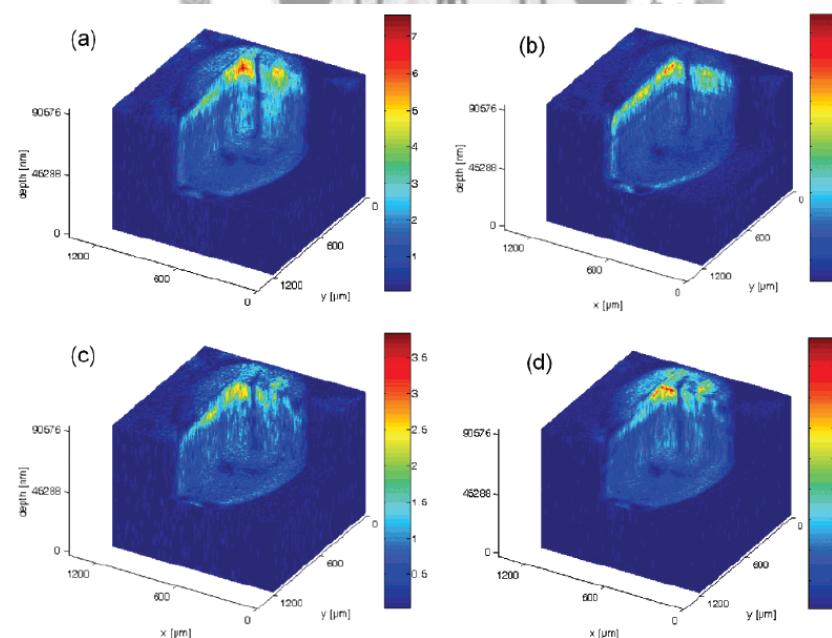


圖2.5 卵母細胞於分子量540~650範圍內特徵分子的三維空間分佈影像[50]

(a)548 (b)574 (c)576 (d)600 amu

(色標為訊號強度標準化之示意圖)

2.4 C_{60}^+ 離子濺射中以基質(matrix)協助之分析物縱深分佈分析

研究發現，將分析物尤其是生物樣品，與水溶液混合後使之結凍，即將分析物包裹於冰層中後再施予濺射，可獲得更真實的分析物分子離子訊號[51, 52]。主要是由於以 C_{60}^+ 離子濺射，對冰層具有較高的濺射產率，當承受濺射時所強加的能量大部分可由冰層基質吸收，造成的損傷也可集中於基質，因此隨著濺射進行，帶有損傷層的高濺射產率基質逐漸被移除，分析物可在持續濺射中維持化學結構穩定，而最終即可收集到分析物原始的結構資訊。

除了水合物外，一些冷凍保護劑(cyroprotectant)，如trehalose，也具有高濺射產率的特性，並可協助混合使生物分析物形成玻璃狀及有助於維持儀器真空穩定性。Cheng等人於2005年的研究即利用 C_{60}^+ 離子對trehalose有高濺射產率的特點，將勝肽(peptide)與trehalose基質混合製成薄膜並進行縱深分佈分析，分子量約達500 amu的勝肽分子訊號在 C_{60}^+ 離子的濺射中可迅速達到穩定狀態，證實trehalose基質在濺射中確實有助於減少生物分析物的損傷，而可維持其化學結構完整性[53]。

以類似機制，甚至可用生物組織為基質，亦可獲得摻雜其中之合成化合物的穩定訊號。Jones等人就以 C_{60}^+ 離子濺射收集參雜於老鼠大腦中藥物的分子離子訊號[45]，此類研究對於偵測生物組織內的藥物反應之應用有相當大的助益。

2.5 C_{60}^+ - Ar^+ 共同濺射離子源之應用

雖然 C_{60}^+ 離子濺射已被證實十分適用於分析生物及有機分析物等軟性物質的化學結構，但如同章節2.3.3最終所述，由於高通量的 C_{60}^+ 離子濺射將在分析物表面形成碳沉積，此外亦有可能發生離子引發之分析物分子交連現象(cross-linking)，將阻擾後續濺射分析，其解析深度亦因此受限。本實驗室研究發現，以對矽晶片上之氧化物濺射為例，隨著矽氧化物愈厚，濺射時間愈長， C_{60}^+ 離子的平均濺射速率也逐步下降，濺射速率無法保持定值，對於厚分析物的縱深分佈分析將十分不利[54]。此外，過高通量的 C_{60}^+ 離子濺射源將會造成分析物化學性質的改變，且亦必須面對碳沉積的問題，因此僅利用提高離子濺射源通量來促使解析深度的提升是十分不智的選擇。本實驗室近年來一直致力於研發新的濺射源系統，即 C_{60}^+ - Ar^+ 共同濺射離子源，利用 Ar^+ 離子的共同濺射來抑制 C_{60}^+ 離子形成碳沉積。

2.5.1 C_{60}^+ - Ar^+ 共同濺射離子源濺射機制

本實驗室薛景中教授將SIMS的質譜儀與裝配 C_{60}^+ 及 Ar^+ 離子源之XPS儀器結合，即可於離子源濺射期間同時收集SIMS中的分析物分子二次離子與XPS中的元素光電子訊號。藉由此套儀器裝置，即可研究共同濺射之 Ar^+ 離子在 C_{60}^+ - Ar^+ 共同濺射中扮演何種角色及其形成的效應為何[55]。

以金屬為分析物並同時收集XPS與SIMS的縱深分佈分析圖，可發現共同濺射確實可降低 C_{60}^+ 離子單獨濺射時之碳沉積效應，主要是由於共同濺射之 Ar^+ 離子可抑制並逐漸清除 C_{60}^+ 離子形成的碳沉積。因此在共同濺射時，可較快達成穩定的濺射狀態，濺射速率可維持定值，因此以長時間濺射進行厚分析物的縱深分佈分析將為可行的。

此外也觀察到共同濺射在某些情形下，其濺射速率及二次離子訊號強度反而較 C_{60}^+ 離子源濺射為弱，有違於一般對於增加濺射離子源通量應提升濺射速率的

認知。為研究此效應，使兩離子源於空間中交錯，可觀察到 C_{60}^+ 離子有破裂的現象，代表兩離子源間確有交互作用。當共同濺射時，雖然碰撞機率小但兩離子源間可互相作用， Ar^+ 離子對 C_{60}^+ 離子形成干擾並使其在到達分析物表面前即分裂為小分子破片，濺射能量較不集中，因而在某些狀況下會造成濺射速率與二次離子強度降低。

因此，適度調節離子源間的電流比值，使其能同時達到抑制碳沉積與降低離子源間的干擾作用以維持濺射效率的功用，才能順利進行分析物的縱深分佈分析。

2.5.2 Ar^+ 輔助濺射離子源之控制

本實驗室於2008年的一篇研究報告，以10 kV, 10 nA的 C_{60}^+ 離子搭配各組電流電壓的 Ar^+ 離子，共同濺射一有機發光二極體(OLED)元件，並以XPS收集其元素之縱深分佈分析圖[56]。表2.2為濺射其中一層有機聚合物薄膜(PEDOT:PSS)時搭配各組 Ar^+ 離子源所收集的數據。

當 Ar^+ 離子電壓超過0.25 kV時，薄膜分析物的化學組成產生改變，代表在濺射過程中已對分析物造成損傷；此外，當固定電流時，低電壓的 Ar^+ 離子可藉由抑制碳沉積而增進濺射速率，但當電壓過高時反而因過度干擾 C_{60}^+ 離子並使其在到達分析物表面前即破裂，因此整體的濺射速率下降。實驗發現當 Ar^+ 離子電壓固定在0.2 kV時，濺射速率可在其電流為300 nA時達到最大值。因此，最終認定0.2 kV, 300 nA的 Ar^+ 離子源為最佳設定值，並以此組 Ar^+ 離子源輔助搭配10 kV, 10 nA的 C_{60}^+ 離子作為共同濺射離子源而應用於此後的研究中。

單獨使用0.2 kV, 300 nA的 Ar^+ 離子源濺射時，分析物化學結構已產生改變，且其濺射相同薄膜所需時間遠大於 C_{60}^+ - Ar^+ 共同濺射，顯示0.2 kV的 Ar^+ 離子的作用深度較淺並會緩慢改變分析物結構。在共同濺射中，低電壓 Ar^+ 離子造成的淺層損傷可輕易地被高濺射速率的 C_{60}^+ 離子移除，整體的濺射速率亦由 C_{60}^+ 離子控制。

Table 1. Sputtering Times and Observed Chemical Compositions of PEDOT:PSS Thin Films Sputtered with a 10 kV, 10 nA C_{60}^+ Ion Beam and Different Doses of Ar^+ Ions

dose of Ar^+	0	0.2 kV, 75 nA	0.1 kV, 300 nA	0.2 kV, 300 nA	0.1 kV, 600 nA	0.2 kV, 600 nA	0.25 kV, 600 nA	0.3 kV, 600 nA	0.5 kV, 600 nA
sputtering time (min)	5.42	4.24	4.87	3.76	4.87	4.29	4.03	4.49	5.56
composition (C/O/S)	67:24:9	67:24:9	67:24:9	67:24:9	67:24:9	67:24:9	70:21:9	72:20:8	78:14:8

表2.2 滅射薄膜(PEDOT:PSS)時以10 kV, 10 nA的 C_{60}^+ 離子搭配各組電流電壓的 Ar^+ 離子源[56]

2.5.3 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同滅射離子源成效與特性 — 縱深分佈分析

同樣以滅射矽氧化物為例，不論分析物厚薄， $C_{60}^+-Ar^+$ 共同滅射離子源皆能維持穩定的滅射速率，相較於 C_{60}^+ 離子滅射源的滅射速率隨分析物厚度增加而逐漸下降，顯示 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同滅射離子源於進行縱深分佈分析時更具發展潛力[56]。

圖2.6顯示分別以 C_{60}^+ 聚離子滅射源與 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同滅射離子源滅射OLED元件時，XPS收集之的元素縱深分佈分析圖。 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同滅射可順利解析元件中各組成層的元素分布，並可於200分鐘內將底層之ITO陽極滅射完畢。另一方面，單獨只用 C_{60}^+ 離子滅射時，於滅射高達300分鐘後甚至都無法將其中的發光層(emission layer, CBP)滅射完畢，代表 C_{60}^+ 離子滅射造成的碳沉積速率已與其滅射速率達成平衡，因而無法持續滅射分析物。

於本實驗室早期的研究中，分別以 C_{60}^+ 離子滅射源與 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同滅射離子源滅射並比較其矽基材上碳沉積的元素分布[8]。實驗發現不論使用 Ar^+ 輔助滅射離子源與否，碳沉積層的元素分布幾乎相同，顯示低電壓之 Ar^+ 離子源主要用途為抑制碳沉積。此外，雖然使用了 Ar^+ 離子源但並無 Ar 沉積於基材表面，表示 C_{60}^+ 離子清除表面的滅射速率高於 Ar 的沉積速率。在後續研究中陸續發現 Ar^+ 離子源亦具有清除碳沉積的作用[55]。

在同篇研究中，在高解析度電子顯微鏡(HRTEM)觀察下，發現使用 C_{60}^+ 離子源滅射所造成的損傷層(damage layer)厚度皆較 Ar^+ 離子源滅射小，其中又以 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同離子滅射所造成的損傷層為最小。

但在原子力顯微鏡(AFM)的觀察中，發現使用上述兩種 C_{60}^+ 離子源滅射皆會造

成表面粗糙度增加，可能會影響分佈分析中之深度解析度，造成界面擴張現象，尤其在緊密排列的無機物質之縱深分佈分析中將成為一限制因子。

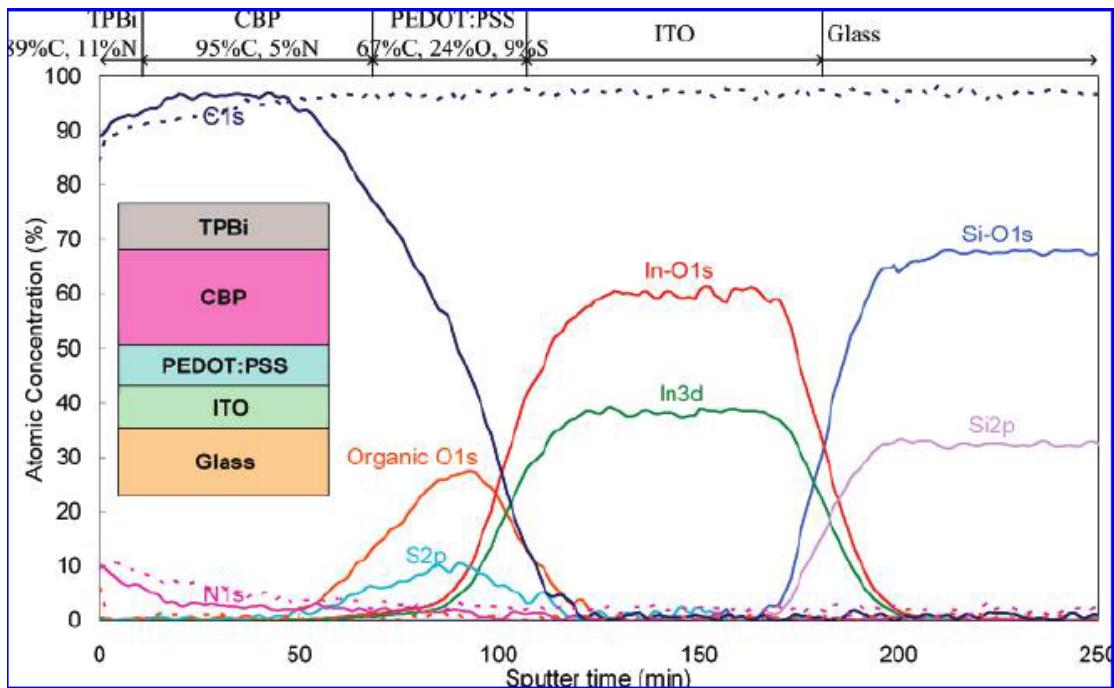


圖2.6 XPS收集之OLED元件元素縱深分佈分析圖[56]

實線： $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射；虛線： C_{60}^+ 離子源單獨濺射

2.5.4 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源成效與特性 — 協助影像建立

$C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射源對於有機物質分析物，因具備損傷機率低與濺射速率高於損傷累積速率的特性，除了在縱深分佈分析的應用上頗具成效外，亦可應用於分析物成分分層影像的建立。

本實驗室於2010年的一項研究[57]，以OLED元件的磷光發光層(PVK為主體，FIrpic為客體)為實驗樣品，利用 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源在分析物表面上濺射形成凹槽，以力調變顯微鏡(force modulation microscopy, FMM)分析凹槽邊緣的奈米結構，利用PVK與FIrpic在彈性系數上的對比，而可顯示兩者在三維空間的分布情形。實驗顯示，濺射後分析物表面會形成一些粒狀結構，因此在FMM影像對比上會較不連續，代表濺射過程已稍微改變了分析物的機械性質。圖2.7顯示

FMM影像在濺射前後的對比變化圖，可發現濺射後由機械性質不同造成的對比程度稍減；因此若原本分析物成分中彼此的機械性質(在此指彈性系數)差異過小，則在濺射後於FMM影像呈現上，因無足夠對比，可能會有部份成分遭到掩蓋，而無法清楚顯示實際的分佈情形。但在本案例中，因PVK及FIRpic兩者彈性系數相差大，因此即使在濺射後，FMM影像的對比依然足夠呈現樣本內成分結構分佈的具體狀況。

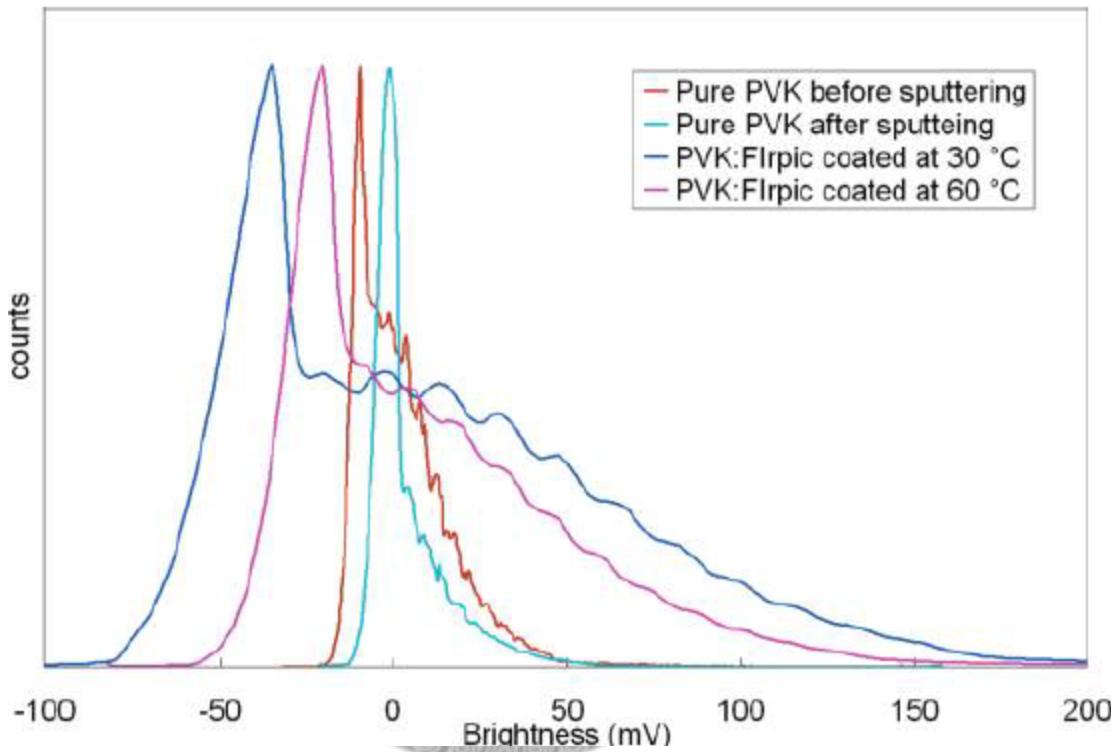


圖2.7 PVK與FIRpic在不同條件下於FMM影像中明暗對比示意圖[57]

如章節2.5.3中所述，在 C_{60}^+ 離子源單獨濺射或 $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射情形下，都會造成分析物表面粗糙度增加。本實驗室另一篇研究[58]，以常見的有機物質PET及PMMA為實驗主體，分別接受上述兩種離子源濺射，發現 $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射造成的表面粗糙度遠較 C_{60}^+ 離子源單獨濺射為小，在PET中， $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射造成的表面粗糙度為11 nm， C_{60}^+ 離子源單獨濺射者為68.8 nm，如圖2.8所示。另外於PMMA中， $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射造成的表面粗糙度為32.6 nm， C_{60}^+ 離子源單獨濺射者為155 nm。

C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射造成的表面粗糙度較小，因此對於解析度的破壞影響也較輕微，在影像呈現上，尤其在三維空間影像重建應用中，亦可避免下層分析物表面出現假結構(fake)或原結構遭到掩蓋，可獲得更清晰真實的成分結構分佈狀態。

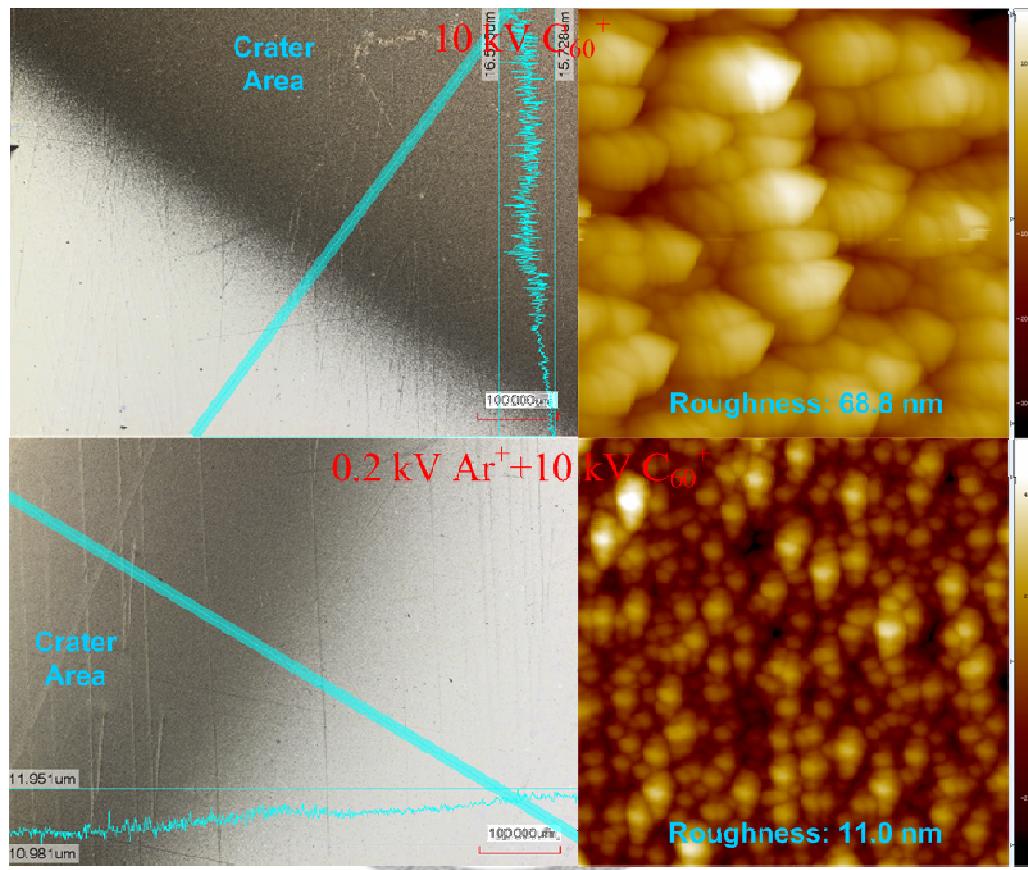


圖2.8 PET於不同濺射條件下之表面形貌圖[58]

