

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

螢光微光譜術之研發與奈米結構元件之應用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2213-E-002-085-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 10 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學電機工程學系暨研究所

計畫主持人：詹國禎

計畫參與人員：林淵翔、詹益鑑、陳彥宇、郭文娟、成佳憲、廖克槃

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 2 月 5 日

計畫名稱：螢光微光譜術之研發與奈米結構元件之應用

Title: Development of micro-imaging techniques and applications on nano-structure devices

摘要

本計畫以螢光光譜、調制光譜以及雷射激發之螢光顯微量測系統，進行奈米結構的材料與元件的光學性質研究。奈米結構以掃瞄式探針顯微術描繪其型態尺寸及分佈，並以螢光光譜及光調制反射率光譜進行電子態的光躍遷能值量測。使用螢光或調制顯微影像術，配合非接觸式、非侵入式的光學量測，對於化學或生物奈米結構的光學性質與高空間解析的微影像技術，提供極有用的物理、生化及生物機制的信息，將能夠發展成具有應用潛力的診斷工具。

關鍵詞：螢光光譜、光調制反射率光譜、奈米結構、螢光顯微影像、共焦顯微術

Abstract

In this study, we develop micro-imaging techniques such as confocal microscopy and differential confocal microscopy systems combining with photoluminescence (PL) and photoreflectance (PR) spectroscopic systems. These techniques are used to study the optical properties of the nano-structure materials and devices such as InAs/GaAs quantum dots (QDs) and biological nano-structure specimens. We employ the scanning probe microscope (SPM) to observe the morphologic structures of the nano-structure devices' surface, and to measure the size, shape and distribution. The results provide important information about physical, chemical and biological mechanism, and it would extend the potential applications on biological field of these powerful diagnostic tools.

Keywords: photoluminescence, photoreflectance, nano-structure, PL-microspectroscopy, confocal microscopy

報告內容

一、動機與目的

生物科技結合奈米結構材料及元件，是具有前瞻性與高經濟價值的科技研究重點，而量子結構材質的基座與生物流體樣本之檢測已熱烈進行研究。奈米結構材料對優質物性的改變均有重大的影響，而奈米尺寸元件對於機械力學、光學、熱學、電學、磁學，甚至是量子光學等方面，有著高附加價值的應用。其中半導體元件如奈米尺寸的二維的量子井，一維的量子線、奈米管以及零維的量子點，在微電子、光電領域（如光感測與發光元件）有著極優良的特性與效益。目前對於生物分子樣品與量子尺寸元件間之作用力，物理化學與生物間之機制仍未明確了解，對本課題的基本機制及研發技術急需進行研究，才有可能實現生化奈米結構元件之於產品化。

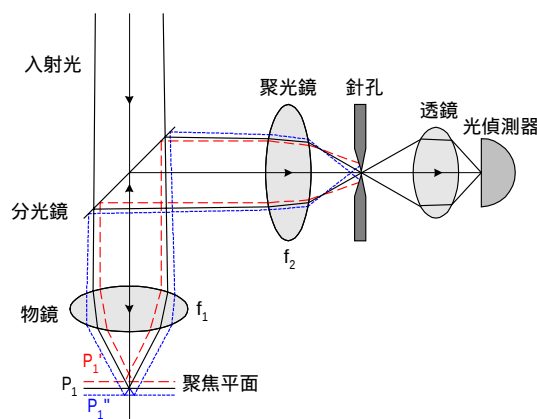
本研究以光學式顯微影像技術應用於奈米結構及元件的光學性質研究。光學顯微影像技術應用的目標，是設計及研發螢光共焦顯微量測系統，應用於微米尺寸的幾何形狀之觀察及度量；以非侵入、無接觸、無傷害的方法，實際觀察生物組織、細胞的機械結構，並配合螢光光譜技術，建置一套螢光微影像光譜術（PL-microspectroscopy）系統。本研究所規劃建立的掃描式共焦顯微系統需符合下列目標：光學切片能力、高空間解析度、高訊雜比、好的影像品質與高掃描速度。在發展初期以前三項為主，待此三方面均達到水準後，再改善掃描速度，達到快速成像的目標。

