

穿透式 X 光顯微術之原理與應用

The Principles and Applications of Transmission X-Ray Microscopy

湯茂竹、宋豔芳、殷廣鈐、陳建樺、陳一銘、陳福榮、梁耕三

Mau-Tsu Tang, Yen-Fang Song, Gung-Chian Yin, Jian-Hua Chen, Yi-Ming Chen, Fu-Rong Chen, Keng S. Liang

X 光具有高穿透力，短波長，多種成像對比機制等特性，一直以來 X 光顯微術即被認為是偵測物質結構的利器。然而 X 光顯微鏡的發展則是在同步輻射光源被廣泛應用之後才逐漸實現。國家同步輻射研究中心之穿透式 X 光顯微術實驗站於 93 年 9 月完成建造，操作能量 8–11 keV，空間鑑別力 25–60 奈米，具備相位對比與三維斷層掃描能力，目前已完成試車與性能測試，已於 94 年春天開放國內外用戶申請使用。本文將簡介穿透式 X 光顯微術之光學原理，報導該實驗站之性能測試，並介紹目前在該實驗站進行之部分實驗課題。

Due to the nature of high penetration depth, short wavelength and various contrast mechanisms of X-rays, the X-ray microscopy has been long expected a powerful imaging tool. It is, however, until the invention of modern highly brilliant synchrotron light sources, the X-ray microscopy has become practical. The newly constructed advanced transmission hard X-ray microscope at National Synchrotron Radiation Research Center operational in energy 8–11 keV, provides three-dimensional images with spatial resolution 25–60 nm and with phase contrast capability for imaging light specimens. This article will introduce the optical principle of the X-ray microscopy. The performance of the NSRRC X-ray microscope will be presented in the article with examples.

一、前言

當德國的倫琴在 1895 年發現 X 光時，人們立即認識到 X 光的高穿透力將是作為醫學成像術 (radiology) 的大利器。百多年來，X 光在醫學上的應用，一直是醫生們作為醫療診斷最方便且無可取代的工具。另一方面，因為 X 光是電磁波的一種，波長只有可見光的五千到一萬分之一，將 X 光作為顯微鏡的光源，相較於可見光，將可大幅提

高所能檢測的空間鑑別力。然而 X 光顯微鏡的發展，相較於光學顯微鏡，或另一個現今被廣為應用的電子顯微鏡，則是遠遠落後的。主要原因是高亮度 X 光光源的發展遠落後於光學雷射與高亮度電子鎗的發明。其次，X 光光學元件，如聚焦鏡、放大鏡的發明則是近二十來才有長足的發展，主要可分為反射式、折射式、繞射式。本文所介紹的穿透式 X 光顯微鏡的主要光學元件是一組作為聚焦用的內反射式毛細管 (tapered capillary)，與作為放大用的

波帶片 (zone plate)，其工作原理將在後面介紹。

同步輻射光源的發明與應用是 X 光科學上的一件大事。同步輻射光源的光通量 (flux) 高於傳統 X 光機所產生的光源約萬倍，光亮度 (brilliance) 約百萬倍以上。同步輻射光源具水平偏振性 (polarization)，能量連續且可調。同步輻射光源雖然不是完全同調性 (coherent) 光源，但光源所提供的同調性足以使樣品產生足夠的相位對比 (phase contrast) 成像，對於如生物樣品等「輕」樣品至為重要。世界上專用同步輻射光源設施的建造約開始於 80 年代，我國的同步輻射光源設施則於 1993 出光並於次年開放用戶使用，目前一年有超過 4000 人次國內外用戶於該設施進行實驗。

X 光顯微鏡依據所使用的光學元件方式可約略區分為 (圖 1) 投影式 (projection)、掃描式 (scanning type) 及全場區式 (full-field type)⁽¹⁾。投影式 X 光顯微鏡基本上不需要光學元件，成像對比機制由樣品對於 X 光的吸收來決定，例如一般的醫學成像術 (radiology) 即屬於此類。投影式 X 光顯微鏡的空間鑑別力是由光源準直度、樣品厚度、顯像底片顆粒大小決定，一般來說，可以達到數個微米的空間鑑別力。投影式 X 光顯微鏡因為無需光學元件，成像與 X 光波長無關，所以可以使用白光快速成像，對於追蹤動態樣品變化的研究是很方便的。此外，X 光在樣品邊際因樣品厚薄變化所產生的折射率差，可以強化在樣品邊際的相位對比成像，相位對比對於如生物細胞或組織切片等的成像是重要的。(請參見本期「胡宇光：X 光相對比高解析度顯微術的原理及應用」)