第三章 實驗

3.1 藥品與基材

1. D(+)–海藻糖二水合物 (D(+)-Trehalose dihydrate) , SIGMA-ALDRICH
2. 以下為三種胜肽 (peptide)：
 - (1) PGLU-HIS-PRO AMIDE FREE BASE , SIGMA-ALDRICH
 - (2) GLY-GLY-TYR-ARG , SIGMA-ALDRICH
 - (3) LYS-ARG-THR-LEU-ARG-ARG , SIGMA-ALDRICH
3. 乙醇 (Ethanol absolute, C₂H₅OH, >99%) , SIGMA-ALDRICH
4. N型矽晶圓 (N-type silicon wafer , 摻雜物：磷，結晶方位：(100)) ,
金燕



3.2 實驗儀器簡介

3.2.1 二次離子質譜儀(Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)

SIMS 是以離子源濺射樣品，並收集其表面飛濺出分析物分子的二次離子，再以質量分析儀分析樣品的分子量之儀器。

構成 SIMS 儀器裝置主要有四個要素：(1)高真空腔體 (2)濺射離子源 (3)質量分析儀 (4)偵測器，其架構如圖 3.1 所示。以下分別針對各裝置說明。

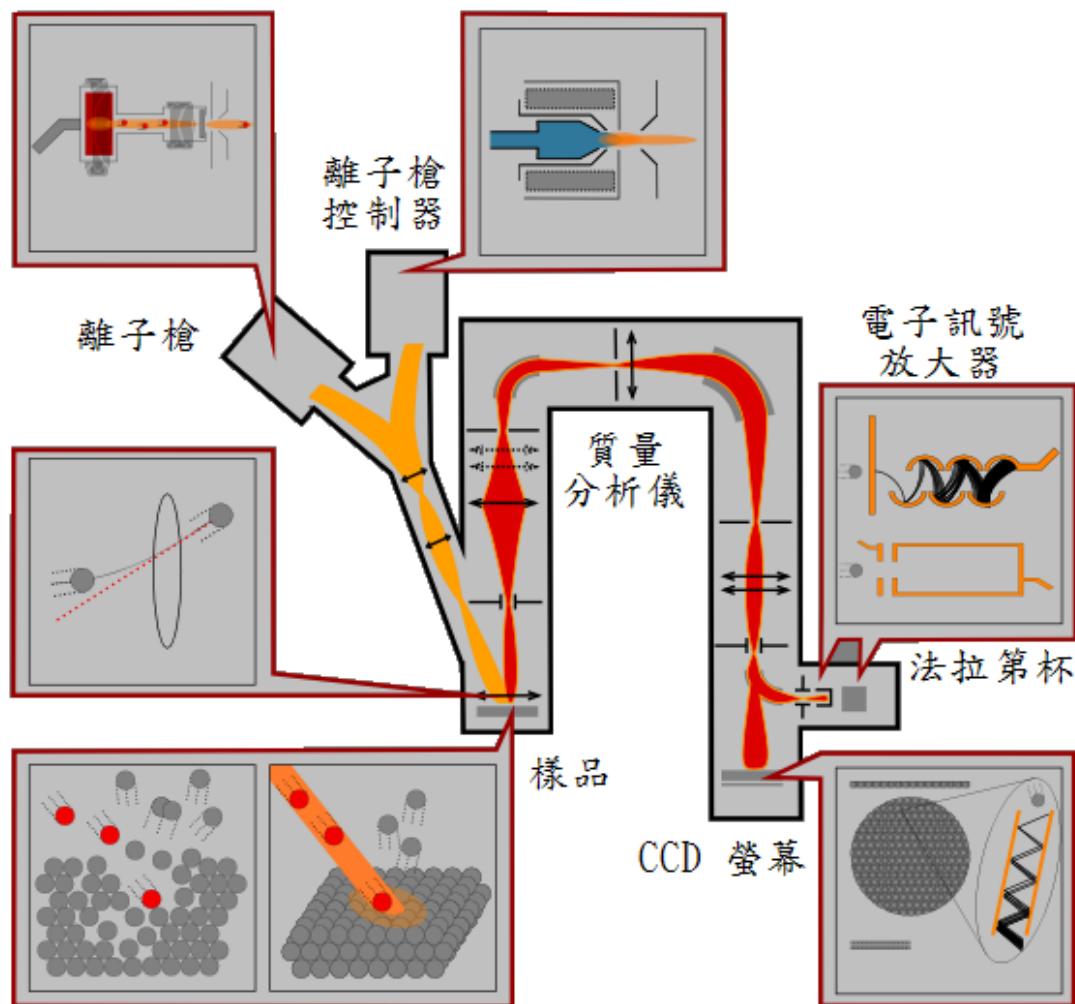


圖 3.1 SIMS 架構圖 [59]

(1)高真空腔體：

SIMS 之內部腔體須保持在 10^{-6} torr 以下的高真空中，甚至可達 10^{-10} torr 之超高真空。主要目的是為防止飛濺出的二次離子在尚未進入偵測器前的路徑中與背景氣體發生碰撞而影響分析與偵測。另外亦可預防背景氣體吸附於分析物表面而造成樣品污染。

(2)濺射離子源：

依照需求與用途不同主要可分為五種：

1. 惰性氣體離子源如： Ar^+ , Ne^+ , Xe^+
2. 反應性氣體： O_2^+
3. 液態金屬離子源如： Ga^+ , In^+
4. 銫離子源： Cs^+
5. 多原子離子源： SF_5^+ , C_{60}^+ , Au_n^+ , Bi_n^+

在本實驗中選用 C_{60}^+ 與 Ar^+ 作為共同濺射離子源。自離子槍發射出的離子束經一系列電磁場作用使其加速、質量過濾及調整後，最後聚焦於樣品表面而展開濺射。

(3)質量分析儀：

依照分析方法與效能不同主要可分為三種：

1. 飛行時間(Time of Flight)質量分析儀

屬於靜態二次離子質譜儀的一種，其裝置如圖 3.2 所示。二次離子被一已知強度的電場加速，各離子皆擁有相同的動能，再測量各離子到達偵測器前飛行一已知距離所需的時間，其所需時間或離子飛行速率是根據其荷質比而有所不同，在相同電荷下較重的離子飛行速率較慢，將加速電能轉化為動能，可推出下式：

$$t = L(m/2zV)^{1/2} \quad (3.1)$$

t 為飛行時間， L 為飛行距離， V 為加速電壓。

根據已知的電場強度與量測而得的飛行時間，即可推算出該二次離子的荷質比與分子量，可同時偵測收集各分子量的二次離子。

2. 磁場偏折(Magnetic Field Deflection)質量分析儀

屬於動態二次離子質譜儀的一種，其裝置如圖 3.3 所示。當二次離子進入質量分析儀的磁場後，行進方向受磁力影響開始產生偏折，較重的離子偏折幅度較小，以磁力等於離心力，可推出下式：

$$m/z = B^2 r^2 / (2V) \quad (3.2)$$

B 為磁場強度，r 為偏折半徑，V 為加速電壓。

只有符合設定荷質比的離子才能通過質量分析儀而到達偵測器。

3. 四極(Quadrupole)質量分析儀

在本實驗中使用四極質量分析儀，屬於動態二次離子質譜儀的一種，其裝置如圖 3.4 所示。其包含四平行金屬棒，相對的金屬棒彼此間以電路連接，於兩對間施以一 RF 電壓，再將一直流電壓疊加至 RF 電壓，藉由調控電壓之間的比值，使特定荷質比(m/z)的離子通過該分析儀並到達偵測器，其餘荷質比的離子將不能維持穩定軌跡與金屬棒發生碰撞而無法進入偵測器。若要掃描偵測一定範圍的荷質比，可由不斷變換施加電壓達成。

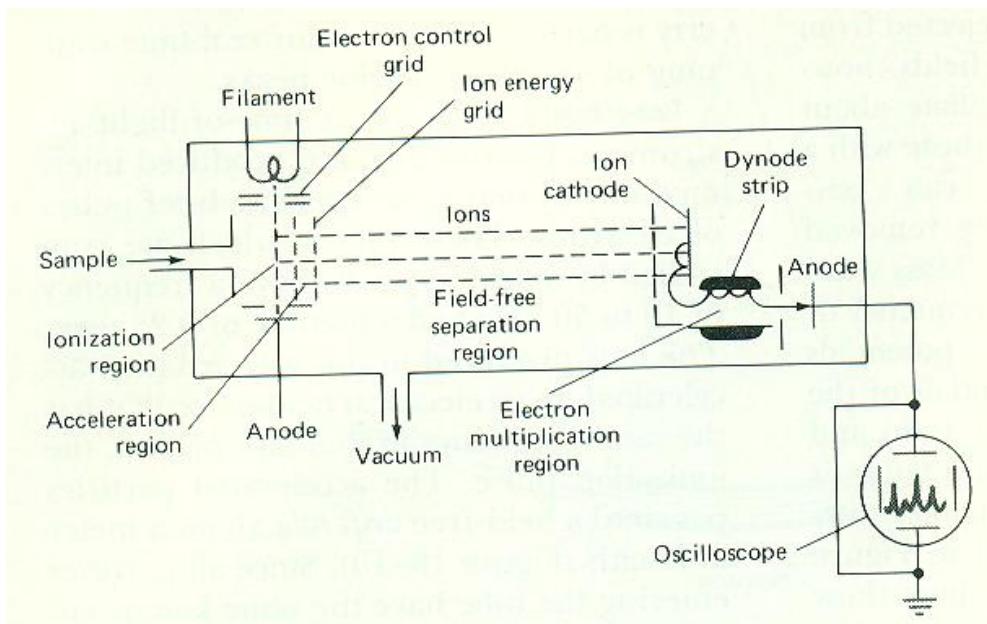


圖 3.2 時間飛行質量分析儀示意圖[60]

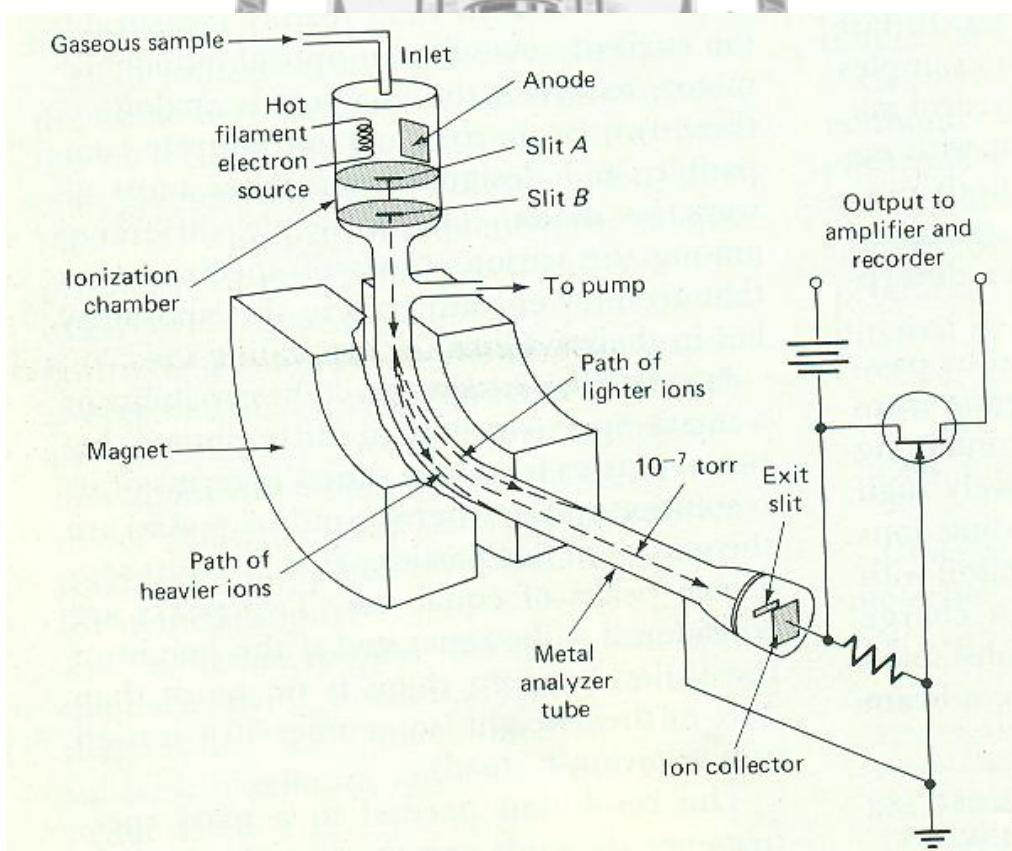


圖 3.3 磁場偏折質量分析儀示意圖[61]

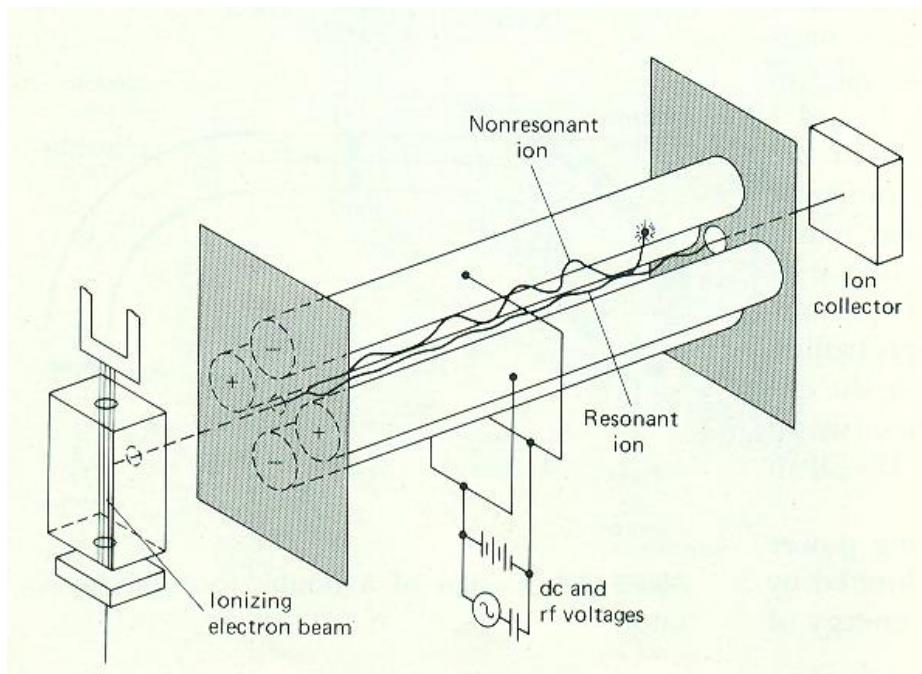


圖 3.4 四極質量分析儀示意圖[62]

(4) 偵測器

以法拉第杯(Faraday cup)量測擊中該金屬杯的電流可做為二次離子的訊號，或以電子訊號放大器(electron multiplier)及微通道板偵測器(microchannel plate detector)放大訊號，並以 CCD、螢光螢幕或量測經放大器放大的電流以記錄。

3.2.2 橢圓儀(Ellipsometry)

橢圓儀是以橢圓偏光為原理設計而成之儀器。橢圓偏光是利用一已知偏振態(polarization state)的偏極光入射至樣品表面，藉由量測入射光與反射光之間的偏振態變化，以反推出樣品的光學特性及薄膜厚度資訊。

其儀器架構如圖 3.5 所示。由光源(light source)發射出的電磁波經偏光片(polarizer)與予偏振態後，經補光片(compensator)到達樣品表面；電磁波經反射後再經補光片、偏光片(或稱析光片，analyzer)到達偵測器(detector)。其中，補光片可由光彈調變器(photoelastic modulator, PEM)所取代，其優點為量測速度增快、誤差小及穩定性高。

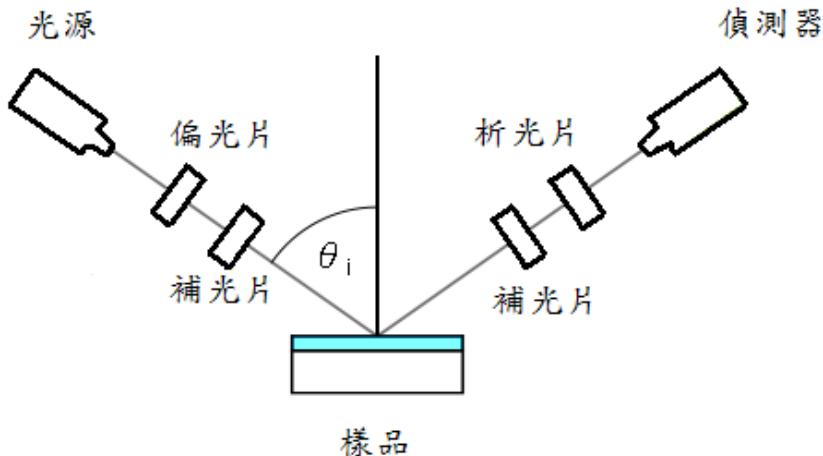


圖 3.5 橢圓儀結構示意圖

當電磁波入射至樣品表面時，其偏振態可分解為兩成分：p 偏極光及 s 偏極光。p 偏極光沿平行入射面方向而震盪；s 偏極光沿垂直入射面並平行樣品表面而震盪，其示意圖如圖 3.6 所示。該 p 及 s 偏極光經反射後並除以原本數值可得 r_p 與 r_s 兩數值。椭圓儀量測電磁波反射比 (reflectance ratio) ρ 的複數形式，即等於 r_p 除以 r_s 的比值。

$$\rho = r_p / r_s = \tan(\Psi) e^{i\Delta} \quad (3.3)$$

$\tan(\Psi)$ 為經反射的振幅比值， $e^{i\Delta}$ 為相位變化 (phase shift)，實驗量測所得的 Ψ 與 Δ 值並不能直接轉換為光學特性值，須先建立一模擬系統，帶入一系列變化的光學性質與薄膜厚度等參數，將模擬出的 Ψ 與 Δ 值與實驗數據比對，最符合的數據其對應的參數亦最接近分析物性質，即可得知分析物的光學性質及薄膜厚度等特性。

椭圓儀的優點為準確度及敏銳度高，可偵測小至幾埃等級的薄膜厚度，可謂是用來偵測薄膜厚度最有力的工具。

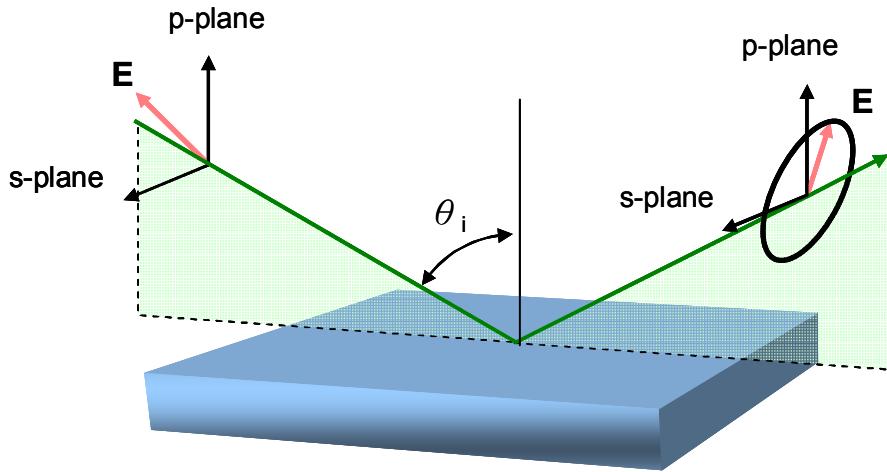


圖 3.6 p、s 偏極光示意圖 [63]

3.2.3 X光光電子光譜術(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)

又稱為化學分析電子光譜(electron spectroscopy for chemical analysis, ESCA)，是一項表面元素分析偵測技術。其使用 X 光為光源，當光入射至樣品表面時，高能量之 X 光轉移能量至表面原子內的內層電子，使其受到激發而脫離原子核束縛並游離。游離之光電子動能與其原子束縛能的關係式如下：

$$E_k = h\nu - E_b - \phi_s \quad (3.4)$$

E_k ：游離光電子之動能

$h\nu$ ：入射 X 光之能量

E_b ：游離光電子之原子束縛能

ϕ_s ：光譜儀本身之功函數

XPS 可偵測游離光電子的動能，加上已知的 X 光能量及光譜儀功函數，即可根據上式得知特定原子種類的束縛能，並推算出對應的原子種類。另外，以對特定元素光譜峰值的積分，亦可定量出樣品表面的元素組成。

因從樣品表面游離出的光電子動能只約為數 eV 至 keV，脫離深度(escape depth)極小，約為數奈米，高於此深度的光電子將因經歷多次非彈性碰撞，能量

損耗而無法自樣品表面離開，只有距樣品表面數奈米內的游離光電子可自表面脫離並被偵測器捕捉量測。因此，XPS 是屬於表面分析之一項技術。



3.3 實驗步驟

3.3.1 試片清洗與製備

將 N 型矽晶圓片切成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 的試片，把試片浸泡在純酒精中，以超音波震盪器使其震盪清洗，並重複兩次，再以氮氣槍吹乾試片。試片初步清潔後，將試片送入臭氧清潔器(UV-ozone cleaner, UV 波長為 193nm)接受照射 15 分鐘，此步驟目的為清除表面汙染物以及使試片表面活化，以利後續薄膜塗佈。