量子元件光學性質之研究，利用本系的氣相分子磊晶成長術（gas source molecular beam epitaxy；GS-MBE）以成長 III-V 族材料，主要是以砷化鎵為基材去成長量子井、量子點的元件，以光譜、調制光譜，研究其光學性質，並配合顯微影像技術以觀測其幾何形貌，度量其量子點之幾何尺寸、分布情形，進行量子尺寸之電子態間躍遷的光學躍遷能量與空間相關性，希望能對高品質、高密度及高均勻度的量子點成長之變因，如成長溫度、時間、成分、壓力、III-V 元素比值以及成長腔內熱處理的參數，進行系統性的研究。此量子元件可提供 1.3 μm 至 1.5 μm 波長的雷射光源或紅外線感測器，而此波長頻帶是水分子的低吸收頻帶，對於生物細胞或組織的觀測與研究非常適用。

二、原理與方法

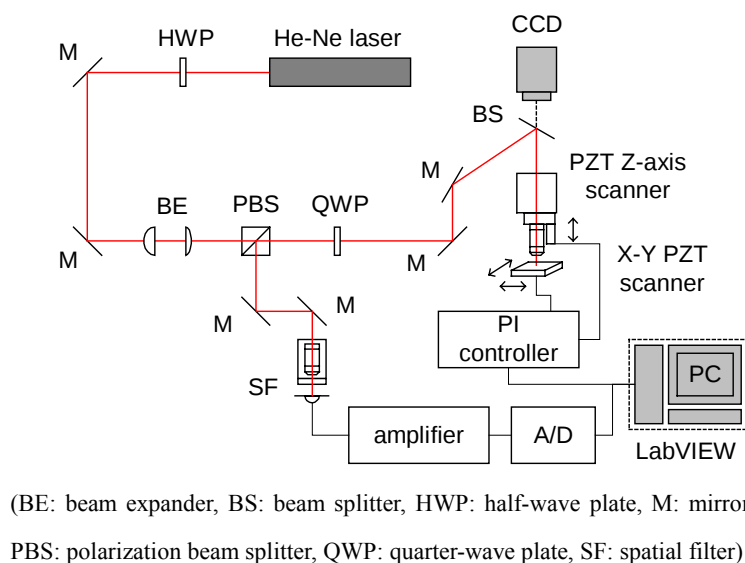
1. 顯微影像技術之研發－共焦顯微術平台

共焦顯微術的原理示意圖如下頁圖一所示。當入射光束經物鏡聚焦於焦平面後，樣品的反射、散射或受激發螢光等各類光子，經物鏡收集、分光鏡分光與聚焦透鏡的聚焦，通過針孔而導入光偵測器中，可得到樣品聚焦面之光子強度。在圖一中，平面 P_1' 和 P_1'' 分別位在焦平面之前後，自這兩個平面所產生的光子，會被偵測器前的針孔所阻擋，而不會影響到自焦平面偵測到的光子訊號。藉由聚光鏡與針孔所構成的空間濾波器，使得單一平面的光子訊號偵測成為可能，而共焦顯微術也因此被稱為「具有『光學切片能力』」。也就是說，焦平面為共焦顯微術的光學解剖刀，可使用非破壞性的方式，對具有光學透明性質的樣本進行檢測，取得不同深度的影像^[1]。



圖一 共焦顯微術原理示意圖

雖然共焦顯微鏡已商品化，但售價極高且系統改裝不易，國內此方面的技術人才又十分欠缺。有鑑於此，本研究設計了以光學元件建構而成的共焦顯微鏡，並配合各式光譜量測技術與差動式共焦顯微術^[2]，進行設計具光譜及顯微術整合的光學性質量測系統。本計畫裝置了兩套共焦顯微術系統，包括螢光共焦顯微系統與差動式共焦顯微術系統，前者以螢光激發雷射為光源，後者以高穩定性單頻雷射為光源，其系統架構方塊圖如圖二所示。