掃描式 X 光顯微鏡是利用光學元件將光聚焦到近乎光學元件的繞射極限 (diffraction limit)，相對地掃描光源或樣品而成像。掃描式 X 光顯微鏡的成像對比機制可以是如投影式 X 光顯微鏡量取樣品對於 X 光的吸收，或可以量取樣品吸收 X 光之後所產生的螢光。樣品吸收 X 光後所產生的螢光光譜與組成樣品之元素的化學組態有關，所以掃描式 X 光顯微鏡可以量測樣品中特定元素及其化學態，配合同步輻射光源的能量可調性，掃描式 X 光顯微鏡亦可進一步發展成為掃描式 X 光光譜顯微鏡 (spectromicroscope)。掃描式 X 光顯微鏡的空

間鑑別力取決於光學元件的繞射極限，欲達到此極限，光源的同調性必須被保留住。此外，掃描式 X 光顯微鏡相對地掃描光源或樣品，因此成像時間相對其他兩類顯微鏡要長得許多，亦不易作三維立體成像。在同步輻射設施中所建造的掃描式 X 光顯微鏡通常是利用聚頻磁鐵 (undulator) 所產生的光源。

全場區式 X 光顯微鏡的工作原理與光學顯微鏡或穿透式電子顯微鏡類似，X 光經過聚焦鏡聚焦後投射於樣品，入射光經樣品吸收後由物鏡放大成像於二維面積偵檢器，全場區式 X 光顯微鏡的空