於試片送入臭氧清潔器之 15 分鐘間，配製摻雜不同種類及濃度的胜肽之海藻糖溶液。將藥品中已先分別調製出 10 種濃度(25mM、20.83mM、15.63mM、10mM、7.14mM、5mM、2.5mM、1mM、0.5mM 及 0.1mM)的三種胜肽溶液，依實驗條件，將所需種類及濃度的胜肽溶液各 $10\text{ }\mu\text{L}$ 與濃度為 1M 的海藻糖溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ 均勻混合。

3.3.1.1 試片製備—塊材(bulk)

將調配好的混合溶液滴至已完成臭氧清潔的試片上，並放置於乾燥箱中，待隔一夜可在試片上乾燥為透明、似玻璃態的凝固物，即完成塊材試片的製備。依其混合比例，分別形成摻雜 2.5%、2.08%、1.56%、1%、0.71%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05%、0.01%胜肽之海藻糖塊材試片。

3.3.1.2 試片製備—薄膜(thin film)

使試片固定於旋轉塗佈機(spin coater)上，將調配好的混合溶液散佈於試片表面，以轉速 5000rpm 使機器旋轉 20 秒，使溶液均勻塗佈於試片表面，待其乾燥後即完成薄膜試片的製備。依其混合比例，分別形成摻雜 2.5%、2.08%、1.56%、1%、0.71%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05%、0.01%胜肽之海藻糖薄膜試片。

另以 5 M 海藻糖溶液與 5 mM 各胜肽溶液混合，以相同的旋轉塗佈條件，可製備出較厚的摻雜 0.1%胜肽之海藻糖薄膜試片，厚度約為 400~500 nm。

3.3.2 薄膜厚度量測

將製備完成的試片以光譜式橢圓儀(ellipsometry, SpecEI-2000-Vis, Mikropack)進行厚度量測。將試片置放於載台上，使光源照射至適當位置，先使用「configuration」功能將載台調至最適高度，使偵測器能接收到最強的訊號。調整完畢後便可開始量測分析，軟體將自動計算試片的薄膜厚度。量測一次後，可稍微調整試片位置或使之轉向再量測一次，將量測值平均後即為該試片的薄膜厚度值。

3.3.3 SIMS 量測

以 PHI 5000 VersaProbe(ULVAC-PHI, Chigasaki, Japan)系統，以 C_{60}^+ 離子源(ION C60-10, Ionoptika, Chandler's Ford, UK)為濺射離子源，其操作條件為 10 kV, 10 nA，於共心高度(eucentric height)以 70°角入射至試片表面，掃描濺射面積為 2 mm × 2mm。

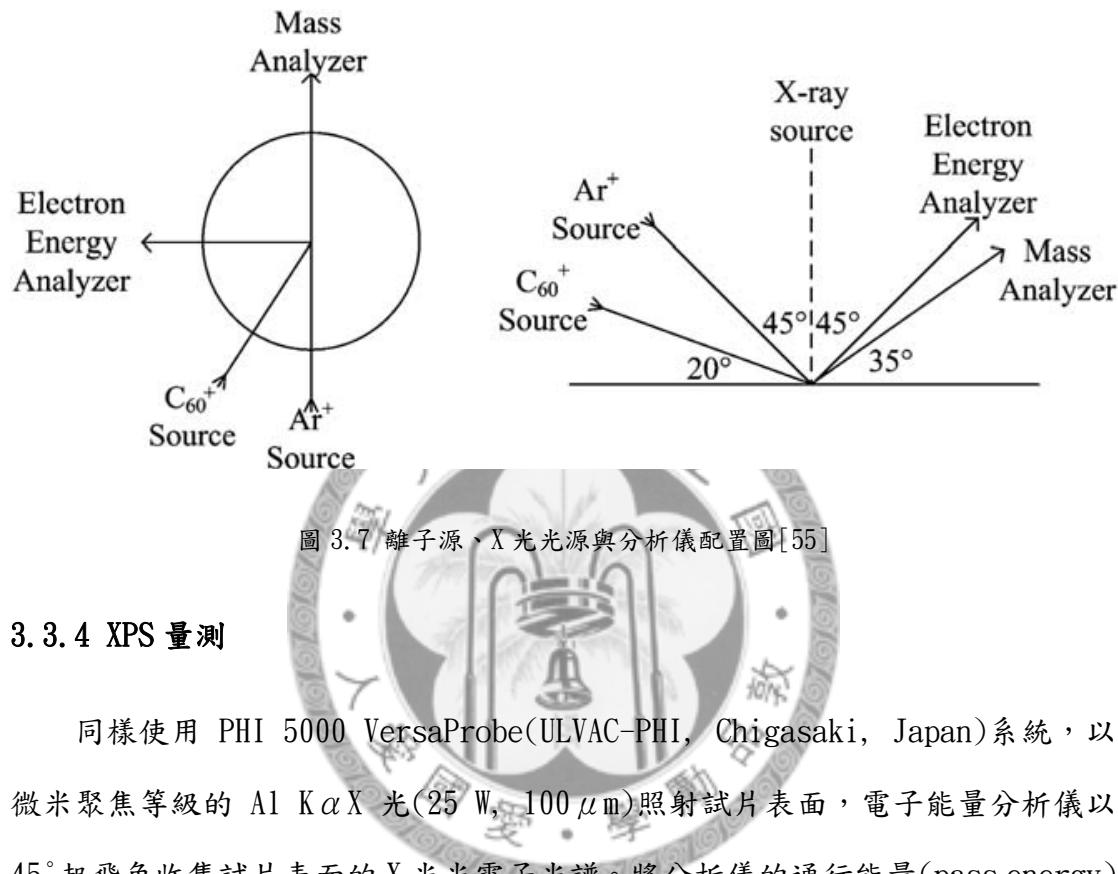


依實驗條件，另搭配各組電壓與電流的 Ar^+ 離子源(FIG-5CE)與 C_{60}^+ 離子源作為共濺射離子源，於共心高度以 45°角入射至試片表面，掃描濺射面積亦為 2 mm × 2 mm。 Ar^+ 離子源與 C_{60}^+ 離子源間的角度為 33°。

四極(quadrupole)質量分析儀(EQS1000, Hiden, Warrington, UK)架設於 Ar^+ 離子源正對面，以 35°的起飛角(take-off angle，偵測器與試片表面的夾角)收集從試片表面飛濺出的二次離子並進行質量分析。詳細配置架構如圖 3.7 所示。

試片置入儀器真空腔體後，開啟濺射離子源，依照欲收集正離子或負離子訊號，分別先針對 SIMS 儀器進行全調(full tune)及細調(fine tune)，以達到最佳偵測及收集分析狀態。在細調前可先設定掃描範圍 1 至 1000 amu 進行概略性檢測，以了解樣品中所含元素及分子。於儀器調整完畢並輸入適當儀器參數後，便可設定分子量掃描範圍正式收集其質譜。

若要進行縱深分佈分析，輸入欲收集的分子量，即可獲得其分子量訊號強度隨時間變化圖。若樣品為薄膜，為避免分層混淆，會特別使用掃描閘道(raster gating)限制其二次離子收集範圍，使其僅佔濺射面積中間之 50%，預防收集到濺射凹槽(crater)邊緣其他分層的訊號。



3.3.4 XPS 量測

同樣使用 PHI 5000 VersaProbe(ULVAC-PHI, Chigasaki, Japan)系統，以微米聚焦等級的 $\text{Al K}\alpha\text{X}$ 光(25 W, 100 μm)照射試片表面，電子能量分析儀以 45° 起飛角收集試片表面的 X 光光電子光譜。將分析儀的通行能量(pass energy)設定為 117.4 eV，對試片表面所含元素作概略性檢測。

第四章 實驗結果與討論

4.1 海藻糖及各勝肽之定性分析

在本實驗中以三種勝肽摻雜濃度皆為 1 mol% 之海藻糖基質塊材 (bulk) 為樣品，並分別以 Ar^+ 、 C_{60}^+ 單濺射離子源及 $\text{C}_{60}^+ - \text{Ar}^+$ 共濺射離子源三組條件分析所收集到的 SIMS 正負離子質譜。

4.1.1 以 Ar^+ 離子源單獨濺射

以 Ar^+ 離子源單獨濺射者幾乎無法獲得分子量 300 amu 以上的訊號，如圖 4.1 所示，即便增加其電壓及電流，高分子量訊號強度雖略微增加，但只是平均雜訊增強，來自海藻糖及各勝肽的訊號仍十分微弱，並混合於雜訊之中，而無法作為定性或定量分析之用。主要原因為如 Ar^+ 此類原子型濺射離子源穿透分析物深度大，因二次離子脫離深度淺，當殘留在表面的濺射能量過小，會不易使大分子離子飛濺出來，因此訊號強度微弱。若一味增加 Ar^+ 離子源的電壓及電流，恐將破壞材料內部結構，導致所獲資訊失真。

4.1.2 以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者如圖 4.2 所示，海藻糖及各勝肽的分子量訊號皆可清楚辨識。因 C_{60}^+ 離子於到達分析物表面後即分裂為 60 個碳原子，能量平均分散，原子穿透深度淺，且能量集中於表面，因此能使表面大分子離子飛濺出來，而能偵測到高分子量離子的訊號。有關海藻糖及各勝肽的分子量訊號將於章節 4.1.3 一併說明。

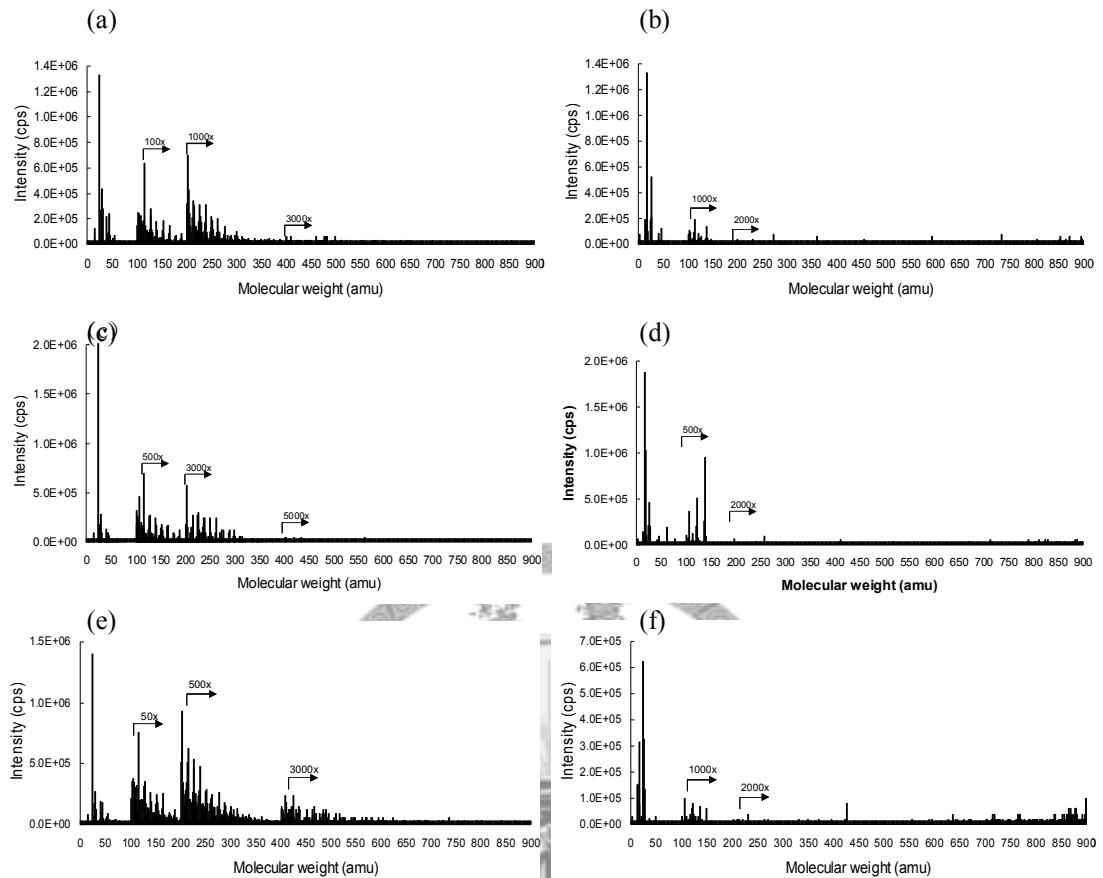


圖 4.1 Ar^+ 離子於各條件下濺射 1 mol% 胜肽-海藻糖塊材之質譜

(a) 0.2 kV, 300 nA, 正離子質譜 (b) 0.2 kV, 300 nA, 負離子質譜

(c) 0.2 kV, 600 nA, 正離子質譜 (d) 0.2 kV, 600 nA, 負離子質譜

(e) 2 kV, 300 nA, 正離子質譜 (f) 2 kV, 300 nA, 負離子質譜

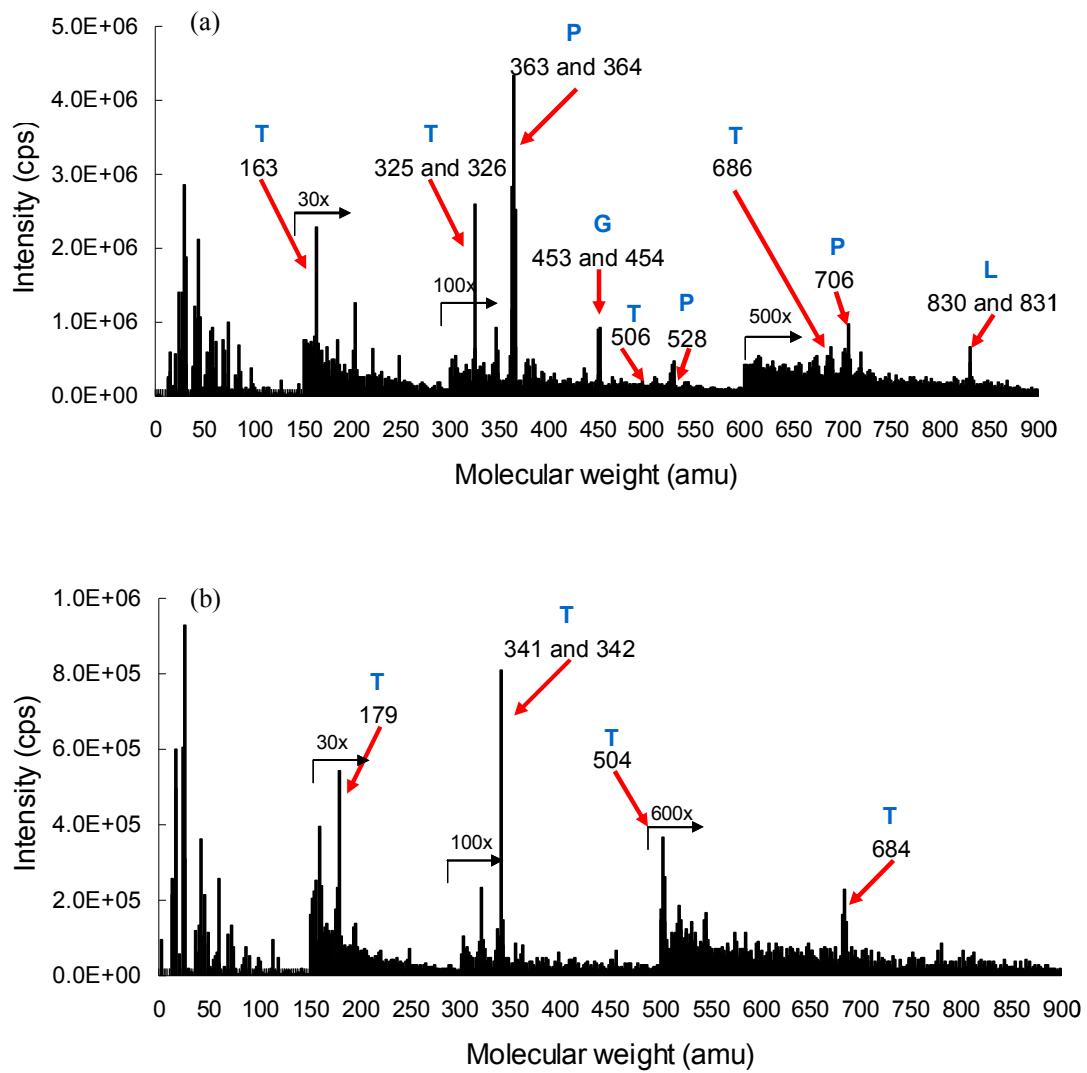


圖 4.2 以 C_{60}^+ 離子源濺射 1 mol% 胜肽-海藻糖塊材所得 (a)正離子質譜 (b)負離子質譜

(圖中標示 T 為海藻糖，P 為 Peptide P，G 為 Peptide G，L 為 Peptide L 之訊號)

4.1.3 以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射

以下分別針對以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射所收集到的海藻糖基質及選用的三種勝肽(Peptide P、G、L)之分子量訊號詳細解析。

(一) 基質：

$D(+)$ -海藻糖-二水合物($D-(+)$ -Trehalose dihydrate)，為使簡化在本論文中皆以海藻糖稱呼。分子式為 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$ ，分子量為 378 amu。當其溶於水中並脫去所含的兩個水分子後，分子量變為 342 amu。

(a)正離子質譜分析：圖 4.3(a)為以 SIMS 收集海藻糖分子飛濺出之正離子所呈現的質譜。主要的特徵分子破片之分子量為 325 及 326 amu，此為海藻糖分子損失一氫氧基($T-OH$)⁺或一氧基($T-O$)⁺的結果[53]；163 amu 為海藻糖分子片段的訊號[53]；由質譜中含有 Na (23 amu)的訊號及文獻[49]中可得知，365 amu 為海藻糖分子附帶 Na 離子($T+Na$)⁺的訊號；由本圖及後續摻雜勝肽分子之海藻糖樣品的正離子質譜圖(Fig. 4.5(a)、4.7(a)、4.9(a)及 4.11(a))中均可觀察到，506 amu 的訊號會隨 163 amu 訊號強度增減而消長，並從海藻糖分子結構判斷，506 amu 為海藻糖分子聚合物並附帶 2 個質子的訊號；而從海藻糖分子結構判斷，686 amu 為海藻糖分子二聚合物並附帶 2 個質子的訊號。

(b)負離子質譜分析：圖 4.3(b)為以 SIMS 收集海藻糖分子飛濺出之負離子所呈現的質譜。主要的特徵分子破片之分子量為 341 及 342 amu，此為該糖類分子損失一質子($T-H$)⁻或保持完整分子(T)⁻的結果；從海藻糖分子結構判斷，179 amu 為海藻糖分子片段的訊號；由本圖及後續摻雜勝肽分子之海藻糖樣品的負離子質譜圖(Fig. 4.5(b)、4.7(b)、4.9(b)及 4.11(b))中均可觀察到，504 amu 的訊號會隨 179 amu 訊號強度增減而消長，並從海藻糖分子結構判斷，504 amu 為海藻糖分子聚合物的訊號；而從海藻糖分子結構判斷，684 amu

為海藻糖分子二聚物的訊號。

海藻糖分子及其他特徵分子片段結構式如圖 4.4 所示。

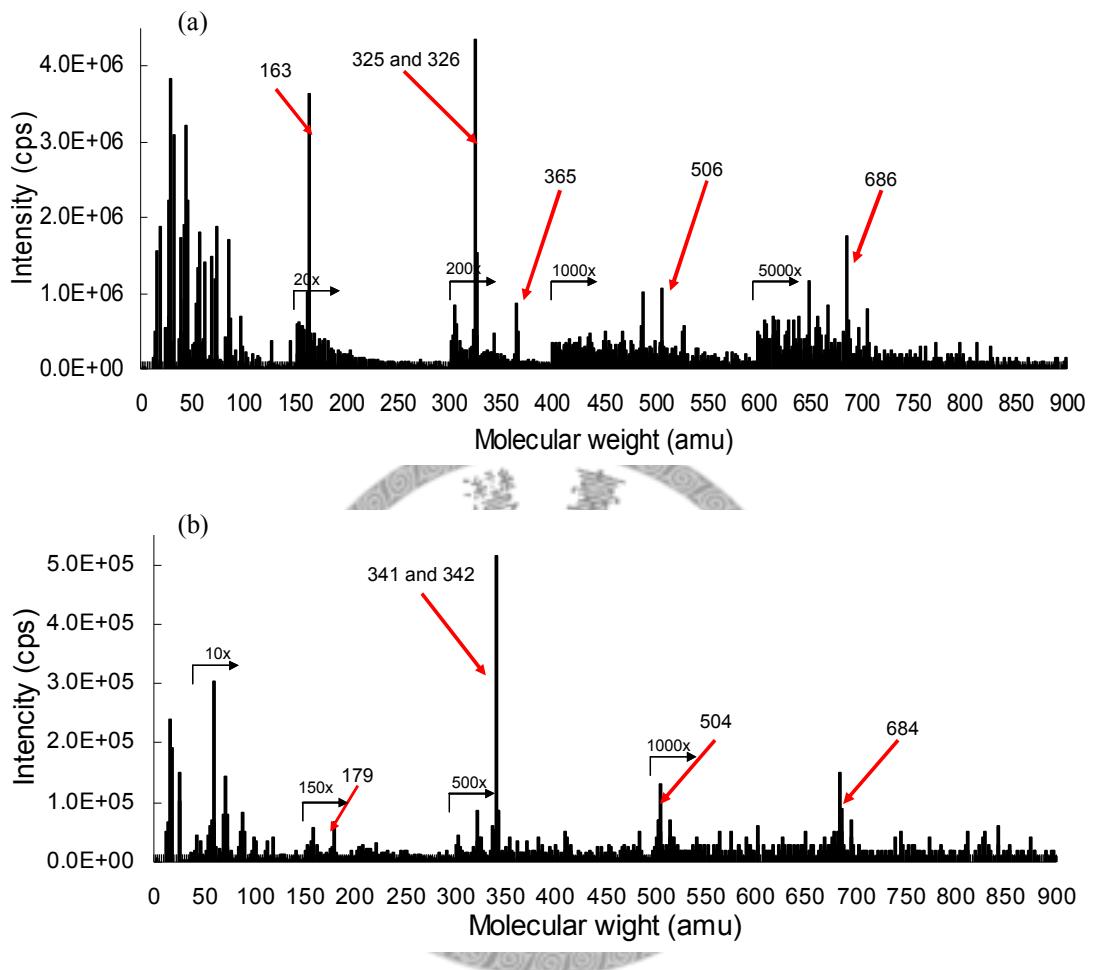


圖 4.3 以 $\text{C}_{60}^+-\text{Ar}^+$ 離子源共同濺射海藻糖塊材之(a)正離子質譜 (b)負離子質譜

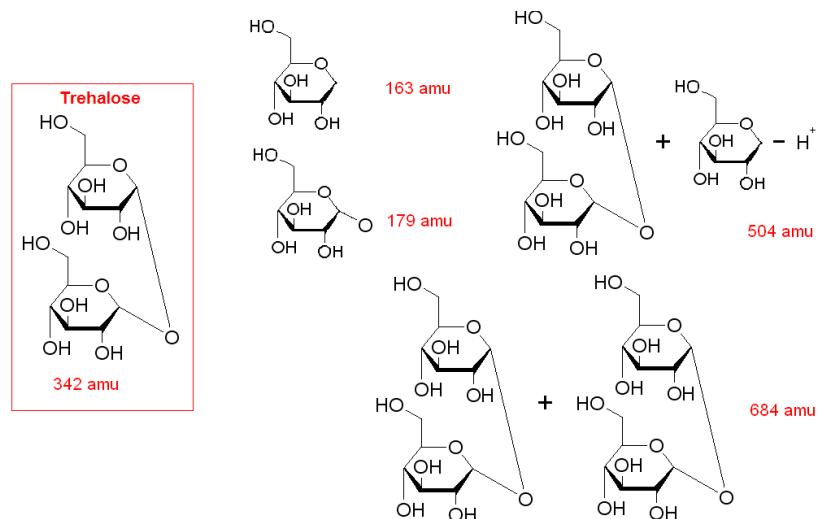


圖 4.4 海藻糖分子結構式(左)及其他分子破片(右)