圖二 差動式共焦顯微術之系統架構圖

本系統使用高穩定性(擾動 $<0.1\%$)氦氖雷射為光源，並利用極化分光器與二分之波長板與四分之波長板作強度調變與回授光分離，使用 PI 公司所生產的壓電驅動控制平台，作樣品二維掃描與物鏡縱向驅動的奈米級驅動控制。光偵測器所收集到的共焦光子信號經放大後，透過類比/數位信號擷取卡，利用 LabVIEW 軟體進行信號擷取與三維掃描的自動控制。

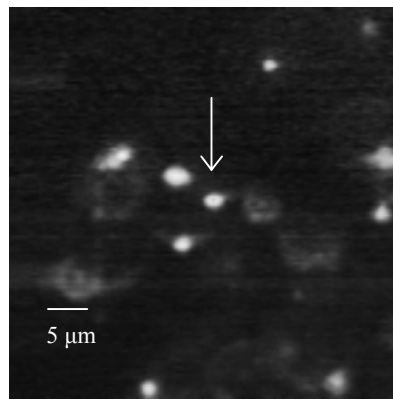
2. 奈米結構材料及元件－砷化銦鎵量子點

砷化銦量子點大部分利用分子束磊晶成長術及運用 S-K 成長模式以成長樣品^[3]。一般以 n^+ 摻雜的砷化鎵(100 面)為基材，先以氫離子電漿在 610 左右去除表面氧化物，隨即成

長厚度約數百奈米的緩衝層。將溫度調降至 500 (一般在 450 至 550 間)進行砷化銦磊晶層的成長，其厚度隨生成率及時間而增厚，在 1.8 單層(Mono-layer, ML)前不會有明顯的量子點出現；但當厚度超過 1.8 ML 時，也就是當厚度超過臨界厚度(critical thickness)，砷化銦層會形成自聚集量子點的型態。量子點品質諸如尺寸、密度、均勻度、形態...等，與長晶方法、條件及參數設定極為相關，其相關技術更可說是一門工藝(state of the art)。

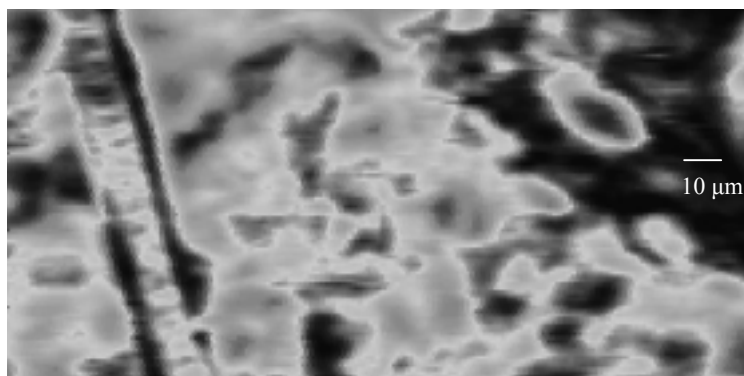
三、結果與討論

使用 532 nm 波長的雷射為光源，與數值孔徑 0.65 的 40X 物鏡，以直徑 1 μm 的螢光小球（激發中心波長 540 nm，放光中心波長 560 nm）為樣品，進行螢光共焦顯微術的 X-Y 二維掃瞄，其結果如圖三所示。掃瞄面積為 50 x 50 μm^2 ，影像中心的螢光小球直徑（箭頭標示處）經影像強度剖面分析，縱向與橫向的半高全寬值分別為 1.0 μm 與 1.5 μm ，驗證了共焦顯微系統的二維解析能力與螢光影像能力。