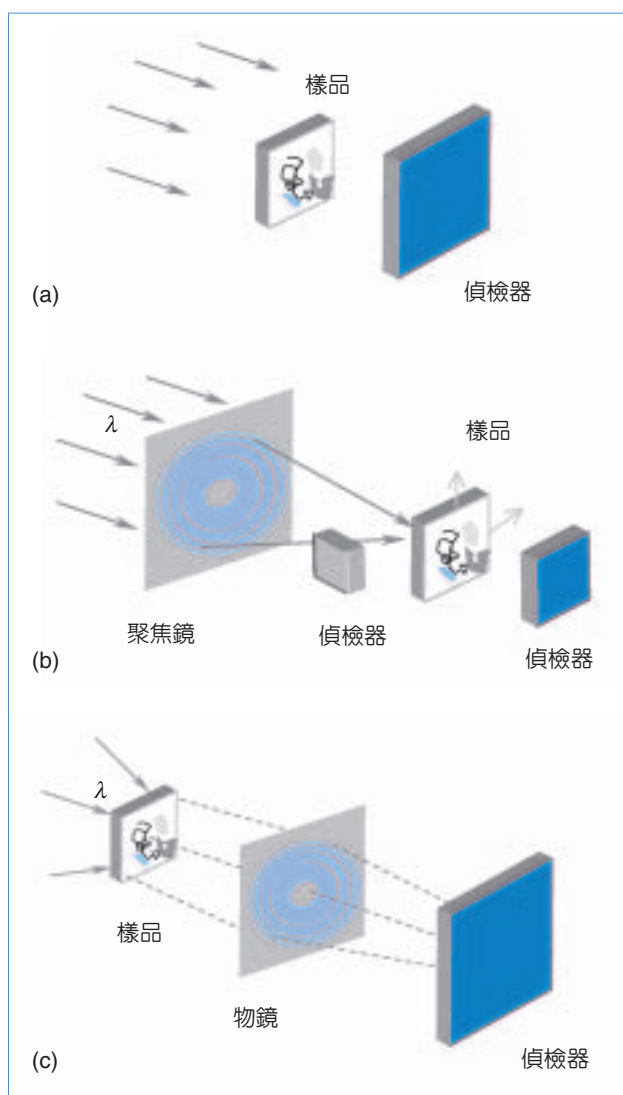


圖 1. 三種主要 X 光顯微鏡示意圖；(a) 投影式，(b) 掃描式，(c) 全場區式。

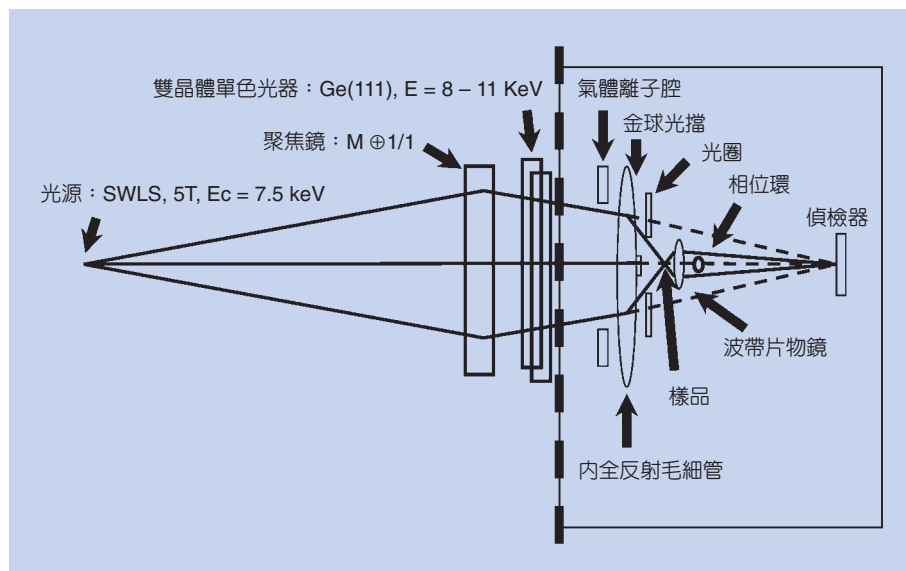


圖 2. 穿透式 X 光顯微鏡光學示意圖。

間鑑別力由物鏡決定，亦即物鏡的繞射極限。為方便起見，本文將全場區式 X 光顯微鏡稱為穿透式 X 光顯微鏡 (TXM) 類似光學顯微鏡，穿透式 X 光顯微鏡的成像並不需要光源同調性，在偵檢器上一次成像，成像時間短，配合同步輻射光源的能量可調性可以強化樣品中特定元素的成像。穿透式 X 光顯微鏡的樣品製備相較於電子顯微鏡簡單許多，樣品通常無需染色或脫水，樣品厚度可以厚至數十微米。穿透式 X 光顯微鏡是本文介紹的重點，我們將在後面章節更詳細地介紹其光學原理與所使用的元件。

二、光學原理與設計

圖 2 是在同步輻射研究中心所建造的穿透式 X 光顯微鏡的光學示意圖。顯微鏡所使用的光源是由一座不對稱三極超導移頻磁鐵 (superconducting wavelength shifter) 所產生。該磁鐵將 1.5 GeV 同步輻射加速器光譜的臨界能量由 2.14 keV 提昇至 7.5 keV。所產生的光通量，在 5–20 keV 間約達 5×10^{12} photons/s/0.1%bw⁽²⁾。超導移頻磁鐵所產生 X 光繼續被初級反射式曲面聚焦鏡 (focusing mirror) 聚焦於面積偵檢器，聚焦比例約為 1:1。聚焦鏡的下游是一座雙晶體單色光器 (double crystal monochromator) 選取 8–11 keV 的單色 X 光，能量鑑別力 (resolving power) 由所使用之完美鍺單晶決