(二)各胜肽(peptide)分別摻雜於海藻糖基質中：

在此實驗中，將選用的三種胜肽(Peptide P、G、L) 個別摻雜於海藻糖基質中，並收集其正負離子質譜。

(1)PGLU-HIS-PRO AMIDE FREE BASE，為使簡化在本論文中皆以 Peptide P 稱呼。其分子式為 $C_{16}H_{22}N_6O_4$ ，分子量為 362 amu。

(a)正離子質譜分析：圖 4.5(a)為以 SIMS 收集摻雜 1 mol% Peptide P 之海藻糖飛濺出的正離子所呈現的質譜。主要的分子破片分為兩類：分子量 325 及 326 amu 為海藻糖分子訊號；由文獻得知，胜肽分子易產生附帶多質子的二次離子訊號[53]，因此分子量 363 及 364 amu 為 Peptide P 分子附帶一($P+H$)⁺至二個質子($P+H_2$)⁺的結果。此外，Peptide P 分子有其餘 2 個較弱的訊號：528 與 706 amu，前者為 Peptide P 分子附帶一 166 amu 分子破片的訊號，此 166 amu 分子破片依其結構式觀察，來源可能性眾多，暫且無法確定；後者推測為 2 個 Peptide P 分子損失 1 水分子(P_2-OH_2)⁺的訊號；其餘如 163、506 及 686 amu 為海藻糖分子片段的訊號；此外海藻糖之 365 amu 訊號因與 Peptide P 的訊號混雜，不易直接從質譜圖中觀測。

(b)負離子質譜分析：圖 4.5(b)為以 SIMS 收集摻雜 1 mol% Peptide P 之海藻糖飛濺出的負離子所呈現的質譜。主要的分子破片為 341 及 342 amu，為海藻糖分子訊號；其餘如 179、504 及 684 amu 為海藻糖分子片段的訊號。另在負離子質譜中未能觀測到 Peptide P 的特徵分子破片。

Peptide P 分子結構式如圖 4.6 所示。

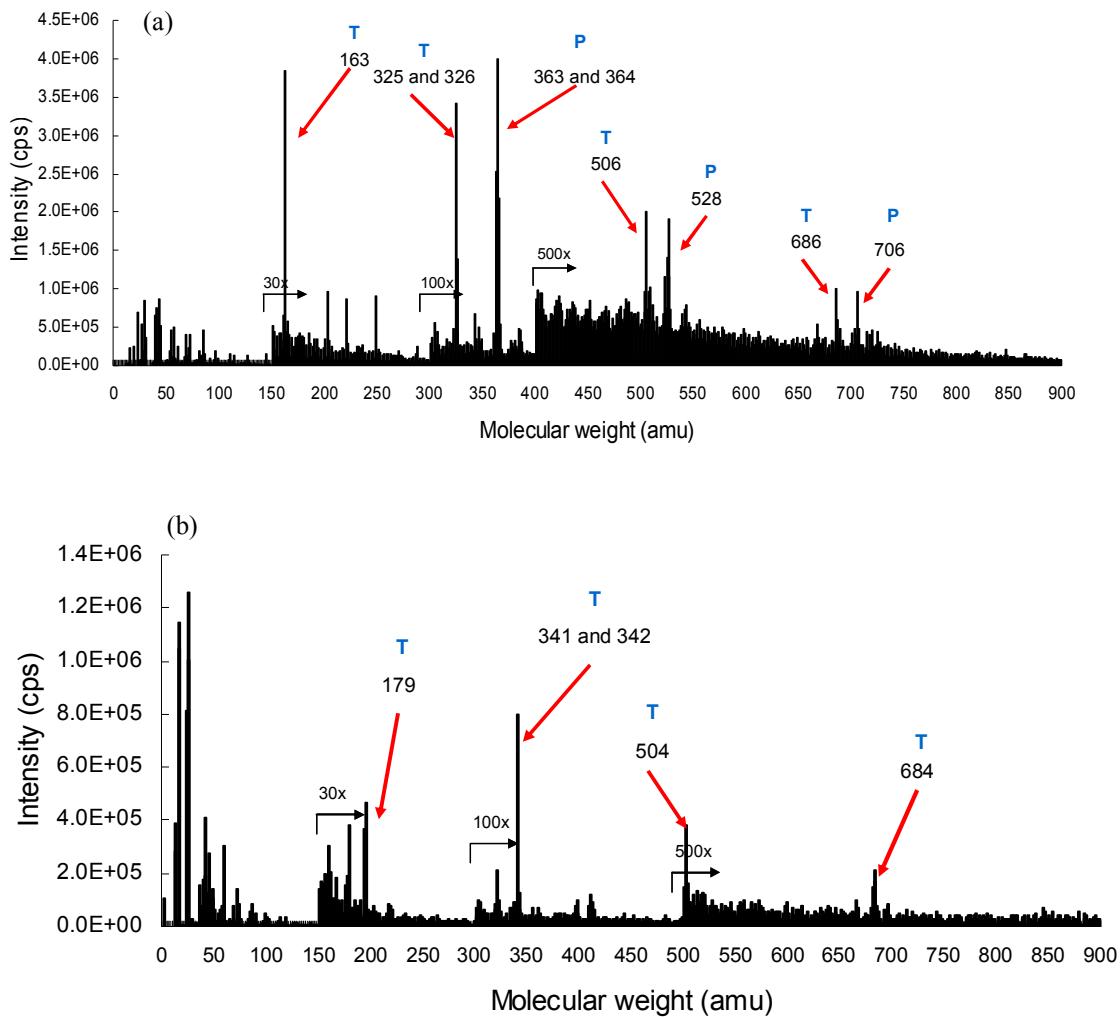


圖 4.5 以 $C_60^+ - Ar^+$ 離子源共同濺射 1 mol% Peptide P-海藻糖塊材 (a)正離子質譜 (b)負離子質譜

(圖中標示 T 為海藻糖，P 為 Peptide P 之訊號)

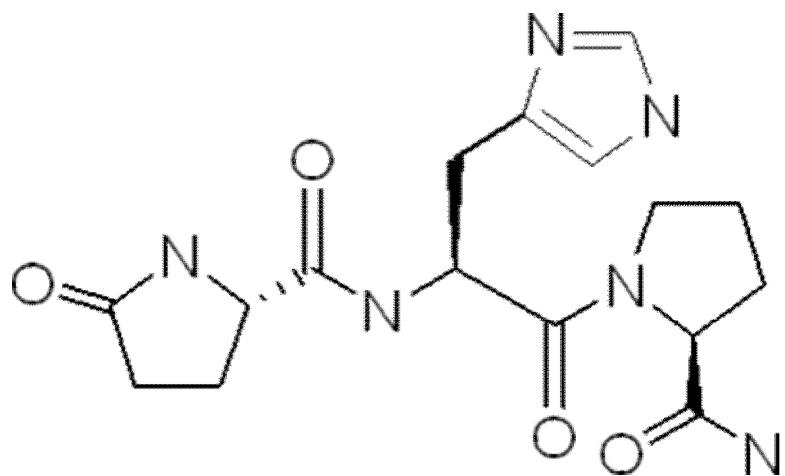


圖 4.6 Peptide P 分子結構式

(2) GLY-GLY-TYR-ARG，為使簡化在本論文中皆以 Peptide G 稱呼。其分子式為 $C_{19}H_{29}N_7O_6$ ，分子量為 452 amu。

(a) 正離子質譜分析：圖 4.7(a)為以 SIMS 收集摻雜 1 mol% Peptide G 之海藻糖飛濺出的正離子所呈現的質譜。主要的分子破片分為兩類：分子量 325 及 326 amu 為海藻糖分子訊號；分子量 453 及 454 amu 為 Peptide G 分子附帶一($G+H$)⁺至二個質子($G+H_2$)⁺的結果；其餘如 163、365、506 及 686 amu 為海藻糖分子片段的訊號。

(b) 負離子質譜分析：圖 4.7(b)為以 SIMS 收集摻雜 1 mol% Peptide G 之海藻糖飛濺出的負離子所呈現的質譜。主要的分子破片為 341 及 342 amu，為海藻糖分子訊號；其餘如 179、504 及 684 amu 為海藻糖分子片段的訊號。另在負離子質譜中未能觀測到 Peptide G 的特徵分子破片。

Peptide G 分子結構式如圖 4.8 所示。



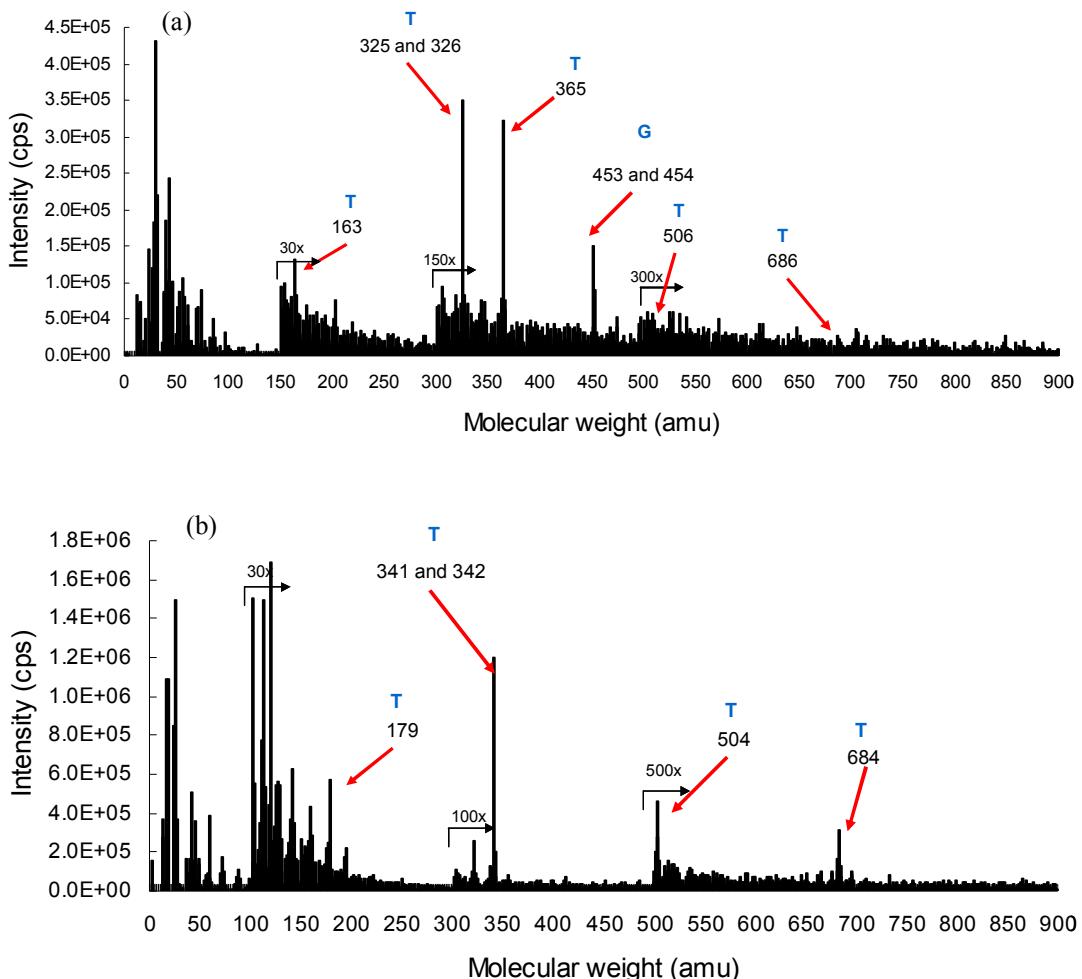


圖 4.7 以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射 1 mol% Peptide G-海藻糖塊材 (a) 正離子質譜 (b) 負離子質譜
(圖中標示 T 為海藻糖, G 為 Peptide G 之訊號)

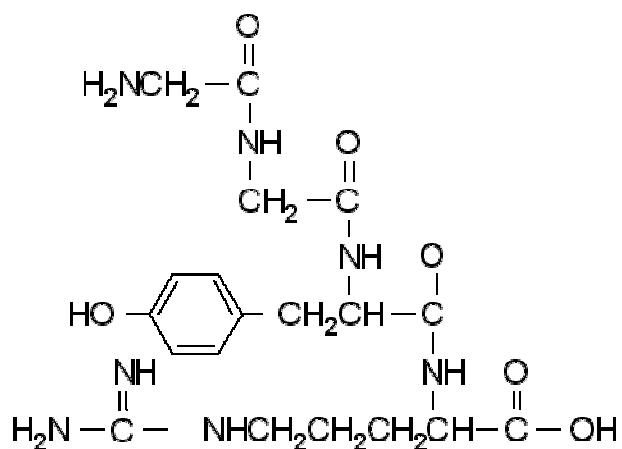


圖 4.8 Peptide G 分子結構式

(3) LYS-ARG-THR-LEU-ARG-ARG，為使簡化在本論文中皆以 Peptide L 稱呼。其分子式為 $C_{34}H_{68}N_{16}O_8$ ，分子量為 829 amu。

(a) 正離子質譜分析：圖 4.9(a)為以 SIMS 收集摻雜 1 mol% Peptide L 之海藻糖飛濺出的正離子所呈現的質譜。主要的分子破片分為兩類：分子量 325 及 326 amu 為海藻糖分子訊號；分子量 830 及 831 amu 為 Peptide L 分子附帶一($L+H$)⁺至二個質子($L+H_2$)⁺的結果；其餘如 163、365、506 及 686 amu 為海藻糖分子片段的訊號。

(b) 負離子質譜分析：圖 4.9(b)為以 SIMS 收集摻雜 1 mol% Peptide L 之海藻糖飛濺出的負離子所呈現的質譜。主要的分子破片為 341 及 342 amu，為海藻糖分子訊號；另在負離子質譜中可觀測到 456 amu 之 Peptide L 的特徵分子破片，但訊號強度十分微弱；其餘如 179、504 及 684 amu 為海藻糖分子片段的訊號。

Peptide L 分子及其他特徵分子片段結構式如圖 4.10 所示。



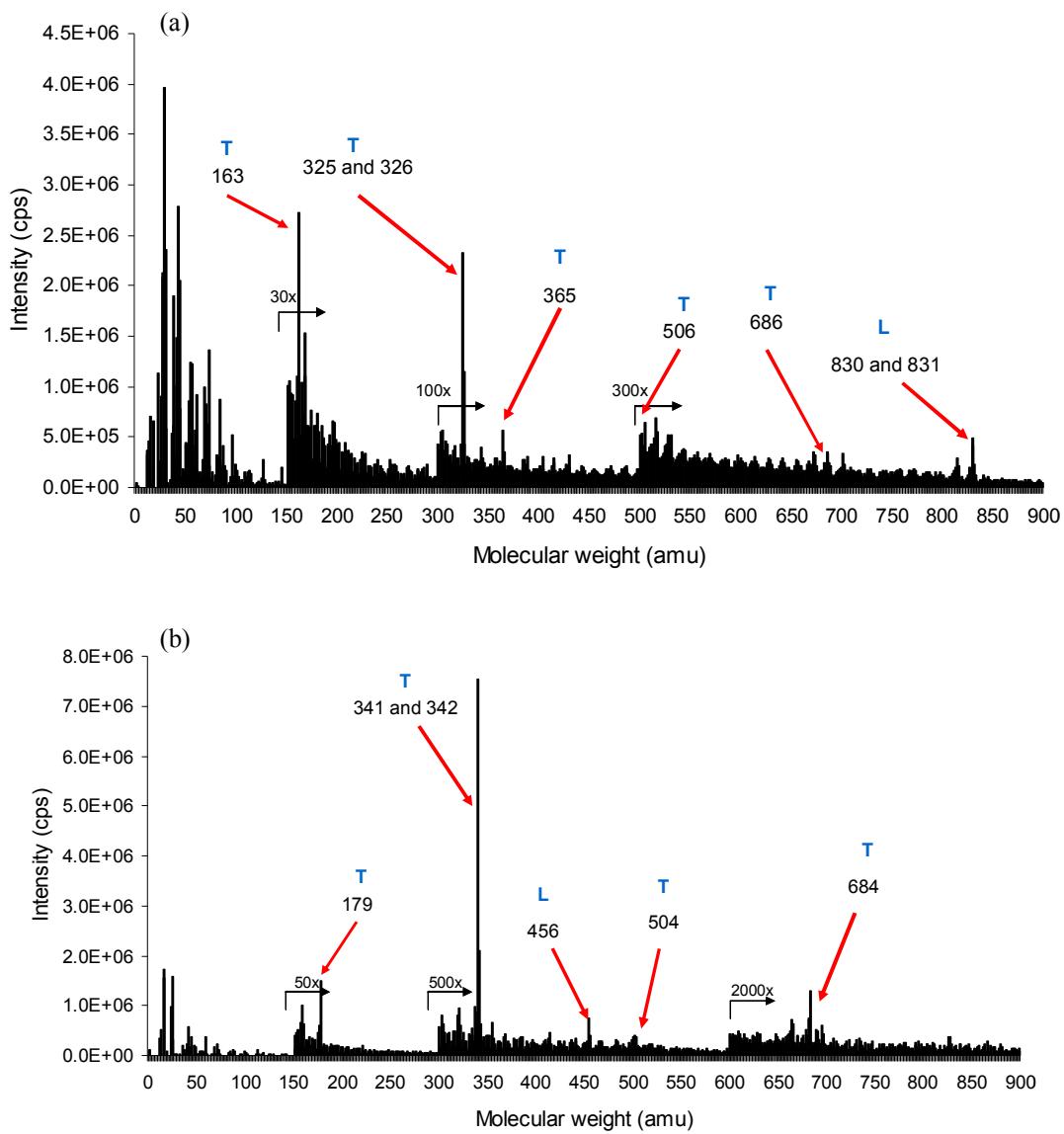


圖 4.9 以 C_{60}^+ -Ar $^+$ 離子源共同濺射 1 mol% Peptide L-海藻糖塊材 (a)正離子質譜 (b)負離子質譜

(圖中標示 T 為海藻糖，L 為 Peptide L 之訊號)

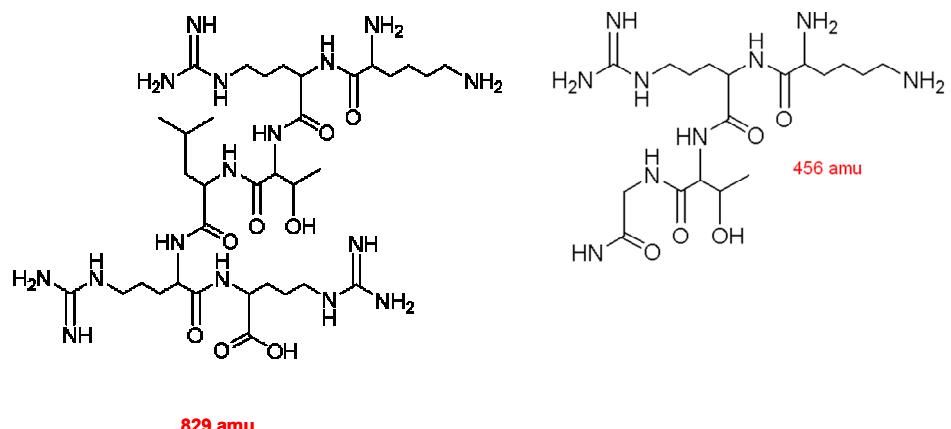


圖 4.10 Peptide L 分子結構式(左)及其他分子破片(右)

