



國立中山大學機械與機電工程研究所

碩士論文

Department of Mechanical and Electro-Mechanical Engineering

National Sun Yat-sen University

Master Thesis

物鏡式波長解析表面電漿共振系統於高空間解析度生

物量測之應用

Wavelength-Resolved, Objective Lens Based Surface Plasmon

Resonance System for High Spatial Resolution Bio-detection

Applications

研究生：陳冠維 Kuan-Wei Chen

指導教授：林哲信 教授 Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 102 年 9 月

July 2013

國立中山大學研究生學位論文審定書

本校機械與機電工程學系碩士班

研究生陳冠維（學號：M003020035）所提論文

物鏡式波長解析表面電漿共振系統於高空間解析度生物量測之應用  
Wavelength-Resolved, Objective Lens Based Surface Plasmon Resonance  
System for High Spatial Resolution Bio-detection Applications

於中華民國 102 年 7 月 31 日經本委員會審查並舉行口試，符合碩士學位論文標準。

學位考試委員簽章：

召集人 傅龍明 傅龍明

委員 林哲信 林哲信

委員 李佳言 李佳言

委員 洪玉珠 洪玉珠

委員 徐瑞鴻 徐瑞鴻

委員 \_\_\_\_\_

指導教授(林哲信) 林哲信 (簽名)

## 致謝

這些年汲汲營營，但也算是不愧對自己與父母，告別了大學生涯與碩士班的旅程，而來到人生的一個逗號。猶記得國中時期，閱讀王國維著作人間詞話，當中提到人生與讀書的三個境界。大學畢業時，覺得自己好像可以獨當一面，且自認為讀過不少書，猶如--昨夜西風凋碧樹。獨上高樓，望盡天涯路--這般的自恃，直到進入了碩士班才發現，知識不是自己想像般的容易習得與上手。更在接到了人生中第一個棘手的任務時，絲毫不知自己已陷入泥沼，對於苦思不得的學問更是有種--衣帶漸寬終不悔，為伊消得人憔悴--這樣的感觸。過程中承蒙 **哲信老師** 不辭辛苦的教誨，總是在我走錯方向時提攜我，在無助徬徨時給予鼓勵，其耐心與毅力更是讓學生敬佩不已。良駒仍需伯樂!我很高興在碩士班中可以與到這樣的老師。當然離開這一段美好，終將進入下一段的憧憬，在此也期許自己快點進入第三階段--眾裡尋他千百度，驀然回首，那人卻在，燈火闌珊處--那樣的豁達與開朗!

在中山大學的六年裡，**感謝我的雙親與摯愛 思涵**給予我最大的容忍與關愛，沒有家人的支持，大學的文憑與這本論文根本無法順利完成。此外也感謝於大學時代的恩師 **楊台發**老師，謝謝您給予我物理上的啟蒙，以及開闊式的想法誘導，您的關懷與照顧，學生也謹記於心了。當然還有我那群支持我在緊要關頭協助我的朋友，**俊潔、勝凱、嘉元、礎儀(山豬)、政穎、永哲、其加、承毅以及我的好室友健源**。進入實驗室的兩年當中，首先是感謝**書銘與和政**兩位博士班學長，在實驗上大大小小的雜事，不厭其煩的教導與幫忙。也感謝學長姐們：**伯堯、政鴻(江博)、浚屹、信德、歆宇(蘇博)與翊旂(宵夜)**在研究上的提攜，更感謝我的好同儕們：**庭毅(汪汪)、俊傑(小鐵)、辰勳**在研究上互相扶持與鼓勵。學弟**必軒(白目猴)**在實驗室中分擔了我大部分的工作量，**俊邑(阿波)**更是在我心情鬱悶時逗我開心，以及學妹**諭安(小安兒)、助理毓珊(澄紫)**在行政事務上的幫忙，讓我安心的度過了碩

二忙碌的生活。更感謝專題生**宜芝、堂宇**在實驗上的幫忙，此外特別感謝光電系**齊志翰**同學以及機電系自控組**小郭**同學在 MATLAB<sup>®</sup>模擬上的幫助。

在此更要感謝我的口試委員：**傅龍明老師、李佳言老師、洪玉珠老師以及徐瑞鴻老師**，不辭颶風下雨，來到口試會場參與，給予學生多項提點與教導。其中洪老師更是在學理上，循循善誘地讓學生明白奈米光學中的奧義。

在實驗上的架設中，屢次遭遇困難，其中感謝宏惠光電業務**楊于慶**先生以及實密光電**陳漢忠**先生，兩位在小弟懵懂時給予大量光學基本架設的常識，受益良多！更感謝已畢業的**林振成**學長，您豐富的經驗無私地教導給學弟，雖沒辦法與您再時常分享與談話，但你對於學弟的照顧實在是無法以言語表達！！

八股文終於寫完，其實我心裡的 OS 是：

*阿~~!! 冠維，你終於畢業了，雖然一路走來總是跌跌撞撞，傷口還未結痂時，下一波的苦難總可以接踵而至。年少時總是一個想法：我怎麼這麼倒楣啊!? 現在我才體會到老爸說的**逆上緣**，一路走來真的感覺到自己一下子成長好多!! 再會了西子灣的夕陽! 再會了陪我度過熬夜的月光海! 再會了門口滿滿的大陸客! 再會了我最熟悉的高雄! 再會了 BEMSLAB 的大家!*

本論文於此獻給我的雙親與恩師 哲信

2013 年 9 月  
冠維 於 西子灣 高雄

## 中文摘要

即時的BIA感測晶片廣泛應用於生物醫學檢測，過去所發展的技術，SPR為最有發展之應用。過去表面電漿共振檢測方式，多探討角度量測及圖像式解析，以分辨生物分子進行生理反應後之對比。其中稜鏡系統量測方式，可檢測行專一特性的生物交互作用分析，精準量測非常微弱的光學性質變化，但由於檢測光點面積過大，並無法精細觀測管道內單一區域的特性及反應程度上做辨別。以光纖為基底之SPR感測器具有低成本優勢，但是卻很難與微流道系統整合。角度變化檢測有助於整合微流道系統做即時的檢測，但侷限於相對大的入射光點，與即時的觀測光學影像具有困難度。

本研究提出一個以TIRF物鏡的表面電漿共振系統，結合可替換狹縫晶片之自製光學元件，以取代表面電漿共振稜鏡系統，進行圖像捕捉和波長分辨SPR檢測微應用。面對不同折射率之樣本，可藉由更換光狹縫，調變光源入射離軸距離，取得最佳辨別的量測訊號。為驗證此一想法，以一簡單雷射光路的稜鏡系統，用以確認光學薄膜品質，以鎢絲燈做為燈源，結合全反射物鏡模組於倒立式顯微鏡組中，以激發SPR。研究中選擇MATLAB<sup>®</sup>做為光學模擬軟體，實驗中可以理論數據，校正系統穩定度與精確度。除了驗證系統可成功量測表面電漿共振訊號外，本研究利用離軸距為5.8 mm之光狹縫，精準量測樣本折射率於1.33到1.36之間之動態變化過程。光線通過所設計的1.00 mm孔徑之光遮片以獲得連續波長的光束。然後光束通過TM模態偏振片，並利用全反射式物鏡激發SPR。以此方法，入射光束可進一步凝結成小光點以提高空間解析度。此外，使用多模態光纖搜集反射光束且以高效能之光譜儀作為SPR分析。當檢測到SPR時，低數值孔徑物鏡使用於即時捕捉圖像。研究結果顯示5.8 mm距離的離軸距離具有較佳的SPR效能。

本研究成功於TIR物鏡上測量到SPR訊號。不論根據不同的入射角度改變

off 軸距離或是改變樣本的折射率，皆可以觀測 SPR 波長光強度之散失。此光學架構開發將可建立高空間解析度與高密度晶片系統的使用以整合與降低成本於製作 SPR 檢測平台。

光學微流體部分，研究中以鈉玻璃作為基板，採取濺鍍系統、表面改質以及蝕刻製程製作玻璃微流體晶片，再於高解析蓋玻片改質後濺鍍上 45 nm 黃金薄膜做為感測層。藉由填充高折射率耦合油於晶片與物鏡之間，降低光源在界面反射率。管道內注入自組裝薄膜分子進行黃金表面改質，同時以高解析度與高量子效應光譜儀於光路後端收光，切確及時地觀測表面改質過程。

實驗證明系統在 50  $\mu\text{m}$  週期結構上可清楚辨識，同時於晶片下方使用 CCD 拍攝或錄製掃描過程。此外更於單一定點量測不同折射率之樣本，以週期性交錯注入管道中，進行長時間動態量測，其中更利用黃金改質過後之表面官能基抓取酵母菌細胞，即時進行表面電漿共振量測。

**關鍵字：**表面電漿共振、表面電漿共振顯術、全反射式物鏡、光學微流體系統

## Abstract

Real-time biomolecule interaction analysis (BIA) sensor chips are widely used in biomedical testing. Over the developed techniques, surface plasmon resonance shows the most promising for these applications. Optic fiber based SPR sensors exhibit the advantage of low-cost but it is difficult to integrate with microfluidic systems. The angle variation detection is promising to integrate with microfluidic system for real-time detection. However, conventional angle-variation SPR detection schemes are usually limited by the relatively big size of the incident light spot and the difficulty for real-time optical image observation. In addition, an expensive goniometer is required to obtain precise angle measurement. Therefore, it is essential to develop a system for simultaneously optical image observation and SPR detection without using the moving part.

This work presents a TIRF objective-based surface plasmon resonance (SPR) system for simultaneously image capturing and wavelength- resolved SPR detecting for microfluidic applications. The light from a low-cost tungsten bulb passes through a designed light stop and polarizer is used as the light source for SPR detecting. The light spot is reduced to around 15  $\mu\text{m}$  after passing through the 60X objective lens, resulting in a higher spatial resolution for SPR detection in microfluidic channels. Moreover, the designed confocal scheme makes the system capable of simultaneously optical observation and SPR detection without scanning the wavelength or switching the optical system. Results show that the developed system is capable of detecting samples of refractive index in the range from 1.0 to 1.38 with a sensitivity of around 3417 nm/RIU. The developed system provides a simple yet high performance method for on-site detecting the SPR spectra anywhere inside a microfluidic device.

The system was constructed under a home-built microscope system. A tungsten

bulb was used for the light source for SPR excitation. The light passed through a designed light-stop with a 1.0 mm hole to obtain light beam with continuous wavelength. The light beam then passed through the polarizer (TM mode) and deflect using a TIRF objective lens for SPR excitation. With this approach, the incident light beam can be further condensed into a small light spot such that the spatial resolution can be enhanced.

The system setup for simultaneously image capturing and high spatial SPR detection. The reflected light beam was collected using a multimode optic fiber and analyzed with a high performance spectrometer for SPR analysis. A low N.A. objective lens was used for simultaneously capturing the image while SPR detection. Therefore, microscopic image and SPR analysis can be achieved in a simple system without moving or scanning parts. Results show that the off-axis distance of 5.8 mm has the greater SPR performance.

This study has measured the signal of SPR upon TIR Objective successfully. Whether we changed the off-axis distance corresponding to a different angle of incidence, or changed in the refractive index of the sample, we all find the obvious SPR wavelength of the light intensity lost. This optical architecture development will create a high spatial resolution and the utilization of high-density chip system which will integrate and reduce the cost of making the SPR measurement stage.

**Keywords:** surface plasmon resonance, surface plasmon resonance microscope, total internal reflection objectives, optofluidics



# 目錄

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| 中文摘要 .....                            | I    |
| Abstract.....                         | III  |
| 目錄.....                               | V    |
| 圖目錄.....                              | VIII |
| 表目錄.....                              | XII  |
| 簡寫表.....                              | XIII |
| 符號表.....                              | XIV  |
| 第一章 緒論.....                           | 1    |
| 1.1 研究動機.....                         | 2    |
| 1.2 研究目標.....                         | 3    |
| 1.3 章節概要.....                         | 4    |
| 第二章 基礎原理與文獻回顧.....                    | 5    |
| 2.1 表面電漿波原理.....                      | 5    |
| 2.1.1 漸逝場(Evanescent Field).....      | 5    |
| 2.1.2 表面電漿與金屬色散原理與電漿子(Plasmon)理論..... | 6    |
| 2.1.3 偏振光學原理馬克斯威方程.....               | 9    |
| 2.1.4 表面電漿激發原理.....                   | 13   |
| 2.1.4.1 稜鏡耦合方式.....                   | 13   |
| 2.1.4.2 光柵式耦合.....                    | 16   |
| 2.1.4.3 波導耦合(Waveguide coupling)..... | 17   |
| 2.2 表面電漿共振激發與量測方式.....                | 19   |
| 2.2.1 調變角度量測.....                     | 19   |
| 2.2.2 調變波長量測.....                     | 20   |
| 2.2.3 光強度量測.....                      | 20   |
| 2.3 表面電漿於生醫免疫分析之運用.....               | 20   |
| 2.3.1 薄膜自組裝表面改質與免疫分析.....             | 21   |
| 2.3.2 表面電漿共振用於生醫檢測之方法.....            | 24   |

|                       |                           |    |
|-----------------------|---------------------------|----|
| 2.3.3                 | 表面電漿共振顯微術 .....           | 26 |
| 2.3.4                 | 全反射式物鏡螢光生醫檢測系統 .....      | 28 |
| 第三章 光學系統架設與晶片製程 ..... |                           | 30 |
| 3.1                   | 光學系統架設 .....              | 30 |
| 3.1.1                 | 倒立式螢光顯微鏡 .....            | 30 |
| 3.1.2                 | TIRF 表面電漿共振偵測系統原理 .....   | 32 |
| 3.1.3                 | 光遮擋片設計與物鏡基本原理 .....       | 33 |
| 3.1.4                 | 基本實驗架構 .....              | 34 |
| 3.1.5                 | 即時掃描與影像捕捉 .....           | 35 |
| 3.2                   | 晶片製程 .....                | 36 |
| 3.2.1                 | 標準玻璃晶片製程 .....            | 36 |
| 3.2.2                 | 鈉玻璃蝕刻速率探討 .....           | 37 |
| 3.2.3                 | 表面電漿共振金薄膜製程及驗證 .....      | 39 |
| 3.2.4                 | 表面電漿共振生醫晶片製程與設計 .....     | 41 |
| 3.3                   | 光譜儀訊號分析 .....             | 44 |
| 3.3.1                 | 光訊號擷取系統 .....             | 44 |
| 3.3.2                 | 數位訊號處理與模擬方法 .....         | 46 |
| 第四章 實驗結果與討論 .....     |                           | 51 |
| 4.1                   | 金薄膜特性量測 .....             | 51 |
| 4.2                   | 稜鏡式表面電漿共振 .....           | 52 |
| 4.3                   | 物鏡式波長解析表面電漿共振系統量測結果 ..... | 52 |
| 4.3.1                 | 光離軸距離對表面電漿共振之影響 .....     | 52 |
| 4.3.2                 | 折射率改變與表面電漿共振波長 .....      | 55 |
| 4.4                   | 管道內 SPR 量測 .....          | 59 |
| 4.4.1                 | 表面改質製程與黃金黏著層之貼附能力探討 ..... | 59 |
| 4.4.2                 | 自組裝單分子層之表面改質與生醫量測 .....   | 60 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 4.5 動態偵測單點之 SPR 解析與掃描方式探討 ..... | 62 |
| 第五章 結論與未來展望 .....               | 65 |
| 5.1 結論 .....                    | 65 |
| 5.2 未來展望 .....                  | 66 |
| 參考文獻 .....                      | 67 |
| 附錄 A .....                      | 74 |
| 附錄 B .....                      | 76 |
| 附錄 C .....                      | 77 |
| 附錄 D .....                      | 80 |



## 圖目錄

|   |    |
|---|----|
| 圖 2-1 Goos-Haenchen effect 示意圖 .....  | 5  |
| 圖 2-2 自由電子黃金介電常數遵守 Drued-Sommerfeld theory .....  | 7  |
| 圖 2-3 自由電子雲之介電系數與實際量測 [20].....   | 8  |
| 圖 2-4 金屬內電子受束縛影響，所得之介電系數修正 .....  | 9  |
| 圖 2-5 理論介電系數取線與實際量測曲線。[21].....   | 9  |
| 圖 2-6(A)TE 模態光源與 (B)TM 模態光源示意圖 .....  | 11 |
| 圖 2-7 介電質-金屬薄膜-樣本介電質動量匹配示意圖 .....   | 13 |
| 圖 2-8 變角度光動量匹配示意圖.....  | 14 |
| 圖 2-9 稜鏡系統中(A)以角度入射空氣黃金介面(B)以水平入射空氣黃金介面(C)<br>以角度入射稜鏡黃金介面(D)以水平入射稜鏡黃金介面 .....                               | 14 |
| 圖 2-10 Otto 式光柵耦合示意圖[22].....   | 15 |
| 圖 2-11 Kretschmann 式稜鏡耦合示意圖[23] .....   | 16 |
| 圖 2-12 光柵耦合示意圖[24].....   | 16 |
| 圖 2-13 光柵耦合色散曲線示意圖 .....  | 17 |
| 圖 2-14 利用光纖全反射原理，運用表面電漿感測器[27].....   | 18 |
| 圖 2-15 (A)使用光纖架構之光波導激發表面電漿共振(B)相異折射率表面電漿共<br>振波長量測[28] .....  | 18 |
| 圖 2-16 調變角度量測系統訊號圖.....   | 19 |
| 圖 2-17 自組裝薄膜示意圖[30].....  | 21 |
| 圖 2-18(A)具有胺基之 3-APTES 與 (B)具有硫基的 3-MPTS 長碳鏈化合物 .....   | 23 |
| 圖 2-19 基板改質與沉積黃金奈米粒子組成薄膜，藉由載有配體(ligand)且可自組<br>裝之長碳鏈分子作為鏈結器(linker)，連接黃金與生物物質如:DNA 或蛋白質<br>等之過程圖[75]。 ..... | 24 |
| 圖 2-20 表面電漿共振調變角度生醫量測系統(A)架構圖 (B)訊號圖[76] .....  | 25 |

|  |    |
|--|----|
| 圖 2-21 典型使用波長位移量測於免疫蛋白交互作用量測示意圖[77].....   | 26 |
| 圖 2-22 (A)表面電漿共振顯微術架構圖(B)反射端及感測層影像擷取(C)表面電漿共振顯微術示意圖[11].....   | 26 |
| 圖 2-23 定角度表面電漿影像量測原理示意圖[80].....   | 27 |
| 圖 2-24 全反射物鏡工作原理圖 .....  | 29 |
| 圖 3-1 倒立式螢光顯微鏡 Nikon TE2000U 實體圖[81].....  | 30 |
| 圖 3-2 倒立式生物螢光顯微鏡光路示意圖，綠色框中為 EPI 系統，紅色框中為 TIRF 系統.....  | 31 |
| 圖 3-3 物鏡式表面電漿共振工作圖與光檔圖騰設計.....   | 32 |
| 圖 3-4 離軸距與光檔片設計示意圖.....  | 33 |
| 圖 3-5 全反射條件示意圖.....  | 33 |
| 圖 3-6 (A)波長解析表面電漿共振顯微系統示意圖(B)系統更改及架設實體 .....   | 34 |
| 圖 3-7 (A)鎢絲燈及(B)氬氣燈光譜圖.....  | 35 |
| 圖 3-8 管道內表面電漿共振驗證實體圖.....  | 36 |
| 圖 3-9 高速玻璃蝕刻製程流程圖.....   | 37 |
| 圖 3-10 玻璃晶片蝕刻深度與溫度對應圖.....   | 38 |
| 圖 3-11 光阻抵擋時間與鹽酸相對濃度關係圖.....   | 39 |
| 圖 3-12 (A)共振角度量測實體光路架構。(B)鍍有黃金薄膜之高解析蓋玻片以耦合油( $n=1.515$ )貼附於 BK-7 光學稜鏡實體圖。.....                         | 40 |
| 圖 3-13 表面電漿共振之調變角度量測架構示意圖。.....  | 41 |
| 圖 3-14 蓋玻片表面改質過程與黃金濺鍍示意圖.....  | 42 |
| 圖 3-15 (A)晶片封裝示意圖 (B)晶片封裝後實體照片.....  | 42 |
| 圖 3-16 於管道內部改質過程示意圖(A)使用 Piranha 溶液清潔黃金表面 (B)經過 11-MUA 做表面改質後，尾端官能基改變 (C)在 EDC 水溶液中活化 NHS 使其與羧基接合..... | 43 |
| 圖 3-17 OCEAN OPTICS QE65PRO 光譜儀內部架構示意圖[82].....  | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 圖 3-18 Kretschmann 稜鏡耦合式三層薄膜反射與透射示意圖 .....  | 47 |
| 圖 3-19 以 MATLAB®模擬白光以 76.4°入射 Kretschmann 稜鏡系統(A)樣本折<br>射率為 1.3323 吸收波長為 619 nm(B)樣本折射率為 1.3601 吸收波長為 670 nm<br>..... | 48 |
| 圖 3-20 使用 MATLAB®表面電漿共振三維模擬示意圖.....   | 49 |
| 圖 3-21 使用 MATLAB®表面電漿共振二維模擬示意圖.....   | 49 |
| 圖 3-22 使用 MATLAB®表面電漿共振相異折射率與吸收波長圖 .....  | 50 |
| 圖 4-1 利用原子力學顯微鏡觀察黃金薄膜，(A)(B)功率 15 W 濺鍍黃金 8 分鐘 15<br>秒 (C)(D)功率 30 W 濺鍍黃金 5 分鐘 30 秒下，黃金表面輪廓 .....                      | 51 |
| 圖 4-2 表面電漿共振角度量測結果圖 .....   | 52 |
| 圖 4-3 TIRF 系統量測不同離軸距光狹縫之反射光譜 .....  | 53 |
| 圖 4-4 MATLAB®模擬不同離軸距離所對應吸收波長 .....  | 54 |
| 圖 4-5 晶片於相異量測點重複測試對應折射率變化之曲線 .....  | 54 |
| 圖 4-6 理論計算離軸距離對應入射角度 .....  | 55 |
| 圖 4-7 高折射率酒精表面電漿共振反射強度量測圖 .....   | 56 |
| 圖 4-8 MATLAB®模擬 TIRF 共振波長訊號圖 .....  | 57 |
| 圖 4-9 MATLAB®模擬相異入射角度與樣本折射之共振波長 .....   | 57 |
| 圖 4-10 低濃度酒精表面電漿共振波長量測圖 .....   | 58 |
| 圖 4-11 低折射係數樣本之 MATLAB®模擬 .....   | 59 |
| 圖 4-12 鉻金屬作為黏著層實體圖 .....  | 60 |
| 圖 4-13 利用 3-MPTS 做為黏著層實體圖 .....   | 60 |
| 圖 4-14(A)11-MUA 酒精溶液進行表面改質及 (B)EDC/NHS 水溶液改質後實體<br>圖 .....  | 60 |
| 圖 4-15 11-MUA 酒精溶液與 EDC/NHS 水溶液於黃金表面改質過程圖 .....   | 61 |
| 圖 4-16 利用胺基捕捉酵母菌於介面，與通入硫酸做表面清洗之動態偵測圖 .  | 62 |
| 圖 4-17 利用白光 TIRF 全波段量測表面電漿共振動態過程訊號圖 .....   | 63 |

圖 4-18 相同酒精濃度於動態量測下共振波長位移圖 ..... 63

圖 4-19 (A)週期性光阻結構實體圖 (B)逐點掃描下固定波長量測反射強度 ..... 64



## 表目錄

|  |    |
|--|----|
| 表 2-1 金屬與半導體於自組裝薄膜材質選歸納表.....                | 21 |
| 表 3-1 QE65PRO OCEAN OPTICS 光譜儀配件名稱與功能解說..... | 45 |
| 表 4-1 表面電漿共振波長與光軸離心距離對照及其反射相對強度.....         | 55 |





## 簡寫表

|        |  |
|--------|--|
| BIA    | 生物分子交互作用分析(biomolecular interactions analysis)               |
| CCD    | 電荷耦合元件(charge-coupled device)                                |
| CMOS   | 互補式金屬氧化物半導體(complementary metal-oxide-semiconductor)         |
| EDC    | 乙基(二甲基氨基丙基)碳胺(ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide)        |
| HMDS   | 六甲基二矽氮烷(hexamethyl disilazane)                               |
| N.A.   | 數值孔徑(numerical aperture)                                     |
| NHS    | N-羥基丁二醯胺( <i>N</i> -Hydroxysuccinimide)                      |
| SAM    | 自組裝薄膜(Self-assemble monolayer)                               |
| SPR    | 表面電漿共振(surface plasmon resonance)                            |
| SPRM   | 表面電漿共振顯微術(surface plasmon resonance microscopy)              |
| TIRF   | 內全反射螢光(total internal reflection fluorescence)               |
| TIRFM  | 內全反射螢光顯微術(total internal reflection fluorescence microscopy) |
| 3-MPTS | 3-硫基丙基三甲氧基矽氧烷(3-mercaptopropyl trimethoxysilane)             |
| 3-APTS | 3-氨基丙基三氧基矽氧烷(3-aminopropyltriethoxysilane)                   |
| 11-MUA | 11-硫基十一酸(11-mercaptoundecanoic acid)                         |

## 符號表

|                                |                                 |
|--------------------------------|---------------------------------|
| $P$                            | 電偶極化                            |
| $D$                            | 電通密度                            |
| $\vec{j}$                      | 電流密度                            |
| $k_{sp}$                       | 表面電漿波動量                         |
| $k_x$                          | X 軸向光動量                         |
| $k_{x,spw}$                    | 表面電漿波 X 軸向動量                    |
| $k_z$                          | Z 軸向光動量                         |
| $\Gamma$                       | 自由電子阻尼係數(Damping ratio)         |
| $\gamma$                       | 束縛電子阻尼係數(Damping ratio)         |
| $\Lambda$                      | 週期函數                            |
| $\epsilon$                     | 電容率                             |
| $\epsilon_0$                   | 真空電容率                           |
| $\epsilon_{Drude}(\omega)$     | 自由電子介電係數                        |
| $\epsilon_{interband}(\omega)$ | 束縛電子介電係數                        |
| $\epsilon_m$                   | 金屬介電常數(Metal permittivity)      |
| $\rho$                         | 電荷密度                            |
| $\sigma$                       | 電導係數                            |
| $\mu_0$                        | 真空磁導率                           |
| $\mu$                          | 磁導率                             |
| $\omega_0$                     | 共振頻率(Resonance frequency)       |
| $\omega_p$                     | 電漿頻率(Surface plasmon frequency) |
| $\widetilde{\omega}_p$         | 束縛電子電漿頻率                        |

# 第一章 緒論

1959 年理查·費曼教授於加州理工學院進行一段「底層大有空間」(There's Plenty of Room at the Bottom)之演講，提出了人類在原子尺度上運用物質之可能性，以及將會面臨之困境，其中包含尺寸效應及表面張力等，揭開了人類對於科技進步之另一序幕[1]。此後微機電系統(Micro-Electro-Mechanical-System, MEMS)及其製程，無論是化學或物理特性甚至是生物分析上之運用，於過去幾十年間蓬勃發展。傳統生醫檢測分析方法，通常需要大量的人力、物力與作業時間，且過程中流程繁雜，容易有外界干擾所造成之影響，致使單位體積或濃度之樣本使用率降低。過去半導體製程技術的快速發展，進入了微奈米時代，也帶動了 MEMS 概念的實現，且藉於科技化及微小化的腳步，快速、精準的量測與即時量測和少量樣本擷取的需求下，樣本檢測端與分析流程整合於單一晶片，實現實驗室晶片(Lab on chip)的想法便應運而生[2]。於眾多生醫檢測系統中，微流體(Microfluidics devices)系統利用樣本在管道中運輸、儲存、混和以至於反應[3]，皆扮演重要之腳色。微全分析系統(Micro-total-analysis-system,  $\mu$ -TAS)[4, 5]便是運用微小化晶片製作微流體系統，提升單位樣本準確度與降低試劑使用量，增加分析物之空間解析度，減低檢測儀器運行所需能量，並提升運行速度以及平行化偵測，以取代傳統檢測下逐一步驟之耗時。

微流道之生醫檢測方法總類繁多，但其性質可歸納成機械性質分析、電性分析、光學分析、化學分析等，性質的使用與適用性可依當下量測方法，及樣本物質特性做選擇。然而光學性質的分析於量測，與其他相比可視為最直覺性、最快速與容易分析的方式並已廣泛使用，其高穩定性、高空間解析度以及對於樣本極佳的分辨度，在半導體及雷射裝置快速發展的年代，光源選擇及其特性控制都已可被量化與量產，於微流體管道樣本之流動、分布以及樣本光學性質及行為已是最普遍之運用，且光學分析性質是最容易被量化與模擬的方式[6]。光學系統最

容易被詬病的便是量測體積大，且須精細的量測架構與配件，這與微晶片之整合有相當的難度，此時減少精細光學架構的使用，回歸簡單且最易實現光學特性的量測設計，並致力於微流體流道設計需求下，光學微流體(Optofluidics)的概念隨即被提出[7]。

表面電漿共振 (Surface plasmon resonance, SPR)為典型觀測樣本折射率改變，及經由生物分子交互作用(Biomolecular interactions analysis, BIA)，致使區域性折射率改變，之傳統量測技術[8-10]。表面電漿共振利用雷射經由偏振片作為入射光源與高折射係數之稜鏡貼附金屬薄膜，或是使用全波段白光結合鍍上金屬層之單模光纖，作為量測之傳感器，藉由量測樣本與金屬薄膜上有機分子的交互作用，改變介面薄膜特性致使電漿波之耦合動量改變，其光路後端常以電荷耦合元件 (Charge-coupled device, CCD)，或互補式金屬氧化物半導體 (Complementary metal-oxide-semiconductor, CMOS)作為量測端子，量測元件常為一維線性陣列，為變角度與多波長量測最佳選擇，其中藉由光柵分光並餘後端利用一維 CMOS 作為量測的光譜儀原理在光纖系統中常被使用。

## 1.1 研究動機

表面電漿共振顯微術(Surface plasmon resonance microscope, SPRM)於 1988 年提出後便被廣泛使用於稜鏡系統上[11]，但因所使用的光源之光點大小只能由光圈所控制，影像擷取受制於 CCD 與 CMOS 陣列的量子效應，進而解析度無法再做提升，所以表面電漿共振顯微術局限於稜鏡系統應用。有鑑於近年來精細光學架構與顯微物鏡的推陳出新，隨著高數值孔徑(Numerical aperture, NA)之內全反射式物鏡問世，廣泛應用於生醫螢光顯微術上[12]，藉由全反射下產生的漸逝波，制動並激發生物螢光分子，藉由二維 CMOS 陣列擷取影像。近十年來，更有學者將表面電漿共振顯微術與高數值孔徑的光學物鏡做結合，使雷射於晶片上匯聚並全反射，擷取反射光源，後端架設 CMOS 拍攝影像作單一像束的分析，稱之為掃描式表面電漿共振顯微術(Scanning surface plasmon microscope,

SSPRM)，雖然光點縮小，但所探討的解析度與分辨率，取決於所使用的影像擷取器材的優劣[13, 14]。二十世紀中期，諾貝爾物理學獎得主高焜等人發現光能夠藉由全反射，在高折射係數的管狀或平板介質中傳遞[15]，已然成為改變全世界通訊方式的重大發明，近年來光纖的大量製作以及運用，更說明了利用光傳遞訊號已然不是理論紙上談兵。利用全反射所造成的漸逝波推動電漿子運作，不再只是稜鏡可以達成，光纖即是藉由全反射傳遞光，過程中全反射次數依據感測光纖長度與入射角度而定，使用其作為表面電漿波耦合方法，既可增加敏感度與縮小感測系統體積，未來更可以作為手持式生醫量測，但這兩種量測架構之缺點在於無法於同一段光纖中做多重性質之量測。