定，約為 1000。半導體工業所常用的金屬元素 Cu、Zn、Ga、Ge、As、Ta、W、Au、Hg 及 Pb 等的特性吸收皆包含於此能量範圍內。

單色光進入實驗站後其光通量強度由一個離子腔 (ionization chamber) 擷取監視。X 光的次級聚焦是由一組石英毛細管所完成，該毛細管的內壁寬度由入口漸減至出口，入射的 X 光被該毛細管擷取並在管壁內產生一次全反射，而聚焦於樣品處，毛細管聚焦率約為十倍，毛細管出口處的金球與光圈組將入射光定義成圓錐型入射，避免直射光直接打在物鏡所造成的損壞。入射光經過樣品吸收散射後被一面波帶片所放大，波帶片是一種繞射元件，利用蝕刻技術作成，放大物像並且限制顯微鏡最後的空間鑑別力。根據波帶片成像原理⁽³⁾，當波帶片的數字鏡徑 (numerical aperture, NA) 遠小於 1 (在 X 光能量範圍內普遍符合的)，波帶片的放大公式與折射式光學透鏡相同，可以幾何光學公式計算。因此若將樣品置於波帶片一端聚焦處，可以相當程度放大物像。本顯微鏡所使用之波帶片焦距約 3 公分，物距約 132 公分，放大倍率約 44 倍。因為波帶片是顯微鏡的最重要光學元件，顯微鏡的設計皆因為波帶片的規格而逐一決定，我們將在後面章節再回來討論。

顯微鏡的偵檢系統由一片螢光板、20 倍光學放大鏡、電荷耦合偵檢器 (charge coupled device, CCD) 所組成。螢光板將由物鏡傳送過來的 X 光轉

換為可見光，光學放大鏡接收此可見光並且光學放大 20 倍。放大後的可見光由電荷耦合偵檢器記錄成數字資訊進入電腦等待處理。電荷耦合偵檢器由 1000×1000 個 pixel 所組成，每一個 pixel 大小為 $13 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$ 。配合波帶片所提供的 60 nm 最終空間鑑別力，偵檢器的取樣數 (sampling) 為 4。顯微鏡的最終放大倍率為 880 倍，在下文中將討論，當使用波帶片的高階繞射時，放大倍率可提高至 2640 倍。

波帶片是一組不同間隔的同心圓結構 (圖 3)，相鄰兩圈同心圓一為透光，一為不透光，同心圓的間隔隨著同心圓的半徑增加而減少，使得各透光圈所透過的光到達焦點處的光程差剛好為整數波長，亦即形成建設性干涉，光強度因而增加形成聚焦作用。波帶片的理論可參考相關文獻⁽³⁾，本文僅列出部分常用之公式以利討論。

$$\text{波帶半徑 } r_n = (nf\lambda)^{1/2} \quad (1)$$

$$\text{第 } m \text{ 階繞射空間鑑別力 } d_m = 1.22dr_n/m \quad (2)$$

$$\text{第 } m \text{ 階繞射焦距 } f_m = 2rdr_n/(m\lambda) \quad (3)$$

$$\text{數字鏡徑 } NA = m\lambda/(2dr_n) \quad (4)$$

$$\text{繞射效率 } \sim 1/(\pi m)^2 \quad (5)$$

其中，

n : 波帶碼 (zone index)，透光與不透光之圈數和

λ : 入射光波長

m : 第 m 階繞射， m 為奇數

dr_n : 最外圈波帶間寬

由以上波帶片公式可知，空間鑑別力完全由波帶片最外圈波帶間寬 dr_n 與繞射階數 m 所決定。因此，欲達到高空間鑑別力，必須使用小的 dr_n ，或高階繞射。同步輻射中心之 X 光顯微鏡所使用之波帶片，其 dr_n 為 50 nm，所以在第一階繞射下可提供 60 nm 之空間鑑別力，當使用第三階繞射時，空間鑑別力更可提高至 20 nm。本顯微鏡是目前世界上唯一成功將波帶片操作在第三階繞射者。值得注意的是，當波帶片操作在高階繞射時，波帶片的繞射效率亦相對成平方反比減少，因此第三階繞射

雖然增加空間鑑別力三倍，但曝光時間因此增加約十倍。其次，因為波帶片為繞射式光學元件，其焦距、數字鏡徑皆與光波長直接相關，為大致保持物距與像距的比例，因此在顯微鏡實際設計上使用了六個波帶片，三個一組作為第一階繞射與第三繞射之用，以涵蓋 8–11 keV 的能量範圍。

