

K-kit—應用於奈米溶液原位電子顯微鏡分析的創新微晶片

The K-kit Innovative Microchip for *in-situ* Electron Microscopy of Nanofluids

陳弘仁

Hung-Jen Chen

隨著奈米溶液應用擴展，全球對液態奈米產品的檢測標準日趨嚴格，要求精確分析溶液中奈米粒子的形貌與分佈。近年來穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM) 在液態原位分析方面已取得進展，特別是微型液池矽晶片技術。本文介紹一款創新的微型液池晶片「K-kit」，其可利用毛細力快速載入溶液，適用各種 TEM 設備，並可透過濕式負染提升奈米粒子影像對比度。K-kit 具備多項獨特產品優勢，已廣泛應用於學術研究及電子、化工、醫藥、食品等產業領域的奈米溶液分析。

With the expanding applications of nanofluids, global standards for the analysis of liquid-phase nanoproductions are becoming increasingly stringent, requiring precise characterization of nanoparticle morphology and distribution in solution. In recent years, transmission electron microscopy (TEM) has made significant advancements in *in-situ* liquid analysis, particularly with the development of microfluidic silicon chip technology. This article introduces an innovative microfluidic chip, “K-kit,” which uses capillary forces to quickly load the solution, is compatible with various brands of TEM equipment, and enhances nanoparticle image contrast through wet negative staining. K-kit offers several unique advantages and has been widely applied in academic research as well as industries such as electronics, chemical engineering, pharmaceuticals, and food etc.

一、奈米溶液的分析需求與挑戰

奈米溶液的應用已深入日常生活，隨著奈米科技發展，歐美各國近期也陸續推動液態奈米產品的標示與審查法規，強調需對最終產品的物理化學特性進行全面分析。特別是在液態環境下，對奈米添加物的成份種類、尺寸形狀、粒子濃度、粒徑分佈及群聚團聚等關鍵特性進行評估，以確保產品的安全性與穩定性。

國際標準組織 ISO 於 2012 年 5 月發布 ISO/TR 13014:2012《奈米技術－毒理評估所需

的人造奈米材料物理化學特性分析指引》(Nanotechnologies - Guidance on Physico-chemical Characterization of Engineered Nanoscale Materials for Toxicologic Assessment)，強調在進行毒理學評估前，必須先完成物理化學特性分析，以建立奈米材料與測試結果之間的相關性。如圖 1 所示，該標準列出了八項關鍵的奈米檢測參數。這些參數對於評估奈米材料的安全性、環境影響及產品應用至關重要。此外，ISO/TR 13014:2012 亦提供一套標準化測試方法，幫助研究機構與企業建立一致的奈米材料評估流程。

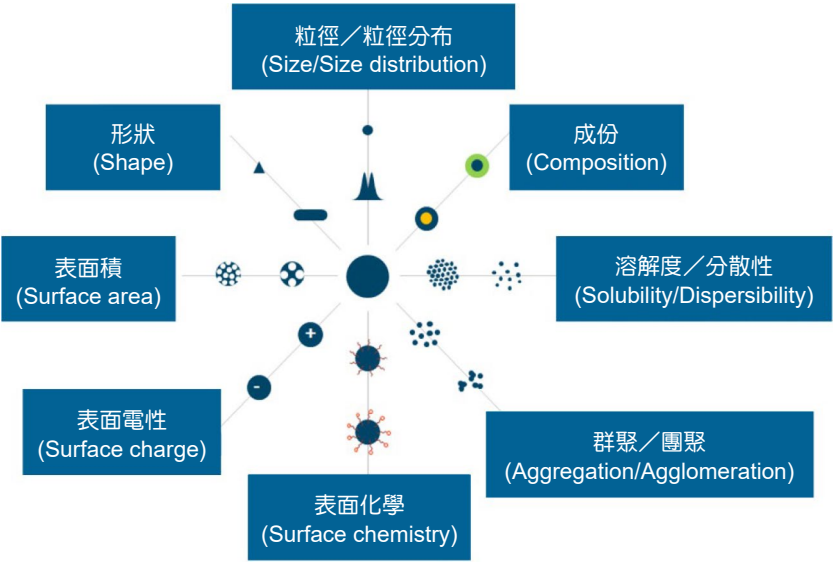


圖 1. ISO/TR13014 規範 8 項重要奈米檢測參數 (2012 年版)。

奈米材料的分析方法如表 1 所列，多數項目已可透過市售儀器進行檢測，唯有奈米溶液分析技術仍面臨諸多挑戰。尤其對於「形狀」、「粒徑／粒徑分布」、「群聚／團聚」及「溶解度／分散性」4 項檢測參數，需要獲取粒子於溶液中的實際影像資訊，才能確保分析結果的準確性。為滿足奈米產業的檢測需求，若能利用電子顯微鏡於微觀尺度下直接觀測溶液內奈米粒子，將有助於獲得產品成份與特性最真實的影像資訊。