綜合上述，吾人認為以上架構並非達到掃描性質之利用與單一晶片的多重量測，故本研究提出了於內全反射螢光(total internal reflection fluorescence, TIRF)物鏡後端增加對稱性光狹縫，進行單光點之表面電漿逐點掃描方式，解決過去單一晶片使用效能，以及有效全反射式物鏡之高空間解析度。

## 1.2 研究目標

為改進過去表面電漿量測架構下之缺點，本研究之研究目標可分為以下三點：

(1) 利用目前市面上已經商業化的 TIRF 物鏡，具有高數值孔徑之特性，藉由狹縫控制光線位移，可於物鏡與樣本端之間進行全反射，創造出高空間解析度的表面電漿偵測系統。

(2) 改變以往倒立式顯微鏡光路上之架構，於過程中增加自製光狹縫模組，並於模組中設計出適合樣本折射率的狹縫晶片，成功架設 TIRF 表面電漿共振系統於顯微鏡組中。

(3) 結合玻璃微流道之生醫晶片，提出表面電漿共振顯微術中之創新光學微流體架構。

### 1.3 章節概要

本論文第一章簡要闡述微機電製程於光電領域之運用，及光學微流體的發展之重要性，並引入表面電漿共振於生醫檢測過去發展的系統，其後描述本研究之動機與目標。

第二章將探討表面電漿子理論與表面電漿共振量測方式及基本光路技術。表面電漿子理論探討範疇包含金屬色散原理以及漸逝波激發表面電漿過程。透過文獻回顧，以表面電漿運用於顯微鏡組之創新架構，及利用高數值孔徑全反射物鏡發揮其高空間解析度的特性為探討基礎，探討過去研究量測方法、表面改質方法、表面電漿顯微術等。

第三章則簡介本研究實驗原理、設備元件改造方式、晶片製程方式等，並針對材料性質選擇、表面改質理論與應用、光學微流體實驗與驗證方法進行探討，晶片製程中更對於過去玻璃流道蝕刻速率，做蝕刻液體及流程上的調配。此外，簡要說明 MATLAB<sup>®</sup>模擬運算過程，和光譜儀訊號擷取後，利用 Excel 進行歸一化演算和表面電漿共振波長解析。

第四章，分成五個小節，分別對於金屬薄膜品質、表面電漿共振架構設計與產生、物鏡是表面電漿量測結果、管道內表面改質與量測與 TIRF 系統逐點掃描做性質上評估與探討。為達到快速與正確性收光偵測，引入 MATLAB<sup>®</sup>模擬結果作為實驗數值之參照，進而可以改良設計選擇與更新光學架構。

第五章則綜論實驗結果與過去文獻比較，及簡要呈現未來研究目標與預期之發展。

## 第二章 基礎原理與文獻回顧

### 2.1 表面電漿波原理

#### 2.1.1 漸逝場(Evanescient Field)

根據司乃爾定律(Snell's Law)，內全反射發生於電磁波由光密介質進入光疏介質，其全反射過程中特定條件下能夠激發漸逝波。目前漸逝波多運於螢光激發與表面電漿子激發，而表面電漿波為漸逝波激發後的一種類型，也常被認定為就是漸逝波的一種。當電磁波通過界面時，因物質介面折射率大幅度改變，直觀上可以解釋原光源經界面產生反射與折射現象，從能量守恆理論，總光強度不會因此減弱，但由精準的光二極體量測下，特定頻譜下之單色光強度衰弱的很快。

$$n_1 \sin \theta_c = n_2 \sin 90^\circ$$

$$\text{或 } \theta_c = \sin^{-1} \left( \frac{n_2}{n_1} \right) \quad (2-1)$$

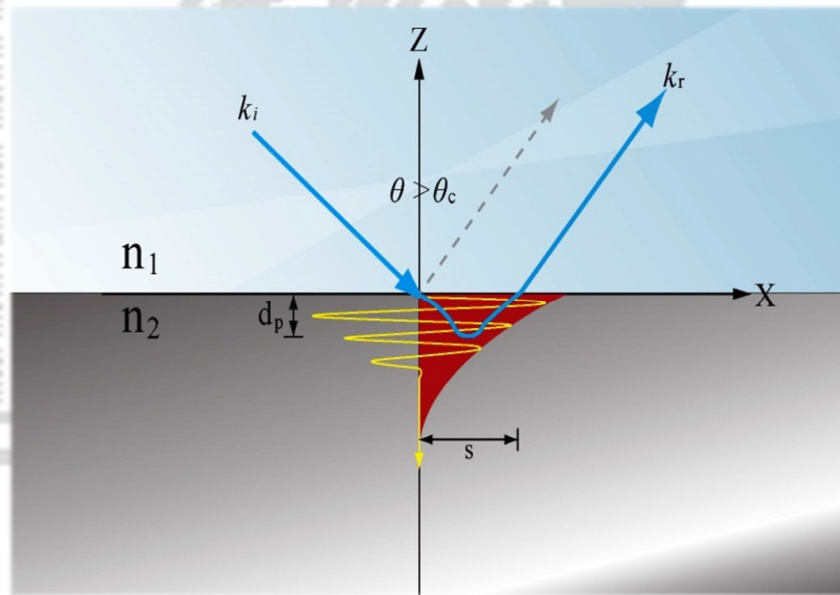


圖 2-1 Goos-Haenchen effect 示意圖

根據圖 2-1 中可以看出，光源經過金屬表面反射後，由於表面自由電子會受電磁波震盪，而吸收光源並且立即釋放，此一現象為電子色散之表現，然而光源可以被認定為穿透了極為淺的膚深(Skin depth)，也正因如此與原光源有了光程差

及光路平行位移，此一現象被稱為 Goos-Haenchen effect [16, 17]。

### 2.1.2 表面電漿與金屬色散原理與電漿子(Plasmon)理論

由於漸逝波傳遞膚深距離約為十奈米至數百奈米之間，欲利用全反射架構下產生表面電漿共振，則必須選用介於膚深範圍中的薄膜厚度，從過去文獻中得知 40 nm 至 50 nm 厚度之黃金薄膜，具有良好的激發能力。表面平整的金膜上帶有大量且均勻分布之自由電子海，藉由全反射所產生之漸逝波推動下，使得海波蕩漾，當自由電子受到特定外加電磁場作用，光波能量偶合於電子中，此時稱此自由電子為表面電漿子(Surface plasmon)，而其所反應過程稱為表面電漿共振(Surface plasmon resonance, SPR)。

電漿意思是指某種或多種原子之離子與游離電子，於特定情況中同時存在。同理在固態物理中，所謂電漿子學便是解釋固態金屬中，自由電子、金屬離子與外層所游離之電子共同存在的一種狀態。外加電磁場改變表面電場分布後，使得電子橫向聚集與縱向來回震盪，進而產生電子集體相對於原子核運動，然而固態物體中這樣電漿子所能傳遞之距離遠小於氣體電漿，只能夠於表面傳遞一小段距離。影響電場分佈的因素主要分為：電漿頻率(Surface plasmon frequency)、金屬介電常數(Metal permittivity)、共振頻率(Resonance frequency)與阻尼係數(Damping ratio)等[16, 17]。由古典電磁學理論中，金屬中自由電子所受之力大致可由古典力學中，利用模型方程式運算，如(式 2-2)、(式 2-3)、(式 2-4)，其中 $\omega_0$ 為自然共振頻率、 $\Gamma$ 為阻尼係數、 $\omega$ 為外加電場頻率。

$$m \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} = eEe^{-i\omega t} - m\Gamma \frac{\partial r}{\partial t} \quad (2-2)$$

$$r = r_0 e^{-i\omega t} \quad (2-3)$$

$$r_0 = \frac{e}{m} \frac{E}{\omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (2-4)$$

上式若不計阻尼效應，可由 Drude-Sommerfeld theory 的自由電子模型詮釋。而介電係數( $\epsilon_{Drude}(\omega)$ )為金屬色散能力亦可以求得，且折射率 $n = \sqrt{\epsilon}$ 。下



圖 2-2 為理論上具有自由電子雲的黃金介電常數，不同波長下介電系數的實部與虛部之量值表示，其中橫軸為波長、縱軸為介電系數大小。

$$P = Np = Ner\left(\frac{e^2}{m} \frac{E}{\omega^2 + i\Gamma\omega}\right) \quad (2-5)$$

$$D = \epsilon_0 E + P = \epsilon_0 \left(1 - N \frac{e^2}{m \epsilon_0 (\omega^2 + i\Gamma\omega)}\right) E \quad (2-6)$$

上式經過理論計算後，可以得自由電子於無束縛的金屬中之介電常數：

$$\epsilon_{\text{Drude}}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\Gamma\omega} \quad (2-7)$$

$$\epsilon_{\text{Drude}}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma^2} + i \frac{\gamma \omega_p^2}{\omega(\omega^2 + \Gamma^2)} \quad (2-8)$$

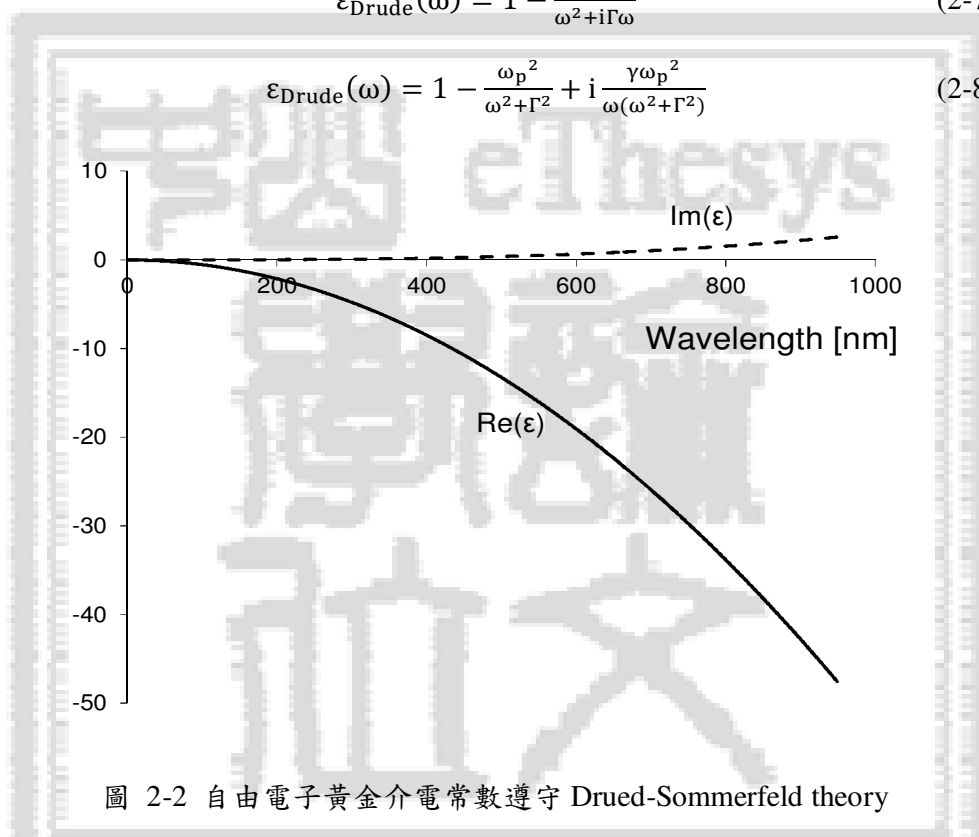


圖 2-2 自由電子黃金介電常數遵守 Drued-Sommerfeld theory

1972 年 Johnson 和 Christy 兩位學者量測過程發現，黃金介電常數與自由電子理論仍有出入，自由電子於金屬終能然部分被束縛，稱之為內束縛傳遞 (interband transition) [18, 19]，進而修正介電系數之公式。

首先假設金屬色散過程中，不只有自由電子參與，被束縛墊子仍有機會被外加電磁場所影響，原來的方程式則可改寫成以下(式 2-9)所表示：

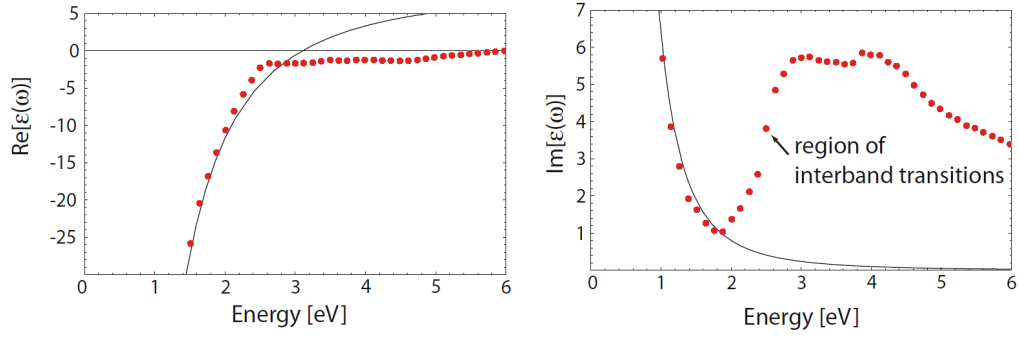


圖 2-3 自由電子雲之介電係數與實際量測 [20]

$$m \frac{\partial^2 r}{\partial t^2} = -m\omega_0^2 r + eEe^{-i\omega t} - m\gamma \frac{\partial r}{\partial t} \quad (2-9)$$

$$\Gamma_0 = \frac{e}{m} \frac{E}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma\omega} \quad (2-10)$$

以上為其束縛電子受電磁波所致動之運動方程式，緊接著便以帶入介電方程

(式 2-11)、(式 2-12)：

$$P = Np = Ner \left( \frac{e^2}{m} \frac{E}{(\omega_0^2 - \omega^2)} \right) \quad (2-11)$$

$$D = \epsilon_0 E + P = \epsilon_0 \left( 1 - N \frac{e^2}{m \epsilon_0 (\omega_0^2 - \omega^2)} \right) E \quad (2-12)$$

進而計算出束縛電子介電常數如式 2-13：

$$\epsilon_{interband}(\omega) = 1 - \frac{\tilde{\omega}_p^2}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\gamma\omega} \quad (2-13)$$

然而金屬折射係數為虛數，未必面其計算及模擬上複雜，將(式 2-13)實部與虛部分開書寫，為(式 2-14)所表示：

$$\epsilon_{interband}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} + i \frac{\gamma \omega_p^2}{\omega(\omega^2 + \gamma^2)} \quad (2-14)$$

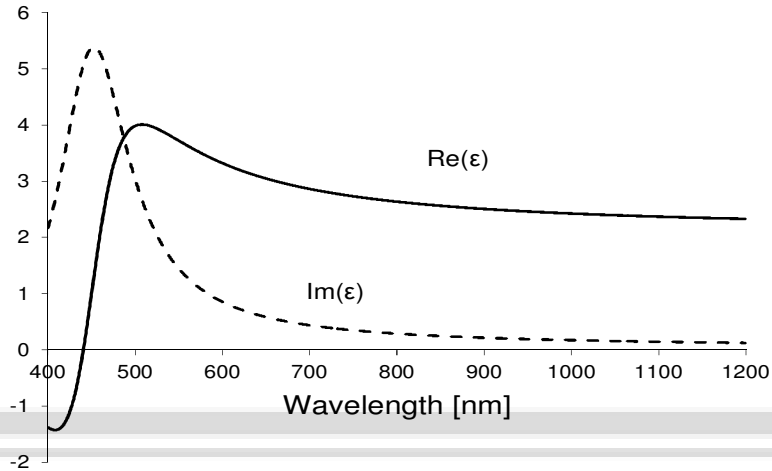


圖 2-4 金屬內電子受束縛影響，所得之介電系數修正

修正後的金屬介電系數為自由電子與受束縛電子之疊加態(式 2-15)，其曲線便與實際值相符合。圖 2-5 即為校正過後之金屬介電常數與實際量測數值做對比。

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{Drude}(\omega) + \epsilon_{interband}(\omega) \quad (2-15)$$

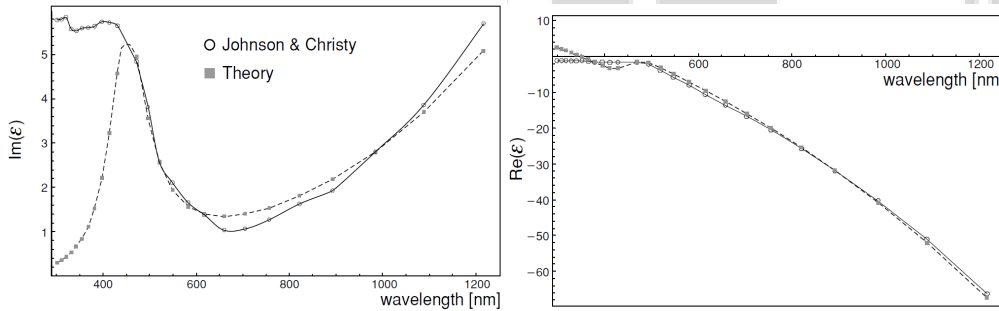


圖 2-5 理論介電系數取線與實際量測曲線。[21]

### 2.1.3 偏振光學原理馬克斯威方程

1930 年真空蒸鍍設備問世後，光學薄膜科技便廣為討論與發展。當金屬原子或其他化合物分子沉積於被鍍物表面時，通常會形成孤島狀非均質聚集，如此一來光學性質會以複雜形式如干涉、非均折射以及散射等呈現。幸運的是在探討光學薄膜干涉或是界面色散問題時，只需探討鉛直分量之光學參數，然而薄膜發生干涉時之厚度與光波長相去不遠，這大幅減低了光學模擬上的難度。以下導入

馬克斯威電磁方程式(Maxwell equation)，及偏振光於介面時候，如何與表面電漿子形成能量耦合進行數學上的探討與描述：

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad (2-16)$$

$$\vec{\nabla} \times \mu \vec{H} = \mu \left( \vec{J} + \mu \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) \quad (2-17)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon} \quad (2-18)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (2-19)$$

考慮一金屬薄膜或介電質無整體電位上之提升，以及無偏壓電場驅動的電荷流動，故表面電荷密度( $\rho$ )與電流密度( $J$ )量值皆為零，此時馬克斯威電磁方程式可由(式 2-16)~(式 2-19)改寫成(式 2-20)~(式 2-22)：

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad (2-20)$$

$$\vec{\nabla} \times \mu \vec{H} = \mu \epsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (2-21)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \quad (2-22)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (2-23)$$

以上方程式中，符號分別為磁導率( $\mu$ )、電容率( $\epsilon$ )、電導係數( $\sigma$ )、電流密度( $J$ )。於介質中磁導率 $\mu$  磁 $\mu_r \mu_0$ ，電容率 $\epsilon$  電 $\epsilon_r \epsilon_0$ ，而在均質光學薄膜中 $\mu$  膜、 $\epsilon$ 、 $\sigma$  皆為常數。

假定 X-Z 平面為平面電磁波之入射平面，電磁波之電磁場可以下式做為電磁波數學表達式：

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot e^{k_x X} \cdot e^{-k_z Z} \cdot e^{-i\omega t} \quad (2-23)$$

$$\vec{H} = \vec{H}_0 \cdot e^{k_x X} \cdot e^{-k_z Z} \cdot e^{-i\omega t} \quad (2-24)$$

其中入射之偏振光源，可依據其電場偏振方向分類，若平行入射平面稱之為 TM 模態(P-wave)，反之電場垂直入射面時稱之為 TE 模態(S-wave) 圖 2-6。

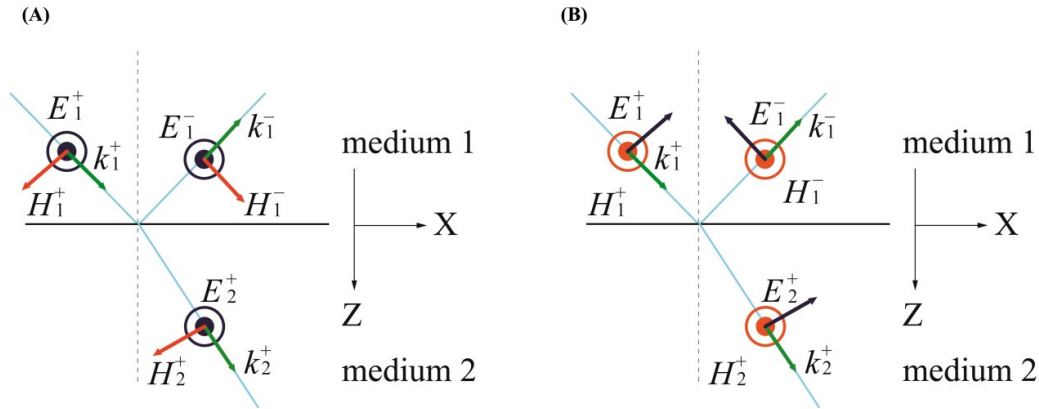


圖 2-6(A)TE 模態光源與 (B)TM 模態光源示意圖

TM 模態之光源可以產生表面電漿波，TE 模態光源並無法激發出電漿子之震盪，依據此性質(式 2-25)、(式 2-26) 為 TM 模態電磁波之數學方程式：

$$\vec{E} = (E_x, 0, E_z) \cdot e^{k_x X} \cdot e^{-k_z Z} \cdot e^{-i\omega t} \quad (2-25)$$

$$\vec{H} = (0, H_y, 0) \cdot e^{k_x X} \cdot e^{-k_z Z} \cdot e^{-i\omega t} \quad (2-26)$$

當 TM 模態電磁波由介電質入射金屬時，金屬與介電質之間的邊界，必須滿足以下(式 2-27)~(式 2-30)邊界方程式才能夠存在，計算過程中 TE 模態光源無法符合邊界方程。

$$E_{x1} = E_{x2} \quad (2-27)$$

$$H_{y1} = H_{y2} \quad (2-28)$$

$$D_{z1} = D_{z2} \quad (2-29)$$

$$D_{z1} = \epsilon_1 E_{z1} ; D_{z2} = \epsilon_2 E_{z2} \quad (2-30)$$

將 TM 模態數學式與邊界方程式運算後，可得下(式 2-31)~(式 2-34)：

$$k_{x1} = k_{x2} = k_x \quad (2-31)$$

$$\frac{\partial H_{yi}}{\partial z} = -\epsilon E_{zi} \frac{\omega}{c} \quad (2-32)$$

$$k_{z1} H_{y1} = -\frac{\omega}{c} \epsilon_1 E_{x1} \quad (2-33)$$

$$k_{z2} H_{y2} = \frac{\omega}{c} \epsilon_2 E_{x2} \quad (2-34)$$

又(式 2-31)~(式 2-34) 中，與  $H_{y1} = H_{y2}$  聯立得知：

$$D_z = \frac{k_{z1}}{\varepsilon_1} + \frac{k_{z2}}{\varepsilon_2} = 0 \quad (2-35)$$

推導至上式後，發現光動量不能是負值，然而兩項相加為零則必有一項為負，便可以大膽推斷，金屬折射係數 $\varepsilon_1$ 必為負值，而介電質折射率 $\varepsilon_2$ 本就為正值。每當選定光源波長以及金屬材質介電材質，定可推斷出必要耦合之光動量，以符合推動表面電漿波之波數。

由平面電磁波理論加上表面電漿波理論之構想，表面電漿波猶如在金屬與介電質介面遊走之光波導管，所以必須符合光波導中傳遞原理如(式 2-36)、(式 2-37)：

$$k_x^2 + k_{z1}^2 = \varepsilon_{z1} k^2 \quad (2-36)$$

$$k_x^2 + k_{z2}^2 = \varepsilon_{z2} k^2 \quad (2-37)$$

其中 $k$ 為光波導管之傳遞係數，此為表面電漿波傳遞係數，其理論運算後所得之特徵值，即為表面電漿波之波數：

$$k_{x,spw} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad (2-38)$$

然而表面電漿波於金屬介面上傳遞的過程中，金屬折射率是為複數方程式(式 2-39)，將其帶入表面電漿波動量中，計算後得(式 2-40、2-41)， $k_x'$ 為實數視為表面電漿傳遞之動量，而 $k_x''$ 為虛數部分為消散過程中的變數：必須考慮到電磁波於金屬介面的散失， $\lambda_{SPP}$ 為表面電漿波之波長。

$$\varepsilon_m = \varepsilon_{m1} + i\varepsilon_{m2} \quad ; \quad k_x = k_x' + ik_x'' \quad (2-39)$$

$$k_x' \approx \sqrt{\frac{\varepsilon_{m1} \varepsilon_2}{\varepsilon_{m1} + \varepsilon_2}} \frac{\omega}{c} \quad (2-40)$$

$$k_x'' \approx \sqrt{\frac{\varepsilon_{m1} \varepsilon_2}{\varepsilon_{m1} + \varepsilon_2}} \frac{\varepsilon_{m2} \varepsilon_2}{2\varepsilon_{m1}(\varepsilon_{m1} + \varepsilon_2)} \frac{\omega}{c} \quad (2-41)$$

$$\lambda_{SPP} = \frac{2\pi}{k_x} \approx \sqrt{\frac{\varepsilon_{m1} + \varepsilon_2}{\varepsilon_{m1} \varepsilon_2}} \lambda \quad (2-42)$$

## 2.1.4 表面電漿激發原理

前一節探討完表面電漿波產生機制:必須藉由足夠的光動量所推動，當消散波產生時其水平動量必須大於表面電漿波所需的動量  $K_{sp}$ ，必須藉由外加電磁場，經過一線性偏振片，以特定偏振方向入射後，使得水平光動量擁有足夠動量極化金屬表面電漿子，致使鉛直光動量耦合能量於電漿子上。然而若只探討位於兩介質間之金屬層，任何位於介電質中的電磁波，並不足以激發消散波來制動表面電漿波，必須藉由特定方式耦合之光動量(圖 2-7)。

常見激發表面電漿波的方式，大致可分為稜鏡耦合(Prism coupling)、光柵耦合(Grating coupling)及光波導耦合(Waveguide coupling)。以下對於三種耦合類型原理進行逐一介紹。

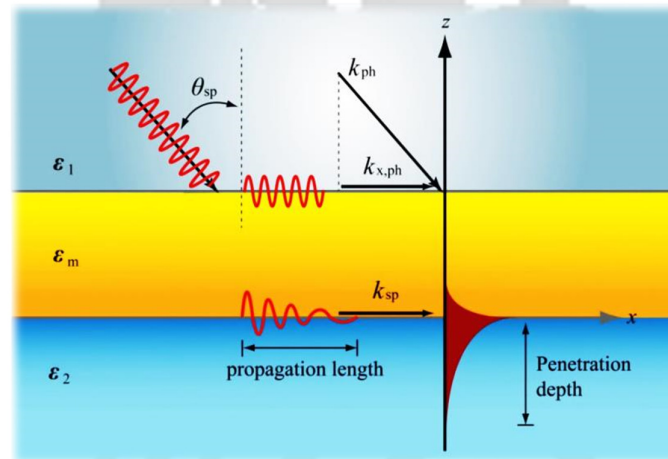


圖 2-7 介電質-金屬薄膜-樣本介電質動量匹配示意圖

### 2.1.4.1 稜鏡耦合方式

稜鏡耦合(Prism based coupling)機制為利用一高折射係數介電材料，作為光密介質，於其介電質與樣本之間做全反射，用以產生漸逝波而致動表面電漿子共振。當偏振光線以角度  $\theta$  入射介電質與金屬薄膜介面，其波動量可以(式 2-43)表示，如果入射光波長固定，亦即光頻率為定值，則在某一特定入射角度能使得光能量耦合於表面電漿子中，此特定角度稱之為表面電漿共振角。如圖 2-8。

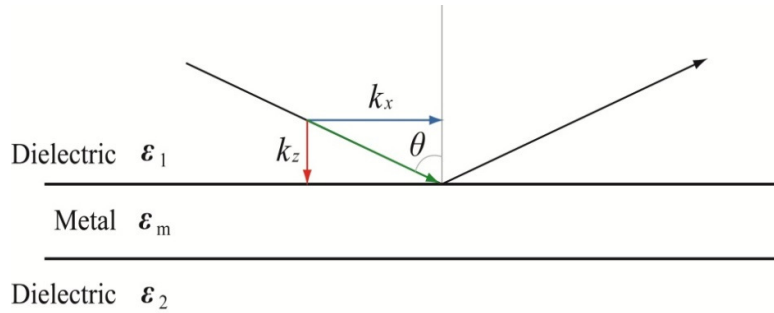


圖 2-8 變角度光動量匹配示意圖

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_1} \sin \theta \quad (2-43)$$

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_1} \sin \theta = k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_2}{\epsilon_m + \epsilon_2}} \quad (2-44)$$

$$\theta = \sin^{-1} \operatorname{Re} \left( \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_2}{\epsilon_m + \epsilon_2}} \right) \quad (2-45)$$

於圖 2-9 中，A 線於空氣中以某一角度入射黃金薄膜之 B 線為空氣中平行於介面光色散曲線 C 在稜鏡中以某一角度入射黃金薄膜之色散曲線 D 於稜鏡與黃金介面以水平入射之色散曲線。由此看出，雖然金屬薄膜已充滿自由電子，但空氣折射率在射散曲線 A、B 下的表現，仍然無法以簡單的電磁場激發表面電漿，此時若將金屬薄膜貼附於高折射係數稜鏡下如色散曲線 C、D，可清楚見到與表面電漿折射率有交點，此即為表面電漿共振的色散關係。

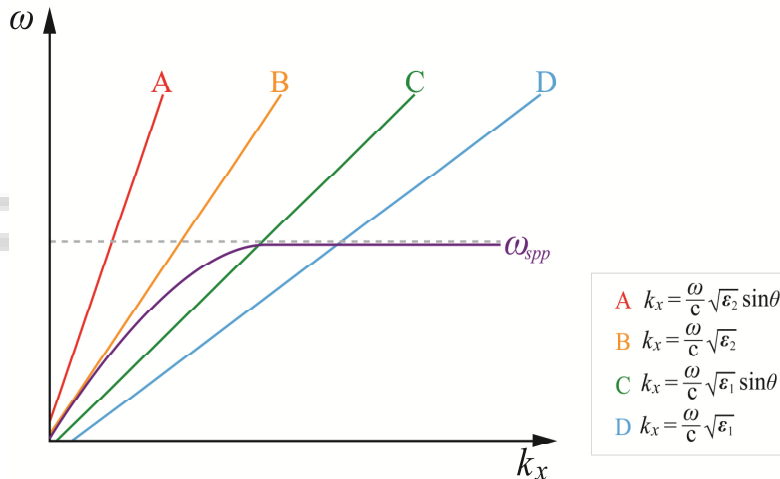


圖 2-9 稜鏡系統中(A)以角度入射空氣黃金介面(B)以水平入射空氣黃金介面(C)以角度入射稜鏡黃金介面(D)以水平入射稜鏡黃金介面

以稜鏡耦合出表面電漿的方式共分為兩種：



### (1) Otto 式架構

根據表面電漿此一架構，1968 年 Otto A. 學者[22]提出以稜鏡與金屬間，夾有一極小縫隙，其大小約為 1250 nm 至 250 nm，然而這間距便是漸逝波可以傳遞之鉛直距離即為膚深。在此間可填入欲量測樣本，當光線經過稜鏡全反射後會產生漸逝波，此漸逝波的強度足以激發黃金表面電漿子震盪。然而晶片封裝過程會造成兼具的差異，所量測表面電漿共振角度便會有很大的出入，所以製程上較為嚴謹，也因此技術門檻較高。