X 光與物質的反應給了 X 光顯微鏡的成像對比機制。X 光與物質的反應可以以物質在 X 光波段的複數折射率 (complex refractive index) 表示，

$$n(\lambda) = 1 - \delta(\lambda) - i\beta(\lambda) \quad (6)$$

其中， $\beta(\lambda)$ 代表物質對 X 光的吸收， $\delta(\lambda)$ 代表 X 光經過物質後所產生的相位移 (phase shift)，此二者皆與入射光波長以及物質原子序有關。在尋常吸收狀況下， $\beta(\lambda)$ 與波長三次方成正比， $\delta(\lambda)$ 與波長一次方成正比或幾乎不變，因此利用物質對 X 光吸收所產生的成像對比因短波長而快速變差，而相位移變化相對小得多。此外，「輕」元素對 X 光的吸收亦較「重」元素為弱，與原子序平方約成正比，因此「輕」元素在 X 光顯微鏡下幾乎透明。如果顯微鏡可以記錄下 $\delta(\lambda)$ ，則可克服此困境。一般 X 光顯微鏡無法記錄 X 光經過物質後所產生的相位移。本顯微鏡利用光學顯微鏡常用的 Zernike 相位對比成像法，可以記錄 X 光經過物質後所產生的相位移，因此對於「輕」的樣品，如生

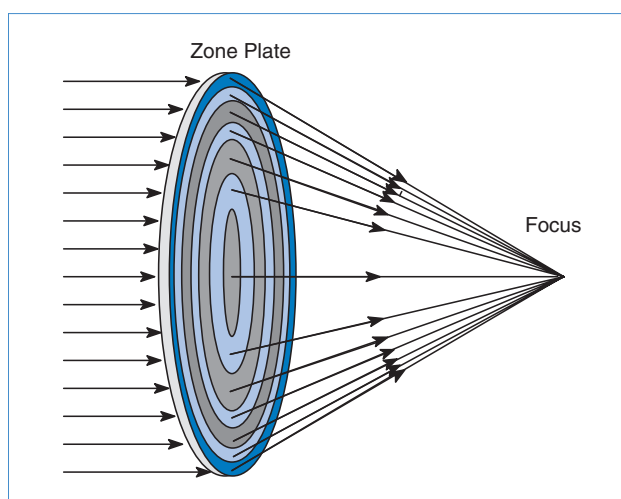


圖 3. 波帶片示意圖。

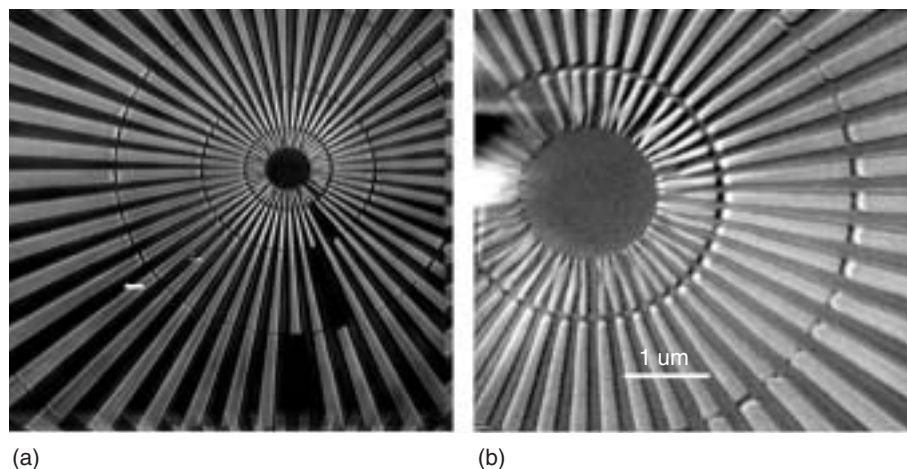


圖 4. 空間鑑別力測試。(a) 第一階繞射，(b) 第三階繞射。

物樣品或組織切片等，可以依此對比而成像。實際作法是在作為物鏡的波帶片的背聚焦平面 (back focal plane) 放置一個金環⁽⁴⁾，其大小與入射光的大小相同，而金環厚度恰恰使透過金環的直射 X 光有一個 90° 或 -90° 相位移，此相位移與樣品產生的散射光同調干涉後將因此記錄下 X 光經過物質後所產生的相位移，亦即相位對比。 $\delta(\lambda)$ 與 $\beta(\lambda)$ 的比值通常被用來評估相位對比的重要性，例如在能量 8–11 keV 之間，對於銅元素，此值為 10–15，而在相同能量區間，對於塑膠，其值約為 500。