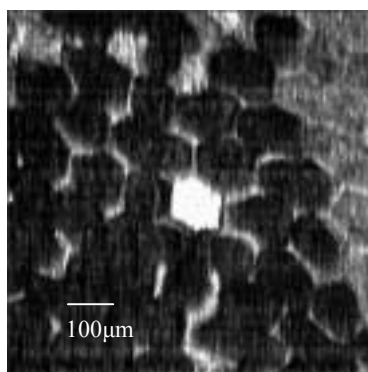
圖三 螢光小球的共焦掃瞄影像

使用同上的系統架構，以老鼠的上皮組織切片做樣品，並經 SRB 染劑 (Sulpho rhodmin B, 激發中心波長 549 nm，放光中心波長 570 nm) 染色，其螢光共焦顯微術掃瞄結果如圖四所示。掃瞄面積為 100 x 200 μm^2 ，驗證了本系統的生物樣品螢光影像能力。



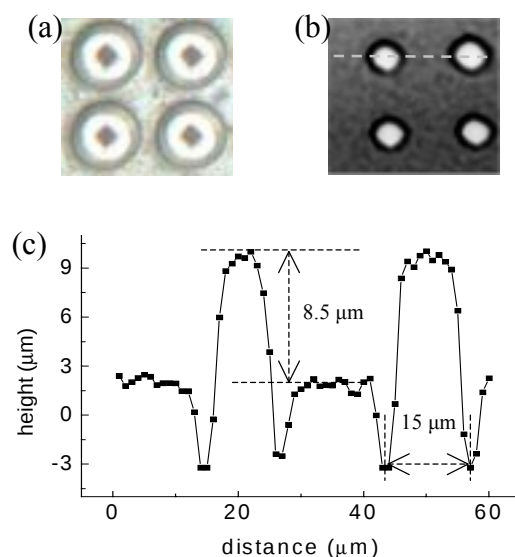
圖四 老鼠上皮組織的共焦掃瞄螢光影像

除了使用螢光激發之外，我們也使用 632.8 nm 波長的雷射光源，搭配數值孔徑 0.65 的 40X 物鏡所建立的共焦顯微術系統，以新鮮洋蔥表皮細胞為樣品，其掃瞄結果如圖五所示。本結果是單波長共焦顯微系統進行 X-Y 二維掃瞄，掃瞄面積為 800 x 800 μm^2 ，表皮細胞的細胞壁結構清晰可見，驗證了生物樣品的二維掃瞄影像能力。



圖五 洋蔥表皮細胞的共焦掃描影像

另外，本研究自行開發製作了微流道晶片。以半導體材料為基材，採用光罩顯影與曝光蝕刻的技術，並在微流道中間設計了柱狀的微米尺度結構。柱狀微結構每個直徑為 $20\ \mu\text{m}$ ，柱狀中心間距為 $30\ \mu\text{m}$ 。下方圖六是柱狀微結構的光學顯微鏡觀察結果以及差動式共焦顯微術的掃描結果。