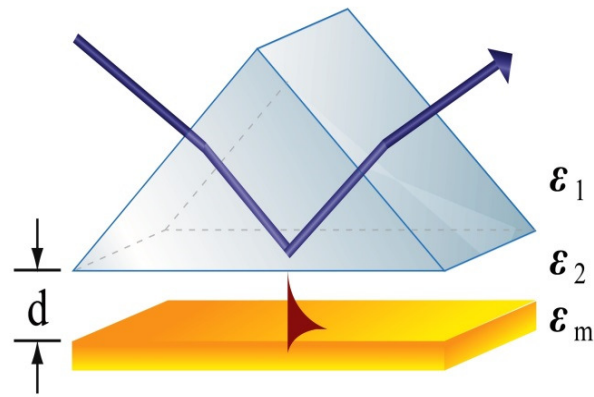


圖 2-10 Otto 式光柵耦合示意圖[22]

### (2) Kretschmann 式稜鏡耦合

此一方式是由 1969 年 Kretschmann 和 Raether[23]一同提出，將黃金薄膜鍍在稜鏡表面，直接利用稜鏡與黃金介面產生的漸逝波，推動黃金與樣本介面的電漿波，與 Otto 差別的是，這樣的架構不需要精準地控制金薄膜與稜鏡之間的縫隙，減少一個參數的不定性，使得實驗的精準度大幅提升，而製程也比 Otto 式更加快速準確。考慮此一方式於光學微流體製程中較易被實現，本研究中亦採用此一光學架構進行表面電漿子的激發。

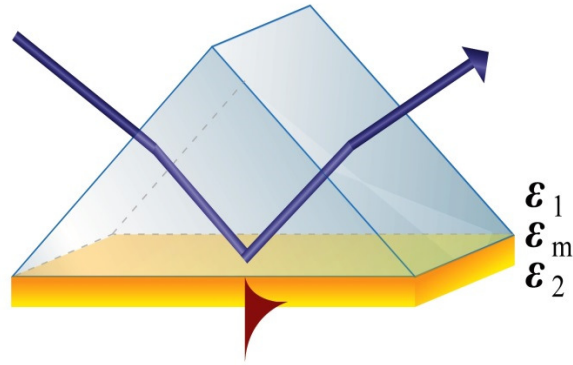


圖 2-11 Kretschmann 式稜鏡耦合示意圖[23]

#### 2.1.4.2 光柵式耦合

光柵式耦合(Grating coupling)於 1902 年 Wood[24]進行一項金屬光柵反射後的光譜量測，意外的發現非預期中的各定光譜吸收，後來在 Rayleigh 等學者理論推導下證明表面電漿的存在，並於 1907 年提出關於光柵激發表面電漿之現象初步解釋[25]，直到 1957 年 Ritchie [26]才將光柵表面電漿子理論進一步的詮釋與驗證。圖 2-12 為光源於光柵反射後之表面電漿波數描述圖。

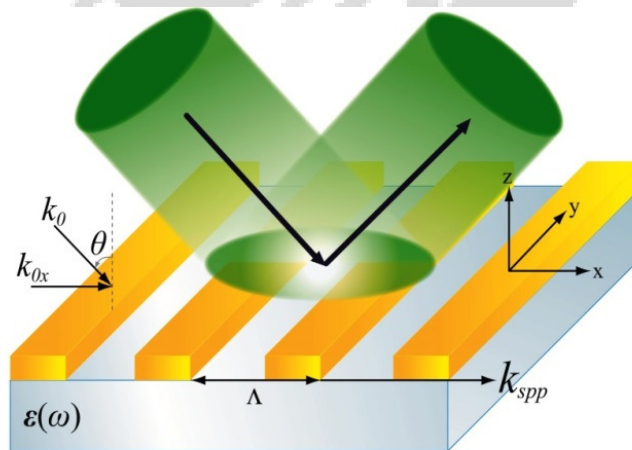


圖 2-12 光柵耦合示意圖[24]

然而 1957 年，Ritchie 等學者當時所使用的光源仍為簡單的鎢絲燈，隨著科技不斷進步，越精細的量測儀器及先進的雷射光源取代過去連續光譜量測，光柵結構已經可以量測奈米結構的表面電漿吸收。而光柵激發關係式如下：

$$k_{x,\text{light}} = k_0 \sin \theta i \frac{2\pi}{\Lambda} m = \frac{\omega}{c} \sin \theta + \frac{2\pi}{\Lambda} m = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m}{1+\epsilon_m}} k_{\text{sp}} \quad (2-46)$$

$$k_{x,\text{light}} = k_0 \sqrt{\epsilon_1} \sin \theta i \frac{2\pi}{\Lambda} m = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_1} \sin \theta + \frac{2\pi}{\Lambda} m = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_m}{\epsilon_1 + \epsilon_m}} k_{\text{sp}} \quad (2-47)$$

光柵耦合可分為兩種因素，一為單純只有光柵結構於黃金表面，另一種為黃金光柵結構而不使用稜鏡做為光動量之匹配，仍然可以達到光波動量耦合，如上(式 2-46) 為不使用稜鏡下光柵耦合方程式，而(式 2-47)則是利用光柵及稜鏡就折射率共同達到光動量匹配。

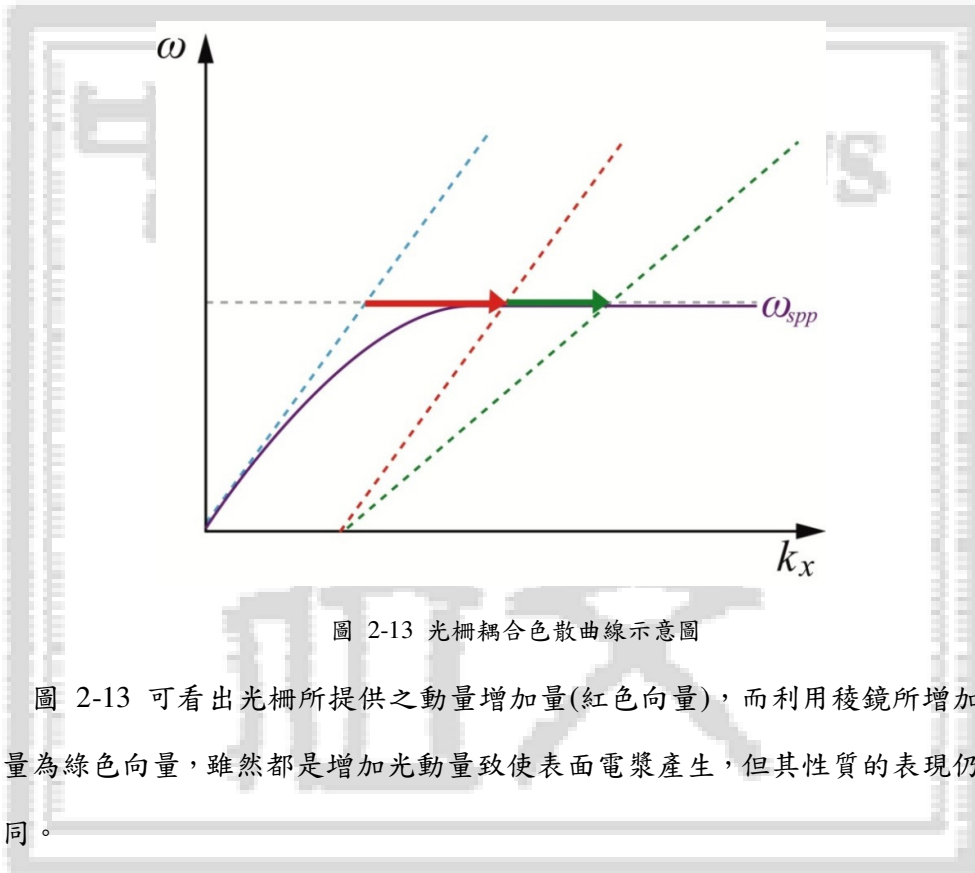


圖 2-13 光柵耦合色散曲線示意圖

圖 2-13 可看出光柵所提供之動量增加量(紅色向量)，而利用稜鏡所增加之動量為綠色向量，雖然都是增加光動量致使表面電漿產生，但其性質的表現仍有不同。

#### 2.1.4.3 波導耦合(Waveguide coupling)

由於光源於光纖中是以全反射進行光線的傳遞，其內徑乘載光源的高折射係數材料與空氣介面可做為表面電漿感測層，過去皆以全波段光源入射後得吸收頻譜。

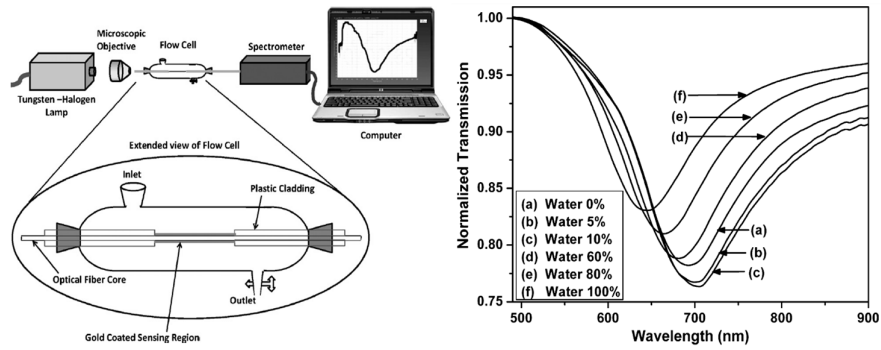


圖 2-14 利用光纖全反射原理，運用表面電漿感測器[27]

Srivastava 等[27]學者致力於使用光纖做為表面電漿感測器之研究已行之有年，圖 2-14 (A)為其中一篇文獻，是利用去除披覆 cladding 之光纖表面，以利用等速旋轉架構固定光纖於其上，進入濺鍍機中濺鍍黃金薄膜於裸光纖表面做為感測層。當白光連續光譜藉由光纖準直鏡耦入光纖後，便會經過鍍有感測層之裸光纖，經由通入不同折射率之液體，改變共振波長，於光纖後端利用光譜儀進行分析。圖 2-14(B)為量測不同濃度酒精所吸收之表面電漿共振波長，折射率越高，其共振波長往紅光位移。

此外 Gupta 等學者也致力於光波導表面電漿共振之研究，但其研究皆與光纖製程緊密結合。圖 2-15(A)為利用彎曲光纖切削過後，其光纖核心與光波導介面耦合，過程中光纖中的光源會致使波島上的表面電漿子產生共振，進而以表面電漿波傳遞出去，圖 2-15(B)為使用這樣的光波導架構下，量測不同折射率樣本的结果圖，其橫軸為量測時序，縱軸為表面電漿共振波長。

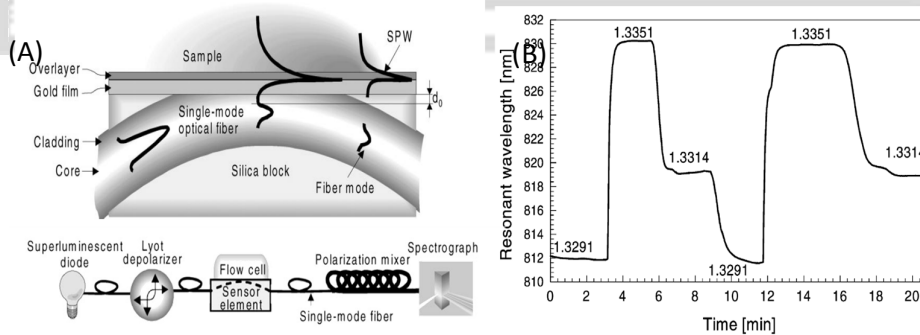


圖 2-15 (A)使用光纖架構之光波導激發表面電漿共振(B)相異折射率表面電漿共振波長量測[28]

## 2.2 表面電漿共振激發與量測方式

裸露的金屬薄膜的受到化學性吸附、物理性吸附或者氧化等，都會改變其表面的折射率，大部分研究著重在樣本與金屬薄膜之間，製作一成鏈結器(Linker)後，形成第四層薄膜作為傳感器最重要之一員。此一薄膜視研究而定，在生化分子免疫分析 BIA 系統中，最常被作為接合抗原與抗體之媒介[29]。此時 TM 偏振態的光源經此四層光學薄膜系統全反射，所擷取訊號視量測機構而定，且先不考慮敏感度、精確度以及系統穩定性可再現性等，大致可分為調變角度量測、調變波長量測、光強度量測三種量測方法：

### 2.2.1 調變角度量測

於光學架構下對稜鏡系統或其他調變角度的光學架構，入射單色偏振光波後量測反射光強度之消長。當樣本折射率固定時，表面電漿所需耦合光動量為定值，可以計算出特定共振角度，只有在此角度下才能激發產生表面電漿共振。如圖 2-16 所示，當待測物折射率改變時，表面電漿共振角度隨著折射率上升而增加，反之折射率若降低，共振角度也會隨之減少。

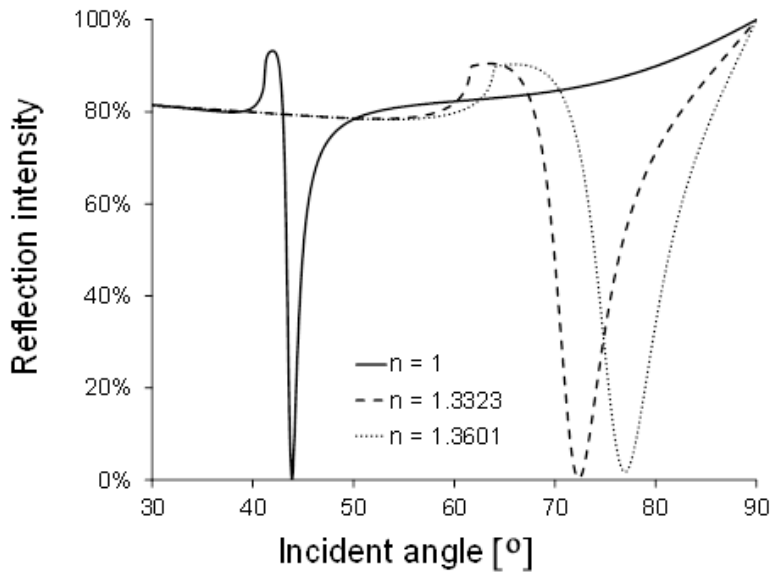


圖 2-16 調變角度量測系統訊號圖

## 2.2.2 調變波長量測

固定角度下使用全波段白光，或者連續波長光源進行表面便將共振量測。經過全反射後藉由光譜儀進行分析不同波長之光強度變化量，由於入射角度固定，而對應到表面電漿共振的吸收波長經理論推導下也唯一，故此一性質可作為調變波長的表面電漿量測。其量測靈敏度取決於光譜儀的解析度，以及液體折射率改變後吸收波長的位移量。

## 2.2.3 光強度量測

於定角度量測或是定波長量測下，根據採用之紀錄方式，仍可歸納出以光強度作為量測的光學架構。此一量測方式必須先得知共振起始之基準值，利用光感測端設定於該共振角度，或者鎖定單一共振波長，當電漿子共振因感測介面物理或化學性之吸附欲測物質時，因鎖定之角度(或波長)已非共振吸收最大，而反射強度變強，如此判斷介面物理性質已然改變，而得知所欲量測之性質。這樣的量測方式與前兩種量測方式比較，敏感度相對高，但只能作用於定性量測，且必須以精準之數學模擬作配套詮釋。

## 2.3 表面電漿於生醫免疫分析之運用

若以量測方式歸納免疫學分析種類可分為：放射免疫學分析(RIA)、酵素免疫分析(EIA)、聯結免疫吸附試驗(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、螢光免疫分析(FIA)，生物分子交互作用分析(BIA)等。雖然 RIA、ELISA 與 FIA 量測速率快，但危險性高、量測之樣本所需擷取的量較大，且檢測試劑相對昂貴，所以本研究利用最簡易之生化交互作用免疫分析(BIA)。

在本節中主要探討於前文中所提及，影響表面電漿波的第四層吸附薄膜。過程中利用吸附動力學來探討自組裝薄膜(Self-assemble monolayer)，黃金基本自組裝薄膜包含一配體官能基能(Ligand)，配體的官能基選擇視基板而定，本研究中選擇易與表面黃金形成之硫鍵。配體後為長碳鏈分子做為間隔(Spacer)，其鏈結長度大約為 1 nm 到 10 nm 之間，碳鏈越長最於表面電漿波的影響相對增加，而

末端官能基則是視生化分子總類而決定。

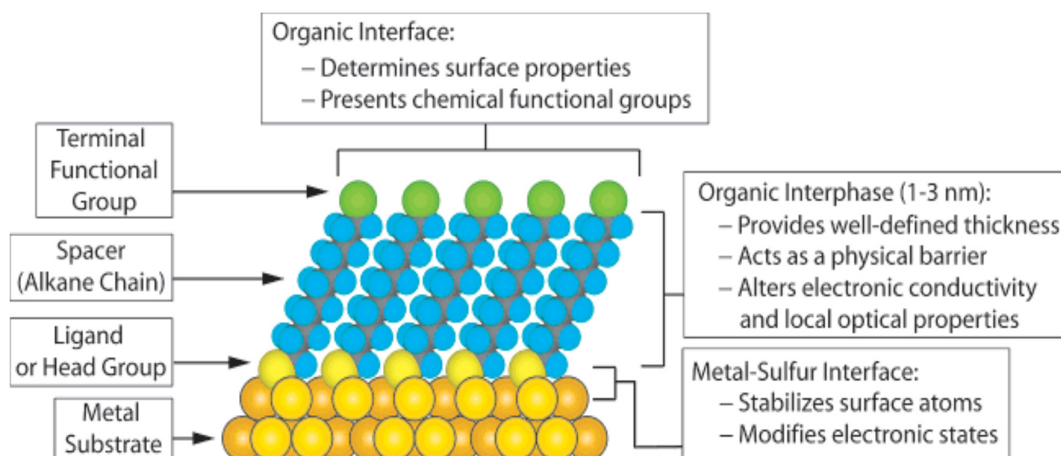




圖 2-17 自組裝薄膜示意圖[30]

### 2.3.1 薄膜自組裝表面改質與免疫分析

過去大量文獻中指出，可利用金屬與有機官能基之間凡德瓦爾力(Van der waals' force)，可將黃金表面固定上高分子作改質，進而用於生化交互作用免疫分析(BIA)中，已經被廣泛運用在生醫感測晶片上。

表 2-1 金屬與半導體於自組裝薄膜材質選歸納表

| 配體               | 基板材質                                     | 基板型態            |                   |
|------------------|--|-----------------|-------------------|
|                  |  | 薄膜<br>或<br>塊狀材料 | 奈米粒子<br>或<br>奈米結構 |
| ROH              | Si-H                                     | [31]            |                   |
|                  | Si                                       | [32]            |                   |
| RCOO-/RCOOH      | $\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [33, 34]        |                   |
|                  | Fe <sub>x</sub> O <sub>y</sub>           |                 | [35]              |
|                  | Ni                                       |                 | [36, 37]          |
|                  | Ti/TiO <sub>2</sub>                      | [38]            |                   |
| RCOO-OOCR        | Si(111):H                                | [39]            |                   |
|                  | Si(100):H                                |                 |                   |
| RNH <sub>2</sub> | FeO <sub>2</sub>                         | [40]            |                   |

|   |   |          |          |
|---|---|----------|----------|
|   | Stainless Steel                                   | [41]     |          |
|   | 316L  |          |          |
|   | YBa <sub>2</sub> Cu <sub>3</sub> O <sub>7-δ</sub> | [42]     |          |
|   | CdSe  |          | [43]     |
| RC≡N  | Ag  | [44]     |          |
|   | Au  |          |          |
| RSH   | Ag  | [45]     | [46, 47] |
|   | Ag <sub>90</sub> Ni <sub>10</sub>                 | [48]     |          |
|   | Au  | [45]     | [49]     |
|   | AuAg  |          | [50]     |
|   | AuCu  |          | [50]     |
|   | CdTe  |          | [51]     |
|   | CdSe  |          | [52]     |
|   | CdS   | [53, 54] |          |
|   | Cu  | [45]     | [50]     |
|   | GaAs  | [55]     |          |
|   | PbS   |          | [56, 57] |
|   | Pd  |          | [58]     |
|   | PdAg  |          | [50]     |
|   | Pt  |          | [59]     |
|   | Ru  |          | [60]     |
|   | YBa <sub>2</sub> Cu <sub>3</sub> O <sub>7-δ</sub> | [61]     |          |
|   | Zn  | [62]     |          |
|   | ZnSe  | [63]     |          |
|   | Au  |          | [64]     |
|  | Au  | [65]     |          |
| RSR'  | Ag  | [66]     | [67]     |
| RSSR'   | Au  |          | [67, 68] |
|   | CdS   |          | [54]     |
|  | Au  | [69]     |          |

由表 2-1 中可看出，黃金、銀與銅都能夠與硫基(R-HS)做自組裝薄膜的共價鍵結[45, 70]，其中又以黃金化學性質最為安定，故過去文獻中與研究上大多採



用金薄膜作為表面電漿感測端。1991 年 Johnson 等學者，於研究表面電漿共振傳感器時，利用自組裝薄膜將黃金表面改質成有機官能基(-COOH)，使其能與有機物進行第二次接合，或與生物分子因凡德瓦爾力而互相吸引，藉由此特性改變金薄膜表面特性，再結合表面電漿感測達到生醫檢測目的[71, 72]。

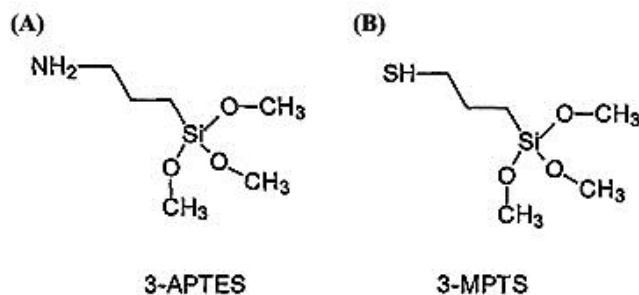


圖 2-18(A)具有胺基之 3-APTES 與 (B)具有硫基的 3-MPTS 長碳鏈化合物

然而近年來，微奈米材料的快速進展，表面改質的技術也運用在微電極黏著上，利用矽氧烷基(-Si(OH)<sub>3</sub>)可與羧基(-OH)做共價鍵結，於玻璃基板上鍵結上胺基或者硫基作為尾端，做為鍵結住濺鍍沉積或水熱法所生成之金奈米粒子之媒合器。於表 2-1 中可得知黃金薄膜特性：能與具由硫原子與氮分子的官能基交互作用。其中(圖 2-18) 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane(3-MPTS) 和 3-Aminopropyltriethoxysilane (3-APTES)便符合一端抓住黃金，另一端可緊緊與玻璃形成共價鍵。1998 年 Rogers 等[73]學者，藉由 3-MPTS 改質過的玻璃，與 EDC/NHS 水溶液將後端官能基改質成胺基，用以結合 DNA 陣列固定晶片表面上，進行單股去氧核糖核酸(ssDNA)或 Oligomer 的生醫檢測，以取代過去利用螢光標定的方法如 cDNA 陣列晶片。而於 1999 年 Zammattéo 等[74]學者也提出三種利用長碳鏈表面改質分子，進行 DNA 接合與檢定之製程。

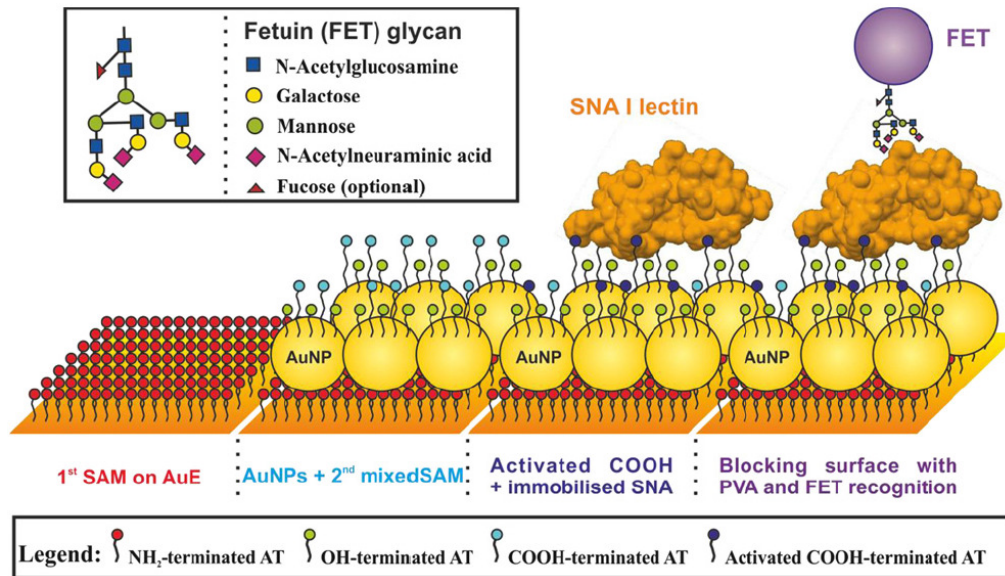


圖 2-19 基板改質與沉積黃金奈米粒子組成薄膜，藉由載有配體(ligand)且可自組裝之長碳鏈分子作為鏈結器(linker)，連接黃金與生物物質如:DNA 或蛋白質等之過程圖[75]。

### 2.3.2 表面電漿共振用於生醫檢測之方法

稜鏡系統為最簡易實現表面電漿共振之方式，目前表面電漿共振的研究大多使用 Kretschmann 式稜鏡耦合，稜鏡生醫量測所選擇的光源較為雷射，由於成本考量大多選擇二極體雷射，下圖 2-20 (A) 為典型的表面電漿共振角度量測系統，先於一玻璃片上鍍上黃金薄膜，選擇與玻璃折射率相同之光學耦合油，利用表面張力將玻璃片貼附於稜鏡面上。此文獻中選用使用兩定波段且共光程之雷射光經過稜鏡後，利用電腦控制載有稜鏡與流體管道的旋轉平台，於光路後端架設光譜儀分析儀器或者光強度計，進行各個角度強度量測。圖 2-20 (B)為變角度生醫量測，其過程中先是使用四種 PBS 做為角度測試量測，同時也是在清洗欲感測之黃金表面，之後注入具有能夠與改質過之表面接合之蛋白質，反應完全後再用相同折射率之 PBS 溶液清洗，明顯看見共振角度大幅度位移。量測完畢必須使黃金表面回復實驗前之活性，只需於流體管道注入鹽酸水溶液，洗淨附著於表面的蛋白質，再進行量測發現共振角度回到原本鎖定之位置。

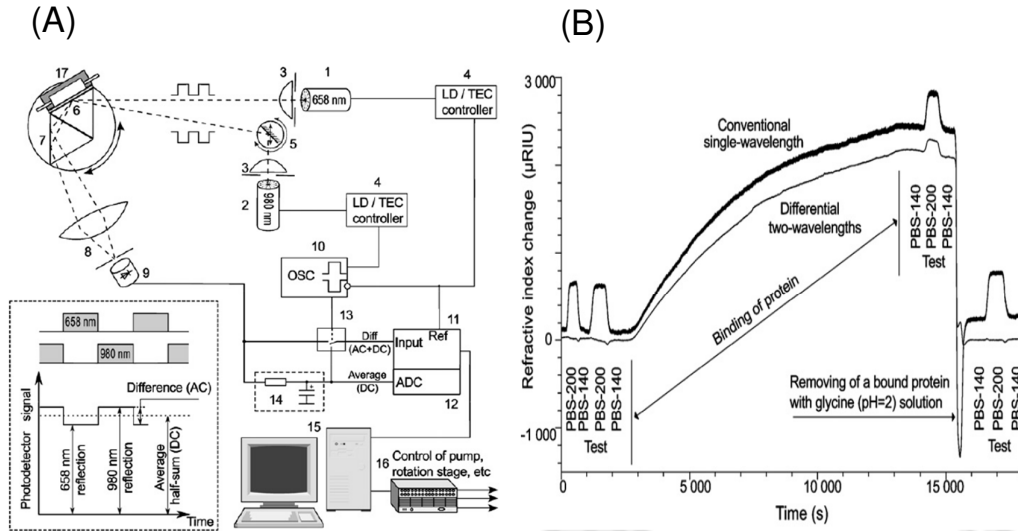


圖 2-20 表面電漿共振調變角度生醫量測系統(A)架構圖 (B)訊號圖[76]

共振角度量測的旋轉架構，其精準度與解析度要求甚高，同時必須以電腦做同步計算與解析，且光路穩定度也會深深影響生醫量測數據。目前可以量測最精細的解析度約為  $10^{-5}$  degree。

圖 2-21 為利用稜鏡表面電漿共振方式進行波長生醫量測，量測過程中由於光源選擇與光路校準皆會影響光源入射角度，所以必須先精準固定光源入射角度，但又因光源選擇及光路校準較為困難，且白光中任何波段在光學稜鏡中的折射率皆不相同，在三稜鏡中紅光較紫光不易折射，紅光折射率較低，紫光折射率高。由於白光必然不為平行光，故量測過程並不會考慮半寬高的比較，而主要關心最大吸收的光波段便可視為表面電漿共振波長。其薄膜折射率改變機制，建立在前文章節中所介紹，薄膜表面改質鍵結生物分子後，其光學特性變化致使表面電漿共振波長位移，利用直覺性高且架構簡單的方法，便能達到精準量測。圖 2-21 (A) 中為抗原與抗體在黃金薄膜表面接合示意圖，表面折射率異動後所對應共振波長漸變成紅光(圖 2-21 (B))，根據變化時間及波長改變量可以判斷表面吸附效率(圖 2-21(c))。

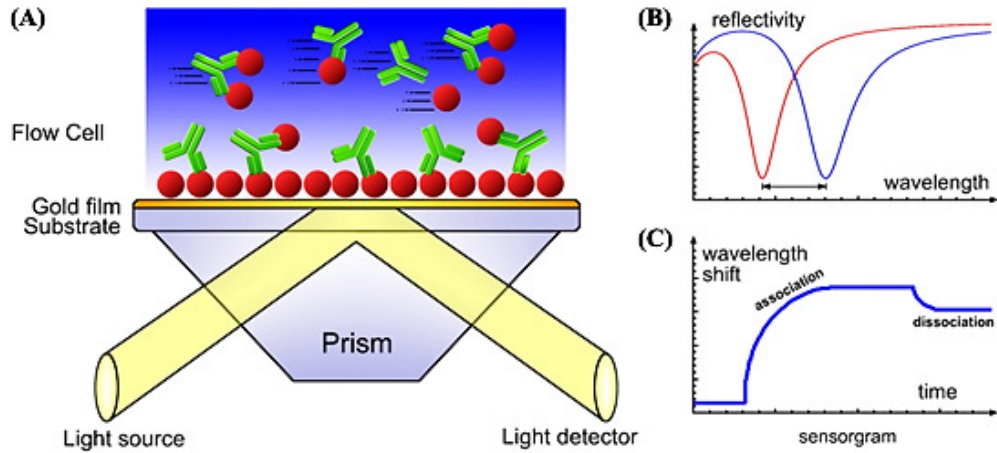


圖 2-21 典型使用波長位移量測於免疫蛋白交互作用量測示意圖[77]