(三)各胜肽全部掺雜於海藻糖基質中：

在本實驗中，將選用的三種胜肽(Peptide P、G、L)全部掺雜於海藻糖基質中，並收集其正負離子質譜。

(a)正離子質譜分析：圖 4.11(a)為以 SIMS 收集掺雜 1 mol% Peptide P、G、L 之海藻糖飛濺出的正離子所呈現的質譜。主要的分子破片有：分子量 325 及 326 amu 為海藻糖分子訊號，分子量 363 及 364 amu 為 Peptide P 分子訊號，分子量 453 及 454 amu 為 Peptide G 分子訊號，分子量 830 及 831 amu 為 Peptide L 分子訊號；其餘如 528 及 706 amu 為 Peptide P 分子聚合片段的訊號，而 163、506 及 686 amu 為海藻糖分子片段的訊號。

(b)負離子質譜分析：圖 4.11(b)為以 SIMS 收集掺雜 1 mol% Peptide P、G、L 之海藻糖飛濺出的負離子所呈現的質譜。主要的分子破片為 341 及 342 amu，是為海藻糖分子訊號；其餘如 179、504 及 684 amu 亦為海藻糖分子片段的訊號。另在負離子質譜中皆未能觀測到各胜肽的特徵分子破片，原本在 Peptide L 的負離子質譜中可偵測到的 456 amu 訊號在此則因十分微弱而不易呈現於質譜中。

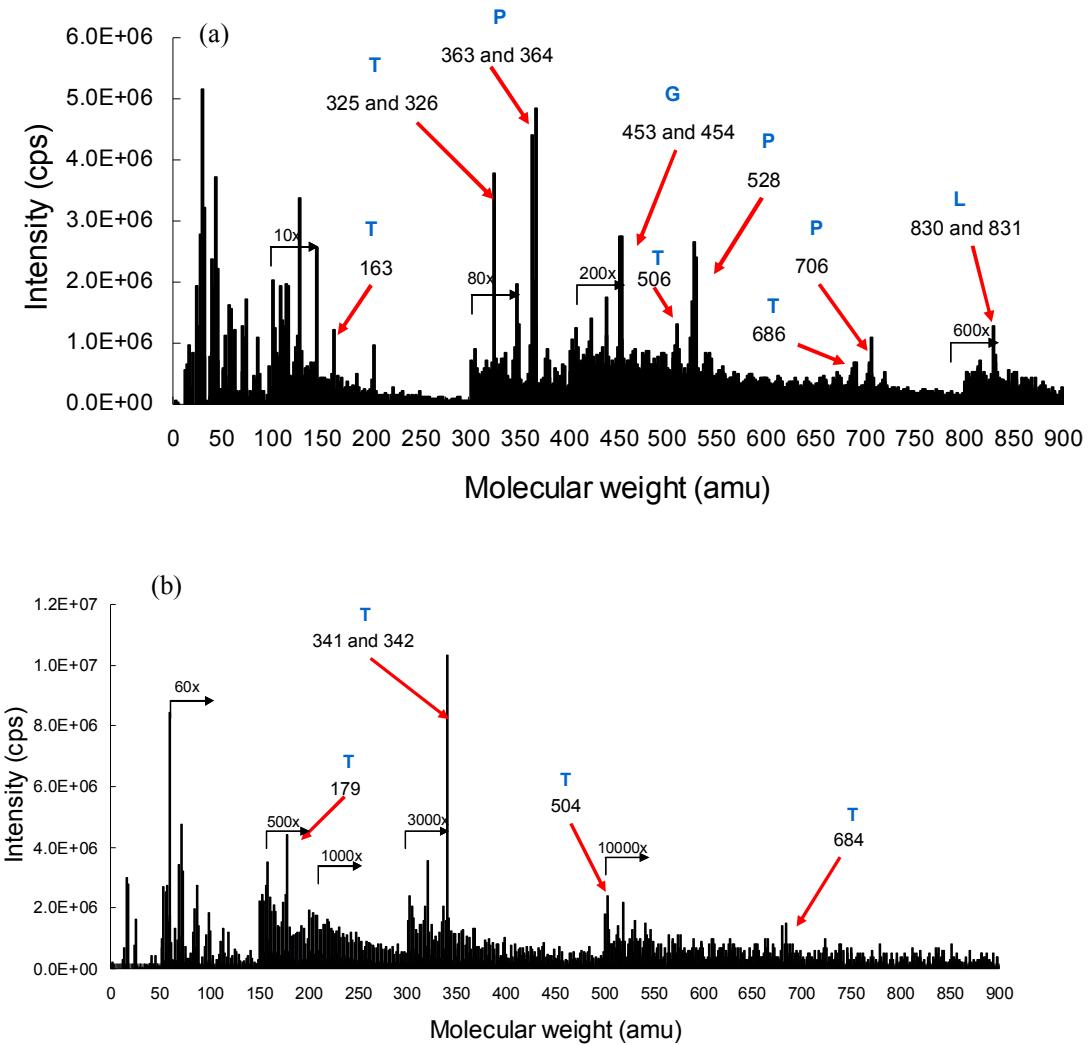


圖 4.11 以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射 1 mol%胜肽-海藻糖块材 (a)正離子質譜 (b)負離子質譜

(圖中標示 T 為海藻糖，P 為 Peptide P，G 為 Peptide G，L 為 Peptide L 之訊號)

(四)小結：

(1)以 SIMS 收集之負離子訊號強度普遍皆較正離子弱。其原因推測為海藻糖基質可促進質子交換，因此正離子訊號可被強化。

(2)於 SIMS 正負離子的質譜中皆可偵測出海藻糖分子的訊號。正離子訊號主要以損失一氫氧基或氨基的分子破片呈現，分子量為 325 及 326 amu；負離子訊號主要以損失一質子或保持完整分子的分子破片呈現，分子量為 341 及 342 amu。正離子訊號如同上述仍較負離子強，因此於往後的定量分析及平行偵測，將以分子量 325 及 326 amu 之訊號代表海藻糖分子。

(3)僅能於 SIMS 正離子質譜中偵測出各勝肽分子的訊號，而較未能在負離子質譜中發現代表勝肽分子的訊號。正離子訊號主要以附帶一至二個質子的分子破片呈現，分子量訊號分別為：363 及 364 amu 為 Peptide P，453 及 454 amu 為 Peptide G，830 及 831 amu 為 Peptide L，因此於往後的定量分析及平行偵測，將各以上述分子量訊號分別代表各勝肽。

(4)如圖 4.11(a)所示，將各勝肽摻雜於海藻糖基質中，可於 SIMS 正離子質譜中分別偵測出各勝肽分子及海藻糖分子的訊號，顯示以 SIMS 為工具，針對收集到特徵分子量訊號，與資料庫中各勝肽分子的化學結構及分子量等資訊交互比對，可進行辨識各勝肽分子之定性分析。

(5)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射或以 $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射，皆可於 SIMS 正離子質譜中分別偵測出各勝肽分子及海藻糖分子的訊號，即此兩種濺射源均可進行定性分析。至於在定量分析方面，將留待後續章節討論。

4.2 用於定量之分子量訊號穩定性

在本實驗中，分別先以 C_{60}^+ 單獨濺射離子源與 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源分析海藻糖與各胜肽分子，如圖 4.12 及 4.13 所示，發現以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射相較於 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射的訊號皆有隨時間大幅衰退的現象，恐不利於定量分析的精確性，此部分將在章節 4.3.1 詳細討論。因此本研究選擇 $C_{60}^+-Ar^+$ 共同濺射離子源，並觀察各分析物特徵分子量的訊號隨時間的穩定性，以訂定出適用於後續定量分析的分子量訊號值。

(一) 海藻糖：於 SIMS 正離子質譜所偵測之主要破片分子量為 $325(T-OH)^+$ 及 $326(T-O)^+$ amu，如圖 4.12(a)與 4.13(a)所示，不論激發條件，325 的訊號雖較 326 強，但因 325 訊號較不穩定，其訊號強度持續隨濺射時間進展而下降，約過 20 分鐘才達穩定狀態，反之 326 訊號大致皆維持穩定值。因此在定量分析考量下，為了較穩定的訊號值，故最終選擇分子量 326 amu 的訊號代表海藻糖分子。

(二) Peptide P：於 SIMS 正離子質譜所偵測之主要破片分子量為 $363(P+H)^+$ 及 $364(P+H_2)^+$ amu，如圖 4.12(b)與 4.13(b)所示，不論激發條件，363 的訊號雖較 364 強，但因 363 訊號較不穩定，其訊號強度持續隨濺射時間進展而下降，一直未能達到穩定狀態，反之 364 訊號大致皆維持穩定值。因此在定量分析考量下，故最終選擇穩定的分子量 364 amu 之訊號代表 Peptide P 分子。

(三) Peptide G：於 SIMS 正離子質譜所偵測之主要破片分子量為 $453(G+H)^+$ 及 $454(G+H_2)^+$ amu，如圖 4.12(c)與 4.13(c)所示，不論激發條件，453 的訊號較 454 強，且兩者大致皆維持穩定狀態，故最終選擇較強之分子量 453 amu 的訊號代表 Peptide G 分子。

(四) Peptide L：於 SIMS 正離子質譜所偵測之主要破片分子量為 $830(L+H)^+$ 及 $831(L+H_2)^+$ amu，如圖 4.12(d)與 4.13(d)所示，不論激發條件，830 的訊號雖較 831 強，但因 830 訊號強度較 831 訊號有較為明顯的降幅，且如圖 4.13(d)中所

示，830 訊號數值較易上下波動，反之 831 訊號較可維持穩定值，在定量分析考量下，故選擇穩定的分子量為 831 amu 之訊號代表 Peptide L 分子。

目前暫且無法解釋為何在大部分訊號中，附帶兩個質子的勝肽分子訊號反而會較附帶一個質子之訊號穩定，僅根據實驗測試的結果而選定可代表各勝肽分子的穩定分子量訊號。

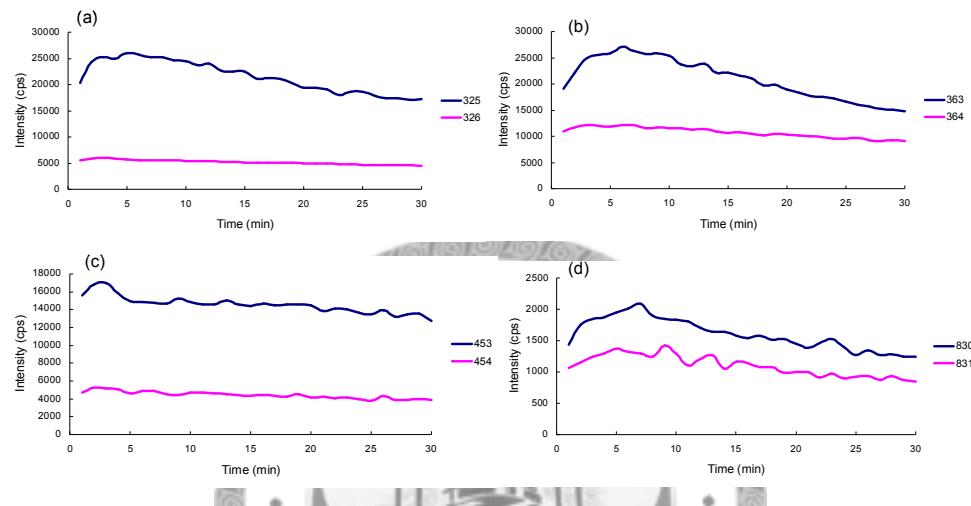


圖 4.12 以 C_60^+ 離子源單獨濺射下各分子量訊號於 30 分鐘內隨時間變化趨勢圖

(a)海藻糖 (b)Peptide P (c)Peptide G (d)Peptide L 之分子訊號

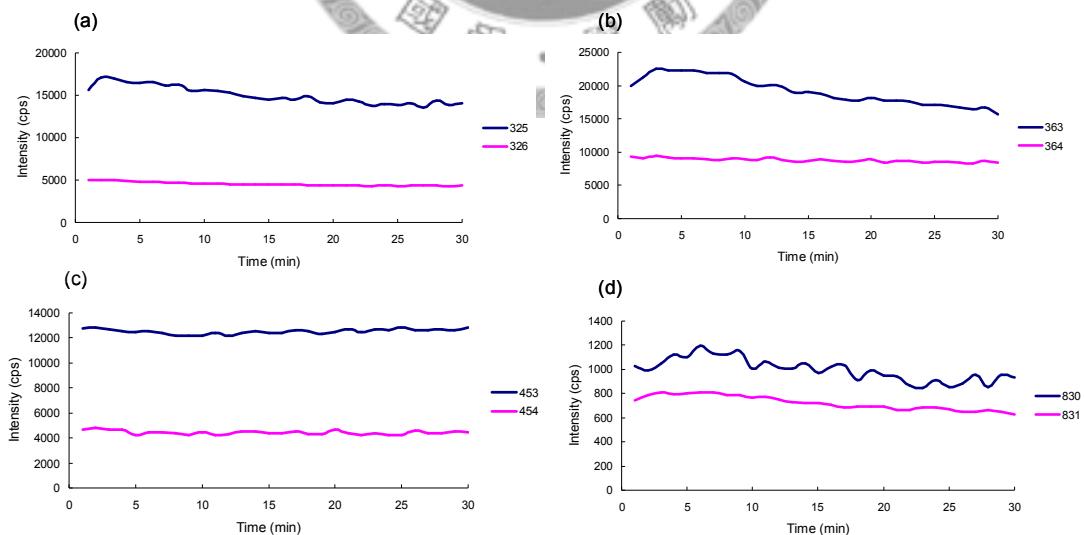


圖 4.13 以 $C_60^+-Ar^+$ 離子源共同濺射下各分子量訊號於 30 分鐘內隨時間變化趨勢圖

(a)海藻糖 (b)Peptide P (c)Peptide G (d)Peptide L 之分子訊號

4.3 滅射離子源對訊號穩定性之比較

根據薛景中教授的研究指出[55, 56]，以 C_{60}^+ 作為滅射離子源雖然已被證實可適用於有機材料的化學及表面結構分析，但其受限於 C_{60}^+ 滅射所導致的表面碳沉積，造成不穩定的滅射速率及狀態，並限制了最大可分析深度。於縱深分佈分析時，若輔以一 Ar^+ 離子源與 C_{60}^+ 離子源共同作用滅射，該 Ar^+ 離子源將可抑制碳固植於表面並緩慢地移除表面碳沉積，而可較單獨使用 C_{60}^+ 滅射易且快速達成穩定的滅射狀態，經由實驗測試，以電壓 0.2 kV，電流 300 nA 的 Ar^+ 與 C_{60}^+ 離子源共同滅射的成效最佳。

4.3.1 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同滅射與單獨以 C_{60}^+ 離子源滅射對塊材訊號穩定性的比較

圖 4.14(a)、(b)為滅射摻雜勝肽之海藻糖基質塊材所得之縱深分佈分析圖，並比較 C_{60}^+ 輔以 Ar^+ 離子源與否對訊號穩定性之影響，其顯示單獨使用 C_{60}^+ 離子源所得訊號能顯較有 Ar^+ 離子源輔助者來得不穩定。兩者訊號的衰減幅度顯示於圖 4.15。

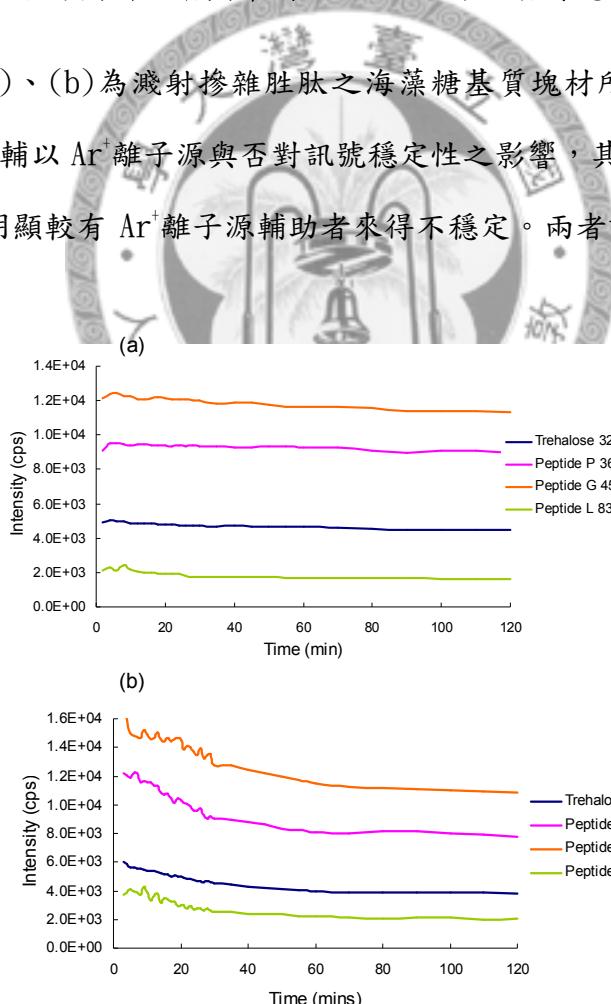


圖 4.14 滅射 1 mol%勝肽-海藻糖所得各分子量訊號能於 2 小時內隨時間變化趨勢圖

(a)以 C_{60}^+ -0.2 kV, 300 nA 之 Ar^+ 離子源共同滅射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨滅射

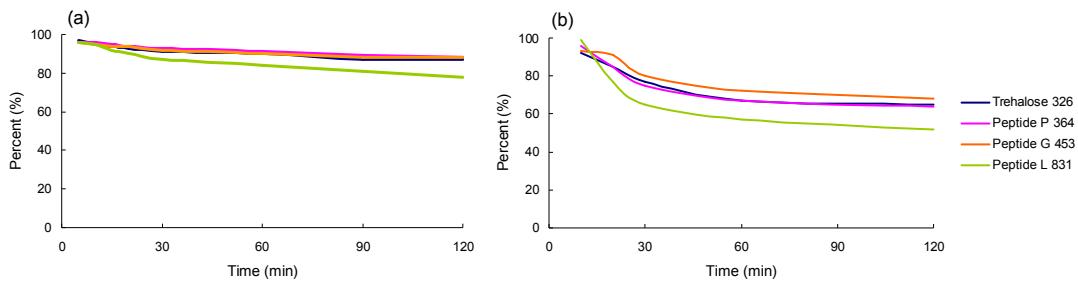


圖 4.15 各分子量訊號於 2 小時內衰減幅度變化圖

(a) 以 C_{60}^+ -0.2 kV, 300 nA 之 Ar^+ 離子源共同濺射 (b) 以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

如圖 4.15 所示，以 C_{60}^+ 單獨濺射所產生的分子破片訊號於濺射開始後極為不穩定，訊號強度在 30 分鐘內大幅下降，約一小時後才趨於穩定，而後隨時間緩慢微幅下降至約 70%原始強度。另一方面，若以 0.2 kV, 300 nA 的 Ar^+ 與 C_{60}^+ 離子源共同濺射，訊號強度在 10 分鐘內較為不穩定，約有 5 %降幅，而後即趨於穩定並隨時間緩慢微幅下降。兩者相同處在於，對高分子量的 Peptide L，即來自分子破片 831 amu 之訊號，其降幅皆遠較於其他分子量訊號高，主要是由於分子量愈大的分子愈難以離子源濺射飛濺出，訊號強度本來就較低，再加上 C_{60}^+ 濺射造成的碳沉積，使大分子更難被濺射飛出，影響訊號偵測，因此訊號強度降幅大，尤其單獨只用 C_{60}^+ 離子源濺射者因無 Ar^+ 離子源協助清除並阻礙碳沉積，其降幅最為嚴重，濺射 2 小時後訊號強度約只剩原本的一半；相對而言，以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射者所得之 831 amu 訊號降幅較小，濺射 2 小時後訊號強度仍可保留近原本強度的八成。

4.3.2 Ar^+ 離子源之電流對訊號穩定度的影響

圖 4.16 比較 C_{60}^+ 離子源輔以各高低電流之 Ar^+ 離子源對訊號穩定度的影響。以低電流 70 nA 而言，大部份之訊號強度在 30 至 40 分鐘內較為不穩定，約有 10%的降幅，而後才漸趨平穩，其協助穩定訊號的能力較不如 300 nA 的 Ar^+ 離子源，推測可能是由於在 70 nA 的低電流 Ar^+ 離子源下，仍不足以清除並抑制 C_{60}^+ 離子源濺射形成的碳沉積，因此須較長的時間達成穩定的濺射狀態。另一方面，

就高電流 600 nA 而言，部份訊號強度隨濺射時間持續衰減，未能達成平衡，甚至有衰減加劇的現象，推測其原因可能為過高的 600 nA Ar^+ 離子源電流已經造成材料化學結構的破壞，後續收集到的訊號已是來自於受破壞表面的資訊，因此訊號強度持續下降，而無法提供真實的化學結構分析資訊。

由以上的實驗結果，以 300 nA 的 Ar^+ 離子源電流輔助 C_{60}^+ 離子源共同濺射，最能有效阻止並清除碳沉積，於縱深分佈分析時，能迅速達成穩定的濺射狀態及速率，以提供完整且真實的化學表面結構分析，此結果也與薛景中教授的研究相吻合。因此爾後在定量分析考量下，本論文皆以 300 nA 的 Ar^+ 輔助 C_{60}^+ 作為共同濺射離子源，以獲得穩定的訊號值。