X 光顯微鏡的三維成像與醫院的電腦斷層掃描術 (computed tomography) 原理完全相同⁽⁵⁾。顯微鏡上的樣品可以繞垂直入射光光軸作大角度旋轉，偵檢系統記錄下各個角度的影像，因此記錄下光路徑上物質吸收的總和，當旋轉樣品時，樣品不同位置之單元進或出光路徑，因此給了不同的成像。原理上，若所收集的成像足夠，亦即足夠大的角度範圍與足夠小的角度差，利用傅立葉合成法 (Fourier synthesis) 將可重建電腦三維立體影像。

三、顯微鏡性能測試

顯微鏡的建造與安裝於 93 年 9 月完成，顯微鏡的性能測試於焉展開。我們利用了數個設計的元件進行性能測試，包括一個內線寬 50 奈米的金質輪狀圖樣 (gold spoke pattern) 用以測試顯微鏡的空間鑑別力與電腦三維立體影像，一個作為波帶片模板的塑膠 (PMMA) 波帶片用以測試相位對比成像。此外，我們亦測試數個真實樣品，部分結果將

於本節中概述。

空間鑑別力的測試是使用一個金質輪狀圖樣，內線寬 50 奈米，厚度 800 奈米。圖 4(a) 所示為其成像。X 光能量 8 keV，波帶片操作在第一階繞射，吸收對比成像，曝光時間 15 秒。圖中 50 nm 的線寬清晰可見，代表顯微鏡之空間鑑別力已達到設計值的 60 nm，部分內圈不夠清晰是因為樣品在放置過程中被人為誤觸所損壞。圖 4(b) 則是同樣樣品但使波帶片操作在第三階繞射，內圈的線條更加清晰，人為誤觸所損壞的部分線條亦非常清晰可見。進一步利用 MTF (modulation transfer function) 法分析後發現，圖 4(b) 的空間鑑別力約達 25 nm，與理論的 20 nm 極為相近，誤差來源判斷為儀器振動所產生的 (約 7 nm)。值得注意的是，此成像曝光時間約 10 分鐘。

同一個樣品被用來測試三維立體影像。圖 5 是重建後的三維影像的一個角度。轉動角度 $\pm 70^\circ$ ，角度間隔 1° ，能量 8 keV，曝光時間 30 秒/張，

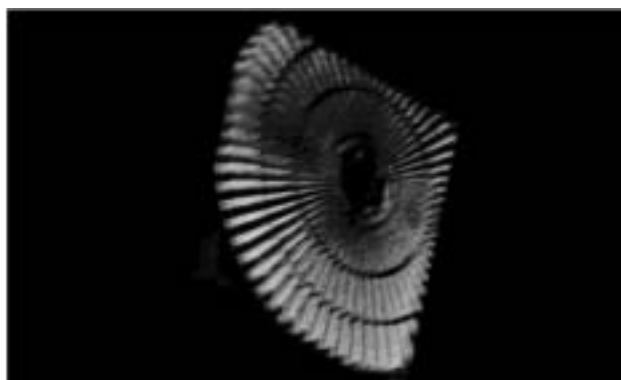


圖 5. 金質輪狀圖樣重建後的三維立體影像。

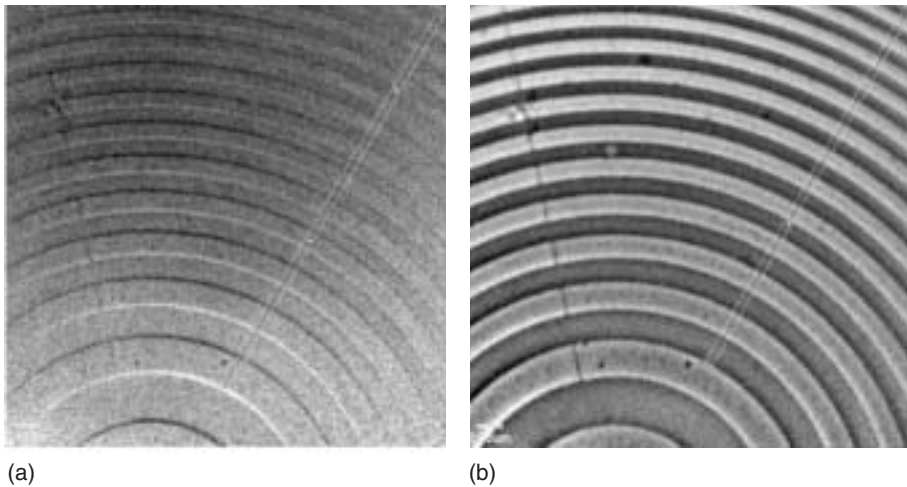


圖 6.
塑膠波帶片的相位對比成像。
(a) 未啟動相位對比成像，(b)
啟動相位對比成像。

吸收對比成像。影像中 50 nm 的內線仍清晰可見，估計空間鑑別力應為 $60 \text{ nm} \times 60 \text{ nm} \times 80 \text{ nm}$ 。