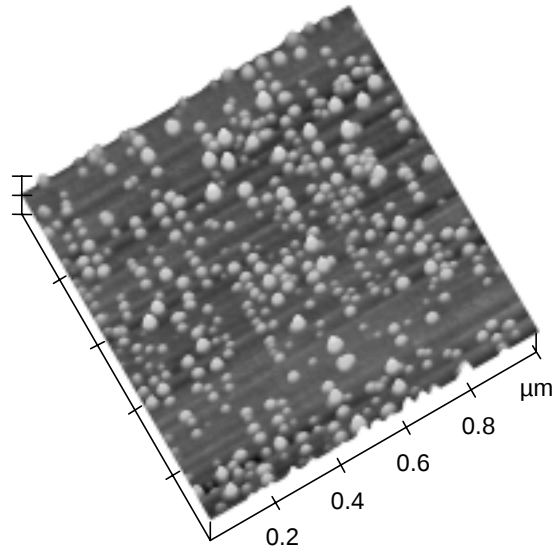
圖六 (a) 柱狀微結構的光學顯微鏡影像圖

(b) 差動式共焦顯微術掃描結果圖

(c) 沿著(b)圖中虛線的縱向剖面分析

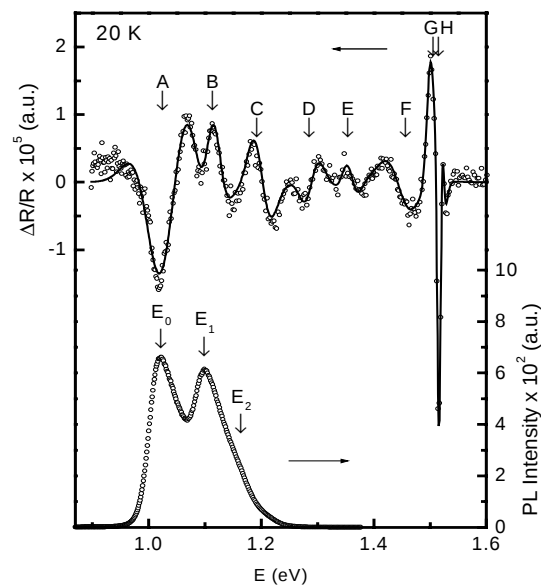
圖六(a)是柱狀微結構在 40X 物鏡下的光學顯微鏡觀察影像，圖六(b)則是以差動共焦顯微術系統進行掃描，以 $632.8\ \text{nm}$ 波長的雷射光源，搭配數值孔徑 0.65 的 40X 物鏡。圖六(c)是沿著(b)圖中的虛線所得到的縱向剖面數據分析，可以得到柱狀結構的直徑與高度。由於柱狀微結構深寬比大，且分佈密度高，一般的探針式表面量測技術，例如探針表面輪廓儀或原子力顯微鏡(AFM)、探針式掃描顯微鏡(SPM)，由於針尖形狀與掃描機制受限，對於此類型的樣品，無法提供準確且不具傷害性的量測結果。一般若要量測高深寬比或高週期密度的微米尺度元件，都需要採用 SEM，然 SEM 造價高昂且操作不易。而差動式共焦顯微術的微米級動態範圍與奈米尺度的縱向解析度，與光學技術的非接觸表面量測特性，對於柱狀微結構的表面輪廓量測，提供了新的解決方案。

而在量子點量測方面，以原子力顯微術所量測的砷化銦／砷化鎵量子點二維影像，如圖七所示。量子點的密度約在 1×10^9 至 $1 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$ ，底部直徑約數十奈米，高度約數奈米。其成長品質的好壞，與成長方法及條件有很靈敏的關係。以氣相分子束磊晶成長術為例，砷化鎵基座晶向(100)或(111)、摻雜成分、成長溫度、砷之蒸汽壓力、III/V 元素比值、成長速度、中斷方式及時間、後被覆蓋層之成分及厚度，以及銦、鎵次單層(sub-mono-layer)之成長方式...等有很大關連。量子點的尺寸密度與長晶之條件參數的相關性，可參閱文獻^[5]。



圖七 砷化銦/砷化鎵量子點的原子力顯微鏡
二維影像 (參考文獻[4])

而III-V族量子點主要的應用價值在其光學及電子特性，如高頻電子元件，高頻高效率發光與光偵測元件。研究量子點光學性質的工具，包括光調制反射率光譜(photoreflectance, PR)、光致螢光光譜術(photoluminescence, PL)以及時析螢光光譜術(time-resolved photoluminescence, TRPL)等，配合光激發的功率變化或低溫系統的溫變實驗，可由光譜數據得知其電子電洞復合的放射光子能譜，及其載子之鬆弛機制、鬆弛時間、生命期等元件相關的參數訊息。砷化銦量子點在 20K 溫度下的 PR 及 PL 光譜，如圖八所示。