### 2.3.3 表面電漿共振顯微術

1988 年，Knoll 與 Rothenhausler[78]兩位學者率先於 Nature 期刊中發表了表面電漿共振顯微術(Surface plasmon resonance microscopy, SPRM)，將入射角度固定於表面電漿共振角度下，進行全反射後端之影像擷取，以及架設一影像擷取器於表面電漿感測層部分。

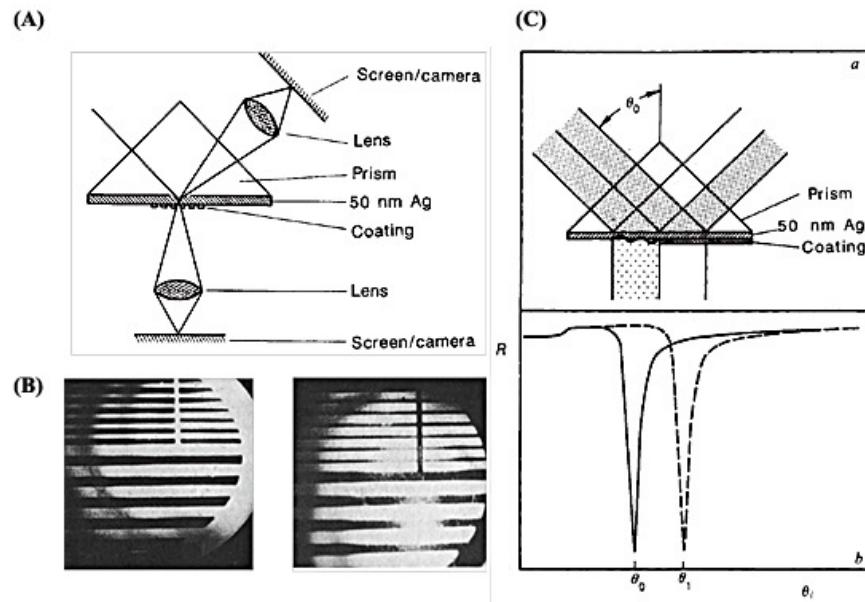


圖 2-22 (A)表面電漿共振顯微術架構圖(B)反射端及感測層影像擷取(C)表面電漿共振顯微術示意圖[11]

圖 2-22(A)為其光學架構簡圖，感測層為 50 nm 厚度的銀薄膜，在銀上利用

光刻顯影技術製作出光柵結構，根據實驗結果顯示(圖 2-22(B))有光柵結構的部分並未在表面電漿共振條件上，故其於全反射的表現下為亮部，有產生表面電漿之部分則為暗區，反之在光柵側索解取的影像會與全反射影像擷取共軛。成功發表此一現象後，1990 年 Knoll [79]更提出利用表面電漿共振顯微術，進行生醫檢測的影像擷取，其原理想同，方法則是使用附著於銀薄膜上的細胞取代之前光柵的方式，做為顯影術的結構。

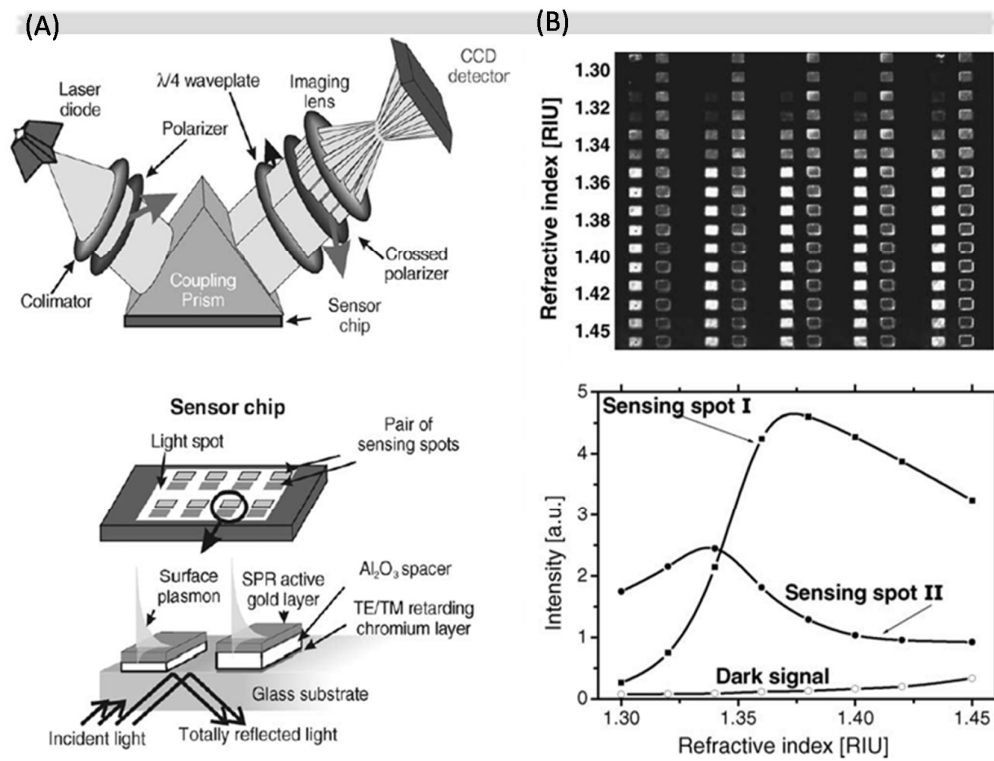


圖 2-23 定角度表面電漿影像量測原理示意圖[80]

2005 年 Piliarik 等[80]學者使用稜鏡架構，採用單色光源及擴束鏡，將平行光源以固定角度方式入設晶片，進行表面電漿共振顯微術(圖 2-23(A))。Hickel 等學者所使用量測方式差異在於 Homola 等學者使用陣列式，於相同折射率下又設計兩個分別鍍有 TE/TM 模態分光層，且每一感測點之折射率都經過量測，圖 2-23(B)為晶片結構示意圖，每格量測區域折射率都不同，上下相鄰兩區域之折射率差異為 0.02 RIU，進行更細微的表面電漿顯微術的原理分析。從此架構可清楚見到，若折射率與入射角度不匹配的狀態下反射強度便會升高，以及 TE 模態

光源跟 TM 模態光源，因產生表面電漿強度的不同，反射的特性表現也不同，而表面電漿顯微術便是藉由此特性，於 CCD 進行實驗設計及數據分析。

#### 2.3.4 全反射式物鏡螢光生醫檢測系統

全反射式螢光顯微系統可分為兩種，一種是利用高折射係數稜鏡，另一種則是使用特製的高數值孔徑(N.A.)的物鏡進行全反射。此兩種方式常被稱為去稜鏡(Prism less)設計，進行全反射推動消散波，以激發鑲嵌在細胞上的螢光分子，且無論採用哪一種方式，入射面及反射面的折射率都非常重要。於顯微鏡上的生醫檢測，最常使用的便是高折射係數的蓋玻片，其表面平整度也較高，假定蓋玻片折射率為 1.515，細胞表面折射率約為 1.38，則經全反射公式計算後其臨界角度約為  $65^\circ$ ，而未接觸到細胞的折射率為 1.33，臨界角度為  $61^\circ$ 。

物鏡在經由高數值孔徑的設計下，藉由一狹縫將光源濾成對稱離軸光源後，便可以在體積非常小的物鏡中進行全反射，所使用的物鏡 NA 值都在 1.4 以上的油鏡。本研究中所採用物鏡 NA 值為 1.49，藉由司乃爾定律(於下一章節中詳細解說)可推算細胞黏附時，臨界角度約為  $77.2^\circ$ ，藉由離軸光源支離軸距離增大，便可以達到大角度入射。然而越接近臨界角度時，漸逝波強度便更為增強，且大部分螢光分子皆是藉由漸逝波能量去激發，故細胞折射率為重要的參數。

近年來由於科技進步快速，許多高折射係數材料漸被發現與運用，其中 Olympus 公司便利用 SF 系列高折射係數玻璃，製作出 NA 值高達 1.69 的全反射式物鏡。高數值孔徑的物鏡因臨界角度變小(約為  $57^\circ$ )，提供了更多的量測範圍(約 25%)，其空間解析度也增高，但其缺點是細胞表面的不平整散射卻相對增強。圖 2-24 為全反射式物鏡工作原理圖，藉由高折射係數玻璃的鏡片組合設計，使聚束的光源(綠色)在物鏡前端與晶片接觸的介面全反射，最後接收散射回來的光源(紅色)進行分析。隨著樣本的折射率不同，全反射的臨界角度便會有所變化，產生消散波的強度以及膚深也不同。

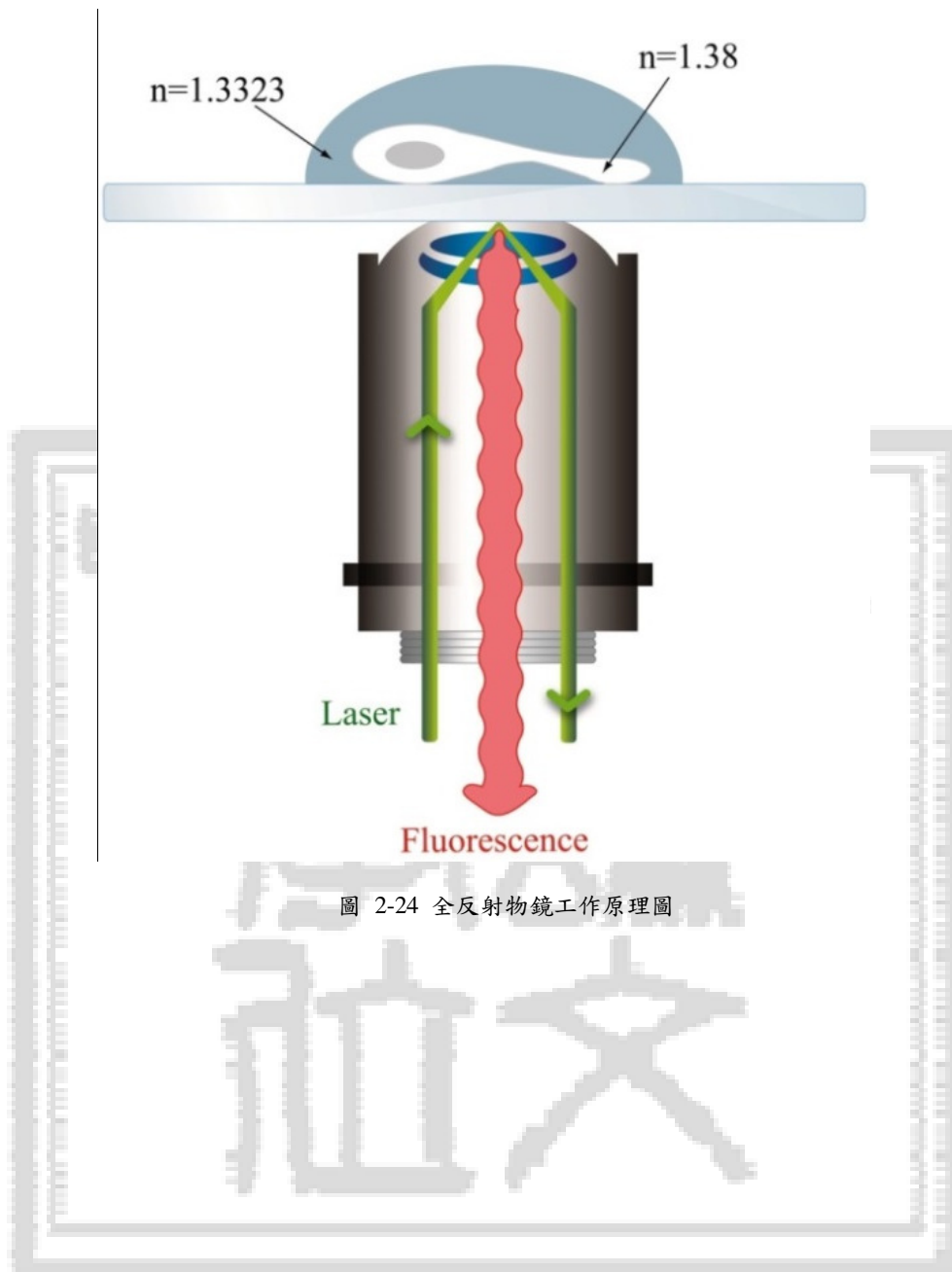


圖 2-24 全反射物鏡工作原理圖

## 第三章光學系統架設與晶片製程

### 3.1 光學系統架設

#### 3.1.1 倒立式螢光顯微鏡

由於反射式量測及共軛焦顯微鏡的需求，本研究室利用 AutoCad<sup>®</sup>及 SolidWorks<sup>®</sup>等 3D 繪圖軟體設計顯微鏡組元件，自行改裝倒立式顯微鏡系統 (Eclipse TE2000U, Nikon, Japan)。本節簡要介紹螢光顯微鏡中之平行光路，以及落射式螢光顯微鏡系統(EPI fluorescence)、全反射式物鏡螢光系統(TIRF)。



圖 3-1 倒立式螢光顯微鏡 Nikon TE2000U 實體圖[81]

生物螢光倒立式顯微鏡之設計，是因應落射式顯微鏡、反射式顯微鏡、全反射式顯微鏡之結合而生，整體可分為各個模組化光路架構，按研究需求可又可細分為相位差模組及微分差顯微鏡等，其改造過程相對於其他固定元件的顯微鏡來的方便許多。顯微鏡依據使用性質分類，可以歸納為兩種，一是落射式螢光顯微鏡系統(EPI)，另一則是全反射式物鏡螢光系統(TIRF)。



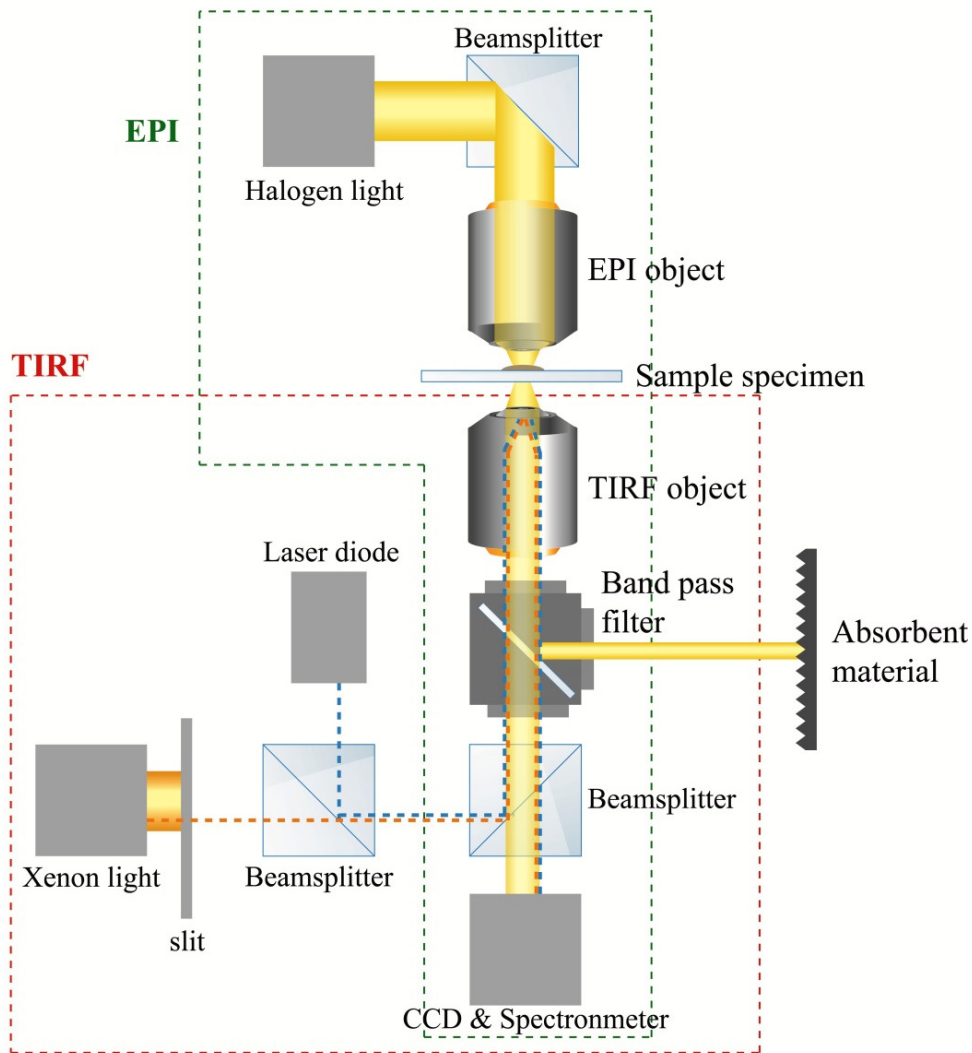


圖 3-2 倒立式生物螢光顯微鏡光路示意圖，綠色框中為 EPI 系統，紅色框中為 TIRF 系統

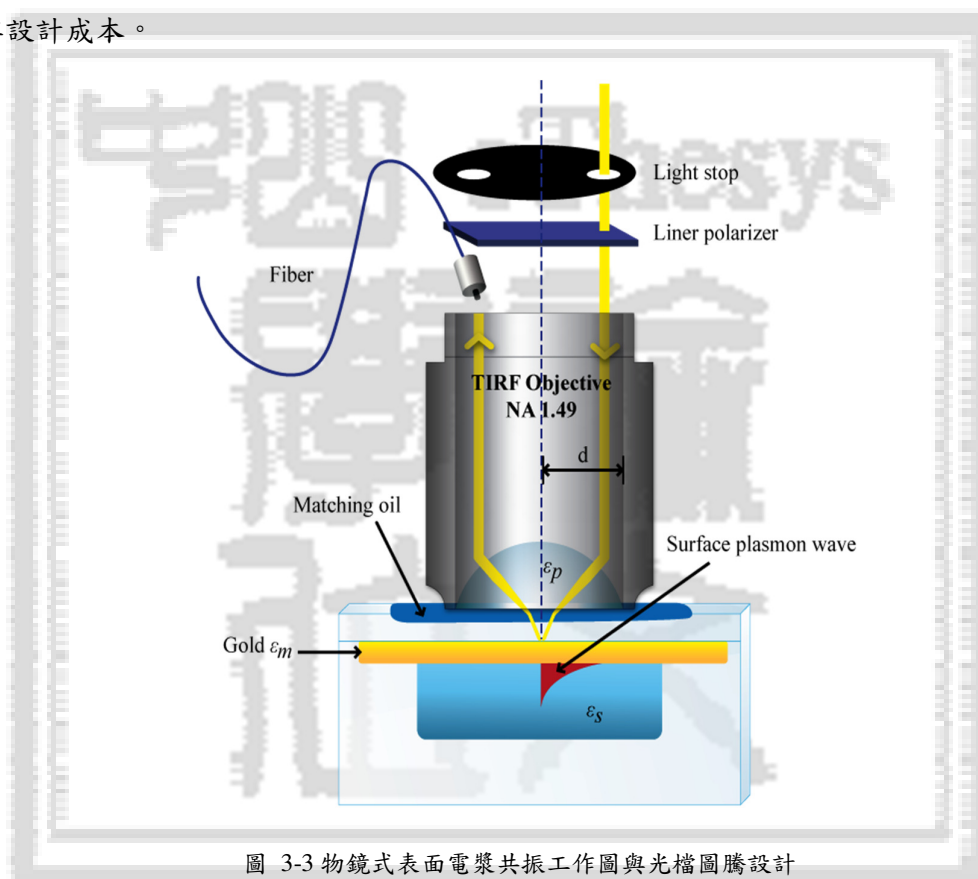
圖 3-2 為 EPI 及 TIRF 系統於倒立式顯微鏡上之光路示意圖，其中 EPI 系統為上光路，使用一連續光譜光源的鹵素燈，經由前鏡組將平行光源，入射較高數值孔徑之物鏡，用以激發螢光分子，再由下方數值孔徑較小之物鏡收光鏡入 CCD 影像或是光譜儀進行分析。

然而 TIRF 系統則是使用雷射，或是連續光譜經由濾鏡後，再由一光狹縫將光路彙整，並沿物鏡邊緣入射於全反射式物鏡上行全反射。由於激發螢光的光源光子能量，必須大於螢光發光能階，所以在光程中使用一頻寬過濾鏡組(band pass filter)使高能光子能夠進入物鏡中，使因彈性散射進入回收程中的高能光子能夠

濾除，所以後端光路可利用 CCD 與光譜儀進行數據分析。

### 3.1.2 TIRF 表面電漿共振偵測系統原理

前章文中簡略提及全反射物鏡工作原理與表面電漿波成因，基於其工作原理與稜鏡式耦合表面電漿相同，提出以高數值孔徑與解析度之全反射式物鏡，用以取代體積較為龐大的能鏡表面電漿共振機台。本研究利用全反射式物鏡高解析度之特質，顯微鏡中濾光處理，與市售表面電漿共振設備相比，大幅降低機台體積與設計成本。



因欲使高倍率物鏡(CFI Apo TIRF 60x, Nikon, Japan)於全反射工作下，必須藉由一組濾光狹縫模組，縮小於光路入射物鏡之前端使光點，其後再以線偏振片達到入射光源為 TM 模態，線偏振片則可以視情況改變偏振方向。光路經黃金薄膜全反射後便可於另一對稱點收光，其作用原理與稜鏡相同，但卻藉由高數值孔徑與高放大倍率性質，大幅縮小作用光點及提高收光效率。

### 3.1.3 光遮擋片設計與物鏡基本原理

前文所簡介之光遮擋片離軸距離，為本實驗重要參數之一。光軸離心距離直接對應入射角度，本研究中選定以 1 mm 濾光孔徑之光遮板，其主因為收光效率以及光纖準直鏡客製化大小的限制。根據司乃耳定律中，當光源從兩物質界面折射率穿越時，若由密介質至疏介質，入射角度過大過於臨界角度時，便會產生全反射現象。選用高折射係數及高數值孔徑的物鏡，目的在於夠有效率的產生全反射，使得量測效率提升。

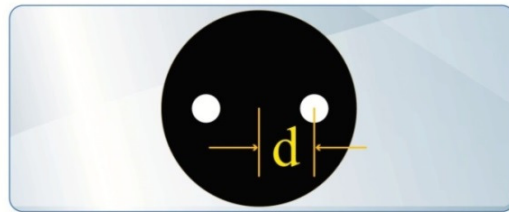


圖 3-4 離軸距與光擋片設計示意圖

式 3-1 在全反射鏡片中利用司乃耳定律計算，光線經過透鏡全反射後的折射角度，便可以視為全反射角度，經過計算研究中所使用的高倍率物鏡(CFI Apo TIRF 60x, Nikon, Japan)的焦距  $f$  約為 6.09 mm，於式 3-1 中推算每位移 0.1 mm 的過程中，角度之位移。

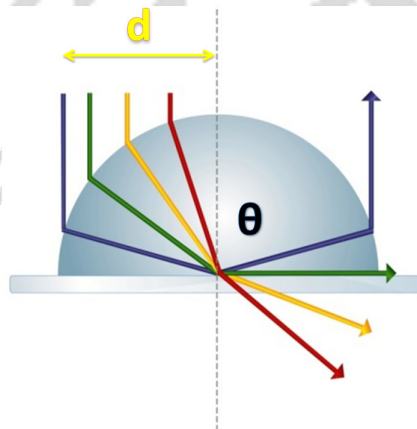


圖 3-5 全反射條件示意圖

$$d = f \sin\theta \quad (3-1)$$

$$d - d_0 = f(\sin\theta - \sin\theta_0) \quad (3-2)$$

### 3.1.4 基本實驗架構

本系統整合不同元件於一倒立式顯微鏡(Eclipse TE2000U,Nikon,Japan)，系統架構如圖 3-6 所示，以下將對於不同元件的選擇進行評估以及分析。光源的選擇對於本研究之影響甚大，常見光源使用大多為汞燈、氙燈、鹵素燈、鎢絲燈，但考慮到汞燈於可見光波段特徵光譜之影響，以及氙燈雖強度高，但相較於鹵素燈與鎢絲燈，在紅光波段能具有收光後訊號解析上之影響。而 120 W 鎢絲燈不但穩定且連續波長分布極適合本研究於晶片上反射後收光之辨別，也可減少計算出之結果誤差，故本研究選擇鎢絲燈為光源。

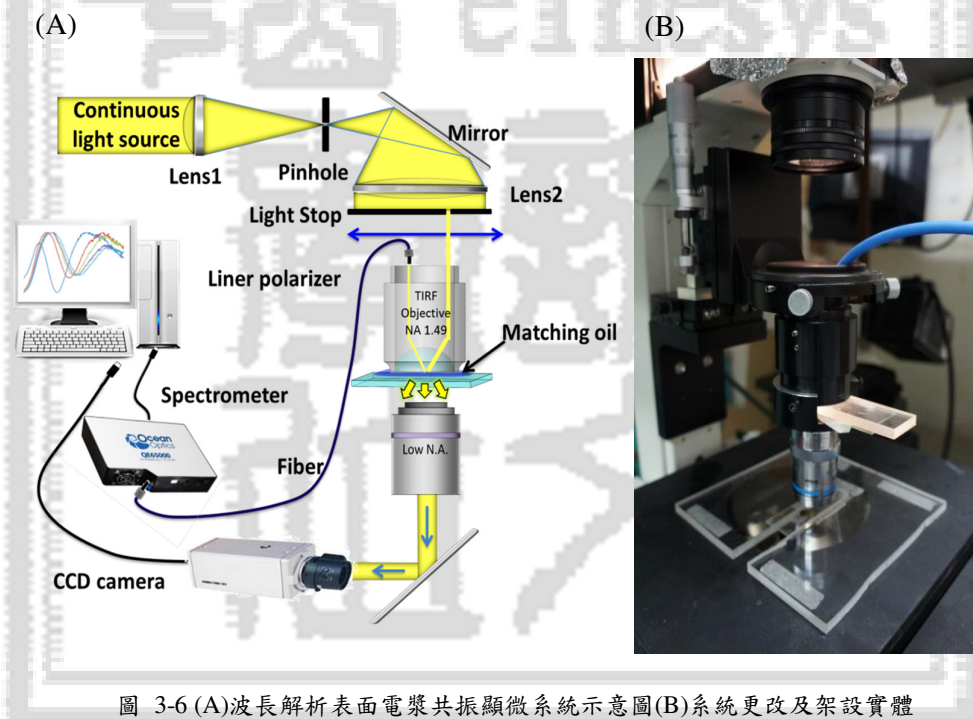


圖 3-6 (A)波長解析表面電漿共振顯微系統示意圖(B)系統更改及架設實體

圖 3-6 (A) 為表面電漿共振顯微系統整體光路與偵測端示意圖，於前文中所探討連續光譜與特徵光譜之影響及後端運算需求下選擇之鎢絲燈(鹵素燈)架設於光源，經由光學鏡組與光圈於 Lens2 出口端已為平行光。然而將光源導入全反射式物鏡之光學架構前，本研究設計了一套使光路離軸之光檔片，其設計尺寸以及離軸距之設計，皆是經由理論計算及實際實驗做即時更改，如圖 3-6 (A)中光遮擋片設計方式可清楚知道，離軸距離  $d$  恰與入射角度相對應，其關係式為

$d = f \sin\theta$ 。以上設計出自於 Nikon 公司的 TIRF 螢光顯微系統套件中可動式光狹縫之設計，了解待測樣品在空氣或水之不同折射率下，全反射角度有所不同，針對此一基本特性，Nikon 公司便設計了一校正經過光狹縫的光點位置之同心圓。故本研究進行水溶液樣本量測時，光檔片離軸距離設計於 5.5 mm 以上，反之若待測物為氣體便可使用離軸距為 4.5 mm 以上即可量測到表面電漿共振吸收波長。

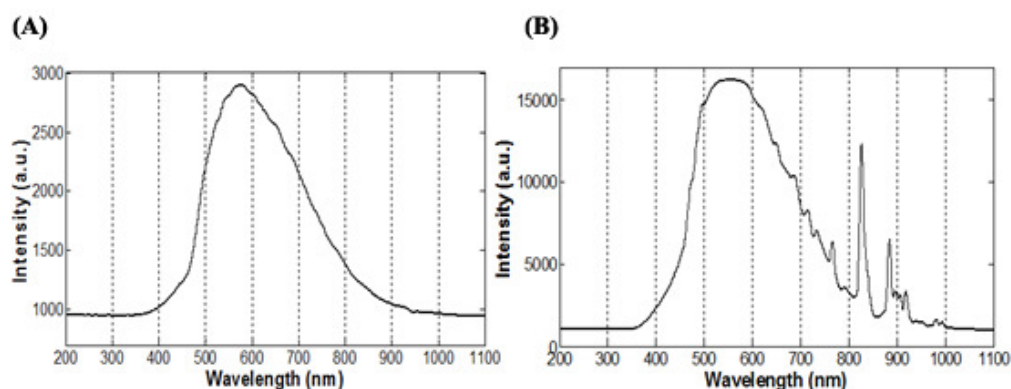


圖 3-7 (A)鎢絲燈及(B)氬氣燈光譜圖

最後光源選用鎢絲燈(圖 3-7(A))而捨棄氬氣燈(圖 3-7(B))的原因在於：氬氣燈仍然有許多特徵光譜位於長波長中，然而 TIRF 系統的表面電漿共振波長也處於黃光至紅光的波段中，為避免因特徵波長造成解析上的不便，進而選擇使用連續光譜的鎢絲燈源。

### 3.1.5 即時掃描與影像捕捉

本研究基於即時偵測以及定點偵測的概念，於晶片下方設置有一物鏡，其倍率可依使用性質替換。圖 3-8 為晶片經下方物鏡即時捕捉畫面，其中可明顯觀測出光點匯聚於黃金薄膜上，經由物鏡全反射後，於光纖後端光譜儀量測，明顯看出表面電漿共振之吸收波長，然而在無黃金薄膜下不會有明顯特定波長之吸收。以放大倍率之理論計算下，光點大為縮減約略為 15  $\mu\text{m}$ (1 mm 光遮版孔徑/物鏡放大倍率 60x)，其解析度會於第四章中動態解析與定點掃描中部分探討。