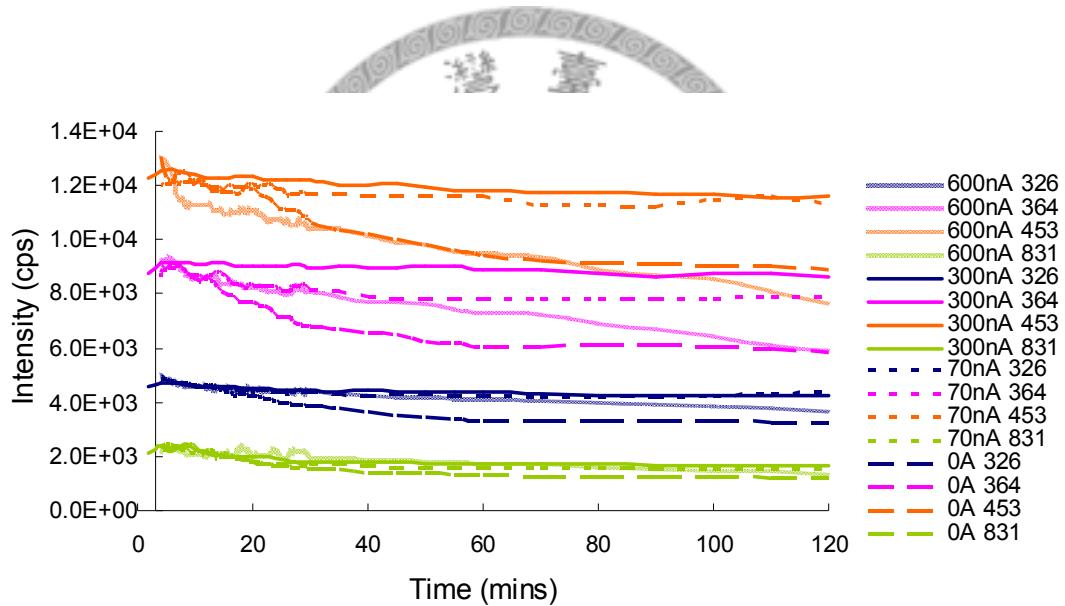


圖 4.16 C_{60}^+ 離子源輔以各電流之 Ar^+ 離子源濺射 1 mol%胜肽-海藻糖

所得訊號於 2 小時內隨時間變化趨勢圖

4.4 海藻糖及各類胜肽之塊材定量分析

在本實驗中，分別將摻雜濃度為 0.01~2.5 mol% 之三種胜肽混合於海藻糖基質中，並將該混合溶液滴於矽晶片基材上，待其乾燥形成塊材後，以 $C_{60}^+ - Ar^+$ 共同濺射離子源，收集各胜肽及海藻糖帶正電之二次離子訊號，計算各胜肽於各摻雜濃度時相對於海藻糖的訊號強度之比值，即可繪出各胜肽於各摻雜濃度下相對於海藻糖的校正曲線，而可應用於胜肽之定量分析。

海藻糖及各胜肽的分子量訊號如章節 4.2 所述，分別選擇如下：海藻糖為 326 amu、Peptide P 為 364 amu、Peptide G 為 453 amu，以及 Peptide L 為 831 amu。圖 4.17(a)、(b)、(c)分別為 Peptide P、Peptide G 及 Peptide L 於摻雜濃度 0.01~2.5 mol% 間相對於海藻糖的定量校正曲線。如圖所示，各類胜肽相對於海藻糖的訊號強度比值大致與其摻雜濃度變化成正比關係。詳細數據分別列於表 4.1。

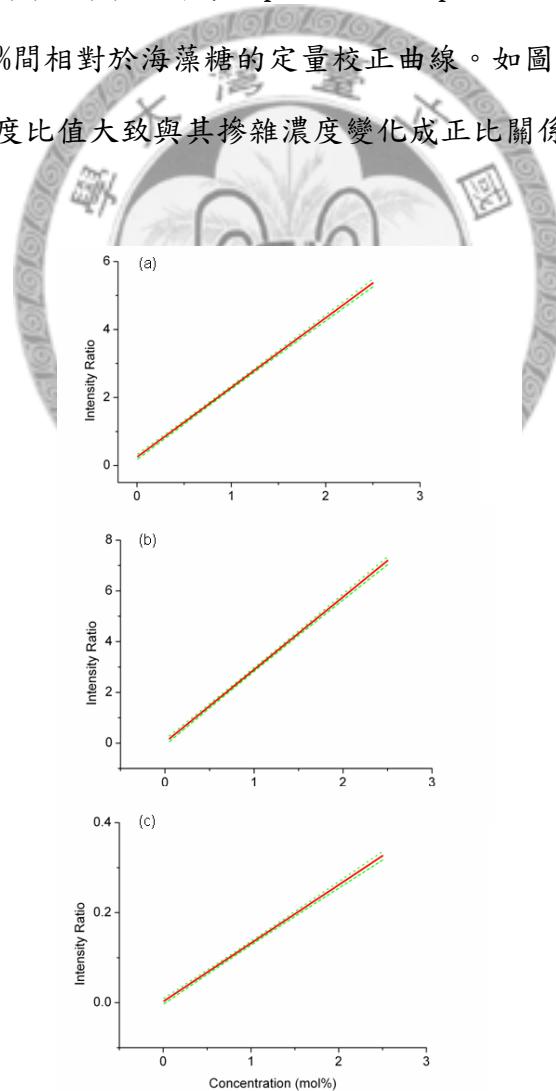


圖 4.17 0.01~2.5 mol% 之各類胜肽-海藻糖的校正曲線圖(虛線為含標準差之 95% 信賴區間)

(a)Peptide P (b)Peptide G (c)Peptide L

	Peptide P	S.D.	Peptide G	S.D.	Peptide L	S.D.
2.50 mol%	5.2887	0.2452	7.0487	0.5253	0.345	0.0215
2.08 mol%	4.4029	0.3353	6.1027	0.1341	0.2599	0.0299
1.56 mol%	3.4714	0.127	4.5536	0.3158	0.1913	0.0164
1.00 mol%	2.4548	0.0441	3.0647	0.4245	0.1316	0.0176
0.71 mol%	1.9527	0.0727	2.0233	0.3142	0.0959	0.0078
0.50 mol%	1.4084	0.1584	1.3478	0.0791	0.0695	0.0124
0.25 mol%	0.7454	0.0512	0.7691	0.0961	0.0358	0.0173
0.10 mol%	0.4088	0.0923	0.3559	0.0486	0.0166	0.0066
0.05 mol%	0.1774	0.017	0.2147	0.0065	0.0109	0.0012
0.01 mol%	0.1161	0.0143	0.1157	0.0029	0.0057	0.0021

表 4.1 0.01~2.5 mol%之各胜肽-海藻糖的校正點及其標準差(S. D.)

4.4.1 胜肽掺雜之海藻糖塊材定量分析測試

在本實驗中，製作兩種濃度比例的胜肽-海藻糖混合物，分別為 1 mol% 及 0.1 mol%，作為測試定量校正曲線之用。

圖 4.18(a)、(b)、(c)分別為 1 mol% 及 0.1 mol% 胜肽-海藻糖塊材之測試樣品所得訊號強度比值與 Peptide P、Peptide G 及 Peptide L 校正曲線的比較圖。於本實驗中，將掺雜全部三種胜肽的海藻糖塊材樣品的定量點與掺雜單一胜肽的校正曲線做比對，如圖所示，兩測試樣品所得各胜肽相對於海藻糖之訊號強度比值，大致皆與各胜肽的定量校正曲線相吻合。此結果證實在掺雜多種胜肽的情況下，其各胜肽分子特定掺雜濃度的定量點，仍可符合定量校正曲線，顯示以 SIMS 為工具，確實可達成胜肽分子於糖類基質中的平行偵測及定量分析。

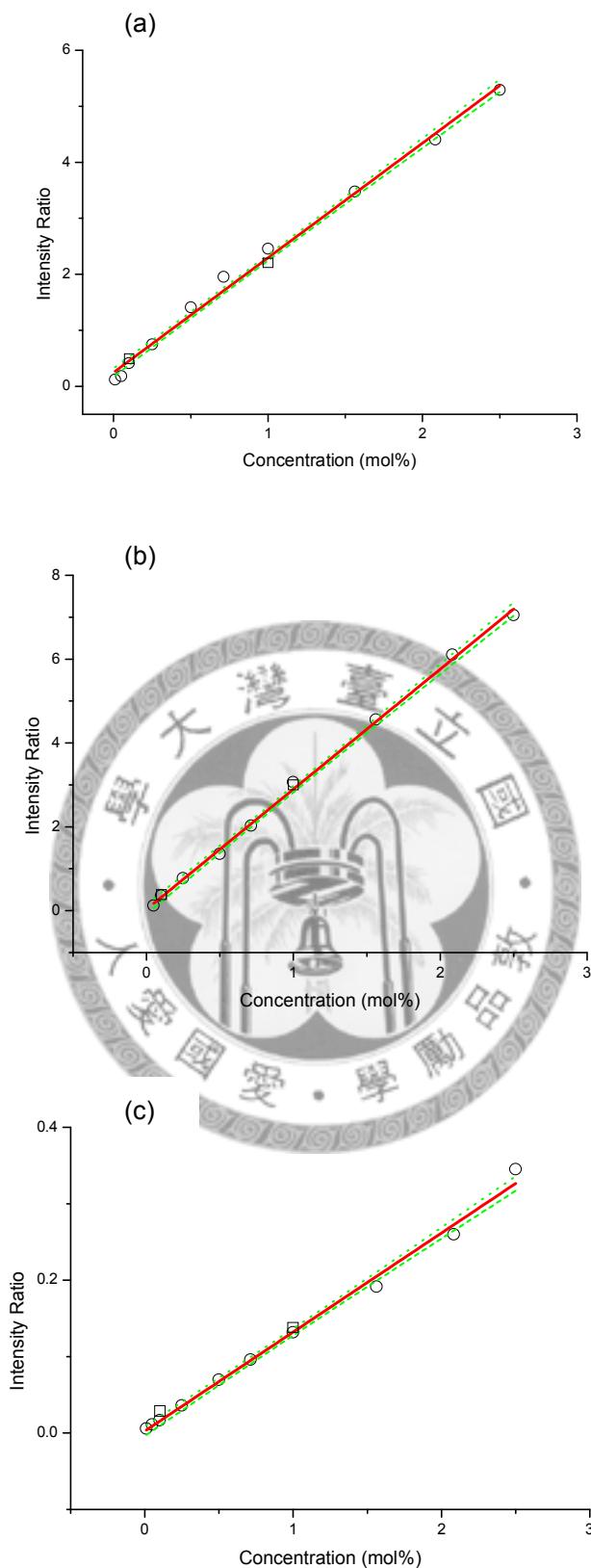


圖 4.18 1 mol% 及 0.1 mol% 胜肽-海藻糖塊材之測試樣品所得訊號強度比值與
 (a)Peptide P (b)Peptide G (c)Peptide L 之校正曲線的比較圖(□為測試樣品定量點)

4.4.2 Ar^+ 輔助濺射離子源於共同濺射時的角色定位

根據薛景中教授的研究指出[55]，於 $\text{C}_{60}^+ - \text{Ar}^+$ 離子源共同濺射時，0.2 kV 的 Ar^+ 離子源貢獻的高分子量二次離子極低，甚至在某些情況下會導致整體的濺射速率及二次離子訊號強度降低，顯示 Ar^+ 離子源與 C_{60}^+ 離子源產生交互作用， Ar^+ 離子源會干擾 C_{60}^+ 離子源，並使其破裂成較小分子。其共同濺射時的濺射產率及速率主要是由 C_{60}^+ 離子源所主導， Ar^+ 離子源僅是作為抑制及清除碳沉積之用。

如章節 4.3.1 之圖 4.14(a)、(b)所示，使用 C_{60}^+ 單獨濺射者確實可於濺射開始時造成較大的訊號強度，以 $\text{C}_{60}^+ - \text{Ar}^+$ 共同濺射者起始訊號強度反而較小，推測其因素有二：其一為 Ar^+ 離子源易對分析物化學結構造成損傷，因此離子強度降低，尤其對高分子量離子影響更為明顯；另一則為 Ar^+ 離子源對 C_{60}^+ 離子源形成干擾，使其碎裂成較小的分子片段，而導致整體的濺射能量分散，濺射所得的訊號強度也隨之下降；其中尤以前者的影響較為顯著。

圖 4.19 分別比較 C_{60}^+ 、 C_{60}^+ 與 70 nA 之 Ar^+ 以及 C_{60}^+ 與 300 nA 之 Ar^+ 三組濺射離子源濺射 1 mol% 的勝肽-海藻糖混合塊材 30 分鐘間所得各勝肽相對於海藻糖的訊號強度比值。如圖所示，各勝肽於不同 Ar^+ 離子源通量與 C_{60}^+ 共同濺射下所得的訊號強度比值僅略微不同，幾乎可視為一致的數值。由此實驗與章節 4.1.1 中 Ar^+ 離子源無法產生分子量高於 300 amu 的分子離子訊號等資訊，可證實 Ar^+ 輔助濺射離子源於濺射分子量 300 amu 以上分子時，對其二次離子產率幾乎無任何貢獻。

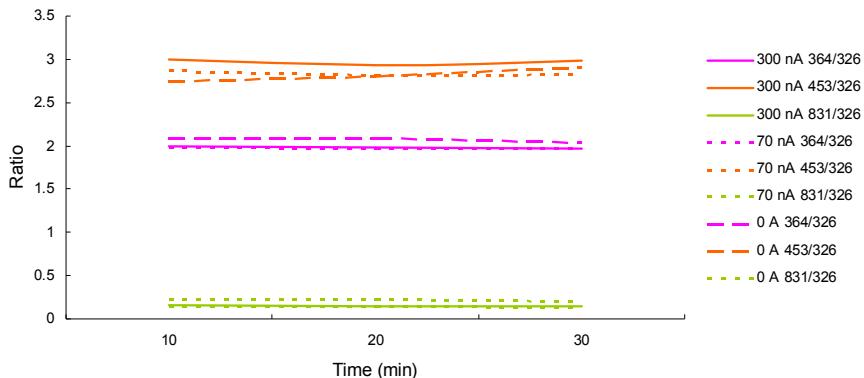


圖 4.19 各離子源濺射 1 mol% 的勝肽-海藻糖塊材得各勝肽相對於海藻糖的訊號強度比值變化圖

4.4.3 Ar^+ 離子源於濺射塊材時對定量分析穩定性的影響

因濺射離子源不同，濺射所得各勝肽相對於海藻糖之訊號強度比值會略有不同，故在此不討論使用 Ar^+ 離子源濺射與否，所得的訊號強度比值之數值差異，而只單純分析兩者所得的訊號強度比值隨時間變化對定量分析的影響。

圖 4.20(a)、(b)分別顯示由圖 4.14(a)、(b)縱深分佈分析圖中計算而得各勝肽相對於海藻糖之訊號強度比值趨勢圖。雖然如章節 4.3.1 中所提及，以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者在濺射開始後訊號大幅下降，且達到穩定濺射狀態的時間也較長，但因其海藻糖和大部分勝肽訊號於同時間內的衰減幅度大致相同，因此所得勝肽相對於海藻糖的訊號強度比值仍可維持平穩直線的變化趨勢，變動幅度小，尚屬於合理誤差範圍。如圖所示，無論 C_{60}^+ 輔以 Ar^+ 離子源與否，兩者大部份的訊號強度比值在濺射 2 小時內大致皆保持穩定直線變化。唯一不同之處在於高分子量的 Peptide L，即分子量 831 amu 的訊號，在此兩種濺射狀況下，其長時間之訊號強度衰減幅度皆大於海藻糖，因此所得相對於海藻糖的訊號強度比值隨濺射時間持續衰減，尤以單獨使用 C_{60}^+ 離子源濺射者影響較大，其濺射 2 小時後，與原定量點數值誤差可達 22 %；另一方面，以 $\text{C}_{60}^+-\text{Ar}^+$ 共同濺射者之 Peptide L 訊號於濺射 2 小時後，其定量點數值誤差約為 15 %，誤差相對較小。因此， C_{60}^+ 離子源較不適用於大分子長時間濺射的定量分析。

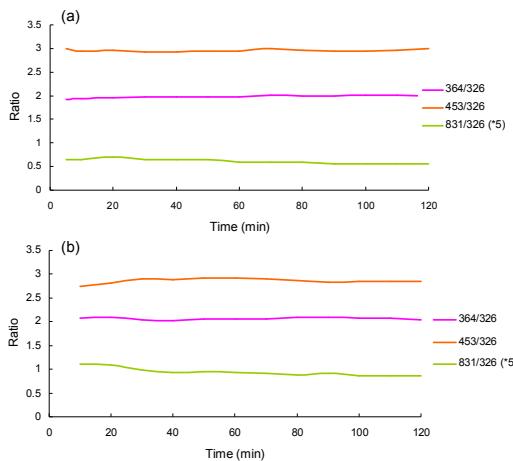


圖 4.20 濺射 1 mol%勝肽-海藻糖塊材 2 小時內所得各勝肽相對於海藻糖之訊號強度比值趨勢圖
(a) 以 $\text{C}_{60}^+-\text{Ar}^+$ 離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

4.5 胜肽-海藻糖薄膜的測定

4.5.1 使用掃描閘道(raster gating)對薄膜縱深分佈分析的影響

當離子源濺射材料表面時，會在表面形成一凹槽，若收集的訊號是來自於該凹槽邊緣時，其極有可能並非來自於與凹槽底部同深度，而是來自於較淺材料層的訊號，如此便會造成訊號判讀混亂，材料資訊失真，尤對多分層的薄膜影響更為嚴重。因此為克服該現象，於收集訊號時以掃描閘道限制收集範圍，使其小於離子源濺射範圍，即可避免收集到濺射凹槽邊緣的訊號，於進行縱深分佈分析時可提供縱深解析度較佳的資訊。

(一) 薄膜厚度小

圖 4.21(a)、(b)分別為 84 nm 之 0.5 mol% 胜肽-海藻糖薄膜使用與不使用掃描閘道所得的縱深分佈分析圖。兩者較大的不同在於界面的解析度，使用掃描閘道對於界面的判定較為明確，界面的訊號交換可於 3 分鐘內完成；另一方面，未使用掃描閘道所得的界面解析度稍差，訊號交換約需 4 分鐘完成，且所得訊號較為不穩定，上下跳動大。

(二) 薄膜厚度大

圖 4.22(a)、(b)分別為 504 nm 之 0.1 mol% 胜肽-海藻糖薄膜使用與不使用掃描閘道所得的縱深分佈分析圖。於厚度較大的薄膜，因 C_{60}^+ 離子濺射累積造成的表面不平整化，界面解析能力較差[58]，界面訊號交換需較久的時間，使用掃描閘道需時 6 分鐘；未使用者解析度更差，至少於 15 分鐘內訊號交換仍未完成，而無法定義界面範圍，另外其所得訊號更加不穩定。

由上述得知，不論薄膜厚度大小，使用掃描閘道皆可獲得較佳的界面解析度，可明確定義界面範圍，從而得知濺射時間並能精確計算濺射速率。在本論文中，對於薄膜的測定皆使用掃描閘道限制訊號收集範圍。