圖 6 是利用塑膠 (PMMA) 波帶片所做的相位對比成像測試。塑膠波帶片厚約 $1 \mu\text{m}$ ，在 8 keV 的 X 光之下，除在邊際所產生的邊際加強效應外，應幾近透明。圖 6(a) 是未啟動相位對比成像，圖 6(b) 是啟動相位對比成像。兩圖之差別清晰可見，啟動相位對比成像後，圖 6(b) 波帶片上的細部裂痕亦可肉眼得見。進一步數值分析發現，圖 6(b) 之成像對比約為 15%，圖 6(a) 未啟動相位對比成像者則少於 1%。

在顯微鏡試車期間，我們亦測試數個不同來源的樣品，包括 IC 元件的非破壞檢測、氧化鋁奈米管道、子宮頸癌細胞、蝴蝶翅膀鱗片的光子晶體結構分析、地震岩塊錯排分析等。限於篇幅，本文將只介紹 IC 元件的非破壞檢測、蝴蝶翅膀鱗片的光子晶體結構分析的部分結果。

圖 7 顯示連接多層架構的鎢插銷 (tungsten plug) 製作過程所常見的缺陷，在半導體 IC 工業的所謂 key-hole 缺陷。此缺陷將減低插銷的導電性，嚴重時會令元件停止工作，是半導體 IC 工業製程上經常必須面對的問題。圖 7 的成像是掃描鎢的特性能量吸收邊，並相減吸收邊兩端的成像以加強鎢元素成像。圖中所示的 key-hole 約 150 nm。

圖 8(a) 所示是台灣野外常見的烏鴉鳳蝶翅膀鱗片的二維成像。鱗片在可見光下原呈現紅色。鱗片在 X 光顯微鏡下呈現網絡結構。蝴蝶翅膀鱗片的結構據信與其所反射的光波長有關，是自然界所

形成的光子晶體。X 光顯微鏡相較於光學顯微鏡可以提供更高的空間鑑別力，相較於電子顯微鏡則可以提供三維立體影像，此外因為鱗片的化學組成為蛋白質以及部分幾丁質，在一般的 X 光顯微鏡下幾近透明，本顯微鏡的相位對比成像則可以清晰地得到鱗片結構，圖 8(b) 則是鱗片重建後的三維立體影像。