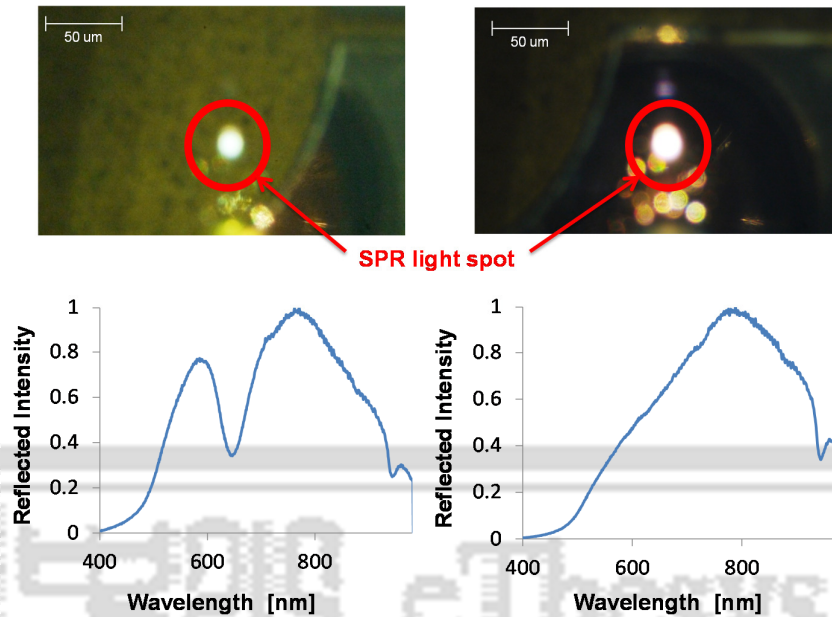


圖 3-8 管道內表面電漿共振驗證實體圖

## 3.2 晶片製程

### 3.2.1 標準玻璃晶片製程

圖 3-9 為研究中生醫晶片玻璃流道標準製作流程，選用一快速玻璃晶片製程技術加以改良，以市售常見的載玻片(76 mm×26 mm×1 mm, Assistant, Germany)做為晶片基材，於其蝕刻微流道結構。首先，將載玻片浸泡於煮沸之 Piranha 溶液(98% $H_2SO_4$  : 30%  $H_2O_2$  = 3 : 1)10 分鐘，以強氧化還原反應對載玻片表面之有機、無機污染物逕行清潔(圖 3-5A)。然而未經任何加工處理過的玻璃基板上，其所裸露出之 OH 官能基通常較少，為致使其後表面改質效率增加，研究選用 365nm 紫外光源曝照 20 分鐘，其後再於 70°C 下蒸鍍一薄層之 hexamethyldisilazane (HMDS, J. T. Baker, USA)作為玻璃及光阻之黏著層，接著旋佈厚約 3  $\mu m$  之正光阻(PR, AZ4620, Clariant, USA)於上，作為蝕刻玻璃之遮罩。將欲製作之流道圖騰置於已覆蓋光阻之蓋玻片上方，並配合標準的光刻流程(lithography)，使用光源為 g-line(365 nm)使光阻吸收後產生光化學反應，於蓋玻片上形成結構(圖 3-9D)。接著使用顯影液(AZ400K : DI water = 1 : 3)脫去光刻之圖騰區域光阻，以 BOE 蝕刻液 (6 : 1, J.T. Baker, USA) 與鹽酸做固定比例之混和進行蝕刻 40 分鐘，獲

得深度約 120  $\mu\text{m}$  之微管道(圖 3-9D),其邊鞘以及前方流道其寬度皆為 500  $\mu\text{m}$ , 後方聚焦流道寬為 200  $\mu\text{m}$ , 如圖 3-6 上方所標示; 此蝕刻過程中管道邊極易產生鈣、鎂離子之結晶, 故於每 5 分鐘將晶片取出後以 1M 之 HCl 溶液震洗約 10 秒後再浸潤於蝕刻液中。其中為了使兩側流入之邊鞘流能平衡地對樣本流體進行聚焦使之集中於中央, 故將兩邊鞘流只設置單一的共同入口處, 對兩邊鞘流道產生相等壓力。之後利用稀釋之氫氧化鉀水溶液(KOH (49%): DI = 10: 1, 70°C)脫去剩餘作為蝕刻遮罩之光阻(圖 3-9F)。取另一空白載玻片, 並於上方鑽洞, 作為流道之進出口或儲存槽(圖 3-9G); 將鑽孔後之空白載玻片與具微流道結構知載玻片對位後置入高溫爐以 670 °C 持續 20 分鐘進行熱接合(圖 3-9H)。

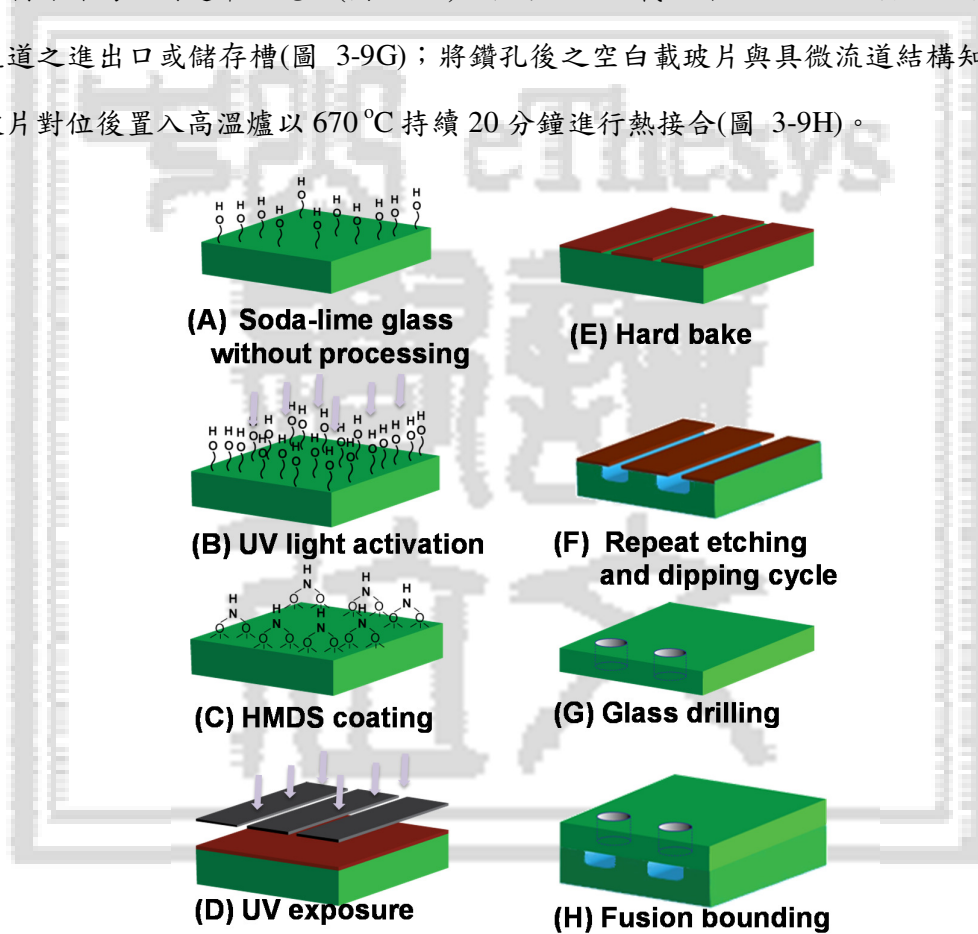


圖 3-9 高速玻璃蝕刻製程流程圖

### 3.2.2 鈉玻璃蝕刻速率探討

自玻璃蝕刻廣泛利用在生醫晶片上,其蝕刻速率與製程時間是為著重的部分。本研究使用的快速玻璃流道製程,使用市售價格較為低廉的鈉玻璃,也是過去最

難以被蝕刻快速且平整的材料。本研究選擇使用含有 74% SiO<sub>2</sub>、13%Na<sub>2</sub>O 與 10%CaO 的鈉玻璃進行蝕刻，而蝕刻液選擇含有 HF:NH<sub>4</sub>F=1:6 的 Buffered Oxide Etch 緩衝蝕刻溶液(6:1, J. T. Baker, USA)。然而遭遇到最困難的部分為，蝕刻過程中鈣離子(Ca<sup>2+</sup>)和鎂離子(Mg<sup>2+</sup>)傾向與氟離子(F<sup>-</sup>)產生結晶形狀沉澱，此一沉澱便遮擋了蝕刻方向性而是表面粗度增加。部份學者致力於改善此狀況，便使用了鹽酸穿插於蝕刻過程中，以每蝕刻五分鐘取出晶片，置入鹽酸水溶液中，將鎂、鈣離子結晶溶解，與氟離子阻隔，降低蝕刻表面粗度。這一項方法最終蝕刻速率仍然未超過 1μm/min，本研究於此調整了實驗參數，在緩衝蝕刻液 BOE 中 添加少量鹽酸水溶液，同時更發現在蝕刻速率大為提高，蝕刻過程中仍然使用鹽酸水溶液做兩分鐘一次循環。

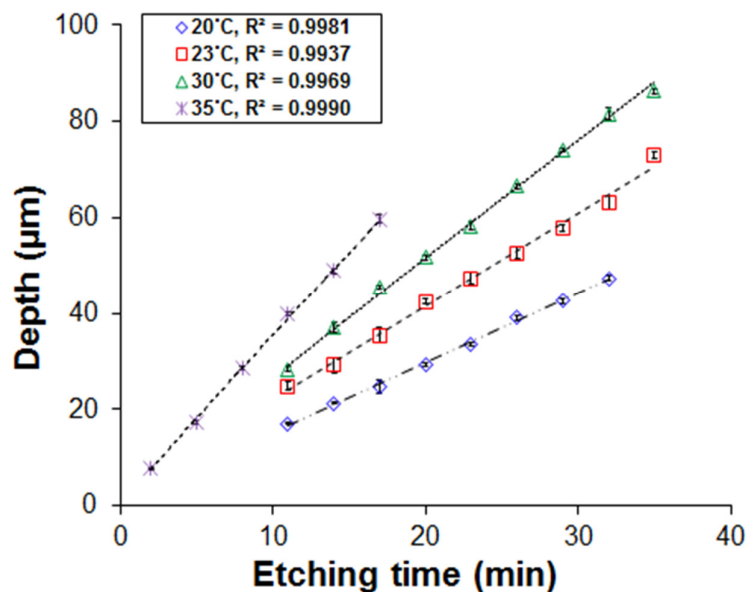


圖 3-10 玻璃晶片蝕刻深度與溫度對應圖

除了鎂、鈣離子之氟化結晶物成沉澱後所造成的鈍化，溫度也是一項控制蝕刻速率最好的參數。在此研究中對於溫度所增快蝕刻速率進行探討，圖 3-10 為 BOE:HCl=9:1 條件下進行最終蝕刻深度研究，明顯觀察到提升溫度至 30°C 蝕刻速率增快到 2.2 μm/min，透過升溫達到蝕刻速率雖已經在過去文獻中常被探討到，但溫度提高也使得光阻阻擋時間減少，光阻剝落的問題在於光阻與玻璃之



間接合的薄膜殘存應力，升溫後致使分子加速侵蝕光阻與玻璃間縫隙而使其翻脫剝落。所以在此對於升溫後光阻所能承受時間進行探討，圖 3-11 縱軸為光阻生存時間，橫軸為不同濃度比的鹽酸蝕刻緩衝溶液。鹽酸濃度越高則酸度越高，在超聲波震盪器中進行二氧化矽蝕刻時，會不斷轟擊光阻與玻璃之間的界面，有機分子害怕遇到強酸，而界面原本即利用 HMDS 做為有機單分子層黏著用，當酸越高光阻所能抵擋時間便漸少。倘若應烤過程中溫度升降太過劇烈，亦會嚴重影響子界面應力不均而造成之錯動拉引，使得原本 HMDS 鍵結減弱，蝕刻過程便會提早脫落。

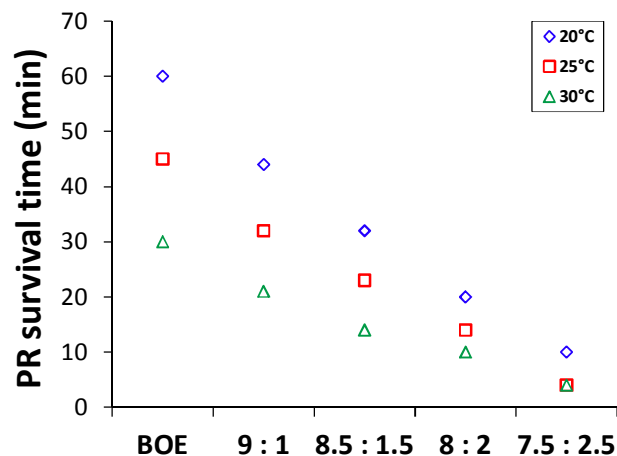


圖 3-11 光阻抵擋時間與鹽酸相對濃度關係圖

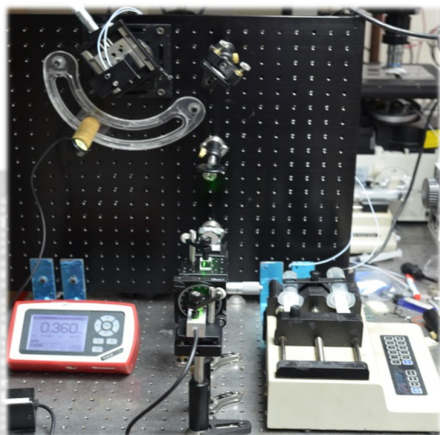
### 3.2.3 表面電漿共振金薄膜製程及驗證

本研究使用經 3-MPTS 表面改質過之高解析度蓋玻片，作為基板去乘載真空濺鍍機轟擊金靶沉積之金奈米薄膜結構，詳細過程於下一節中描述。

於晶片圖形定義與封裝之前，必須透過定角度量測之光學架構，作為黃金薄膜能夠穩定產生表面電漿共振之驗證方式，圖 3-12 為實驗室自行架設，單波長雷射表面電漿共振光路實體圖。研究架構中，搭載三個波段之單波長雷射二極體，其分別為紅光 660 nm、綠光 530 nm 及紫光 405 nm，三光源分別利用一分光稜鏡導入同一光路中，再利用遮光片選擇欲量測的波段，三波段於同一晶片中同時進

行共光路之變角度量測。進行光路校整時使用了氣浮式光學桌及雷射位移計，同時為了將角度誤差將低至最小，於此也在偏光鏡組前後架設上兩片光圈，最小開孔孔徑為 0.8mm 過濾雷射光點之擴散光環，更減少大光點所造成之角度誤差。

(A)



(B)

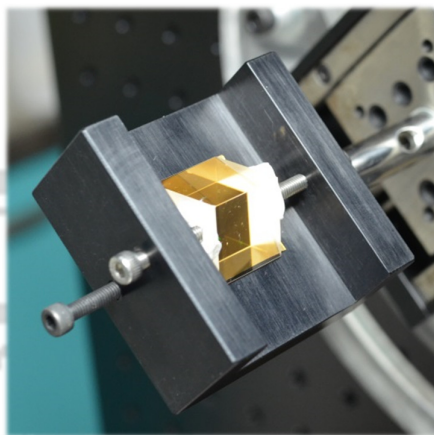


圖 3-12 (A)共振角度量測實體光路架構。(B)鍍有黃金薄膜之高解析蓋玻片以耦合油( $n=1.515$ )貼附於 BK-7 光學稜鏡實體圖。

圖 3-13 為雷射光經過光圈後，透過線偏正片(LP, Kenko, Japan)與偏極分光鏡之間強度的調整，在雷射光出偏極分光鏡時會分成兩道光路，其中必須選擇 TM 偏振模態之光源，作為入射稜鏡以產生表面電漿，隨後再經兩次反射鏡與一次光圈後，便導入稜鏡系統中。

稜鏡系統中選擇使用一載有分厘卡的旋轉載台(148-112, Mitutoyo, Japan)，其精度可達 0.01 mm 作為變角度量測調控端，經換算後最大經度可以量測到  $0.11^\circ$ ，作為粗略的薄膜驗證已然相當足夠。載台上結合以 SolidWorks<sup>®</sup> 程式所設計，以鋁塊材做加工，並且經過陽極處理過而得之流道零件，於貼附黃金一側裝有墊圈(O-ring)防止樣本液體漏出，同時也提高樣本可流通之最高速率。

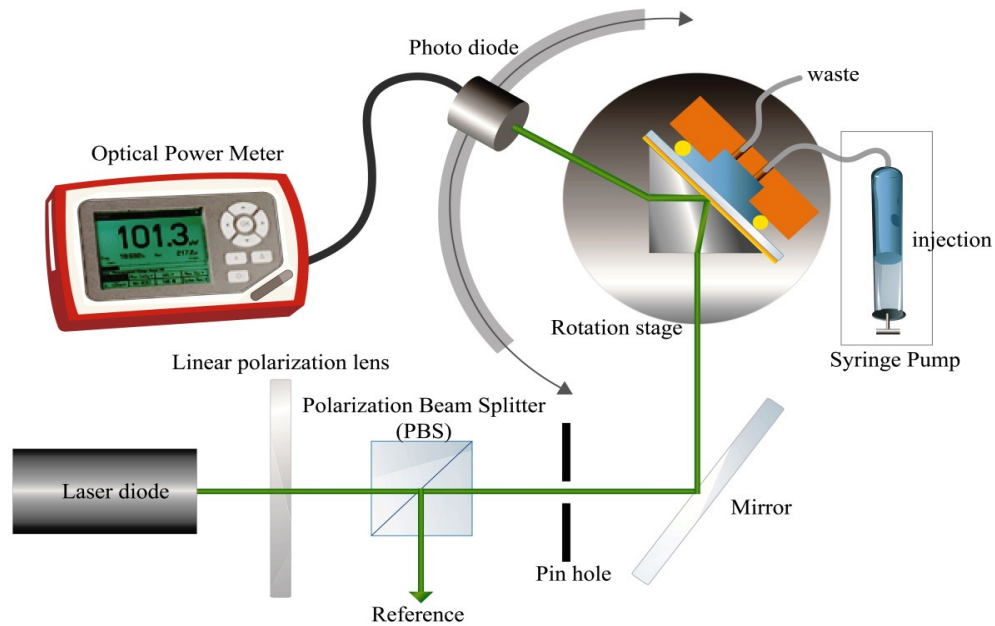


圖 3-13 表面電漿共振之調變角度量測架構示意圖。

### 3.2.4 表面電漿共振生醫晶片製程與設計

藉由黃金表面折射率之改變，致使表面電漿共振吸收波長位移，基於此一原理，如何於金表面改質變成唯一主要晶片製作過程的要點。為符合高數值孔徑全反射式物鏡之工作距離(WD = 0.13 mm)物鏡本研究選擇一高解析度蓋玻片(24 mm × 50 mm × 0.13 mm, Marienfeld, Germany)作為替換式晶片之基材。以鉻金屬作為黏著層，黃金於純水中( $n_d = 1.33$ )所量測得吸收波長約為 610 nm，然而若要降低鉻金屬於表面電漿波之影響，則必須減少其鍍膜厚度，相對的減低黏附能力，為解決此一性質，本研究改使用 3-MPTS 長碳鏈化合物，作為單分子自組裝薄膜以取代鉻金屬薄膜，此長鏈結構其中一端為能夠與玻璃結合的矽氧烷基，另一端則為能夠與黃金接合之硫基。

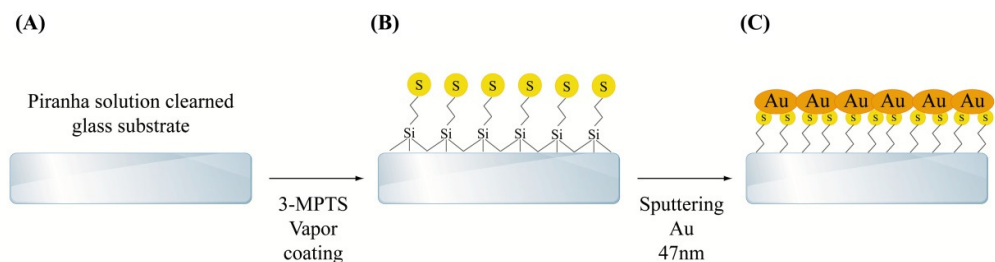


圖 3-14 蓋玻片表面改質過程與黃金濺鍍示意圖

表面改質過程細節較為繁雜，含有硫基之長碳鏈化合物極易與水汽反應，而失去效應。仍然選擇以煮沸之 Piranha 溶液( $98\% \text{H}_2\text{SO}_4 : 30\% \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$ )10 分鐘以上，以強氧化及還原反應對玻璃表面之有機、無機污染物進行清潔(圖 3-14(A))。此後再將清潔過後之蓋玻片放入體積為 2.5 L 密封腔體，以滴管注入 3-MPTS 5ml，置放於烤盤上控溫於  $70^\circ\text{C}$  使其揮發，而後 3-MPTS 氣體以單分子薄膜型式成長於玻璃基板上，持溫 24 小時最後再取出腔體，放入高真空濺鍍系統內，便進行抽真空之過程，目的在減少剛成長之待分子薄膜與水汽作用之時間。利用濺鍍系統內所擁有之加熱板升溫至  $105^\circ\text{C}$ ，此時矽氧烷基端會與玻璃裸露之羥基脫水接合，形成共價鍵結(圖 3-14(B))。經過 3-MPTS 單分子層改質後，基板表面裸露的是硫基，其極易與黃金黏著。再者本研究中所採用的是高真空磁控濺鍍系統，也與以往蒸鍍方式不同，雖然蒸鍍系統能夠控制良好表面品質，卻也因黃金為貴金屬，相對提高成本。本論文在第四章將會探討濺鍍時低功率與平整度的數據。控制濺鍍功率於 15 W 鍍時 8 分鐘，厚度約為 47 nm(圖 3-14(C))。最後在相同附著能力下，比較使用鉻金屬薄膜以及 3-MPTS 之吸收波長差異，3-MPTS 之吸收波長將低到 575 nm，所能夠使用的檢測範圍增加了 35 nm。

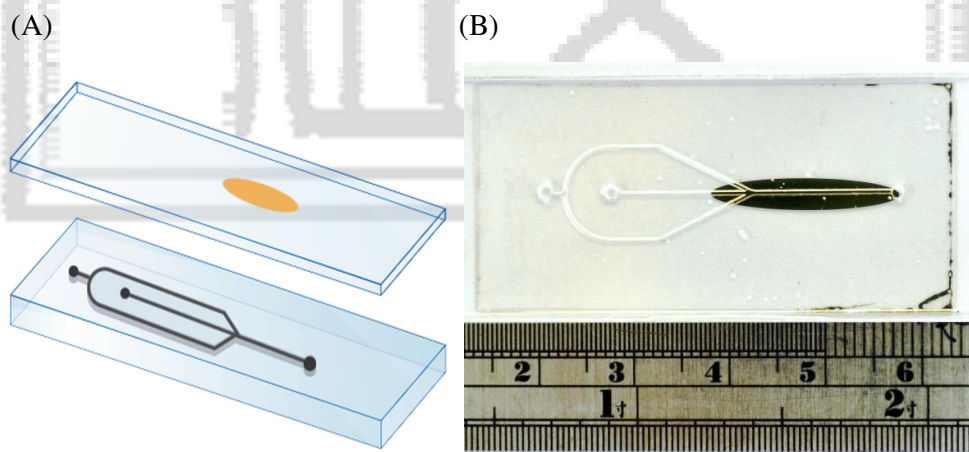


圖 3-15 (A)晶片封裝示意圖 (B)晶片封裝後實體照片

於黃金薄膜上，旋塗上光阻 AZ4620 後，光刻顯影出欲定義在蓋玻片上的檢測圖騰，經黃金蝕刻液蝕刻後完成檢測部位，做為晶片上蓋板。而下板為前文中

所利用之標準玻璃製作過程，所製作出之微流體晶片。考量黃金薄膜無法承受高溫爐嚴苛的條件，本研究中所使用與以往熔融接合不同的方法，選擇使用紫外光膠做為晶片接合 (圖 3-15)。

最終於下板流道進行鑽孔接合鐵氟龍細管做為流體導管。然而表面電漿共振波是一種非常敏感的檢測方式，僅有一點紫外光膠殘留，便會影響吸收波長改變。有鑑於此，於第二次表面改質過程之前，管道會先通入稀釋過的 Piranha 溶液一小時以上(圖 3-16(A))，清洗過程中吸收波長亦會往短波長位移。而完整清潔與否，只需藉著表面電漿共振吸收波長恆定狀況便可知改質情況。

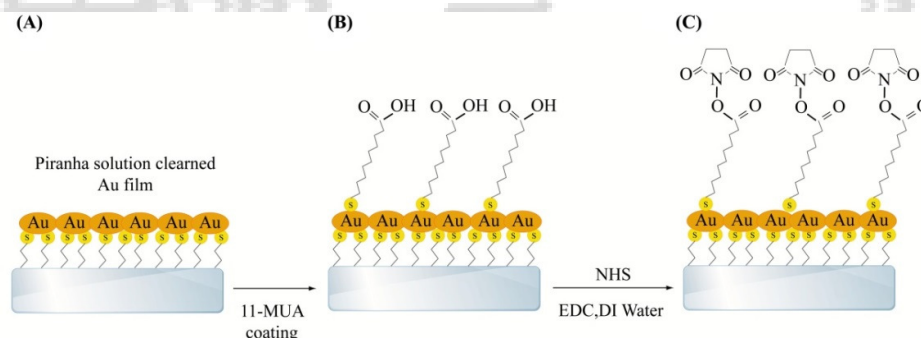


圖 3-16 於管道內部改質過程示意圖(A)使用 Piranha 溶液清潔黃金表面 (B)經過 11-MUA 做表面改質後，尾端官能基改變 (C)在 EDC 水溶液中活化\NHS 使其與羧基接合

同樣也是利用長碳鏈做為鏈結功能，先將裸露且難以進行化學作用的黃金表面，進行自組裝薄膜生成羧基，而其原理於前文中所提到之硫基和黃金關係。本研究採用 11-MUA(11-Mercaptoundecanoic acid, 98% , Sigma-Aldrich) ，將其與無水酒精(absolute Ethanol, 99.8%, Sigma-Aldrich )備製成 5 mM 乙醇溶液，利用針筒架設於微量泵浦上，將流速控制於 5 ml/hr.通入光學微流體晶片中，持續 24 小時(圖 3-16(B))。此一過程中不能有任何水分進入到晶片當中，且流速不得過快以致於自主裝薄膜無法接合於黃金表面。經過長時間的接合，改以無水酒精緩慢通入流道中進行清洗，除去未完成接合及無作用的 11-MUA 成分，此後表面所裸露的羧基，便可成為生醫晶片上的鏈結結構(linker)做為生化分子與金屬原子間的橋梁。

羧基已然可以與大部生物分子作氫鍵與凡德瓦爾力之吸引，亦可以進行共價鍵的接合，可視實驗中需求而自行調整相關官能基之化合物。於本研究中，選擇了電漿子共振研究以及螢光分子之研究，如：局部表面電漿共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)、酵素鏈結免疫吸附試驗(ELIAS)等研究常用之 NHS(*N*-Hydroxysuccinimide)。NHS 能夠以共價鍵接合胺基(-NH<sub>2</sub>)，利用此一性質去捕捉酵素、蛋白質分子與 DNA 等等生化分子。然而將 NHS 固定於長碳鍊 cross linker 上，必須以微酸的 EDC 水溶液作為媒合劑。實驗中以 NHS:EDC = 2 mM:5 mM 並以 DI water 備製完成，為了控制酸鹼度於 PH = 4.5，採用醋酸作為酸劑進行調配。等待 11-MUA 製程完成且純水清理過後，立即通入 EDC/NHS 酸性水溶液，流速控制於每小時 5 ml 之流量，持續 2 小時，最終二次改質過之黃金表面裸露的即是能夠與胺基共價接合之官能基。

### 3.3 光譜儀訊號分析

#### 3.3.1 光訊號擷取系統

研究中因所擷取之光訊號經過兩次光狹縫(pin hole)，光強度損失後約剩下原光強度之萬分之一，致使光源不易解析。經實驗考量下，選擇搭載高量子效應 CMOS 光強度量測晶片(S7031-1006, Hamamatsu, Japan)的光譜儀(QE65PRO, OCEAN OPTICS, Japan)，以下簡要介紹此光譜儀內部光學架構及功能。

圖 3-17 為高量子效應光譜儀內部架構示意圖，當 SMA 接頭之光纖收光後，隨即會經過一光狹縫，過濾掉不平行之光源，提升解析度，但也因此大幅降低光強度，接著利用一濾光片處理不需要之光波段，而波段的選擇依使用功能而定，假若目的為提供發曼光譜使用，可替換成頻寬較為狹窄的濾鏡，於本研究中選擇使用波長 200 nm 至 1100 nm 之濾鏡，做為全光譜之分析。由於出光纖之光源為一會聚光，必須使用一光纖準直鏡做平行光之校正，經過光柵分光後，可得一根據波長發散之光源，此時發散光路越長則分光效果越好，最後在其光路尾端置放上一個二維 CMOS 光感測器，做為單一波長光強度之解析。

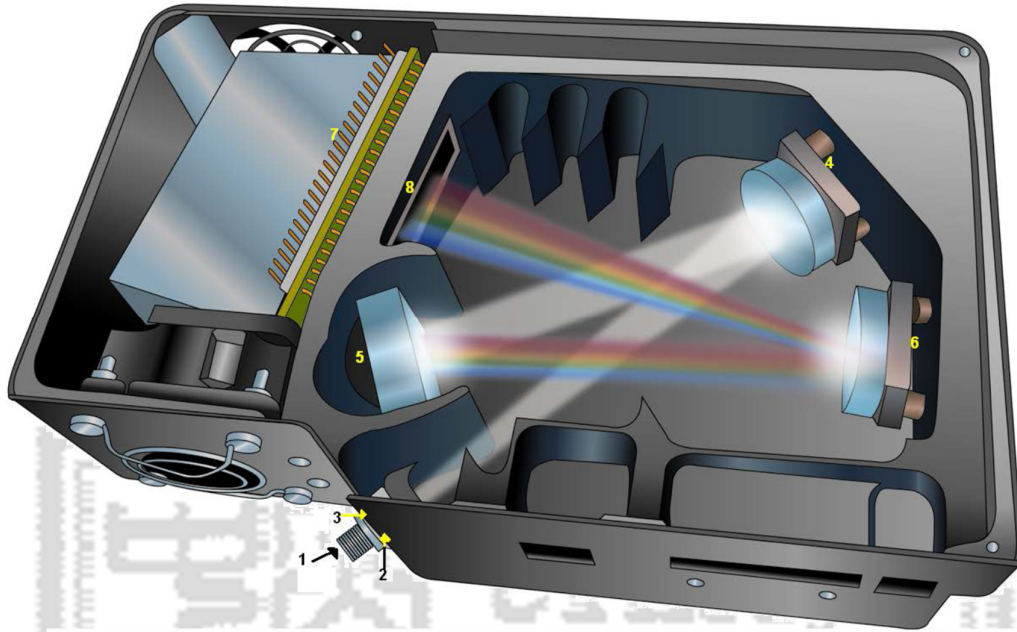


圖 3-17 OCEAN OPTICS QE65PRO 光譜儀內部架構示意圖[82]

由於 CMOS 在量測過程中，必須由外加電源電路推動，過程中發熱會導致量測之訊雜比(Signal noise ratio)升高，因此 QE65PRO 光譜儀在感測晶片後板上加裝製冷晶片與風扇裝置，用以降低溫度進而避免因高溫所造成熱效應雜訊，同時亦提升量子效應。

表 3-1 QE65PRO OCEAN OPTICS 光譜儀配件名稱與功能解說

| 項目  | 名稱      | 功能  |
|-----|---------|---|
| (1) | SMA 連接端 | 藉由此連接器，使光纖之光源順利耦合進入光譜儀光路中。                          |
| (2) | 光狹縫     | 將光纖所導出之光源濾成圓孔狀，藉以消除非精準直徑後之非平行光，當狹縫越小則必須選用數值孔径較高之光纖。 |
| (3) | 頻寬濾鏡    | 使固定頻寬光波通過，本研究採用                                     |

|     |                      |  |
|-----|----------------------|--|
|     |                      | 200 nm 至 1100 nm 頻帶的濾鏡。  |
| (4) | 光纖準直鏡                | 將射出光纖之匯聚光源，折射後呈平行光。  |
| (5) | 分光光柵                 | 藉由光柵分光原理 $d\sin\theta=k\lambda$ ，使不同波長反射角度不同，進而可以用解析單波長之光強度。                 |
| (6) | 聚焦反射鏡                | 使原本需要長工作距離之光路，因反射而縮小光譜儀體積。   |
| (7) | 具有製冷晶片之高量子效應 CMOS 晶片 | 採用高量子效應的 CMOS 晶片 (Hamamatsu, S7031-1006, Japan)，利用製冷晶片於其後端降低溫度以達到高量子效應及高訊雜比。 |