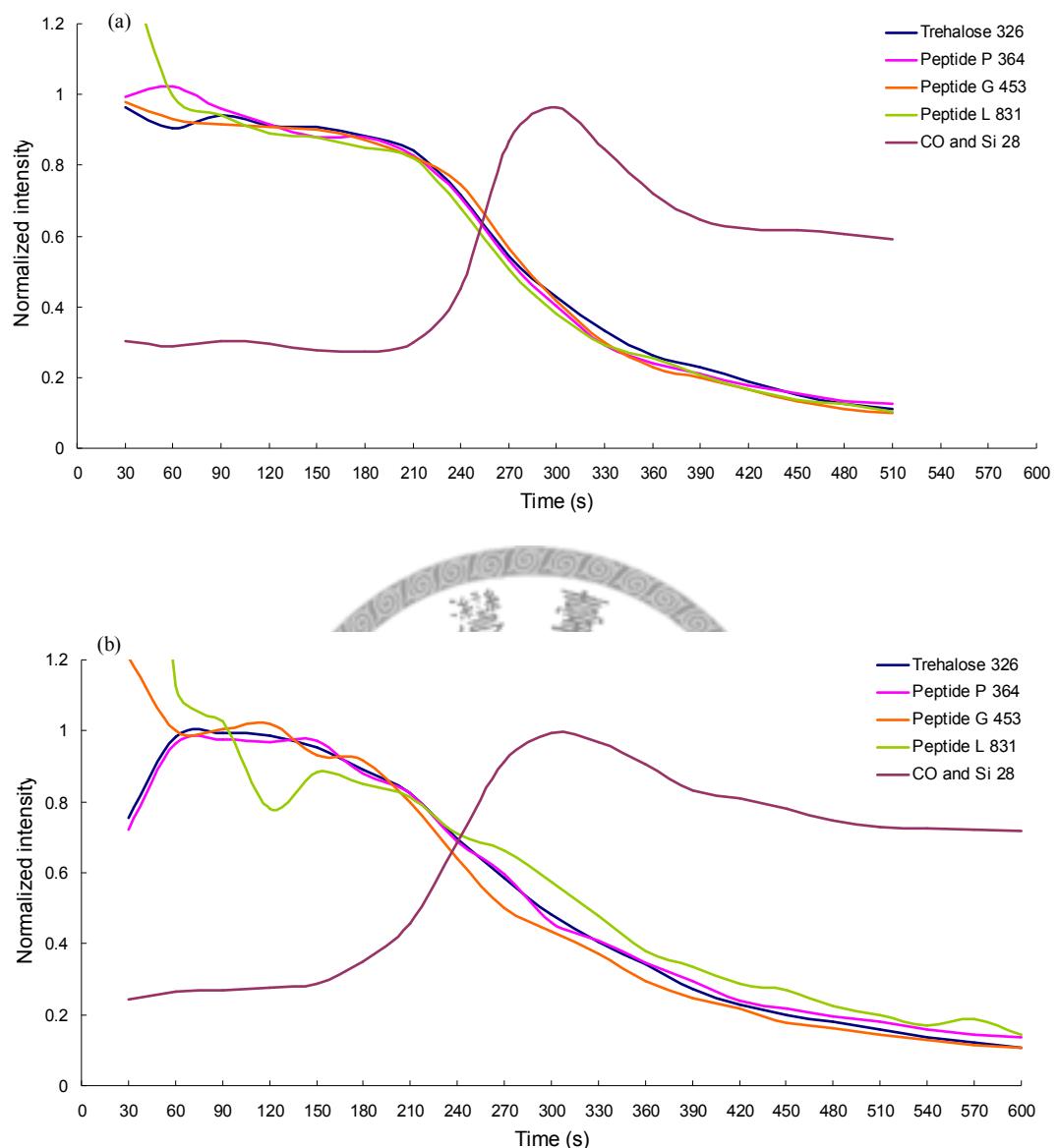


圖 4.21 84 nm 之 0.5 mol% 胜肽-海藻糖薄膜之縱深分佈分析圖

(a) 使用掃描閘道 (b) 未使用掃描閘道

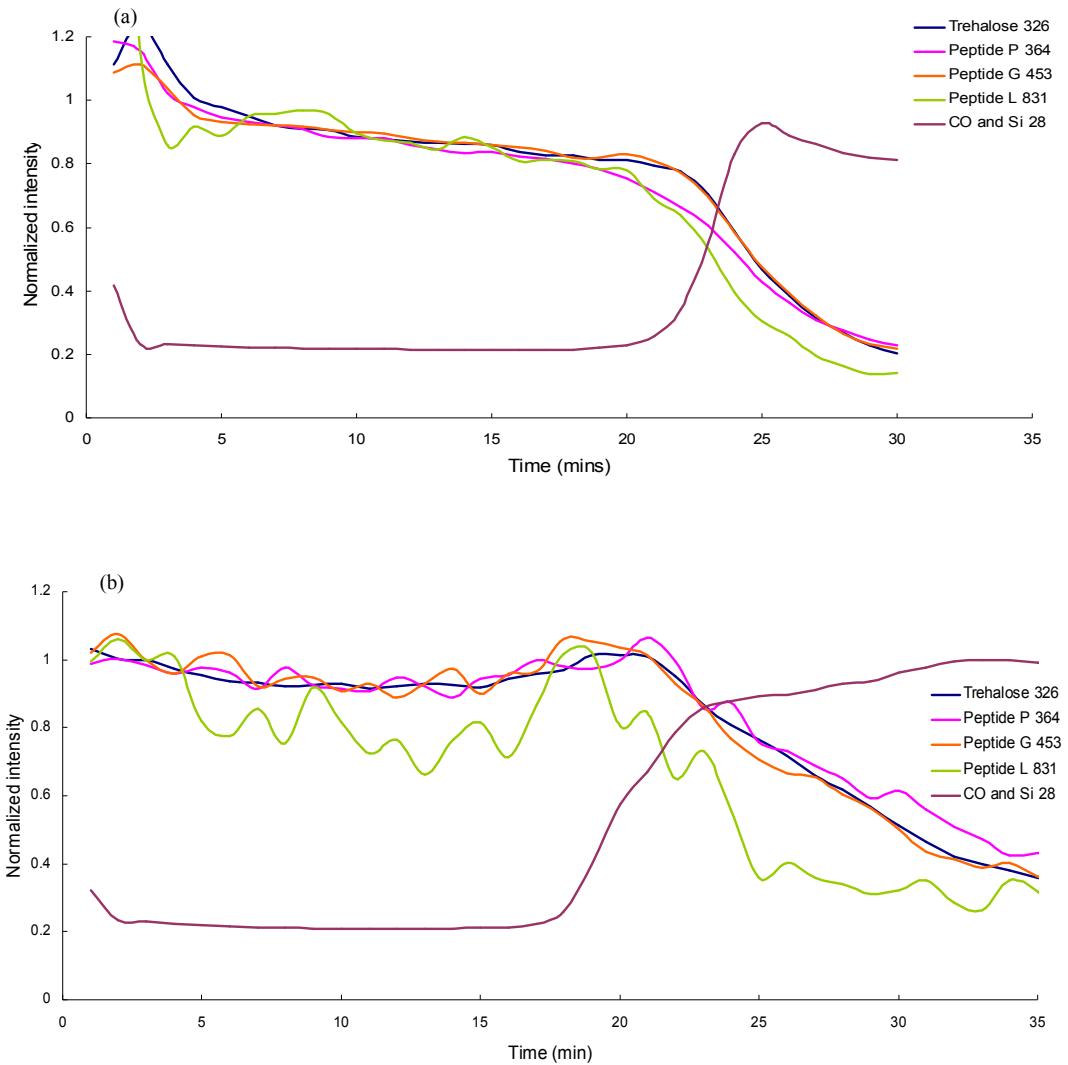


圖 4.22 504 nm 之 0.1 mol% 胜肽-海藻糖薄膜之縱深分佈分析圖

(a) 使用掃描閘道 (b) 未使用掃描閘道

4.5.2 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射與單獨以 C_{60}^+ 離子源濺射對薄膜訊號穩定性的比較

圖 4.23(a)、(b)為由 0.5 mol% 胜肽-海藻糖混合溶液以旋轉塗佈法所製而成之 94 nm 薄膜，分別以 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射以及 C_{60}^+ 離子源單獨濺射所得的縱深分佈分析圖。由於製備出的薄膜厚度遠較塊材小，受濺射後大部份薄膜皆可在十分鐘內被打穿，因濺射時間短，如濺射塊材時之訊號衰減的對比在此則不易觀察到，因此特將圖 4.23 的訊號強度作標準化處理，可直接比較兩者訊號衰減的幅度。以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者，其訊號維持的穩定度較不如 C_{60}^+ - Ar^+ 離子源共同濺射者，部分訊號強度在濺射到達薄膜與矽基材界面前就有提前持續下降的趨

勢，尤以低訊號強度的 Peptide L，即來自分子破片 831 amu 的訊號降幅較為嚴重，此點也與濺射塊材時的實驗結果一致。而以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射者，訊號大致可維持平穩，雖然來自 Peptide L 之 831 amu 訊號較不穩定，但其變動幅度不大，影響較小。

此外，兩者另一不同點在於薄膜與矽基材間界面的解析度，以 C_{60}^+ -Ar⁺共同濺射者對有機分析物造成的粗糙度較小[58]，對於解析度的破壞較為輕微，因此對於界面的界定較為明確，界面的訊號交替大約於 2 分鐘內完成，可較精確定義濺射時間及速率。而以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者，界面的訊號交替約需 3 分半鐘才完成，其界面的輪廓較模糊，連帶影響判斷濺射時間及速率的準確性。

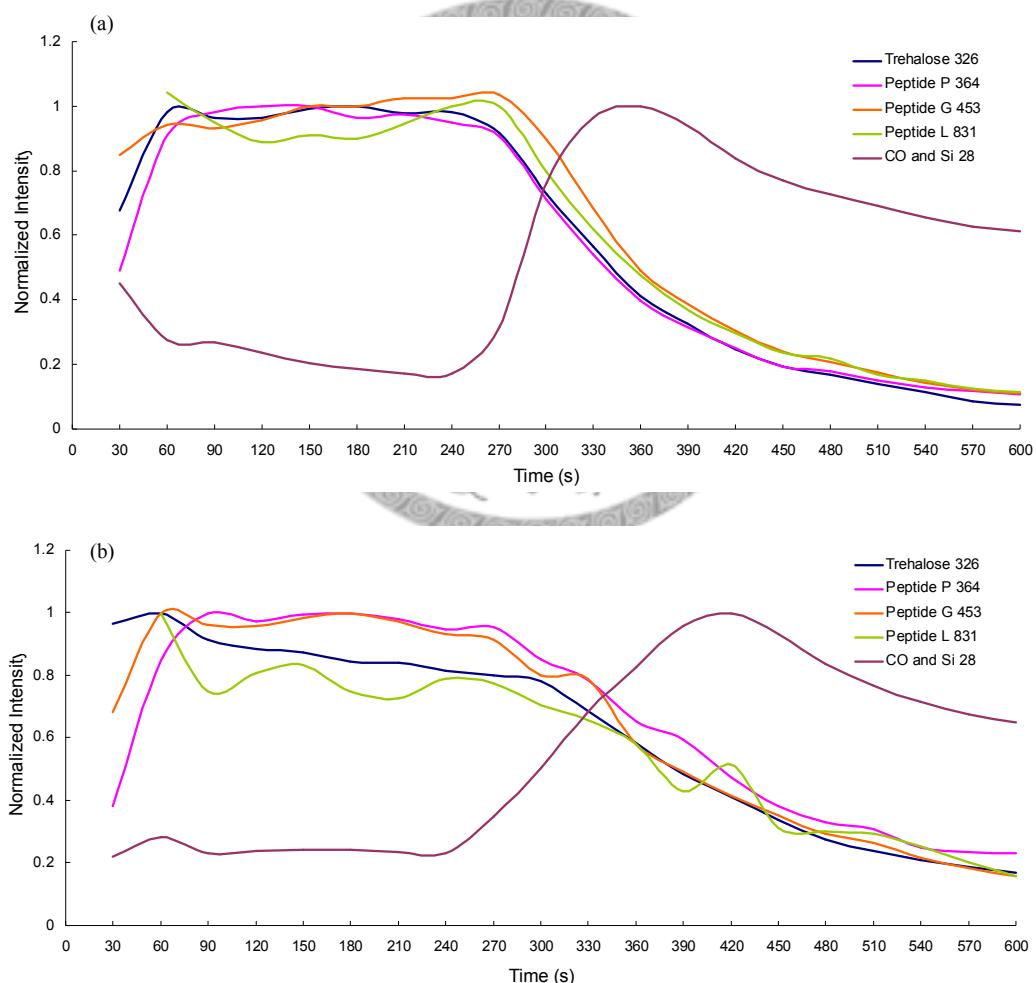


圖 4.23 0.5 mol%胜肽-海藻糖之 94 nm 薄膜縱深分佈分析圖(經標準化處理)

(a)以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射

另一方面，對於濺射較厚的分析物而言，圖 4.24(a)、(b)顯示由 0.1 mol% 胜肽-海藻糖混合溶液塗佈而成的 460 nm 薄膜，分別以 $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源及 C_{60}^+ 離子源濺射所得的縱深分佈分析圖。與濺射厚度較小的薄膜時之情況相似，以 $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源濺射者，至界面前，各分子特徵訊號皆維持平穩而緩慢下降之趨勢，至界面後，除了 Peptide L 之 831 amu 訊號之降幅較急遽外，其餘各分子特徵訊號大致皆維持相同降幅；另外，其界面訊號交替約可於 10 分鐘內完成。

而以 C_{60}^+ 離子源濺射者，至界面前，各分子特徵訊號已有明顯下降的現象，亦以 Peptide L 之 831 amu 訊號最為嚴重；其界面因訊號交替十分不顯著，其訊號交替遲至 20 分鐘以上才完成，界面位置判斷不易。

綜觀而言，不同濺射離子源對薄膜的濺射分析的結果，與濺射塊材時類似，皆以 $C_{60}^+-Ar^+$ 離子源共同濺射所得訊號遠較 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者來得穩定。 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者，除了會對高分子量的 Peptide L 訊號造成不穩定的顯著降幅之外，因碳沉積速度逐漸與濺射速率一致，濺射能力受阻，界面訊號交替時間過久，界面輪廓不明顯，連帶影響濺射速率之判斷與縱深分佈分析之精準度，尤以濺射厚度較大的分析物時更為嚴重。

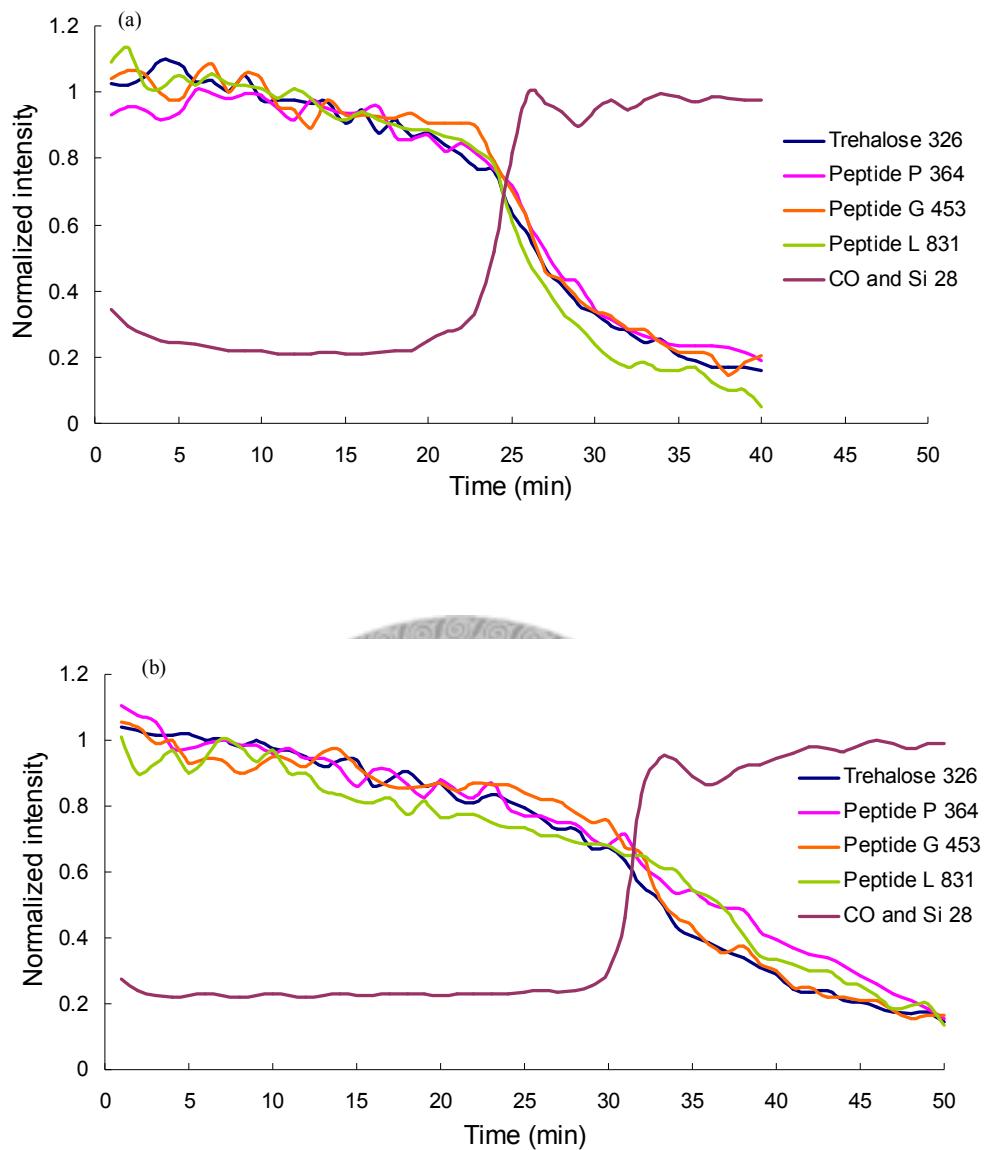


圖 4.24 0.1 mol% 胜肽-海藻糖之 460 nm 薄膜縱深分佈分析圖(經標準化處理)

(a)以 C₆₀⁺-Ar⁺離子源共同濺射 (b)以 C₆₀⁺離子源單獨濺射

4.5.3 薄膜組成元素分析

圖 4.25 為圖 4.23(a)之未經標準化處理的原圖，是由 0.5 mol% 胜肽-海藻糖混合溶液經旋轉塗佈法於矽基材上製成的 94 nm 薄膜。作為偵測矽基材訊號的分子量 28 amu 於濺射開始時即有很強的訊號，其主要是來自濺射有機分子時易飛濺出的 CO 分子破片，因此此時的 28 amu 訊號並非代表矽基材，以 X-ray 光電子能譜儀(XPS) 記錄濺射前的元素束縛能圖，如圖 4.26 所示，證實薄膜只含有碳及氧的元素訊號，而無矽元素分布。隨後濺射至薄膜與矽基材界面時，來自 28 amu 訊號迅速大幅上升，此訊號除了來自殘留的 CO 分子外，亦受到矽基材表面的二氧化矽影響，其中的氧分子可促使 Si 正離子增加，因此可強化 Si 訊號。待表面氧化物皆已清除完畢，強化因子消失，訊號小幅下降，最後隨薄膜被濺射殆盡，訊號逐漸平緩持平，代表可飛濺出 CO 的分子破片也已幾近消耗完畢，主要的 28 amu 訊號來源就只剩下矽基材。

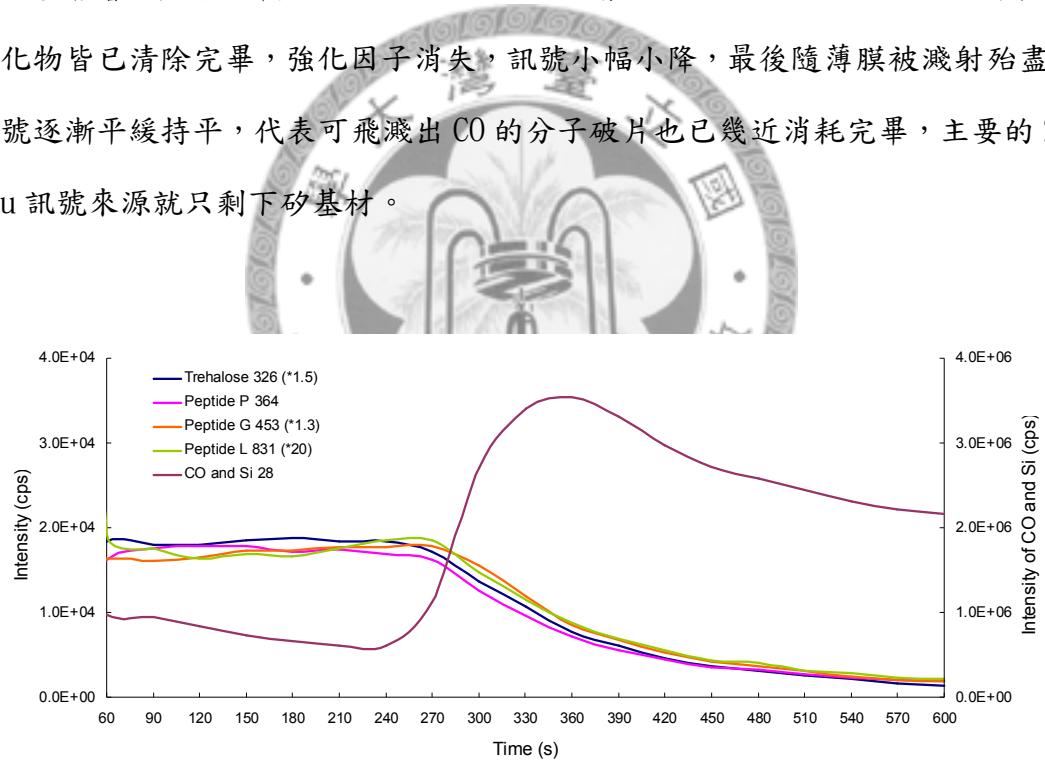


圖 4.25 以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射，0.5 mol% 胜肽-海藻糖之 94 nm 薄膜縱深分佈分析原圖

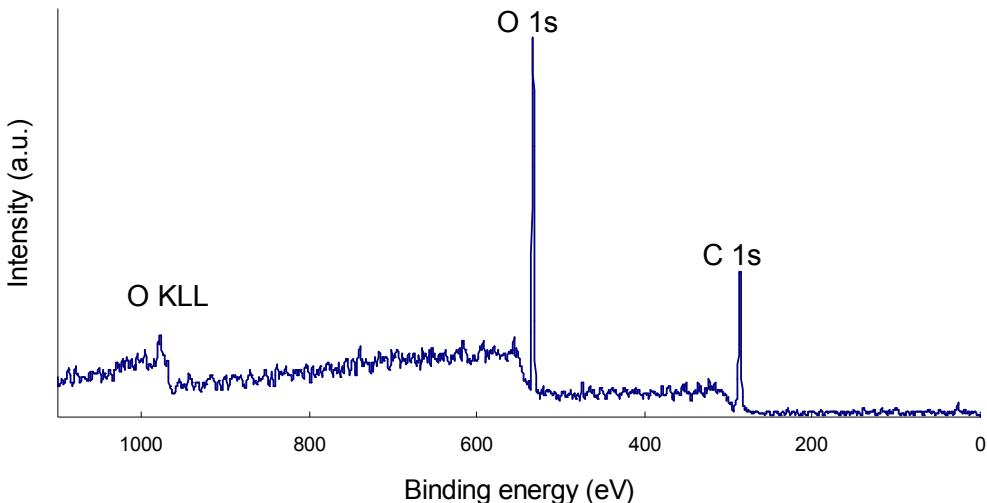


圖 4.26 以 XPS 於濺射開始時偵測薄膜樣品所含元素圖

4.5.4 薄膜厚度與濺射速率測定

各薄膜試片製備完成後，以橢圓儀測定薄膜厚度，隨後即以 SIMS 進行濺射及訊號收集，以胜肽及海藻糖下降訊號與矽基材上升訊號的交界處作為薄膜與矽基材的界面，並由此計算濺射時間及速率。表 4.2 顯示測得各薄膜試片的厚度及以 $C_{60}^+ - Ar^+$ 離子源共同濺射之速率，平均濺射速率為 18.9 nm/min 。