圖八 砷化銦量子點在溫度 20K 下的 PR 及 PL
光譜實驗與理論吻合曲線 (文獻[5])

圖八上半部是 PR 的光譜，在能譜上很清楚地呈現至少七至八個譜線，利用一次微分的高斯函數進行吻合，其光學躍遷能值以箭頭符號與英文字母標示：A 是基態，B 至 E 是第一至第四激發態，F 是砷化銦濕層的能階(量子井)，G 與 H 是砷化鎵的能帶對能帶之光學躍遷。為了證明 B 與 C 是激發態，我們進行了高功率的 PL 能譜量測，結果顯示於圖八下半部。由實驗結果確實可以得知 B、C 至 E 等能階確實是激發態。以螢光光譜雖可快速地觀測到主要的發光機制，電子在能態內的光學躍遷能值、頻寬與發光強度，唯在光能譜特徵之網結構，無法觀測與度量；而調制反射率光譜是一種微分型譜形展示，運用微分式的高斯或勞倫斯曲線去進行實驗曲線的理论性吻合，可將各躍遷的能譜結構特徵值度量出來。量子點的基態能量在室溫時，其波長可由 1.0 μm 調至 1.55 μm ，是屬於水分子低吸收率的高穿透波段，此量子元件的雷射光源或光感測器，對於生醫組織樣品的研究與應用，將有很高的潛力。

五、結語

在顯微影像技術的研發與應用上，我們建立了兩套不同應用方向的共焦顯微術系統，一套以大面積（數百微米見方）掃描為主，解析力達微米尺度，並採用鎖相放大的訊號檢測技術，可應用在生物組織或細胞的表面或淺層結構觀察與量測方面；另一套差動式共焦顯微術系統，其縱向解析力達十奈米以下，配合奈米級壓電驅動平移台，可對樣品的表面輪廓進行奈米級的縱向剖面分析與量測。光學量測的非接觸與非破壞特性，配合共焦顯微術的光學切片特性與差動式共焦顯微術的大動態範圍、奈米級縱向解析力，使得高深寬比與高密度分佈的微米或奈米結構，可以被容易的分析與觀察，配合上微結構對生物流體或樣品的交互作用所將發生的影響，以及螢光光譜檢測技術，可以帶來新的生物科技研究與應用領域。

在量子點結構研究方面，由於砷化銦量子點之幾何尺寸不均勻，量子點內之鎵成分及應力分佈限於量測工具之空間解析率，在巨觀與奈米尺度(或次微米尺度內)所觀測的光學特性是顯著不同，因而對單個或數個量子點之光電特性與影像之觀察就變得十分重要，如此理論計算與量子點之物性的實驗度量才可以加以比較，所顯示的物理機制也會更合理。而以 GS-MBE 成長奈米結構材料及元件，由於各分子束得予精準地控制其磊晶成長，使得 MBE 可用以成長高品質的材質及元件。而由室溫螢光光譜觀測得知，量子點之均勻性及密度均有大幅度的提升。以光致螢光光譜與光調制反射率光譜兩種工具的互補特性，配合顯微影像術之微影像，可充分了解量子點三維侷限態與空間位置分佈的相關性，若迴饋予長晶者，可調整優化其成晶參數，可望得到最優成長品質的量子元件，未來也可望推廣到生物樣品的研究與檢測應用。

參考文獻

- [1] *Confocal Microscopy*, edited by T. Wilson (Academic Press, London, 1990).
- [2] C. H. Lee and J. Wang, *Optical Communications*, **135**, 233-237 (1997).
- [3] J. Y. Marzin, J. M. Gerard, A. Izrael, D. Barrier, and G. Bastard, *Phys. Rev. Lett.* **73**, 716 (1994).
- [4] C. M. Lai, F. Y. Chang, H. H. Lin, and G. J. Jan, *J. Korea Phys. Soc.* **42**, S114 (2003).
- [5] C. M. Lai, F. Y. Chang, C. W. Chang, C. H. Kao, H. H. Lin and G. J. Jan, *Appl. Phys. Lett.* **82**, 3895 (2003).