### 3.3.2 數位訊號處理與模擬方法

#### (1) MATLAB<sup>®</sup> 模擬運算方式:

前文提及實驗中使用 Kretschmann 式之光學架構，驗證黃金薄膜能夠實現表面電漿共振，以及 TIRF 系統實現表面電漿共振後，共振波長的預測和實驗值的精準量測與架構改進之依據。

如圖 3-18 中所示，Kretschmann 式於稜鏡上直接鍍上一層黃金薄膜，樣本與金膜界面上產生表面電漿波，故必須計算不同角度的 TM 模態光線，經過三層介質反射後之強度，及固定角度下反射後的全光譜光強度表現。假定膜厚為  $d$ ，玻璃稜鏡折射率為  $n_1$ 。



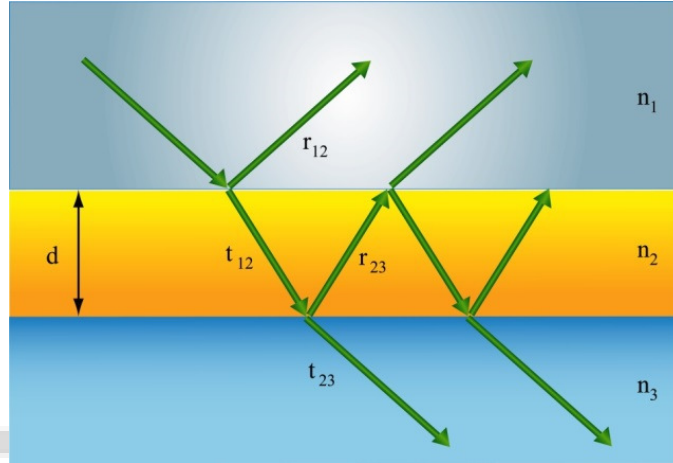


圖 3-18 Kretschmann 稜鏡耦合式三層薄膜反射與透射示意圖

首先根據菲涅耳定律之薄膜反射與透射係數的理論計算，反射波函數可以寫成(式 3-3)、(式 3-4)、(式 3-5)：

$$r = r_{12} + t_{12}r_{23}t_{21}e^{-j2\varphi} + t_{12}r_{23}r_{21}r_{23}t_{21}e^{-j4\varphi} + \dots \quad (3-3)$$

$$2\varphi = 2dk_{n2} \cos \theta = 2dn_2 \cos \theta = 2dn_2 \cos \theta \frac{2\pi}{\lambda} \quad (3-4)$$

$$r = r_{12} + \frac{t_{12}r_{23}t_{21}e^{-j2\varphi}}{1-r_{21}r_{23}e^{-j2\varphi}} = \frac{r_{12}+(t_{12}t_{21}-r_{12}r_{21})r_{23}e^{-j2\varphi}}{1-r_{21}r_{23}e^{-j2\varphi}} \quad (3-5)$$

其中菲涅耳方程式中反射係數與穿透係數之關係式：

$$r_{21} = -r_{12} \quad (3-6)$$

$$t_{12}t_{21} - r_{12}r_{21} = 1 \quad (3-7)$$

根據上式，反射率可以改寫成(式 3-8)：

$$r = \frac{r_{12}+r_{23}e^{-j2\varphi}}{1+r_{12}r_{23}e^{-j2\varphi}} \quad (3-8)$$

光強度之實際量值為其期望值，而波函數期望值可為其與之共軛函數之乘積，如(式 3-9)：

$$R = r r^* \quad (3-9)$$

其中反射係數 $r_{12}$ 、 $r_{23}$ 可以分別被探討成以下，(式 3-10)、(式 3-11)：

$$r_{12} = \frac{n_1 \cos \theta_2 - n_2 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_2 + n_2 \cos \theta_1} \quad (3-10)$$

$$r_{23} = \frac{n_2 \cos \theta_3 - n_3 \cos \theta_2}{n_2 \cos \theta_3 + n_3 \cos \theta_2} \quad (3-11)$$

根據前章節中所探討的金屬電漿子理論，金屬介電質折射率與介電系數關係為 $n=\sqrt{\epsilon}$ ，然而金屬介電系數為複數函數，本研究採用於 1972 年 Johnson 和 Christy 兩位學者[18]量測結果數據，其數據於附錄中清楚寫出。電漿子理論與菲涅耳薄膜反射透射率的結合，可進而推導表面電漿共振於不同角度下量測結果，及固定角度下改變波長時所反射之強度。過程中 MATLAB<sup>®</sup>之執行程序於附錄中詳細介紹。

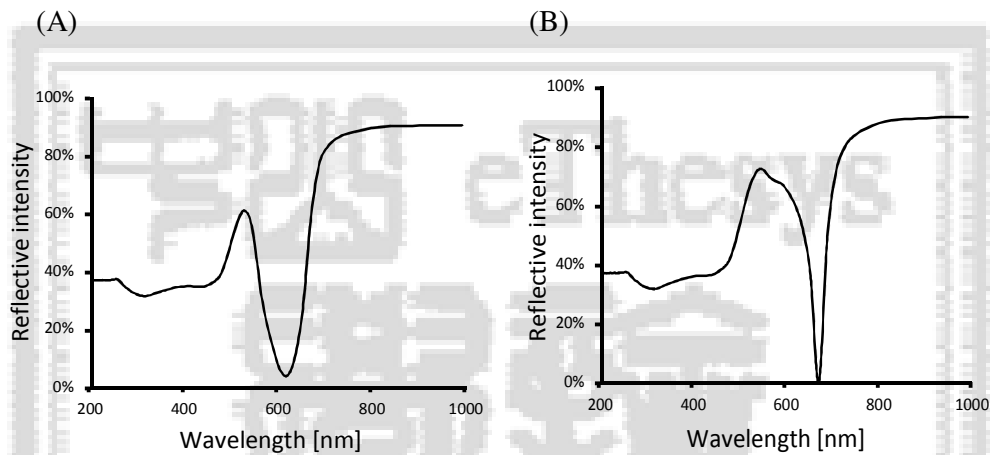


圖 3-19 以 MATLAB<sup>®</sup>模擬白光以 76.4°入射 Kretschmann 稜鏡系統(A)樣本折射率為 1.3323 吸收波長為 619 nm(B)樣本折射率為 1.3601 吸收波長為 670 nm

圖 3-19 為 MATLAB<sup>®</sup>模擬全波段頻譜的 TM 模態光源，在 Kretschmann 架構下全反射後所得之反射率 $R = r r^*$ ，撰寫 MATLAB<sup>®</sup>的過程則是以單一波長對應特定黃金折射係數，每個波長於 20 度與 90 度間擷取 300 個節點，帶入迴圈算取當下反射數值，如此再以反射強度為縱軸、角度為橫軸，繪出表面電漿共振角度示意圖。緊接著再以 200 nm 至 1000 nm 波段劃分成 110 個波長節點，每節點皆都所對應之黃金介電常數，帶入先前所執行之變角度量測，並匯出一個二維的 R 矩陣，圖 3-20 為反射強度之三維示意圖。

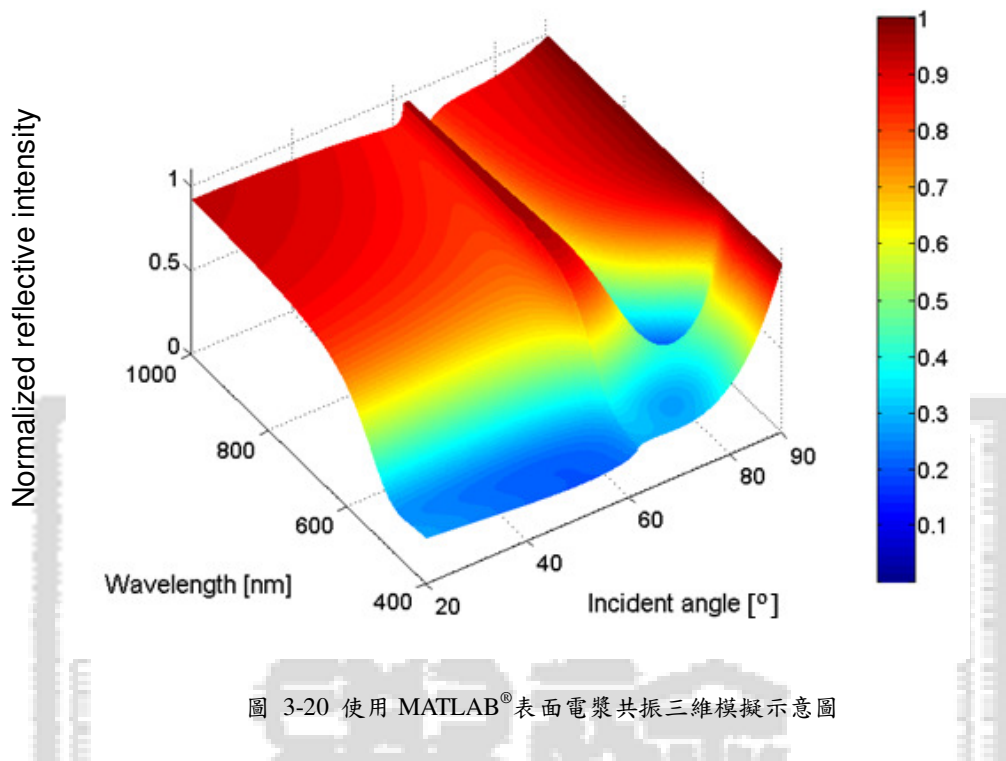


圖 3-20 使用 MATLAB® 表面電漿共振三維模擬示意圖

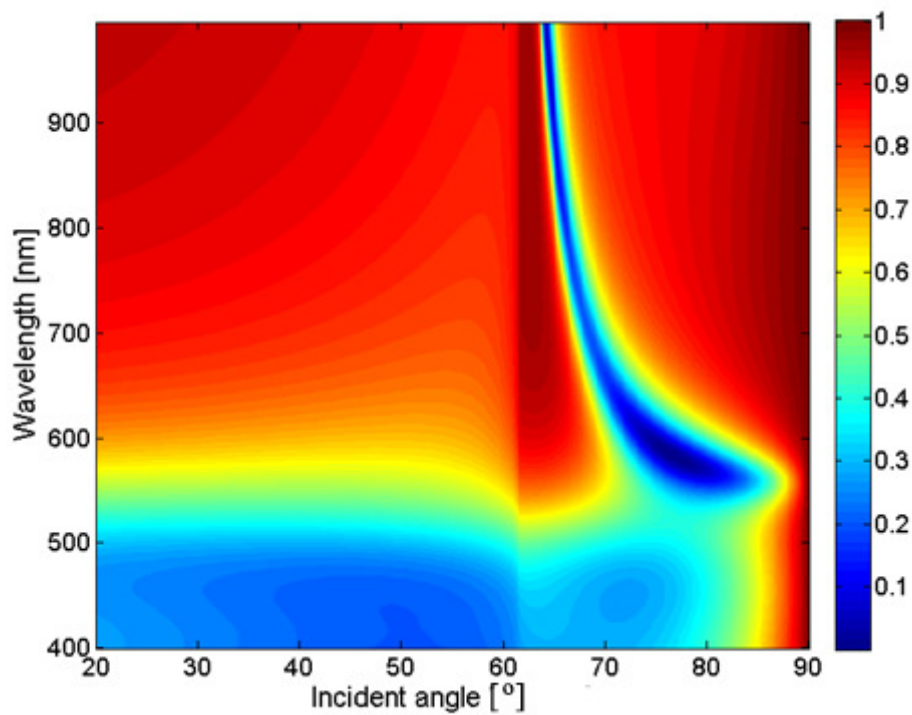


圖 3-21 使用 MATLAB® 表面電漿共振二維模擬示意圖

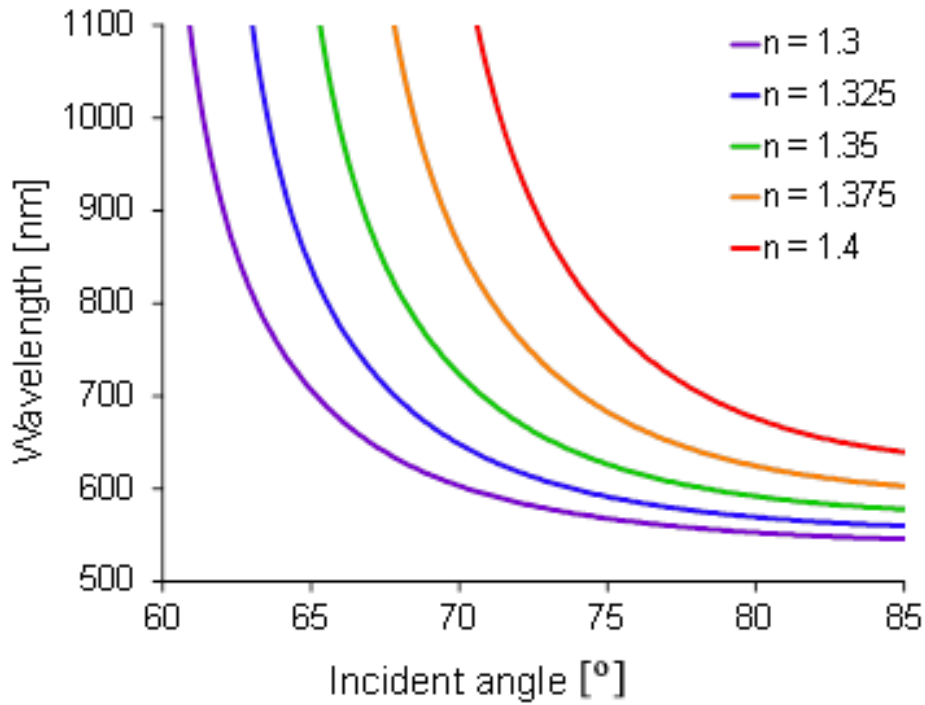


圖 3-22 使用 MATLAB<sup>®</sup>表面電漿共振相異折射率與吸收波長圖

(2) Excel 訊號演算基礎：

於光路後端高量子效應紫外-可見光譜儀(QE65PRO, Ocean Optics, Japan)收光，並選擇以內建 CMOS 高速掃描功能，擷取積分時間約為 1 至 2 秒，所得到的訊號應為經過表面電漿共振後之光譜，而其吸收值集中於黃光與近紅外光之間。光譜儀之量測範圍落在 400 nm~950 nm。然而擷取訊號最小值是無法解析出吸收波段，必須將所擷取之資料控制在 600 nm 到 800 nm 內，並以相對極小質得到切確吸收波長。

在將原始數據導入 MATLAB<sup>®</sup>之前，選擇先使用 Excel 進行歸一化運算，作為相對極值之判斷與理論運算的前處理，之後使用 MATLAB<sup>®</sup>作 3D 圖像化動作，X 軸為波長(nm)，Y 軸為時間(s)，Z 軸則為相對強度(%)。

## 第四章 實驗結果與討論

### 4.1 金薄膜特性量測

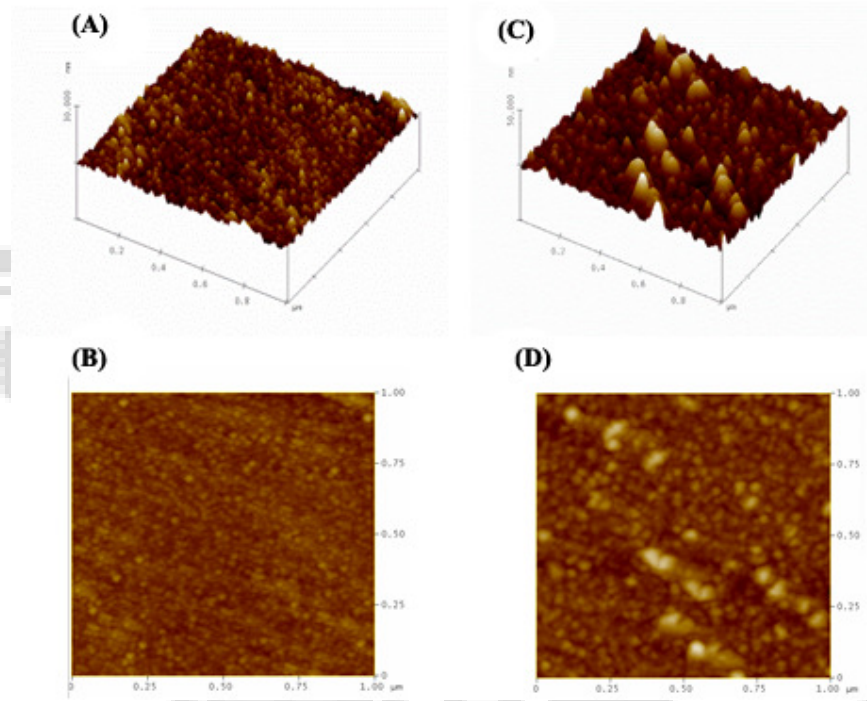


圖 4-1 利用原子力學顯微鏡觀察黃金薄膜，(A)(B)功率 15 W 濺鍍黃金 8 分鐘 15 秒 (C)(D)功率 30 W 濺鍍黃金 5 分鐘 30 秒下，黃金表面輪廓

本研究使用高真空濺鍍機，以直流脈衝電源供應器作為電漿游離源，於腔體內通入氬氣作為轟擊靶材之分子。經過理論鍍率運算，相同厚度調變功率下表面粗糙，因為沉積速率降低，可以使得黃金原子附著時的動能減少，進而不會在表面進行移動形成島狀結構，如此一來表面粗糙度便可大為降低。圖 4-1 中為  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  範圍下的原子力學顯微鏡影像，明顯比較出利用 15 W 功率下之黃金表面粗糙度，約為 30W 功率所鍍黃金表面的三分之一，Ra 約為 0.48 nm。基於表面粗糙度對於表面改質之影響，本研究最終選定使用表面較為平整之 15 W 功率 8 分鐘鍍時黃金薄膜，膜厚為 47 nm。

## 4.2 稜鏡式表面電漿共振

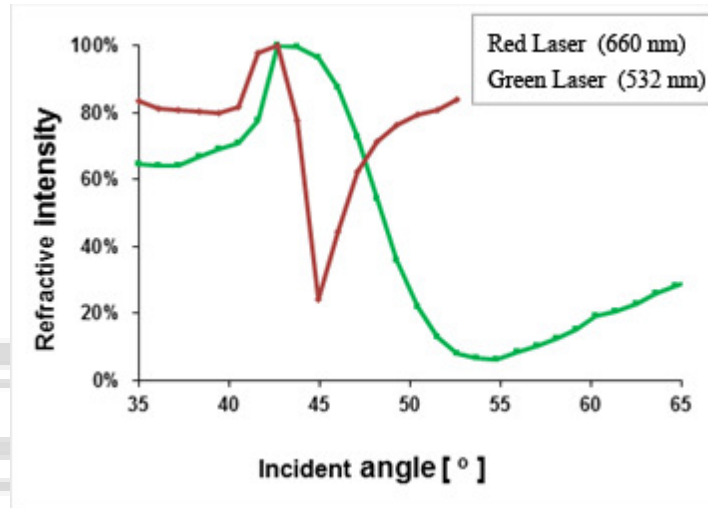


圖 4-2 表面電漿共振角度量測結果圖

本實驗中為明確了解每一批晶片品質，選用於第三章所介紹本研究室所架設「單波長二極體雷射表面電漿量測架構」檢驗之。圖 4-2 為利用紅光二極體雷射 (660 nm) 及綠光二極體雷射 (532 nm) 所量測得表面電漿共振角度，量測樣本為空氣，折射率為 1，其橫軸為雷射光源入射角度，縱軸為歸一化後之相對反射強度，於此圖中可知紅光雷射所量測得的共振角度 ( $45.1^\circ$ )，較綠光 ( $54.5^\circ$ ) 小，此數據與利用 MATLAB<sup>®</sup> 程式所模擬之理論共振角度比較下，誤差值在可接受範圍中，其角度之位移與表面電漿理論相符，其中文所提及雷射二極體皆選購於實密光電。實驗中使用高解析度蓋玻片與極為平整之黃金薄膜，使得綠光共振吸收率高達 88%。

## 4.3 物鏡式波長解析表面電漿共振系統量測結果

### 4.3.1 光離軸距離對表面電漿共振之影響

在前文第三章中所提及不同光遮擋片所設計之離軸距離，對應到不同入射角度，當角度變大時，所對應表面電漿共振波長便會往紅光位移。於本實驗設計了五種適合運用水溶液中之光遮擋片，以離軸距  $d$  為 5.6 mm，每 0.1 mm 間距遞增至 6.0 mm 共五種光遮擋片，進行表面電漿光學微流體量測。量測所得光譜儀訊

號，經過數學規一化處理後，得到相對吸收強度，再藉由 MATLAB<sup>®</sup>進行運，得反射光強度相對極小值所在波長，此波段便是表面電漿共振波長。圖 4-3 中縱軸為反射相對強度，橫軸為光譜儀設定之量測波長範圍，由 450 nm 以每 1.12 nm 的解析度量測到 950 nm。圖中分別對於上述晶片設計進行量測，可判斷出全波段的白光經黃金薄膜全反射後，本應完整且連續的波型，卻在特定波長有相當大的吸收。

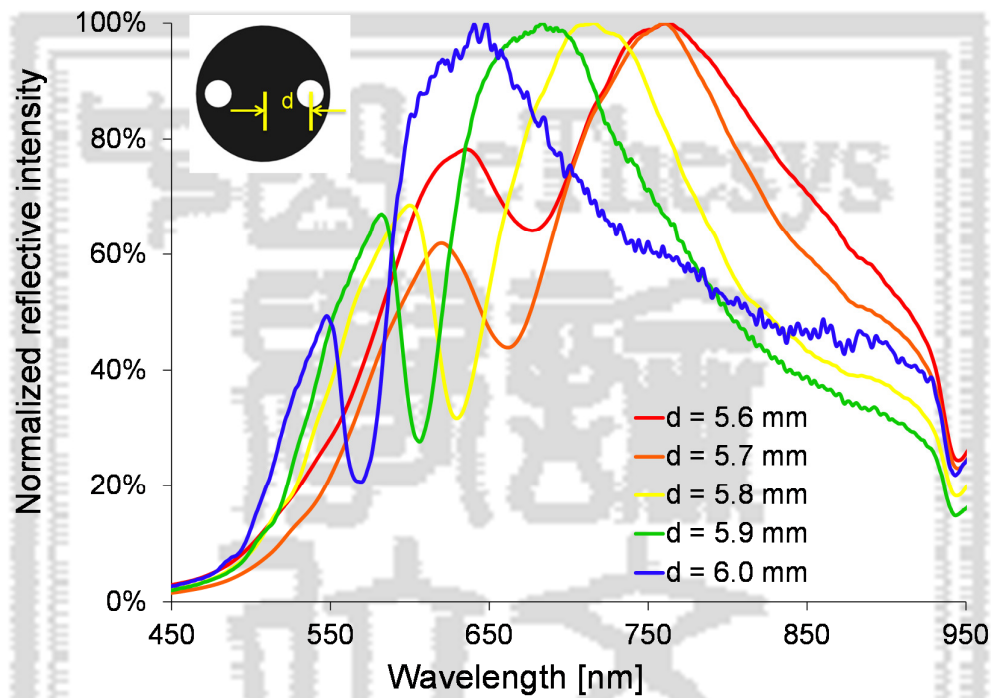


圖 4-3 TIRF 系統量測不同離軸距光狹縫之反射光譜

實驗中也根據表面電漿理論進行模擬(附錄 A)，利用第三章中數位訊號模擬方式，藉由將反射率數學式輸入 MATLAB<sup>®</sup>，將波長劃分成 790 個節點帶入並計算，過程中每一波長節點依入射角度劃分成 600 份逕行運算。最後利用 Excel 數學處理，將模擬所得反射率分布與入射光源光譜相乘，圖 4-4 為模擬輸出之反射光譜圖，其縱軸為反射光相對強度，橫軸為光波長由 450 nm 至 950 nm，其中各個不同離軸距的光遮擋片，所對應的入射角度分別有 5.6 mm 對應 69.10°、5.7 mm 對應 69.67°、5.8 mm 對應 71.54°、5.9 mm 對應 73.52°、6.0 mm 對應 80.18°。

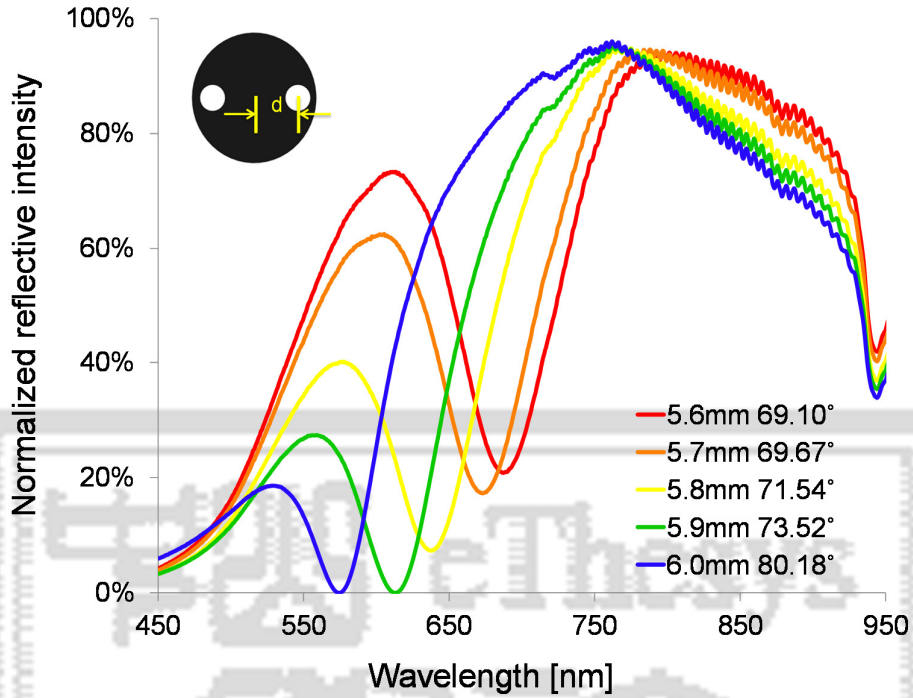


圖 4-4 MATLAB®模擬不同離軸距離所對應吸收波長

圖 4-5 為對同一晶片進行相異量測點，每一離軸距參數都經過五次量測，其標準差在可接受且小於可解析的範圍內。由於離軸距離變異量較小，吸收波長的位移量趨近於線性，本實驗線性度( $R^2$ )達 0.984。

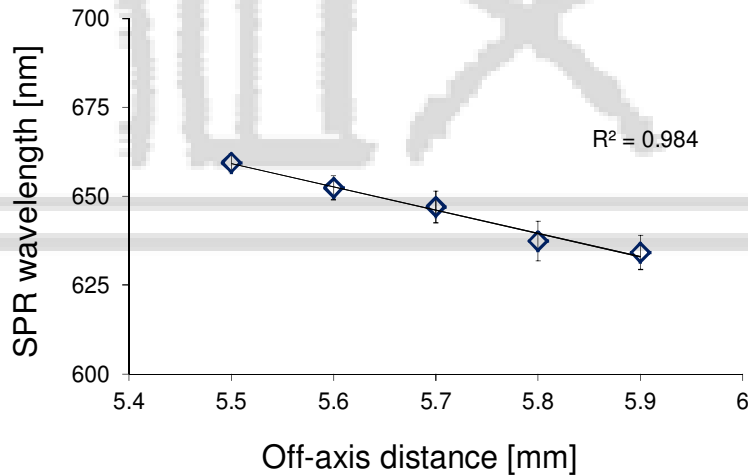


圖 4-5 晶片於相異量測點重複測試對應折射率變化之曲線

研究中吾人藉由實驗數據，計算出所使用的 TIRF 物鏡(CFI Apo TIRF 60x oil,



NIKON, Japan)之焦距約為 6.09 mm，將其代入 $d = f \sin\theta$ 計算，推導出理論入射角度對應光軸離軸距 (圖 4-6)。

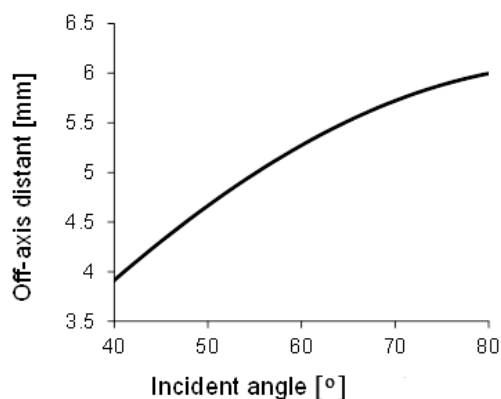


圖 4-6 理論計算離軸距離對應入射角度

表 4-1 表面電漿共振波長與光軸離心距離對照及其反射相對強度

| d volume [mm]                      | 5.6  | 5.7  | 5.8  | 5.9  | 6    |
|------------------------------------|------|------|------|------|------|
| Maximum absorption wavelength [nm] | 673  | 657  | 625  | 602  | 563  |
| Reflection percentage              | 64.5 | 44.4 | 32.8 | 29.5 | 21.9 |

TIRF 物鏡架構下的量測範圍約由 580 nm 至 800 nm，然而隨著入射角度變小，反射光強度上升，表面電漿吸收能力較低，不容易被解析出來。表 4-1 為各離軸距離所對應之波長與反射強度，考慮薄膜敏感角度及收光效率，最終選定軸心距離為 5.9 mm。而純水為樣本時，其表面電漿吸收波長為 600 nm，可偵測範圍約為 250 nm。

#### 4.3.2 折射率改變與表面電漿共振波長

表面電漿共振量測基本概念為折射率的量測，其後運用於表面折射率有些微變化，使得樣本中的物質可以準確檢測。於此，本研究對於折射率之改變以及敏感度做了一系列的測定及結果判斷。

首先，量測樣本必須是活性較低且不易與玻璃流道反應，或者易殘留的液體。無論化學頓性、表面黏滯等特性、具有低表面張力，及常被作為清潔用的酒精水

溶液皆是最好的選擇。本研究利用無水酒精配製不同濃度存放於玻璃針筒中等待使用，並使用四位半手持式折射率測定儀(PAL-RI, ATAGO, Japan)做折射率的檢定，依序分別於管道內注入去離子水( $n=1.330$ )、酒精濃度 5 %( $n=1.3356$ )、10 %( $n=1.3376$ )、15 %( $n=1.3404$ )、20 %( $n=1.3438$ )、25 %( $n=1.3464$ )、30 %( $n=1.3492$ )、40 %( $n=1.3532$ )、50 %( $n=1.357$ )、60 %( $n=1.3592$ )。

圖 4-7 中為高濃度酒精注入微流體管道中，流動下的動態樣本量測，串聯支針筒於微量泵浦上，即時注入所欲量額測的酒精濃度，待光譜吸收值恆定後記錄下的光譜圖。如圖中所得，60%濃度的酒精折射率約為，而吸收波長落在 680 nm 上，尚未超出最大量測上限 850 nm，30%至 60%高折射酒精敏感度大約為 3800 nm/RIU。