表 1. 常見的奈米材料分析方法。

檢測參數	檢測方法
成份	SEM/EDS, TEM/EDS, XRD, ICP-MS, ICP-OES, TGA, XPS, AES, Raman, etc.
粒徑／粒徑分布	DLS, SPM, SEC, SEM/TEM, <u>Liquid-TEM</u> , etc.
形狀	SEM, SPM, <u>Liquid-TEM</u> etc.
群聚／團聚	Cryo-SEM, Cryo-TEM, CLS, <u>Liquid-TEM</u> , etc.
溶解度／分散性	ICP-MS, <u>Liquid-TEM</u> , etc.
表面電性	PI, IEP, ELS, Electrophoresis etc.
表面化學	XPS, XRD, AES, SAM, SIMS, EDS, EELS, Raman, etc.
表面積	BET, TGA, DLS, SEM/TEM, etc.

穿透式電子顯微鏡長久以來一直是探索材料結構的關鍵技術。近幾十年來，該技術經歷了多次突破性發展，例如像差校正 (aberration correction) 技術實現了原子級尺度成像、冷凍電鏡 (Cryo-TEM) 技術為生物樣品提供了高解析度影像觀察，以及各種創新的 TEM 結構設計，使得動態系統的原位 (*in-situ*) 分析成為可能。近年來，基於矽晶片應用架構的原位技術迅速發展，使得模擬真實環境條件下材料和生物樣品的動態變化觀察實驗，能夠在 TEM 腔體內之高真空環境下進行。其中，最受關注的技術之一是利用矽晶片封裝液體，實現在 TEM 內進行奈米尺度的液相動力學觀察⁽¹⁾。透過液態原位 TEM (*in-situ* liquid TEM) 成像觀察液相反應，研究人員得以深入探究電化學過程、抗菌與病理機制、生物細胞行為等重要領域的基礎原理。

二、液態原位電子顯微鏡技術演進

原位電子顯微鏡 (*in-situ* electron microscopy) 技術的發展，突破了傳統電子顯微鏡僅能在高真空環境中運行的限制。早在 1950 至 1960 年代，學者們便開始探索在受控氣體環境下進行電子顯微鏡觀察，並發現這些氣體環境技術有效減少了電子束對樣品的損害。其中 Heide (1962)⁽²⁾ 的相關研究，為後來液態環境下的電子顯微鏡觀察奠定了重要基礎。然而，此類直接修改設備結構、將流體管路建置於 TEM 真空腔體內的作法，不僅成本高昂、清潔維修困難，還存在溶液洩漏之風險。而受限於傳統機械加工精度限制，也難以獲得高解析度的奈米粒子影像 (液層較厚)。

在 1990 年代，液態池 (liquid cell, LC) 的技術問世。這項技術利用強韌的薄膜材料 (如氮化矽 SiN) 來封裝溶液樣品，使其在電子顯微鏡中能夠保持液態，同時又不會影響電子束的穿透。隨著精密加工技術進步，隨後也逐漸發展出可實現動態觀察、功能更強大的液態流動池 (liquid flow cell, LFC)。這項技術的核心在於利用特殊設計的 TEM 樣品桿 (TEM holder)，其內部整合了流道系統。在該樣品桿前端，透過精密鎖合兩片矽晶片、金屬蓋板及密封環等元件，形成一個具備液體流動能力的液池觀察窗口，使得研究者能夠實現奈米尺度液體樣品的動態變化觀察。目前，奧克里奇國家實驗室 (Oak Ridge National Laboratory, ORNL) 和美國國家電子顯微鏡實驗室 (National Center for Electron Microscopy, NCEM) 在此研究領域處於領先地位，並積極支持多家 TEM 原位樣品桿 (*in-situ* TEM holder) 商業設計公司，如 Hummingbird Scientific⁽¹⁷⁾ 和 Protochips⁽¹⁸⁾，推動實際產品的開發與銷售。此外，荷蘭 DENSsolutions、及瑞典 Nanofactory 等公司也已進入市場，成為該領域的重要競爭者。

由於半導體製程與精密加工技術的進步，現今液態原位 TEM 樣品桿 (*in-situ* liquid TEM holder) 產品已多能支援液體流動、加熱、通電等功能，研究人員可在電子顯微鏡內操控液體環境，實現連續反應觀測，從而推動奈米材料成長、觸媒催化與電化學反應等研究。圖 2 為 Protochips 公司推出的液態原位 TEM 樣品桿產品及其配件。然而，此類原位觀測技術通常須依賴特定廠商提供的樣品桿，並須搭配使用專屬設計之矽晶片，導致設備相容性受限、並且成本高昂。此外，樣品桿的組裝、測漏、前處理及清潔等過程也相當繁瑣，單次觀測往往需要花費數小時以上。因此，目前液態原位 TEM 樣品桿產品的應用，主要仍集中在學術研究領域，難以滿足產業界對於高效率、低成本、大量分析樣品之檢測需求。