計畫成果自評

本計畫研究的目標第一部份是利用光子探測術去量測以分子磊晶成長術所成長的量子點的光學能量躍遷值，並探討量子點的光學性質。本實驗以光調制反射率光譜術進行電子在量子點內的能量躍遷能值量測，以及能譜線寬與溫度相關性的研究，其重要結果已發表於美國應用物理快訊（Applied Physics Letters）上，如附件一所示；其他結果也將在整理分析後於國際一流 SCI 期刊上發表。第二部分是自行設計及建立光學共焦顯微術與螢光顯微術，以及奈米尺度的差動式共焦顯微術系統，研發的系統以微米螢光球、染色生物樣本、以及奈米尺寸的樣品進行系統解析力、靈敏度與動態範圍的量測與評估，結果顯示國內設計與裝置的差動式共焦顯微術量測系統已達原創者（參考文獻^[2]）的系統水準，而螢光共焦顯微術系統的解析力也高達 1 μm 左右，對於微米尺度的螢光樣本也達到實用化階段。本螢光共焦顯微量測系統的研發重點是在體積小、價格便宜且具拓展彈性可改裝的系統，研發的成果具有技術擴展而達實用價值的階段。前者重於論文發表的學術貢獻，而後者的目標是放置於技術之設計與研發，落實本土化的技術研發能力提升。總結來說，研究成果確實達到原先擬定的目標。

可供推廣之研發成果資料表

☐ 可申請專利

☒ 可技術移轉

日期：93 年 1 月 30 日

國科會補助計畫	計畫名稱：螢光微光譜術之研發與奈米結構元件之應用 計畫主持人：詹國禎 計畫編號：NSC-91-2213-E-002-085 學門領域：醫學工程
技術/創作名稱	螢光微影像（光譜）量測系統
創作人	詹國禎
技術說明	中文：本系統以光學共焦顯微鏡為架構，設計並裝置一套螢光微影像及光譜量測系統，系統安裝於可攜式光學平台上(40 X 70 X 10 cm ³)，由光學與機械元件組構為精簡的螢光微（光譜）影像量測系統。以 532 nm 的雷射為激發光源，其橫向/縱向空間解析力為 1.0/1.5 μm，達到設計目標，並可應用在生物組織樣品的光學微影像的觀測。
	英文：Based on an optical confocal microscopy, a system for fluorescence micro-image acquisition and spectrum analysis was designed and developed. The system was built up on a portable optical table (40 X 70 X 10 cm ³). The confocal-based system comprises the microscope and spectrometer, and can provide high-quality fluorescence spectrum and images. With a green light source (λ= 532 nm), the lateral and axial spatial resolutions of the system are 1 μm and 1.5 μm respectively, which meet the design requirements and ensure the system's applicability to profile the structure of biological samples.
可利用之產業 及 可開發之產品	可利用之產業：光電產業、生物科技產業、生醫工程產業 可開發之產品：螢光微光譜量測系統、光學共焦顯微鏡、螢光顯微量測系統
技術特點	1. 結合螢光光譜量測與光學共焦微影像系統 2. 可攜而精簡（compact）的螢光顯微量測系統 3. 激發光源與螢光發光之波長可以選擇與調整
推廣及運用的價值	本系統主要的特色是以國產的雷射與光學機械組件做為激發光源與系統元件，設計組裝出價格與功能兼備的精簡螢光顯微造影與量測系統，具實用之價值。

附錄

本計畫研究成果所發表之國際期刊論文：

C. M. Lai, F. Y. Chang, C. W. Chang, C. H. Kao, H. H. Lin and G. J. Jan, 2003, “Temperature dependence of photoreflectance in InAs/GaAs quantum dots”, *Applied Physics Letter* **82**, 3895 (2003)