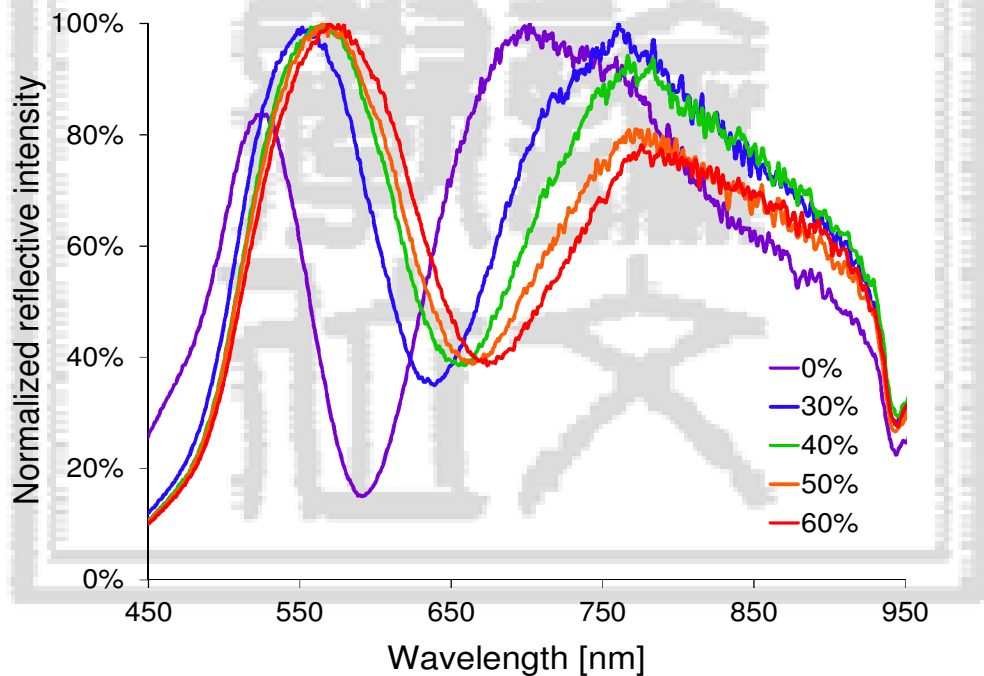


圖 4-7 高折射率酒精表面電漿共振反射強度量測圖

圖 4-8 則為利用 MATLAB<sup>®</sup>模擬高折射係數樣本，其中選擇與圖 4-7 相對應至折射率，進行表面電漿共振波長的擷取，經理論算得到之反射率與入射光譜作乘積後所得，縱軸為相對反射強度，橫軸為波長範圍由 450 nm 至 950 nm。

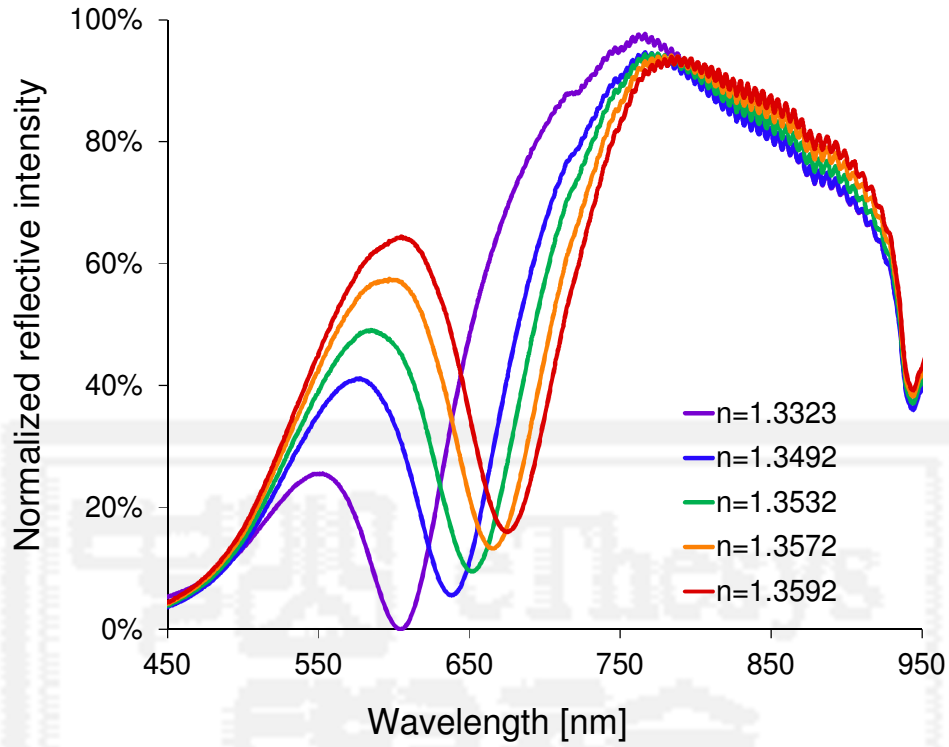


圖 4-8 MATLAB® 模擬 TIRF 共振波長訊號圖

圖 4-9 縱軸為表面電漿吸收波長，橫軸為入射角度擷取範圍從 65° 至 80°，由此圖觀察出固定角度下，其吸收波長的特定值，研究中所選定的 5.9 mm 則對應入射角度為 73.52°。

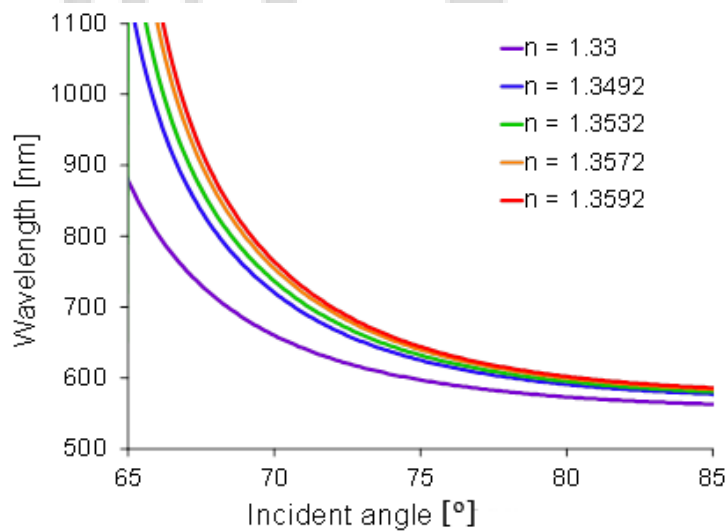


圖 4-9 MATLAB® 模擬相異入射角度與樣本折射之共振波長

此外，本實驗中也針對低濃度酒精水溶液進行表面電漿共振量測。圖 4-10 縱軸為 TIRF 系統量測所得相對反射強度，橫軸為掃描波長由 450 nm 至 950 nm，過程則是以 5 % 為最低濃度酒精水溶液，每 5 % 遞增量測至 40 % 的酒精濃度，吸收波長則從 586 nm 一直緩慢位移至 638 nm，過程中光譜儀以動態的高速掃描紀錄，圖中訊號為一秒積分量測下所擷取。低濃度酒精折射率表面電漿的敏感度，大約為 2826 nm/RIU，與高濃度酒精敏感度 3800 nm/RIU 相比，下降了 1000 nm/RIU。

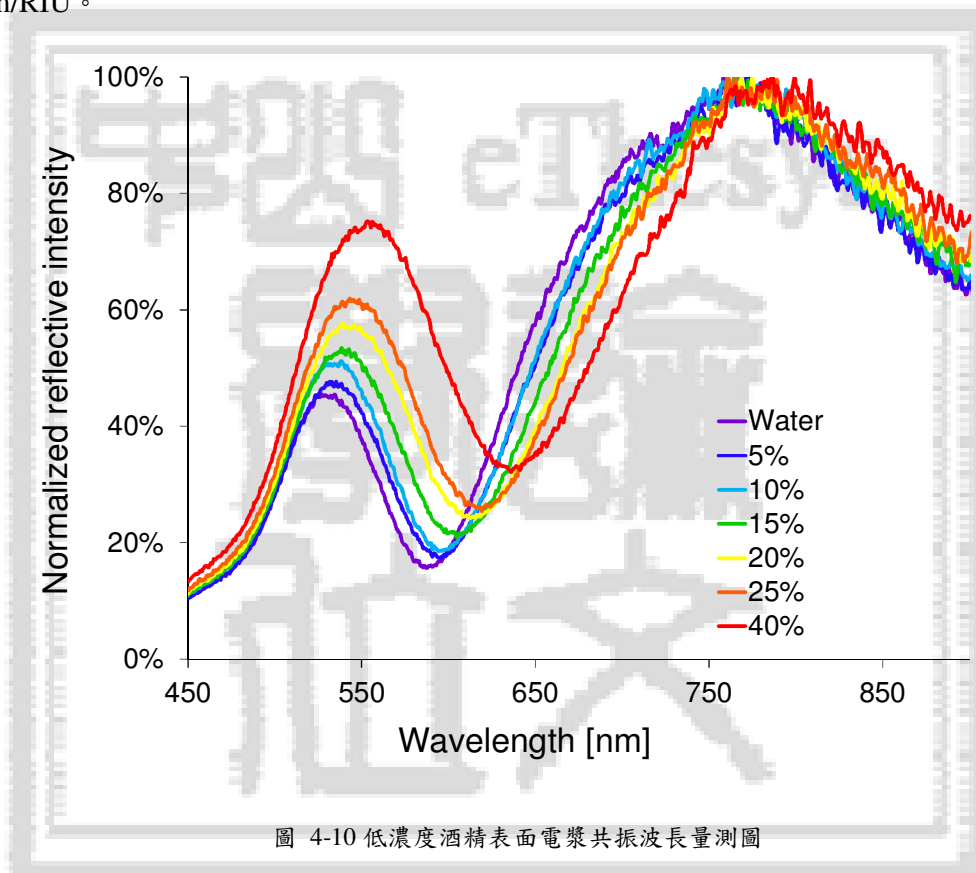


圖 4-10 低濃度酒精表面電漿共振波長量測圖

圖 4-11 為利用 MATLAB<sup>®</sup> 模擬低折射率樣本於 TIRF 系統之反射率，再與原入社鎢絲燈源光譜相乘，得到一縱軸為相對反射強度、橫軸為波長 450 nm 至 950 nm 的模擬範圍之對照圖。綜觀圖 4-10 與圖 4-11，可明顯看出利用 TIRF 系統可正確性解析出低折射係數樣本。然而光線在物鏡與介面之間能然會有散射現象產生，模擬數據與實驗值間仍然會有些微差異。

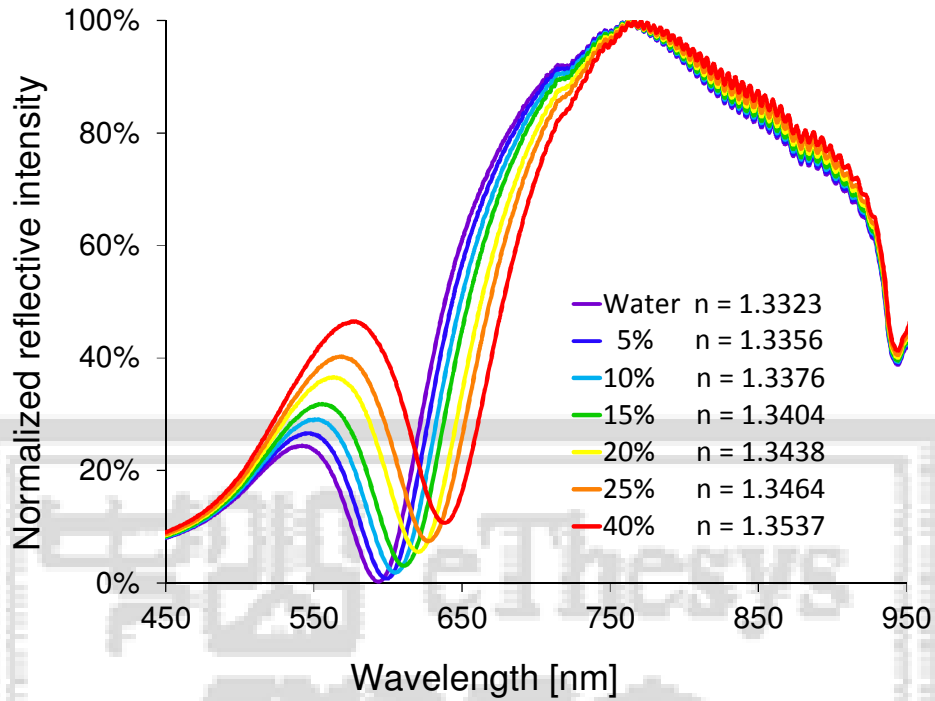


圖 4-11 低折射係數樣本之 MATLAB® 模擬

## 4.4 管道內 SPR 量測

### 4.4.1 表面改質製程與黃金黏著層之貼附能力探討

前文提及使用鉻薄膜作為黏著層，必須考慮鉻金屬薄膜所產生之表面電漿效應，然而實驗上使用 3-MPTS 對平整玻璃進行改質，在二氧化矽介面上自組裝上小於一奈米厚度的薄膜，其折射係數為 1.49。實際於管道內量測下，當充滿折射率為 1.3323 之去離子水時，經由 TIRF 光學架構量測得，以鉻金屬作為黏著層之共振波長為 600 nm，然而利用 3-MPTS 接合黃金之方法其共振波長降至 575 nm。若為降低共振波長而犧牲鉻金屬厚度，其黏附性質不佳，則黃金於管道內進行生醫量測時，會發現剝落的情況，晶片效能與壽命便減少。圖 4-12 與圖 4-13 為使用鉻金屬鍍膜與 3-MPTS 製作黃金薄膜實體圖，利用 3M 公司黏著膠帶做為測試，明顯可見鉻金屬黏附性質沒有 3-MPTS 來的強。

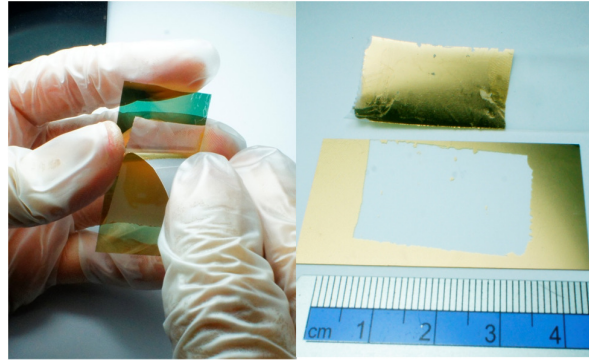


圖 4-12 鉻金屬作為黏著層實體圖

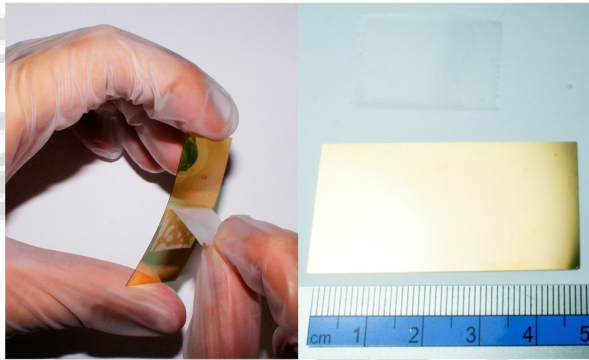


圖 4-13 利用 3-MPTS 做為黏著層實體圖

#### 4.4.2 自組裝單分子層之表面改質與生醫量測

實驗中使用流體聚焦型晶片，於管道雙邊通入水溶液，利用微流體在管道中為層流之性質，將中間樣本流體聚焦於流道中央，藉由調配夾擠流體與樣本流體之流速達到控制樣本流體寬度。

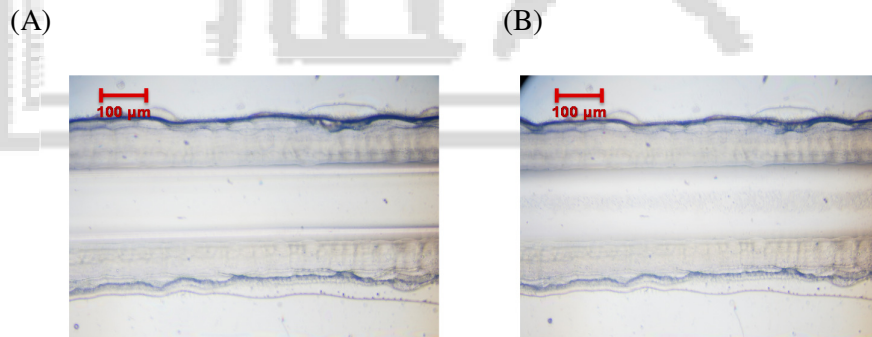


圖 4-14(A)11-MUA 酒精溶液進行表面改質及 (B)EDC/NHS 水溶液改質後實體圖

圖 4-14(A)為管道內樣本流體通入 11-MUA，兩邊夾擠流體則為去離子水，由於 11-MUA 分子欲自組裝於黃金表面時，需要非常緩慢流速，故流速控制於 5

ml/hr，且組裝時間長達五小時，過程中仍不斷以 TIRF 光學架構進行光譜儀之高速掃描並同步紀錄，於下方以高倍物鏡進行影像即時捕捉。圖 4-14(B)為管道成功組裝上 11-MUA 後，再利用 EDC/NHS 水溶液穩定以流速為 5 ml/hr 通入流道，歷時一點五小時，待其與 11-MUA 後端羧基取代成胺基(NH<sub>2</sub>)。

上述過程中於 TIRF 全反射表面電漿系統之光譜儀所擷取之訊號，藉由 Excel 分析相對吸收值，可得表面電漿共振波長，圖 4-15 中橫軸為實驗時間流程，實驗過程共約八小時，縱軸為表面電漿共振波長。由此圖可以明顯觀察出，於前五小時注入配有 5mM 11-MUA 酒精時，因酒精折射率高達 1.36，而其吸收波長餘前章節中所測試約為 675 nm 左右，再經五小時後便注入去離子水做清洗，吸收波長約為 630 nm，此過程中與原黃金薄膜吸收波長相比，位移 40 nm。其後 EDC/NHS 水溶液注入後，因為折射率並無明顯改變，而吸收波長也不會明顯的改變，隨著後端慢慢改值，吸收波長緩緩上升，於 1.5 小時趨於平緩，此時再注入去離子水作為清洗，同樣的吸收波長停留於 638 nm，兩過程中都利用表面電漿共振間接證明了表面改質效果。

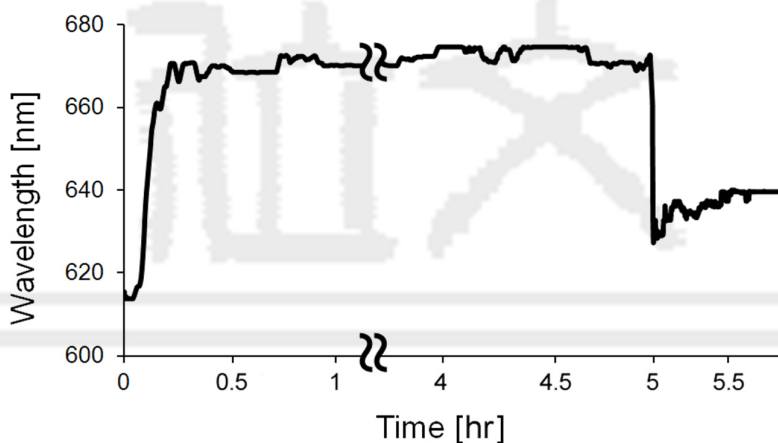


圖 4-15 11-MUA 酒精溶液與 EDC/NHS 水溶液於黃金表面改質過程圖

本研究中因材料取得限制，選擇使用較易培養之酵母菌細胞，其大小大約 5 微米。經由改質後裸露官能基為胺基的表面，已可以凡德瓦力和幾何形狀抓住酵母菌細胞。圖 4-16 為細胞接合過程，於本系統中擷取表面電漿共振波長，先將

帶有酵母菌細胞的溶液，以流速 5 ml/hr 注入 30 分鐘，此時因折射率改變而吸收波長位移至 654 nm，再經由去離子水清洗，吸收波長落在 645 nm。由於過程中細胞溶液會與配體結合的物質只有酵母菌細胞，故大膽推測細胞已與晶片做接合。其後以稀釋過之硫酸水溶液，以 30 ml/hr 通入微流體管道中逕行清洗約 30 分鐘，緊接著再以去離水注入，共振波長回到約 630 nm，與 11-MUA 改質過後的吸收波長相同，可判斷細胞與 NHS 被硫酸所清洗而脫落，至於 11-MUA 與黃金結合之介面強度較強，較難被斷鍵而脫離。

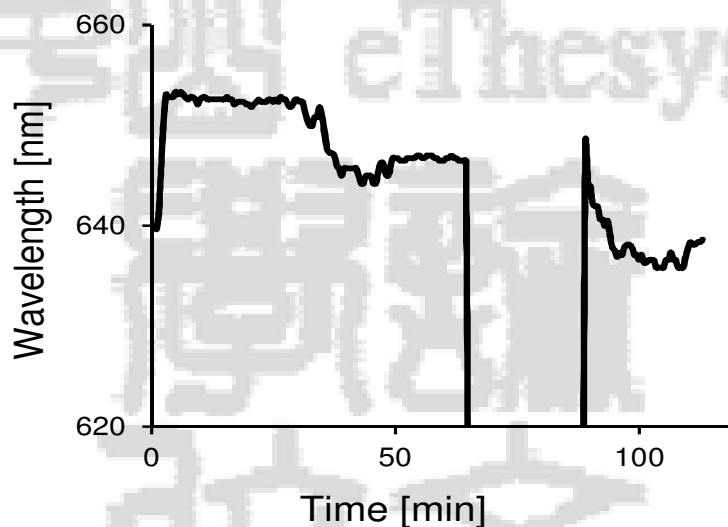


圖 4-16 利用胺基捕捉酵母菌於介面，與通入硫酸做表面清洗之動態偵測圖

#### 4.5 動態偵測單點之 SPR 解析與掃描方式探討

圖 4-17 中為使用 TIRF 表面電漿系統於晶片單一量測點上，以相同濃度酒精與去離子水溶液交錯通入，過程中以光譜儀高速掃描方式每 38 毫秒紀錄一次光譜訊號，藉以測量本系統在長時間量測下之穩定性質。其中 Z 軸為反射光源強度，X 軸為量測波長，Y 軸為量測時間期單位為秒，過程中共量測 600 秒鐘。於圖 4-18 中縱軸為共振波長單位為奈米(nm)、橫軸為量測時間單位為秒，進行四次循環扣除液體從外管道進入微流體晶片之時間約八分鐘，可見純水的表面電漿共振波長為 575 nm，當通入濃度為 30% 的酒精時，共振波長位移至 630 nm 左



右，固定交錯時間為每 2 分鐘變換量測物質進入微流體管道中。

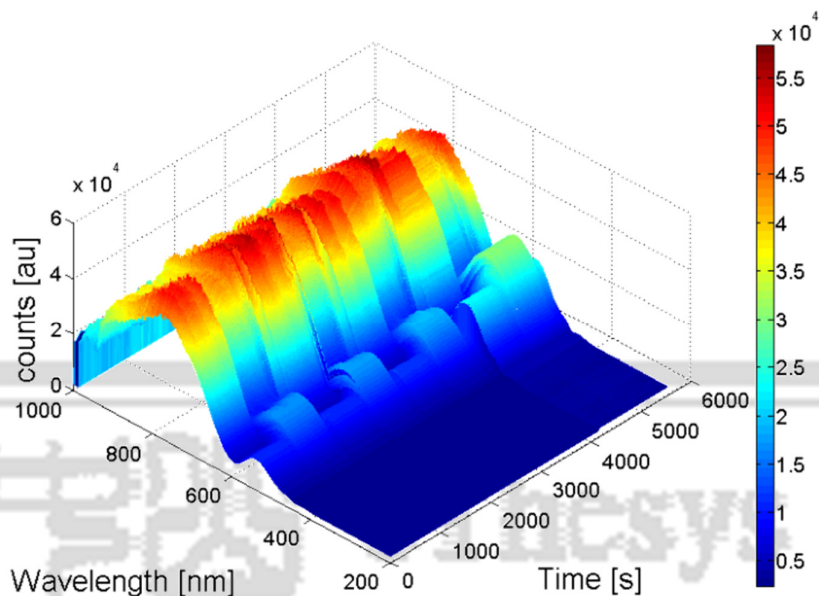


圖 4-17 利用白光 TIRF 全波段量測表面電漿共振動態過程訊號圖

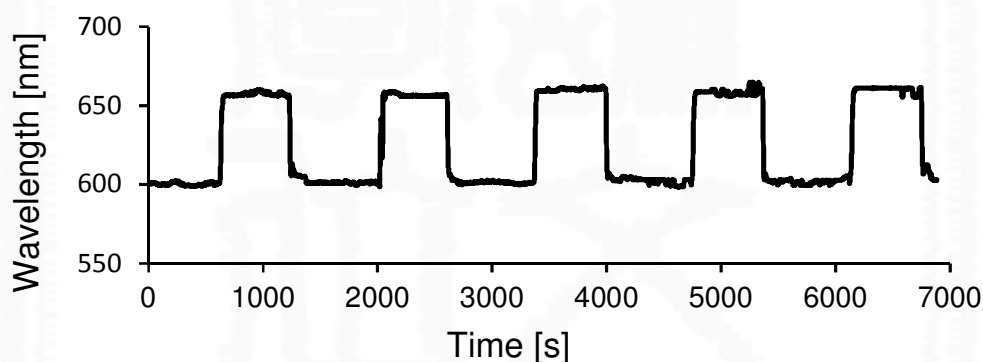


圖 4-18 相同酒精濃度於動態量測下共振波長位移圖

前文中提及本系統具有高空間解析度及達到逐點掃描功能，為了測試本研究系統在空間上解析能力，於黃金介面利用光刻顯影做了週期性光阻結構(圖 4-19 (A))。理論計算上光點大小約為 15  $\mu\text{m}$ ，圖中週期結構長寬皆為 150  $\mu\text{m}$ ，光阻間距為 50  $\mu\text{m}$ ，以手動光學平台乘載自製光學微流晶片，過程中仍不斷通入純水，做為表面電漿共振樣本介電質，選擇折射率為 1.3323 時之共振波長 600 nm 反射強度為相對基準。

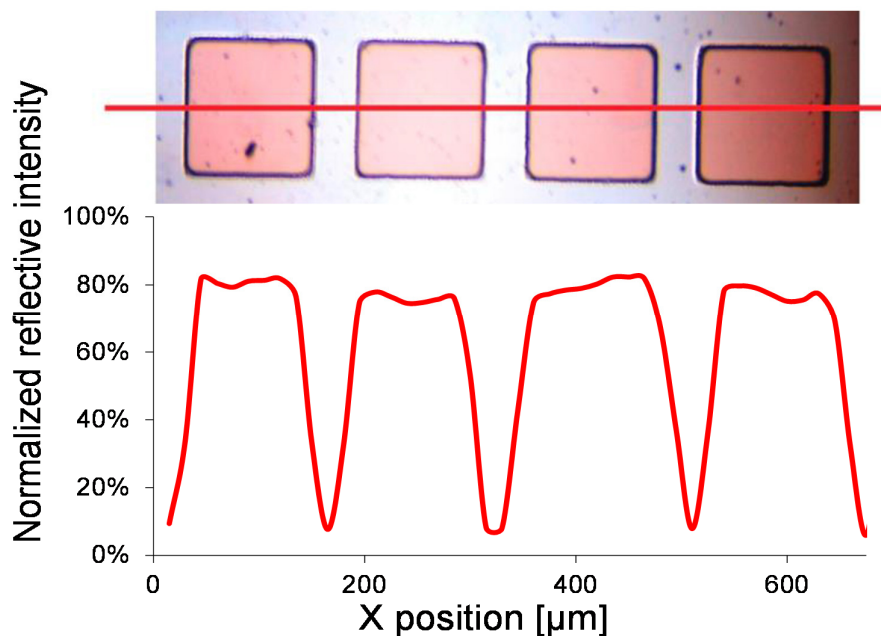


圖 4-19 (A)週期性光阻結構實體圖 (B)逐點掃描下固定波長量測反射強度

由於全反射式物鏡的量測架構下，即是定角度入射，光強度以及變波長的量測方式皆可實現，但因邊界解析過程必須考慮敏感度，所以過程中使用敏感度較高的定角度、定波長光強度量測方式。圖 4-19 (B)中橫軸為位移距離單位為  $10 \mu\text{m}$ ，而縱軸為定波長下之反射相對強度，由此結果清楚證明以全反射式物鏡架構下，光點的大小確實與理論上相符，可以解析至  $50 \mu\text{m}$  的週期性結構，足以認可本架構之發展性。

## 第五章 結論與未來展望

### 5.1 結論

研究中成功以一創新設計下，將鎢絲燈光源整合全反射式物鏡，進行表面電漿共振量測，並架構於倒立式顯微鏡組中，其後更利用高解析與高量子效應光譜儀做為訊號量測，解析經極微弱之反射光源。於 TIRF 系統量測架構中，無論是改變軸心距對應到不同入射角度，或者是樣本折射率的變化，都得到了明顯的表面電漿共振波長的光強度散失。

本研究中成功結合表面電漿共振與微流體管道，進行管道內部的折射率測定，以及利用表面改質方式，使管道內黃金薄膜可靠度提升，並且解決使用鉻金屬做為黏著層時所必需考慮的問題，如鉻金屬厚度增加其吸收波長往紅光位移。

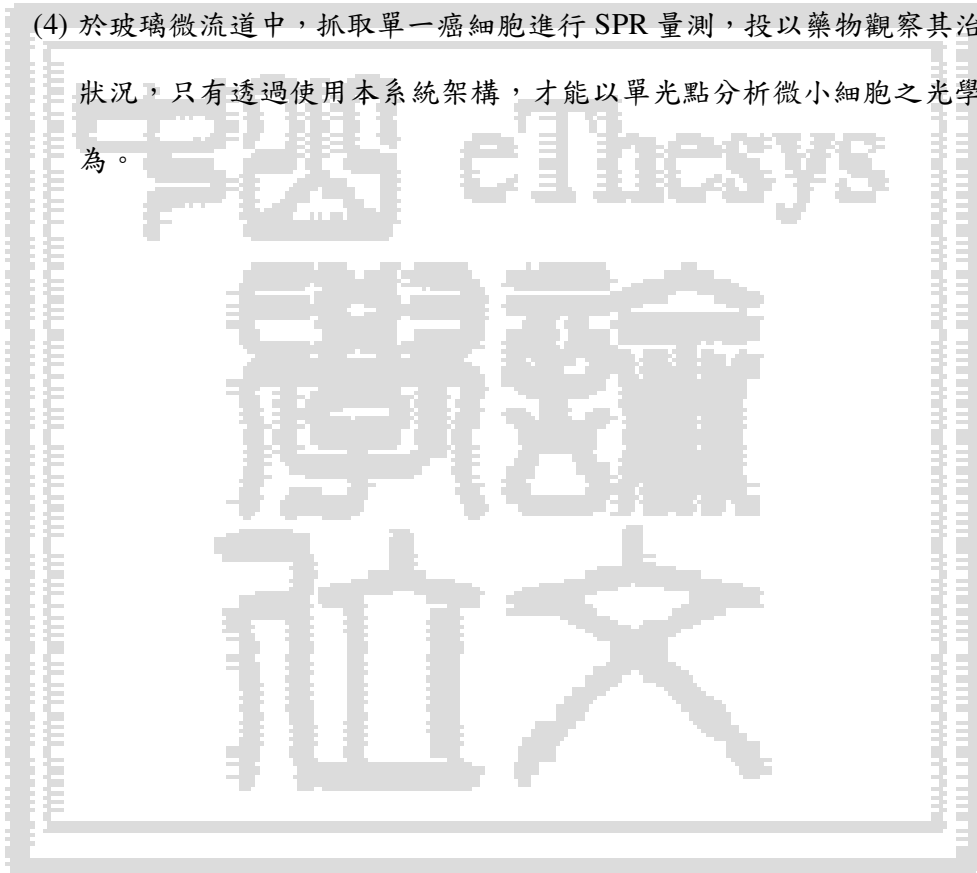
此外更利用自組裝薄膜技術，成功進行管道內部黃金表面的改質，以及改質前後之表面電漿測定，間接證實並實現微流體管道內部生醫交互作用可行性。最後更在管道內做周期性結構，進行單光點解析度之驗證。