四、未來的發展

在同步輻射中心所建造的奈米級穿透式 X 光顯微鏡目前已完成大部分試車工作，即將於 94 年春天開放國內外用戶使用。該顯微鏡的 25–60 奈

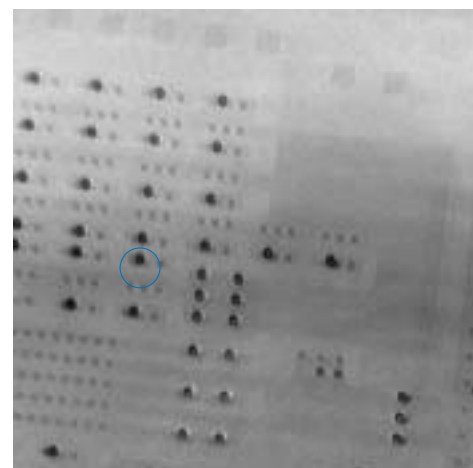


圖 7. 紅圈所示為多層 IC 架構的鎢插銷 (tungsten plug) key-hole 缺陷。缺陷大小約 150 奈米。

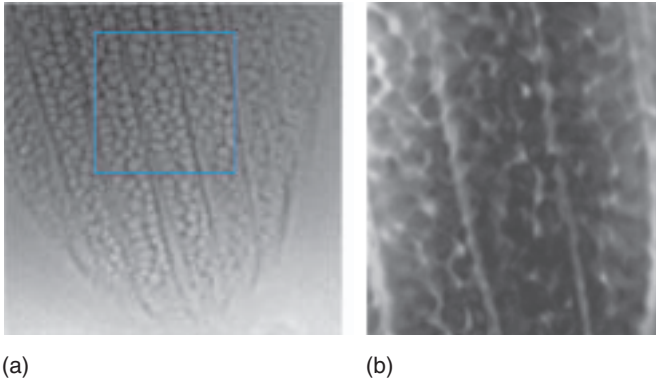


圖 8. 烏鴉鳳蝶翅膀鱗片的二維成像 (a)，與三維重建後之影像 (b)。

米的空間鑑別力在高能量 8–11 keV 波段目前是世界上最佳的成果，該顯微鏡所提供的相位對比成像與三維立體成像則是穿透式 X 光顯微鏡發展的主流。本顯微鏡未來在硬體發展上有幾個方向。其一，操作能量向低能量延伸以涵蓋生物與地質研究上極為重要的鐵元素。其二，評估架構快速降溫設備，以減少 X 光對於生物樣品的輻射破壞。其三，改善雙晶單色光器的能量解析力，以對特定元素進行立體光譜顯微分析。軟體發展目前有兩個方向。其一，利用相位相關函數 (phase correlation function, PCF) 校正當轉動樣品時所產生的機械位移，這部分工作是重要的，因為不良的樣品校正類似樣品失焦，將使重建後的影像解析力大幅下降。我們應用 PCF 來校正影像位移，已有良好成果。其二，我們在顯微鏡除了現有的 Zernike 相位對比成像之外，亦借用電子顯微鏡上所發展的強度傳播方程式 (transport intensity equation)⁽⁶⁾，利用在數個不同散焦位置所得的影像重建樣品的相位，目前已有初步結果。

參考文獻

1. C. G. Schroer *et al*, *MRS Bulletin*, 157-165 (2004), and references therein.
2. Y. F. Song, *et al*, *SRI* (2003).
3. D. Attwood, *Soft X-Rays and Extreme Ultraviolet Radiation: Principles and Applications*, Chapter 9, Cambridge University Press (1999).
4. G. Schneider, *Ultramicroscopy*, **75**, 85 (1998).
5. D. Weiss *et al*, *Ultramicroscopy*, **84**, 185 (2000).
6. W.-K. Hsieh *et al*, *Ultramicroscopy*, **98**, 99 (2004).

- 湯茂竹先生為國立清華大學物理博士，現任國家同步輻射研究中心研究員。
- 宋豔芳小姐為國立台灣師範大學物理博士，現任國家同步輻射研究中心副研究員。
- 殷廣鈞先生為國立交通大學光電碩士，現任國家同步輻射研究中心研究助理。
- 陳建樺先生為國立陽明大學生醫光電碩士，現任國家同步輻射研究中心專案助理研究員。
- 陳一銘先生為國立清華大學工程與系統科學碩士，現任國家同步輻射研究中心專案助理研究員。
- 陳福榮先生為美國紐約州立大學石溪分校材料博士，現任國立清華大學工程與系統科學系教授暨國家同步輻射研究中心合聘研究員。
- 梁耕三先生為美國史丹福大學電機博士，現任國家同步輻射研究中心副主任。
- Mau-Tsu Tang received his Ph.D. in physics from National Tsing-Hua University. He is currently a research scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Yen-Fang Song received her Ph.D. in physics from National Taiwan Normal University. She is currently an associate research scientist of National Synchrotron Radiation Research Center.
- Gung-Chian Yin received his M.S. in photonic from National Chiao-Tung University. He is currently a research assistant at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Jian-Hua Chen received his M.S. in bio-photonic from National Yang-Ming University. He is currently a project assistant research scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Yi-Ming Chen received his M.S. in engineering and system science from National Tsing-Hua University. He is currently a project assistant research scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Fu-Rong Chen received his Ph.D. in materials science from the State University of New York at Stony-Brook, USA. He is currently a professor in the Department of Engineering and System Science at National Tsing-Hua University, and a joint research scientist at National Synchrotron Radiation Research Center.
- Keng S. Liang received his Ph.D. in electric engineering from Stanford University, USA. He is currently deputy director at National Synchrotron Radiation Research Center.