Concentration	(0.1,0.1,0.1)	(0.1,0.1,0.1)	(0.1,0.1,0.1)	(0.1,0.1,0.1)	(0.1,0.1,0.1)	(0.5,0.5,0.5)	(1,2.5, 0.01)	(0.5,1,0.1)
(P,GL) in mol%								
Thin film								
thickness(nm)	77	71	75	504	460	94	77	81
Sputtering rate								
(nm/min)	19.25	17.75	18.75	21.45	18.4	18.8	17.91	18.84
Average					18.9			
Sputtering rate								
(nm/min)								

表 4.2 實驗所得各薄膜厚度及濺射速率一覽表

另一方面，相較於 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同濺射時，不論分析物厚薄，大致皆可得穩定的濺射速率，單獨使用 C_{60}^+ 離子源濺射時，在厚薄不同(94 及 460 nm)兩樣品分析中，分別測得 17 與 14.4 nm/min 的濺射速率，如圖 4.23(b)與圖 4.24(b)所示。顯示單獨使用 C_{60}^+ 離子源濺射分析較厚的分析物時，因碳沉積的影響，當碳沉積速率與濺射速率達成平衡時，後續濺射受阻，無法繼續使分析物分子飛濺出來，因此濺射速率下降。有鑑於此， C_{60}^+ 離子源單獨濺射因無法維持穩定的濺射速率，尤不適用於厚分析物的縱深分佈分析。

4.5.5 Ar⁺離子源於濺射薄膜時對定量分析穩定性的影響

圖 4.27(a)、(b)分別顯示由圖 4.23(a)、(b)縱深分佈分析圖中，至薄膜界面前計算而得各勝肽相對於海藻糖之訊號強度比值趨勢圖。其中，以 C_{60}^+ 及 Ar⁺離子源共同濺射者於有效薄膜濺射時間內所得的強度比值大致維持平穩，變動幅度極小。另一方面，以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者如章節 4.5.2 所述，部分訊號強度容易在濺射尚未到達界面時即提前衰落，訊號維持度不佳，因此所得的強度比值也不如前者穩定。綜觀而言，以 C_{60}^+ 離子源單獨濺射者於濺射薄膜時各分子訊號的降幅變化較不若濺射塊材時一致，導致定量分析的精確度降低，推測可能是由於薄膜厚度小，原本可被濺射飛濺出的二次離子受到 C_{60}^+ 離子源濺射造成之碳沉積干擾更為顯著，因此偵測到的訊號變動幅度大。

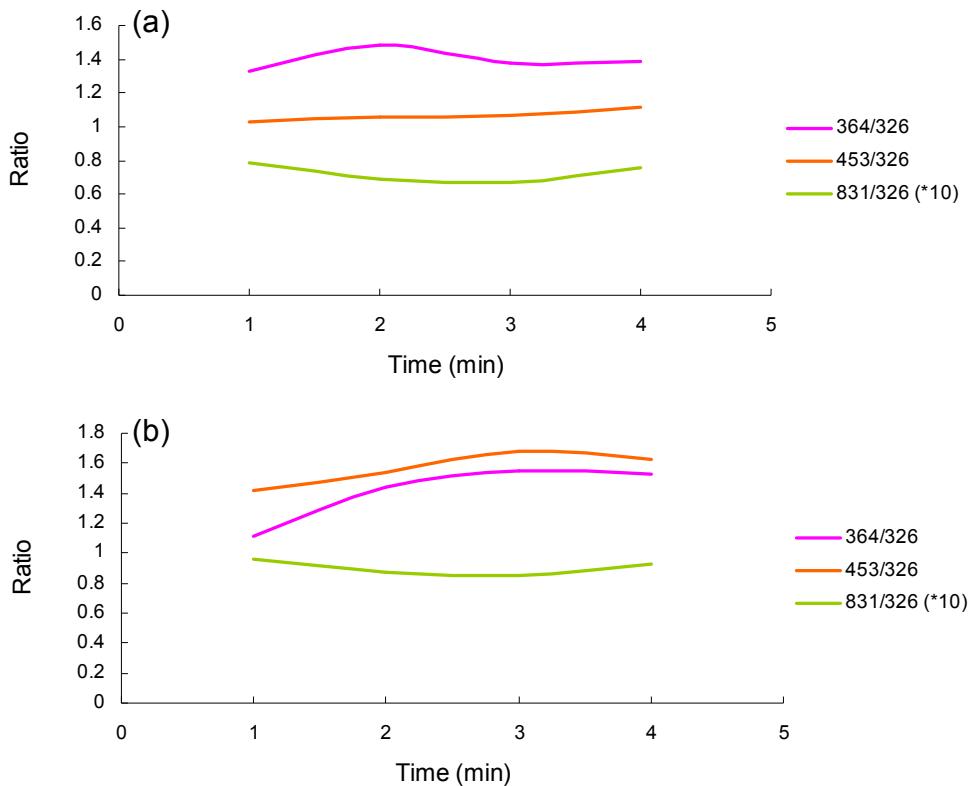


圖 4.27 滅射 0.5 mol%胜肽-海藻糖薄膜達界面前得各胜肽相對於海藻糖之訊號強度比值趨勢圖
 (a)以 C_{60}^+ -Ar⁺離子源共同滅射 (b)以 C_{60}^+ 離子源單獨滅射

4.5.6 胜肽摻雜之海藻糖薄膜定量分析測試

圖 4.28(a)、(b)、(c)分別為四種濃度比例的胜肽-海藻糖薄膜之測試樣品所得訊號強度比值與 Peptide P、Peptide G 及 Peptide L 校正曲線的比較圖。於本實驗中，將摻雜全部三種胜肽的海藻糖薄膜樣品的定量點與摻雜單一胜肽的校正曲線做比對，如圖所示，四測試樣品所得各胜肽相對於海藻糖之訊號強度比值，大致皆與各胜肽的定量校正曲線相吻合。此結果證實在摻雜多種胜肽的情況下，其各胜肽分子特定摻雜濃度的定量點，仍可符合定量校正曲線，顯示於薄膜樣品中亦可達成胜肽分子於糖類基質中的平行偵測及定量分析。

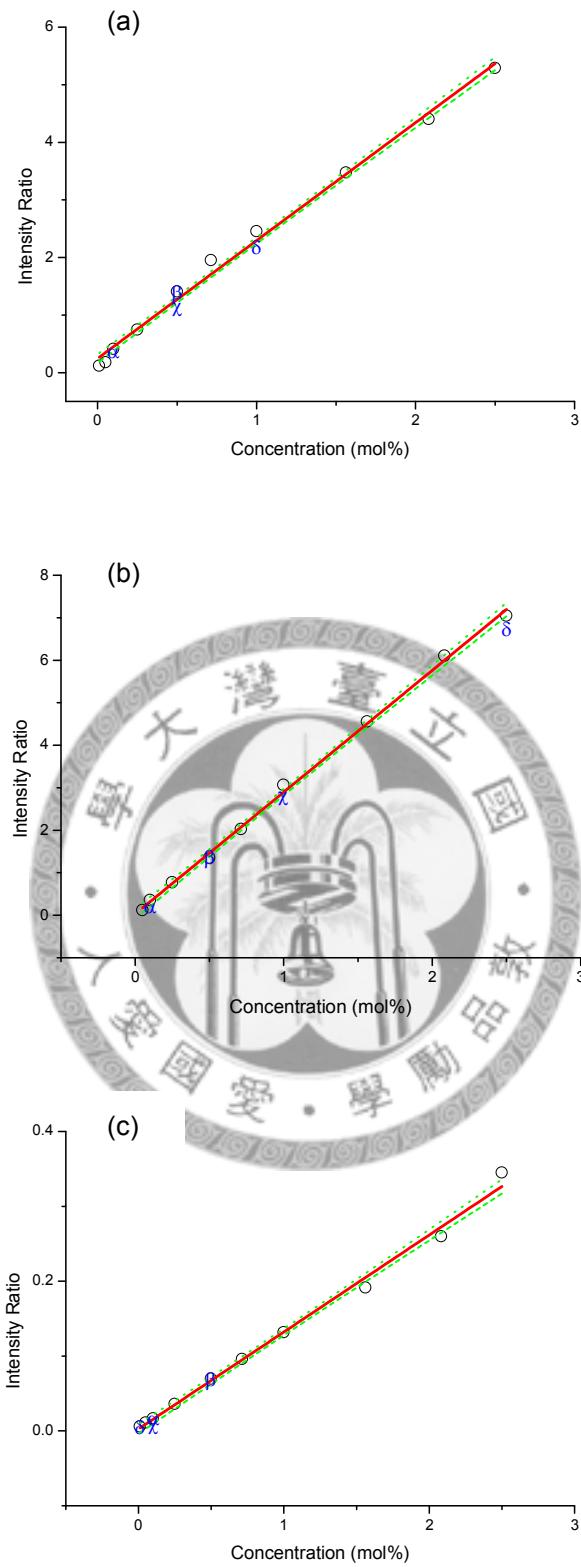


圖 4.28 各濃度比例胜肽-海藻糖薄膜之測試樣品所得訊號強度比值與

(a) Peptide P (b)Peptide G (c)Peptide L 之校正曲線的比較圖

(α β δ χ 分別代表各胜肽分子不同摻雜濃度的測試樣品之定量點)

第五章 結論

1. 以二次離子質譜儀偵測摻雜三種胜肽的海藻糖基質，藉由分子量分析，皆可於正離子質譜中分別找出相對應質量的胜肽與海藻糖訊號，顯示二次離子質譜儀確實可作為生物性分子定性分析之用。
2. 將各摻雜比例的三種胜肽分子之二次離子訊號強度分別對海藻糖基質之訊號作標準化處理，得到各胜肽對於對於海藻糖基質的含量校正曲線，以此為基礎，對未知胜肽摻雜比例的海藻糖試片進行平行偵測，由收集到各胜肽經標準化處理的二次離子訊號強度，對照各胜肽的校正曲線，即可迅速推算出該試片各胜肽的摻雜含量與濃度。實驗試片測試的結果大致皆與校正曲線一致，證實以二次離子質譜儀技術可作為生物性分子定量分析的應用。
3. 使用 $C_{60}^+ - Ar^+$ 共同濺射離子源進行濺射時，較單獨使用 C_{60}^+ 細子更快達到穩定的濺射狀態，且訊號在長時間濺射下也僅有小幅度衰減，整體訊號穩定度皆較 C_{60}^+ 細子單獨濺射時為高； C_{60}^+ 細子濺射對高分子量的二次離子訊號維持度尤為不利。造成此差別的主要原因在於低能量的 Ar^+ 細子源將可抑制 C_{60}^+ 細子濺射造成表面碳沉積的現象且能緩慢移除此積碳，以使後續濺射分析能持續進行， Ar^+ 細子源設定於 0.2 kV 與 300 nA 時效果最佳。此技術於進行縱深分佈分析尤為有利。
4. $C_{60}^+ - Ar^+$ 共同濺射與 C_{60}^+ 細子單獨濺射在定性分析上幾乎一致；對於短時間內的定量分析也無太大差別，但就長時間或厚分析物的定量分析而言， C_{60}^+ 細子單獨濺射對於維持高分子量二次離子訊號的穩定度不佳，造成定量分析結果誤差過大，因此並不適用於此類分析。
5. $C_{60}^+ - Ar^+$ 共同濺射之速率不論於分析厚或薄試片時大致皆維持定值；反觀而言， C_{60}^+ 細子單獨濺射於分析厚試片時的濺射速率較薄試片為低，濺射速率受積碳影響而下降。此外，於分析薄膜試片時， $C_{60}^+ - Ar^+$ 共同濺射者對於界面的界定較

為明確，界面解析度高，可提高判斷濺射時間及速率的精確度。此再次證明 $C_{60}^+ - Ar^+$ 共同濺射技術於進行縱深分佈分析時頗具實用價值。



參考文獻

1. M. Karas, et al, *Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules*. Analytical Chemistry, 1985. **57**(14): p.2935–2939.
2. M. Karas, , et al, *Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1987. **78**: p.53–68.
3. K. Tanaka, et al, *Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1988. **2**(8): p.151–153.
4. J.E. Delmore, et al, *Tube ion source for the study of chemical effects in surface ionization*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1991. **108**(2-3): p.179-187.
5. F. Kötter and A. Benninghoven, *Secondary ion emission from polymer surfaces under Ar⁺, Xe⁺ and SF₅⁺ ion bombardment*. Applied Surface Science, 1998. **133**(1-2): p.47-57.
6. K. Boussofiane-Baudin, et al, *Secondary ion emission under cluster impact at low energies (5–60 keV); influence of the number of atoms in the projectile*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, 1994. **88**(1-2): p.160-163.
7. Y. Le Beyec, *Cluster impacts at keV and MeV energies: Secondary emission phenomena*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1998. **174**(1-3): p.101-117.
8. Bang-Ying Yu, et al, *Sputter Damage in Si (001) Surface by Combination of C₆₀⁺ and Ar⁺ Ion Beams*. Applied Surface Sciences, 2008. **255**(5): p.2490-2493.
9. Yu-Chin Lin, et al, *Sputter-Induced Chemical Transformation in Oxoanions by Combination of C₆₀⁺ and Ar⁺ Ion Beams Analyzed with X-ray Photoelectron Spectrometry*. Analyst, 2009. **134** (5): p.945-951.
10. Douglas A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, third edition. Saunders college publishing, 1984. Chapter.18: p.528-529.
11. Douglas A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, third edition. Saunders college publishing, 1984. Chapter.18: p.529-530.
12. Douglas A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, third edition. Saunders college publishing, 1984. Chapter.18: p.530-531.
13. H.D. Beckey, *Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility*. International Journal of Mass

- Spectrometry and Ion Physics, 1969. **2**(6): p.500-502.
- 14. H.U. Winkler and H.D. Beckey, *Field desorption mass spectrometry of peptides*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1972. **46**(2): p.391-398.
 - 15. J. B. Fenn, et al, *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p.64-71.
 - 16. L. Konermann and D. J. Douglas, *Equilibrium unfolding of proteins monitored by electrospray ionization mass spectrometry: Distinguishing two-state from multi-state transitions*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1998. **12** (8): p.435–442.
 - 17. M. Karas and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(20): p.2299–2301.
 - 18. R.C. Beavis and B.T. Chait, *Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1989. **3**(12): p.436–439.
 - 19. M. Karas and U. Bahr, *Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules*. Trends in Analytical Chemistry, 1990. **9**(10): p.321–325.
 - 20. H.R. Morris, et al, *Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1981. **101**(2): p.623–631.
 - 21. M. Barber, et al, Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1981. (7): p.325–327.
 - 22. D. F. Torgerson, et al, *New approach to the mass spectroscopy of non-volatile compounds*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1974. **60**(2): p.616-621.
 - 23. R.D. Macfarlane and D.F. Torgerson, *Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy*. Science, 1976. **191**(4230): p.920-925.
 - 24. R. G. Cooks, et al, *Advances in Mass Spectrometry*, Longevaille, P., Ed.; Heyden & Son: London, 1989. Vol. 11A.
 - 25. K. J. Wu and R. W. Odom, *Matrix-enhanced secondary ion mass spectrometry: a method for molecular analysis of solid surfaces*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(5): p.873-882.
 - 26. L. Adriaensen, et al, *Matrix-enhanced secondary ion mass spectrometry: the influence of MALDI matrices on molecular ion yields of thin organic*

- films.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(8): p.1017-1024.
- 27. B. Hagenhoff, et al, *ToF-SIMS: Surface Analysis by Mass Spectrometry*, IM Publications and SurfaceSpectra Limited, 2001. p.285-308.
 - 28. H. Nygren, et al, *A cell preparation method allowing subcellular localization of cholesterol and phosphocholine with imaging TOF-SIMS*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **30**: p.87- 92.
 - 29. Vasil Vorsa, et al, *Femtosecond photoionization of ion beam desorbed aliphatic and aromatic amino acids: fragmentation via α -cleavage reactions*. The Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(37): p.7889-7895.
 - 30. K. Wittmaack, *Secondary-ion emission from silicon bombarded with atomic and molecular noble-gas ions*. Surface Science, 1979. **90**(2): p.557-563.
 - 31. S.S. Johar and D.A. Thompson, *Spike effects in heavy-ion sputtering of Ag, Au and Pt thin films*. Surface Science, 1979. **90**(2): p.319-330.
 - 32. H. H. Andersen and H. L. Bay, *Nonlinear effects in heavy-ion sputtering*. Journal of Applied Physics, 1974. **45**(2): p.953-954.
 - 33. M.G. Blain, et al, *A new experimental method for determining secondary ion yields from surfaces bombarded by complex heterogeneous ions*. Journal of Vacuum Science & Technology A, 1990. **8**(3): p.2265-2268.
 - 34. Z. Postawa, et al, *Enhancement of sputtering yields due to C_{60} versus Ga bombardment of Ag{111} as explored by molecular dynamics simulations*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p.4402-4407.
 - 35. Z. Postawa, et al, *Microscopic Insights into the Sputtering of Ag{111} Induced by C_{60} and Ga Bombardment*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(23): p.7831-7838.
 - 36. John S. Fletcher, et al, *C_{60} , buckminsterfullerene: its impact on biological ToF-SIMS analysis*. Surface and Interface Analysis, 2006. **38**(11): p.1393-1400.
 - 37. H.W. Kroto, et al, *C_{60} : Buckminsterfullerene*. Nature, 1985. **318** (6042): p.162–163.
 - 38. Michael J. Van Stipdonk, et al, *A Comparison of Desorption Yields from C_{60} to Atomic and Polyatomic Projectiles at keV Energies*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1996. **10**(15): p.1987-1991.
 - 39. S.C.C. Wong, et al, *Development of a C_{60}^+ ion gun for static SIMS and chemical imaging*. Applied Surface Science, 2003. **203-204**: p.219-222.
 - 40. D. Weibel, et al, *A C_{60} Primary Ion Beam System for Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Its Development and Secondary Ion Yield Characteristics*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(7): p.1754-1764.

41. N. Sanada, et al, *Extremely low sputtering degradation of polytetrafluoroethylene by C₆₀ ion beam applied in XPS analysis*. Surface and Interface Analysis, 2004. **36**(3): p.280-282.
42. R. Kersting, et al, *Influence of primary ion bombardment conditions on the emission of molecular secondary ions*. Applied Surface Science, 2004. **231-232**: p.261-264.
43. A. Tempez, et al, *Orthogonal time-of-flight secondary ion mass spectrometric analysis of peptides using large gold clusters as primary ions*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(4): p.371-376.
44. D. E. Weibei, et al, *C₆₀ cluster ion bombardment of organic surfaces*. Applied Surface Science, 2004. **231-232**: p.146-152.
45. E.A. Jones, et al, *ToF-SIMS analysis of bio-systems: Are polyatomic primary ions the solution?* Applied Surface Science, 2006. **252**(19): p.6844-6854.
46. G. Gillen, et al, *Depth profiling using C₆₀⁺ SIMS—deposition and topography development during bombardment of silicon*. Applied Surface Science, 2006. **252**(19): p.6521-6525.
47. N. Davies, et al, *Development and experimental application of a gold liquid metal ion source*. Applied Surface Science, 2003. **203-204**: p.223-227.
48. D. Touboul, et al, *Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(10): p. 1608-1618.
49. S. parry and N. Winograd, *High-resolution ToF-SIMS imaging of eukaryotic cells preserved in a trehalose matrix*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(24): p.7950-7957.
50. John S. Fletcher, et al, *ToF-SIMS 3D biomolecular imaging of xenopus laevis oocytes using buckminsterfullerene (C₆₀) primary ions*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(6): p.2199-2206.
51. A. Wucher, et al, *Molecular depth profiling of histamine in ice using a buckminsterfullerene probe*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(24): p.7234-7242.
52. A. Wucher, et al, *Molecular depth profiling in ice matrices using C₆₀ projectiles*. Applied Surface Science, 2004. **231-232**: p.68-71.
53. J. Cheng and N. Winograd, *Depth profiling of peptide films with TOF-SIMS and a C₆₀ probe*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(11): p.3651–3659.
54. Y. Y. Chen, et al, *X-ray photoelectron spectrometry depth profiling of organic thin films using C₆₀ sputtering*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(2): p.501-505.
55. W.C. Lin, et al, *The role of the auxiliary atomic ion beam in C₆₀⁺-Ar⁺ co-sputtering*. Analyst, 2011. **136**(5): p.941-946.

56. B. Y. Yu, et al, *Depth profiling of organic films with X-ray photoelectron spectroscopy using C_{60}^+ and Ar^+ co-sputtering*. Analytical Chemistry, 2008. **80** (9): p. 3412-3415.
57. B.Y. Yu, et al, *Effect of fabrication parameters on three-dimensional nanostructures and device efficiency of polymer light-emitting diodes*. ACS NANO, 2010. **4**(5): p.2547-2554.
58. Y. W. You, et al, *Molecular Dynamic-Secondary Ion Mass Spectrometry (D-SIMS) Excited by C_{60}^+ - Ar^+ Co-Sputtering*. Journal of the American Society of Mass Spectrometry (submitted on 2011/4/2).
59. Wikimedia Commons. SIMS - Secondary Ion Mass Spectrometry, instrument scheme.
60. Douglas A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, third edition. Saunders college publishing, 1984. Chapter.18: p.536, Figure 18-10.
61. Douglas A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, third edition. Saunders college publishing, 1984. Chapter.18: p.532, Figure 18-5.
62. Douglas A. Skoog, *Principles of instrumental analysis*, third edition. Saunders college publishing, 1984. Chapter.18: p.534, Figure 18-8.
63. Website on Electro-Optics Research Center, University of Texas at Arlington. Research - Ellipsometry - schematic of the geometry of an ellipsometry experiment.