研究所量測得敏感度為 3842 nm/RIU，與以往光纖波導式的 SPR 系統比較，精準度提高(吸收光之半高寬減小)，且這樣的架構可以結合微陣列的概念，達到單一晶片同時量測不同訊息之功能，此外為證明光學架構所量測訊息正確性，以及光學架構及時調整與後製改良，利用 MATLAB<sup>®</sup> 模擬反射強度作為校正，更減低了系統的誤差。

此一光學架構的開發，開創出高空間解析度與高密度使用率的晶片系統，使得表面電漿共振量測架構積體化，並且達到成本降低，突破以往表面電漿共振在顯微微系統上之空間受限與功能限制，進而結合生醫微流體晶片下，增加使用功能與效率，此外敏感度與解析度亦高於市面上所售大型機台設備與過去所提及之相關文獻。最後更結合動態系統量測與生醫微流體晶片之表面改質，結合過去表面電漿共振所擁有之功能。

## 5.2 未來展望

- (1) 使用光縮束鏡將入射光源匯聚後，在以光纖於物鏡後端收光。
- (2) 重新設計光學架構於導力是顯微鏡組中，使上光路不會因長時間的量測，使得波長有所飄移。
- (3) 架設高精度二維線性移動平台，進行逐點掃描與同時記錄表面電漿共振波長，且期許可以利用套裝軟體達到共真波長分析。
- (4) 於玻璃微流道中，抓取單一癌細胞進行 SPR 量測，投以藥物觀察其治癒狀況，只有透過使用本系統架構，才能以單光點分析微小細胞之光學行為。



## 参考文献

- [1] R. P. Feynman, "There's plenty of room at the bottom," *Engineering and Science*, vol. 23, pp. 22-36, 1960.
- [2] V. Srinivasan, V. K. Pamula, and R. B. Fair, "An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids," *Lab on a Chip*, vol. 4, pp. 310-315, 2004.
- [3] P. Abgrall and A. Gue, "Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, p. R15, 2007.
- [4] D. R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, and A. Manz, "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 2623-2636, 2002.
- [5] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, and A. Manz, "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications," *Analytical Chemistry*, vol. 74, pp. 2637-2652, 2002.
- [6] S. Balslev, A. Jorgensen, B. Bilenberg, K. B. Mogensen, D. Snakenborg, O. Geschke, *et al.*, "Lab-on-a-chip with integrated optical transducers," *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 213-217, 2006.
- [7] C. Monat, P. Domachuk, and B. Eggleton, "Integrated optofluidics: A new river of light," *Nature Photonics*, vol. 1, pp. 106-114, 2007.
- [8] R. L. Rich and D. G. Myszka, "Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 11, pp. 54-61, 2000.
- [9] L. A. Lyon, M. D. Musick, and M. J. Natan, "Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing," *Analytical Chemistry*, vol. 70, pp. 5177-5183, 1998.
- [10] J. Homola, "Present and future of surface plasmon resonance biosensors," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 377, pp. 528-539, 2003.
- [11] B. Rothenhäusler and W. Knoll, "Surface plasmon microscopy," *Nature*, 1988.
- [12] M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane, and T. Yanagida, "Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 235, pp. 47-53, 1997.
- [13] B. Huang, F. Yu, and R. N. Zare, "Surface plasmon resonance imaging using a high numerical aperture microscope objective," *Analytical Chemistry*, vol. 79, pp. 2979-2983, 2007.
- [14] S. Otsuki and M. Ishikawa, "Wavelength-scanning surface plasmon resonance imaging for label-free multiplexed protein microarray assay," *Biosensors and*

- Bioelectronics*, vol. 26, pp. 202-206, 2010.
- [15] K. Kao and G. A. Hockham, "Dielectric-fibre surface waveguides for optical frequencies," *Electrical Engineers, Proceedings of the Institution of*, vol. 113, pp. 1151-1158, 1966.
- [16] J. D. Jackson and R. F. Fox, "Classical electrodynamics," *American Journal of Physics*, vol. 67, p. 841, 1999.
- [17] M. Born and E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*: CUP Archive, 1999.
- [18] P. B. Johnson and R.-W. Christy, "Optical constants of the noble metals," *Physical Review B*, vol. 6, p. 4370, 1972.
- [19] C. Kittel and B. C. Kittel, "Introduction to solid state physics," 1986.
- [20] S. A. Maier, *Plasmonics: fundamentals and applications*: Springer, 2007.
- [21] L. Novotny and B. Hecht, *Principles of nano-optics*: Cambridge university press, 2012.
- [22] A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Zeitschrift für Physik*, vol. 216, pp. 398-410, 1968.
- [23] E. Kretschmann and H. Raether, "Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light(Surface plasma waves excitation by light and decay into photons applied to nonradiative modes)," *Zeitschrift Fuer Naturforschung, Teil A*, vol. 23, p. 2135, 1968.
- [24] R. Wood, "XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum," *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 4, pp. 396-402, 1902.
- [25] L. Rayleigh, "On the dynamical theory of gratings," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, vol. 79, pp. 399-416, 1907.
- [26] R. Ritchie, "Plasma losses by fast electrons in thin films," *Physical Review*, vol. 106, p. 874, 1957.
- [27] S. K. Srivastava, R. Verma, and B. D. Gupta, "Surface plasmon resonance based fiber optic sensor for the detection of low water content in ethanol," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 153, pp. 194-198, 2011.
- [28] R. Slavík, J. Homola, J. Čtyroký, and E. Brynda, "Novel spectral fiber optic sensor based on surface plasmon resonance," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 74, pp. 106-111, 2001.
- [29] A. Blawas and W. Reichert, "Protein patterning," *Biomaterials*, vol. 19, pp. 595-609, 1998.
- [30] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides,

- "Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology," *Chemical reviews*, vol. 105, pp. 1103-1170, 2005.
- [31] M. Zharnikov, A. Küller, A. Shaporenko, E. Schmidt, and W. Eck, "Aromatic self-assembled monolayers on hydrogenated silicon," *Langmuir*, vol. 19, pp. 4682-4687, 2003.
- [32] T. L. Niederhauser, Y. Y. Lua, G. Jiang, S. D. Davis, R. Matheson, D. A. Hess, *et al.*, "Arrays of Chemomechanically Patterned Patches of Homogeneous and Mixed Monolayers of 1-Alkenes and Alcohols on Single Silicon Surfaces," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 41, pp. 2353-2356, 2002.
- [33] C. E. Taylor and D. K. Schwartz, "Octadecanoic acid self-assembled monolayer growth at sapphire surfaces," *Langmuir*, vol. 19, pp. 2665-2672, 2003.
- [34] D. L. Allara and R. G. Nuzzo, "Spontaneously organized molecular assemblies. I. Formation, dynamics, and physical properties of n-alkanoic acids adsorbed from solution on an oxidized aluminum surface," *Langmuir*, vol. 1, pp. 45-52, 1985.
- [35] T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, and H. B. Na, "Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 12798-12801, 2001.
- [36] A. K. Salem, P. C. Searson, and K. W. Leong, "Multifunctional nanorods for gene delivery," *Nature materials*, vol. 2, pp. 668-671, 2003.
- [37] N. S. Birenbaum, B. T. Lai, C. S. Chen, D. H. Reich, and G. J. Meyer, "Selective noncovalent adsorption of protein to bifunctional metallic nanowire surfaces," *Langmuir*, vol. 19, pp. 9580-9582, 2003.
- [38] H. G. Chen, X. D. Wu, Q. Q. Yu, S. R. Yang, D. P. Wang, and W. Z. Seen, "Self-assembled Monolayers of n - Hexadecanoic Acid and  $\alpha$  - Hydroxyl n - Hexadecanoic Acid on Titanium Surfaces," *Chinese Journal of Chemistry*, vol. 20, pp. 1467-1471, 2002.
- [39] M. R. Linford and C. E. Chidsey, "Alkyl monolayers covalently bonded to silicon surfaces," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 115, pp. 12631-12632, 1993.
- [40] H.-J. Himmel, M. Kaschke, P. Harder, and C. Wöll, "Adsorption of organic monolayers on pyrite (FeS<sub>2</sub>)(100)," *Thin Solid Films*, vol. 284, pp. 275-280, 1996.
- [41] C.-M. Ruan, T. Bayer, S. Meth, and C. N. Sukenik, "Creation and characterization of n-alkylthiol and n-alkylamine self-assembled monolayers on 316L stainless steel," *Thin Solid Films*, vol. 419, pp. 95-104, 2002.
- [42] D. Kanis, C. A. Mirkin, and J. T. McDevitt, "Molecular Control Over the

- Interfacial Properties of High-T (c) Superconductors," DTIC Document 2000.
- [43] C. F. Landes, M. Braun, and M. A. El-Sayed, "On the nanoparticle to molecular size transition: Fluorescence quenching studies," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 105, pp. 10554-10558, 2001.
- [44] S. Frey, A. Shaporenko, M. Zharnikov, P. Harder, and D. Allara, "Self-assembled monolayers of nitrile-functionalized alkanethiols on gold and silver substrates," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, pp. 7716-7725, 2003.
- [45] P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y. T. Tao, A. N. Parikh, and R. G. Nuzzo, "Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 113, pp. 7152-7167, 1991.
- [46] M. D. Malinsky, K. L. Kelly, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne, "Chain length dependence and sensing capabilities of the localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles chemically modified with alkanethiol self-assembled monolayers," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 1471-1482, 2001.
- [47] S. A. Harfenist, Z. Wang, M. M. Alvarez, I. Vezmar, and R. L. Whetten, "Highly oriented molecular Ag nanocrystal arrays," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, pp. 13904-13910, 1996.
- [48] F. Laffineur, N. Couturier, J. Delhalle, and Z. Mekhalif, "Effect of the solvent on the formation of *n*-dodecanethiol films on a polycrystalline Ag<sub>90</sub>Ni<sub>10</sub> substrate," *Applied Surface Science*, vol. 212, pp. 452-457, 2003.
- [49] A. C. Templeton, W. P. Wuelfing, and R. W. Murray, "Monolayer-protected cluster molecules," *Accounts of Chemical Research*, vol. 33, pp. 27-36, 2000.
- [50] Y.-S. Shon, G. B. Dawson, M. Porter, and R. W. Murray, "Monolayer-protected bimetal cluster synthesis by core metal galvanic exchange reaction," *Langmuir*, vol. 18, pp. 3880-3885, 2002.
- [51] N. N. Mamedova, N. A. Kotov, A. L. Rogach, and J. Studer, "Albumin-CdTe nanoparticle bioconjugates: preparation, structure, and interunit energy transfer with antenna effect," *Nano Letters*, vol. 1, pp. 281-286, 2001.
- [52] M. A. Marcus, W. Flood, M. Stiegerwald, L. Brus, and M. Bawendi, "Structure of capped cadmium selenide clusters by exafs," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 95, pp. 1572-1576, 1991.
- [53] H. Döllefeld, K. Hoppe, J. Kolny, K. Schilling, H. Weller, and A. Eychmüller, "Investigations on the stability of thiol stabilized semiconductor nanoparticles," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 4, pp. 4747-4753, 2002.
- [54] T. Løver, W. Henderson, G. A. Bowmaker, J. M. Seakins, and R. P. Cooney,



- "Functionalization and capping of a cds nanocluster: a study of ligand exchange by electrospray mass spectrometry," *Chemistry of Materials*, vol. 9, pp. 1878-1886, 1997.
- [55] S. Ye, S. Morita, G. Li, H. Noda, M. Tanaka, K. Uosaki, *et al.*, "Structural changes in poly (2-methoxyethyl acrylate) thin films induced by absorption of bisphenol A. An infrared and sum frequency generation (SFG) study," *Macromolecules*, vol. 36, pp. 5694-5703, 2003.
- [56] S. Chen, L. A. Truax, and J. M. Sommers, "Alkanethiolate-protected PbS nanoclusters: synthesis, spectroscopic and electrochemical studies," *Chemistry of materials*, vol. 12, pp. 3864-3870, 2000.
- [57] S. M. Lee, S. N. Cho, and J. Cheon, "Anisotropic shape control of colloidal inorganic nanocrystals," *Advanced Materials*, vol. 15, pp. 441-444, 2003.
- [58] F. P. Zamborini, S. M. Gross, and R. W. Murray, "Synthesis, characterization, reactivity, and electrochemistry of palladium monolayer protected clusters," *Langmuir*, vol. 17, pp. 481-488, 2001.
- [59] S. Gomez, L. Erades, K. Philippot, B. Chaudret, V. Collière, O. Balmes, *et al.*, "Platinum colloids stabilized by bifunctional ligands: self-organization and connection to gold Electronic supplementary information (ESI) available: experimental and characterization details; Schemes 1 and 2; Figs. 1-4; Graphical Abstract." *Chemical Communications*, pp. 1474-1475, 2001.
- [60] G. Viau, R. Brayner, L. Poul, N. Chakroune, E. Lacaze, F. Fievet-Vincent, *et al.*, "Ruthenium nanoparticles: size, shape, and self-assemblies," *Chemistry of materials*, vol. 15, pp. 486-494, 2003.
- [61] K. Chen, F. Xu, C. A. Mirkin, R.-K. Lo, K. Nanjundaswamy, J.-P. Zhou, *et al.*, "Do Alkanethiols Adsorb onto the Surfaces of Tl-Ba-Ca-Cu-O-Based High-Temperature Superconductors? The Critical Role of H<sub>2</sub>O Content on the Adsorption Process," *Langmuir*, vol. 12, pp. 2622-2624, 1996.
- [62] F. Sinapi, L. Forget, J. Delhalle, and Z. Mekhalif, "Self-assembly of (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane on polycrystalline zinc substrates towards corrosion protection," *Applied Surface Science*, vol. 212, pp. 464-471, 2003.
- [63] A. R. Noble-Luginbuhl and R. G. Nuzzo, "Assembly and characterization of SAMs formed by the adsorption of alkanethiols on Zinc selenide substrates," *Langmuir*, vol. 17, pp. 3937-3944, 2001.
- [64] M. Suzuki, T. Miyazaki, H. Hisamitsu, Y. Kadoma, and Y. Morioka, "Study on chemical reaction of methylthiirane on gold colloid by surface-enhanced Raman scattering," *Langmuir*, vol. 15, pp. 7409-7410, 1999.
- [65] E. B. Troughton, C. D. Bain, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, D. L. Allara, and M. D. Porter, "Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of

- symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties, and reactivity of constituent functional groups," *Langmuir*, vol. 4, pp. 365-385, 1988.
- [66] M. Venkataramanan, G. Skanth, K. Bandyopadhyay, K. Vijayamohan, and T. Pradeep, "Self-assembled monolayers of two aromatic disulfides and a diselenide on polycrystalline silver films: an investigation by sers and XPS," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 212, pp. 553-561, 1999.
- [67] L. A. Porter, D. Ji, S. L. Westcott, M. Graupe, R. S. Czernuszewicz, N. J. Halas, *et al.*, "Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides," *Langmuir*, vol. 14, pp. 7378-7386, 1998.
- [68] Y.-S. Shon, C. Mazzitelli, and R. W. Murray, "Unsymmetrical disulfides and thiol mixtures produce different mixed monolayer-protected gold clusters," *Langmuir*, vol. 17, pp. 7735-7741, 2001.
- [69] T. M. Willey, A. L. Vance, C. Bostedt, T. van Buuren, R. W. Meulenberg, L. J. Terminello, *et al.*, "Surface structure and chemical switching of thioctic acid adsorbed on Au (111) as observed using near-edge X-ray absorption fine structure," *Langmuir*, vol. 20, pp. 4939-4944, 2004.
- [70] C. E. Jordon, B. L. Frey, S. Kornguth, and R. M. Corn, "Characterization of poly-L-lysine adsorption onto alkanethiol-modified gold surfaces with polarization-modulation Fourier transform infrared spectroscopy and surface plasmon resonance measurements," *Langmuir*, vol. 10, pp. 3642-3648, 1994.
- [71] B. Johnsson, S. Löfås, and G. Lindquist, "Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors," *Analytical Biochemistry*, vol. 198, pp. 268-277, 1991.
- [72] B. Johnsson, S. Löfås, G. Lindquist, Å. Edström, R. M. M. Hillgren, and A. Hansson, "Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 8, pp. 125-131, 1995.
- [73] Y.-H. Rogers, P. Jiang-Baucom, Z.-J. Huang, V. Bogdanov, S. Anderson, and M. T. Boyce-Jacino, "Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays," *Analytical Biochemistry*, vol. 266, pp. 23-30, 1999.
- [74] N. Zammateo, L. Jeanmart, S. Hamels, S. Courtois, P. Louette, L. Hevesi, *et al.*, "Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays," *Analytical Biochemistry*, vol. 280, pp. 143-150, 2000.
- [75] T. Bertok, A. Sediva, J. Katrlík, P. Gemeiner, M. Mikula, M. Nosko, *et al.*,

- "Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles," *Talanta*, 2013.
- [76] S. Nizamov and V. M. Mirsky, "Self-referencing SPR-biosensors based on penetration difference of evanescent waves," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, pp. 263-269, 2011.
- [77] A. D. Taylor, J. Ladd, S. Etheridge, J. Deeds, S. Hall, and S. Jiang, "Quantitative detection of tetrodotoxin (TTX) by a surface plasmon resonance (SPR) sensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 130, pp. 120-128, 2008.
- [78] B. Rothenhaeusler and W. Knoll, "Surface-plasmon microscopy," *Nature*, vol. 332, pp. 615-617, 1988.
- [79] W. Hickel and W. Knoll, "Surface plasmon microscopy of lipid layers," *Thin Solid Films*, vol. 187, pp. 349-356, 1990.
- [80] M. Piliarik, H. Vaisocherová, and J. Homola, "A new surface plasmon resonance sensor for high-throughput screening applications," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2104-2110, 2005.
- [81] NIKON. *NIKON TE2000 inverted microscope manual*  
[http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/5/57/Inverted\\_microscope\\_nikon\\_manual.pdf](http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/5/57/Inverted_microscope_nikon_manual.pdf). Available:  
[http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/5/57/Inverted\\_microscope\\_nikon\\_manual.pdf](http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/5/57/Inverted_microscope_nikon_manual.pdf)
- [82] OCEANOPTIC. *QE65000 Data Sheet*. Available:  
<http://www.oceanoptics.com/technical/engineering/OEM%20Data%20Sheet%20-%20QE65000.pdf>

## 附錄 A

### (調變角度量測模擬)

```
N=300;
x=linspace(20,90,N);
n1=1.515;
n2=0.16111+3.55229521i;
AU
n3=1.3601;
d=50e-9;
lambda=700e-9;
angle1=(x./180).*pi;
angle2=asin((n1./n2).*sin(angle1));
angle3=asin((n1./n3).*sin(angle1));
k=2*pi/lambda;
k1x=k.*n1.*cos(angle1);
k2x=k.*n2.*cos(angle2);
k3x=k.*n3.*cos(angle3);

for j=1:N
M(:,j)=(k2x(j)*n1^2+k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))
(k2x(j)*n1^2-k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j));(k2x(j)*n1^2-k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))
(k2x(j)*n1^2+k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))]*exp(-(i*k2x(j)*d)          0;          0
exp((i*k2x(j)*d)))*[(k3x(j)*n2^2+k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))
(k3x(j)*n2^2-k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j));(k3x(j)*n2^2-k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))
(k3x(j)*n2^2+k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))];

r(j)=M(2,1,j)/M(1,1,j);
t(j)=1./(M(1,1,j));
R(j)=abs(r(j)).^2;

T(j)=(n3.*cos(angle3)/(n1.*cos(angle1))).*abs(t(j)).^2;
Q(j)=real(r(j))./imag(r(j));
end

figure(2)
```

plot(x,R,'b')

hold on



## 附錄 B

(光狹縫樓軸距對應入射角度模擬)

```
clear;
```

```
for (N=1:90)
```

```
    d(1,N)=6.09*sind(N);
```

```
end
```

```
plot(d);
```

```
hold on;
```



## 附錄 C

(Durde mode 、Interband transition 模擬黃金折射係數)

```
for (NODE=800:2400)
```

```
e=1.602e-19;
```

```
tau=1.075e14;
```

```
gamma=9e14;
```

```
n=5.9e28;
```

```
me=9.11e-31;
```

```
c=3e8
```

```
lambda1=NODE.*5*1e-10
```

```
w=2*pi*c./lambda1;
```

```
epsilon0=8.854e-12
```

```
%wp=1.38e16
```

```
wp=sqrt((n.*e.*e)/(me.*epsilon0));
```

```
epsilon1(1,NODE-799)=1-((wp.*wp)/(w.*w+tau.*tau));
```

```
epsilon2(1,NODE-799)=(tau*wp.*wp)/(w.*(w*tau+tau*tau));
```

```
lambda2=450e-9;
```

```
wp2=45e14;
```

```
w0=2*pi*c./lambda2;
```

```
epsilon3(1,NODE-799)=1+((wp2*wp2)*(w0*w0-w*w))./(((w0*w0-w*w)*(w0*w0-w*w))+((gamma*gamma)*(w*w)));
```

```
epsilon4(1,NODE-799)=(gamma*wp2*wp2*w)./(((w0*w0-w*w)*(w0*w0-w*w))+((gamma*gamma)*(w*w)));
```

```
epsilonrepart(1,NODE-799)=epsilon1(1,NODE-799)+epsilon3(1,NODE-799);
```

```
epsilonimpart(1,NODE-799)=epsilon2(1,NODE-799)+epsilon4(1,NODE-799);
```

```
lambda3=NODE*5*1e-10;
```

```

AU2=epsilonrepart(1,NODE-799)+epsilonimpart(1,NODE-799)*i;
N=600;
y=linspace(400,1200,1601);
x=linspace(20,90,N);
n1=1.515;
n2=sqrt(AU2);
n3=1.3601;
d=50e-9;
angle1=(x./180).*pi;
angle2=asin((n1./n2).*sin(angle1));
angle3=asin((n1./n3).*sin(angle1));
k=2*pi/lambda3;
k1x=k.*n1.*cos(angle1);
k2x=k.*n2.*cos(angle2);
k3x=k.*n3.*cos(angle3);

for j=1:N
    M(:,j)=(k2x(j)*n1^2+k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))
    (k2x(j)*n1^2-k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j));(k2x(j)*n1^2-k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))
    (k2x(j)*n1^2+k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))*[exp(-i*k2x(j)*d) 0; 0
    exp(i*k2x(j)*d)]*(k3x(j)*n2^2+k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))
    (k3x(j)*n2^2-k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j));(k3x(j)*n2^2-k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))
    (k3x(j)*n2^2+k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j));

    r(j)=M(2,1,j)/M(1,1,j);
    t(j)=1./(M(1,1,j));
    R(NODE-799,j)=abs(r(j)).^2;

    T(j)=(n3.*cos(angle3)/(n1.*cos(angle1))).*abs(t(j)).^2;
    Q(j)=real(r(j))./imag(r(j));
end

```



```
end
```

```
R2=R.*100;
```

```
figure(1);
```

```
mesh(x,y,R2);figure(gcf);colorbar;
```

```
zlabel('Reflection intensity [%]');
```

```
ylabel('Wavelength [nm]');
```

```
xlabel('Incident angle [degree]');
```

```
hold on;
```



## 附錄 D

(多重折射率 3D 示意圖模擬與相異折射率吸收波長圖)

```
clear;
for(DIFN=1:7)

nDIF=[1.3323,1.3356,1.3376,1.3404,1.3438,1.3464,1.3507];

for (NODE=1:790)

lambdaXX ;    欲解析的波長
epsilonX=1.54;
lambdap=143e-9;
garmap=14500e-9;
A1=1.27;
fi1=-pi./4;
lambda1=470e-9;
gamma1=1900e-9;
A2=1.1;
fi2=-pi./4;
lambda2=325e-9;
gamma2=1060e-9;

lambda=lambdaXX(1,NODE).*1e-9
    epsilonAU1(1,NODE)=-1./((lambdap*lambda)*((1./lambda*lambda))+((1./garmap*lambda))*i));
epsilonAU2(1,NODE)=(((exp(fi1*i))/(1/lambda1)-(1/lambda)-((1/gamma1)*i)))+(((exp(-fi1*i))/(1/lambda1)+(1/lambda)+((1/gamma1)*i))));
epsilonAU3(1,NODE)=(((exp(fi2*i))/(1/lambda2)-(1/lambda)-((1/gamma2)*i)))+(((exp(-fi2*i))/(1/lambda2)+(1/lambda)+((1/gamma2)*i))));

epsilonAU=epsilonX+epsilonAU1+(A1/lambda1)*epsilonAU2+(A2/lambda2)*epsilonAU3;
epsilonRE=real(epsilonAU);
epsilonIM=imag(epsilonAU);

lambda3=lambdaXX(1,NODE).*1e-9;
```

```

AU2=epsilonAU;
N=600;
x=linspace(20,90,N);
y=linspace(400,996,790);
n1=1.515;
n2=sqrt(AU2(1,NODE));
n3=nDIF(1,DIFN);
%n3=1.3323;
d=40e-9;
angle1=(x./180).*pi;
angle2=asin((n1./n2).*sin(angle1));
angle3=asin((n1./n3).*sin(angle1));
k=2*pi/lambda3;
k1x=k.*n1.*cos(angle1);
k2x=k.*n2.*cos(angle2);
k3x=k.*n3.*cos(angle3);

for j=1:N
    M(:,j)=(k2x(j)*n1^2+k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))
    (k2x(j)*n1^2-k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j));(k2x(j)*n1^2-k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))
    (k2x(j)*n1^2+k1x(j)*n2^2)/(2*n1*n2.*k1x(j))*[exp(-i*k2x(j)*d)          0;          0
    exp(i*k2x(j)*d)]*(k3x(j)*n2^2+k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))
    (k3x(j)*n2^2-k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j));(k3x(j)*n2^2-k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j))
    (k3x(j)*n2^2+k2x(j)*n3^2)/(2*n2*n3.*k2x(j)];

    r(j)=M(2,1,j)/M(1,1,j);
    t(j)=1./(M(1,1,j));
    R(NODE,j)=abs(r(j)).^2;

T(j)=(n3.*cos(angle3)/(n1.*cos(angle1))).*abs(t(j)).^2;
Q(j)=real(r(j))./imag(r(j));
end

RDIFN1(NODE,DIFN)=R(NODE,480);
RDIFN2(NODE,DIFN)=R(NODE,478);
RDIFN3(NODE,DIFN)=R(NODE,474);
RDIFN4(NODE,DIFN)=R(NODE,472);
RDIFN5(NODE,DIFN)=R(NODE,468);

```

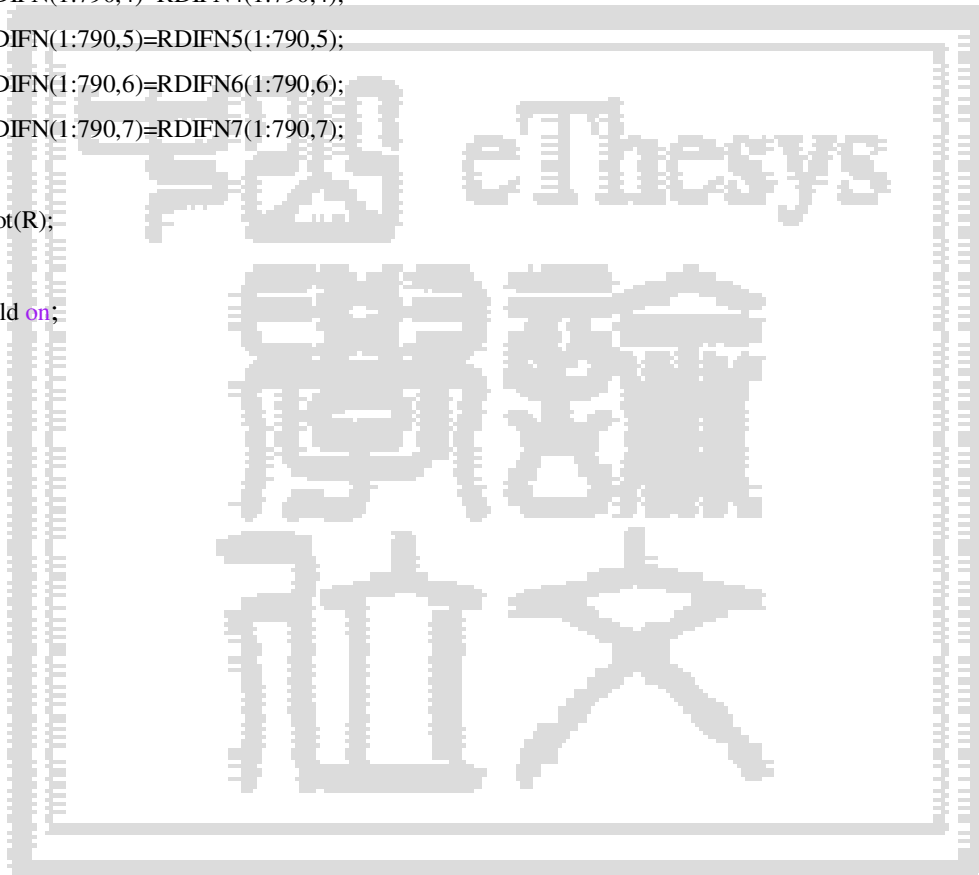
```
RDIFN6(NODE,DIFN)=R(NODE,466);  
RDIFN7(NODE,DIFN)=R(NODE,464);  
end
```

```
end
```

```
RDIFN(1:790,1)=RDIFN1(1:790,1);  
RDIFN(1:790,2)=RDIFN2(1:790,2);  
RDIFN(1:790,3)=RDIFN3(1:790,3);  
RDIFN(1:790,4)=RDIFN4(1:790,4);  
RDIFN(1:790,5)=RDIFN5(1:790,5);  
RDIFN(1:790,6)=RDIFN6(1:790,6);  
RDIFN(1:790,7)=RDIFN7(1:790,7);
```

```
plot(R);
```

```
hold on;
```



## 作者自傳

### 陳冠維 Kuan-Wei Chen

Department of Mechanical and Electro-Mechanical Engineering

National Sun Yat-sen University

Kaohsiung 804, Taiwan

Tel: 07-5252000 ext.4275

E-mail: joseph210385@gmail.com

#### **Education :**

- Bachelor of Science, Department of Mechanical and Electro-mechanical Engineering, National Sun Yat-sen University, Taiwan, 2007~2011
- Master of Science, Department of Mechanical and Electro-mechanical Engineering, June, National Sun Yat-sen University, Taiwan, 2011~2013