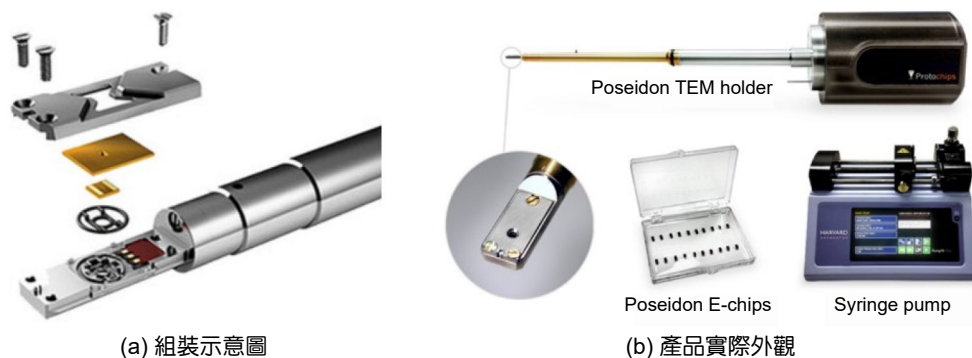


圖 2. 美國 Protochips 公司的液態原位 TEM 樣品桿產品 (圖片來源：⁽¹⁸⁾)。

2016 年，國內知名半導體檢測大廠閎康科技 (Materials Analysis Technology Inc.) 基於獨家專利技術，研發出單體式微型液態池晶片「K-kit」，為奈米溶液樣品的 TEM 影像分析帶來創新突破⁽¹⁶⁾。如圖 3 所示，K-kit 採用通用尺寸 3 mm 外徑的 TEM 標準銅環作為承載平台，具備高度相容性，可直接適用於 Hitachi、FEI、JEOL 等各大品牌之電子顯微鏡設備，無需額外添購昂貴的液態原位 TEM 樣品桿。此外，其單體式結構設計大幅簡化了樣品製備流程，使操作更加快速便利，同時也降低檢測成本。圖 4 展示了 K-kit 對於不同奈米溶液的電子顯微鏡影像觀測結果。憑藉其高適用性、便利性與經濟性，K-kit 不僅能夠滿足學術研究之分析需求，也為產業界提供實用的液態奈米材料檢測方案。

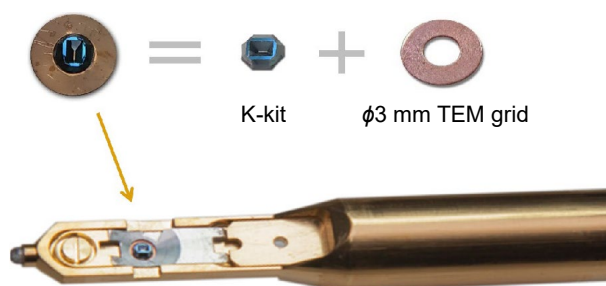


圖 3. K-kit 採用 TEM 標準銅環承載，可適用於各廠牌的 TEM 設備進行觀測。

三、奈米溶液分析的新利器 K-kit

3.1 K-kit 結構原理

K-kit 晶片採用微機電系統 (micro electro mechanical systems, MEMS) 技術製作，其結構由兩片對稱設計的矽晶片上下對準後，經高溫接合與濕蝕刻等製程形成。圖 5 是完成製造的 K-kit 晶圓外觀及單顆 K-kit 晶片之掃描式電子顯微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 影像。如圖 6 所示，K-kit 內部中央設有一微型儲液通道，並可通過該通道兩端的開口載入及密封溶液。K-kit 本體結構的上下兩面各設置有一凹槽，該凹槽底部具有一個由奈米厚度的氮化矽 (Si_3N_4) 薄膜所組成之液池觀測窗，能允許電子顯微鏡的電子束穿透並成像。K-kit 結構本體由堅硬的矽晶材料製成，並且氮化矽薄膜也具有高強韌性，此使得 K-kit 晶片不僅能

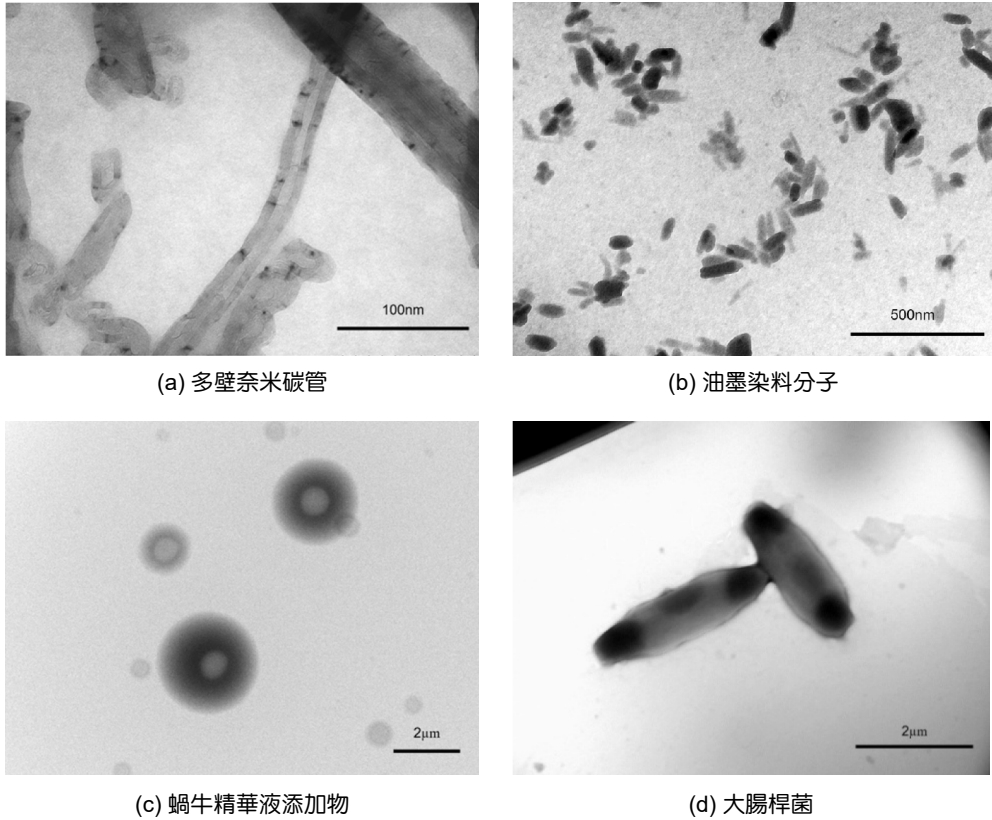


圖 4. K-kit 對於各類奈米溶液樣品的電子顯微鏡影像觀測結果。

夠承受極大之真空環境壓力變化，還能搭配應用具備加熱或冷卻功能的 TEM 樣品桿，進行液態樣品在變溫條件下之原位觀測 (建議操作溫度範圍為 -196°C 至 120°C)。

K-kit 是一款已在市場上銷售多年的液態原位電子顯微鏡影像分析產品，可透過全球超過 20 家知名電子顯微鏡耗材通路商購入使用。如圖 7 所示，K-kit 晶粒的尺寸為 $1.7\text{ mm} \times 1.4\text{ mm} \times 0.8\text{ mm}$ ，上下表面凹槽內的觀測窗尺寸為 $300\text{ }\mu\text{m} \times 25\text{ }\mu\text{m}$ 。本體結構左右兩端的

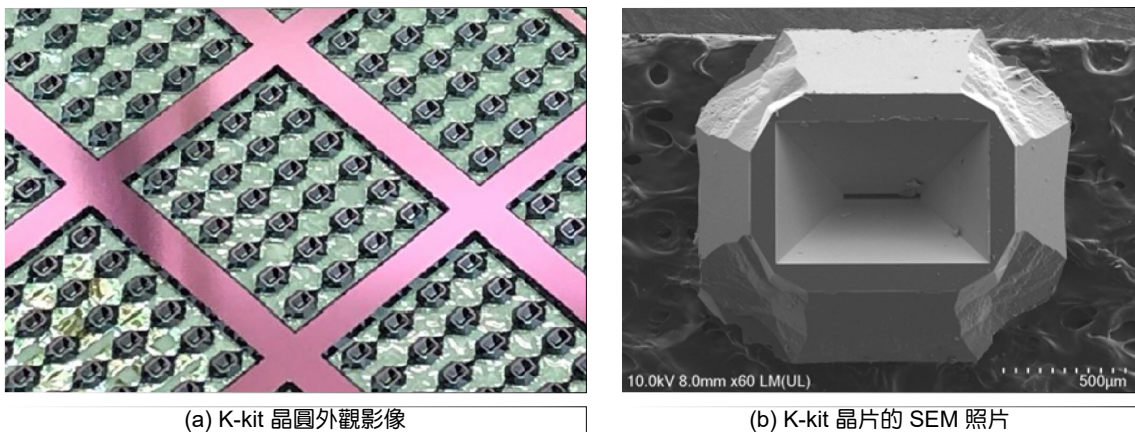


圖 5. K-kit 晶圓及單顆 K-kit 晶片之結構外觀。

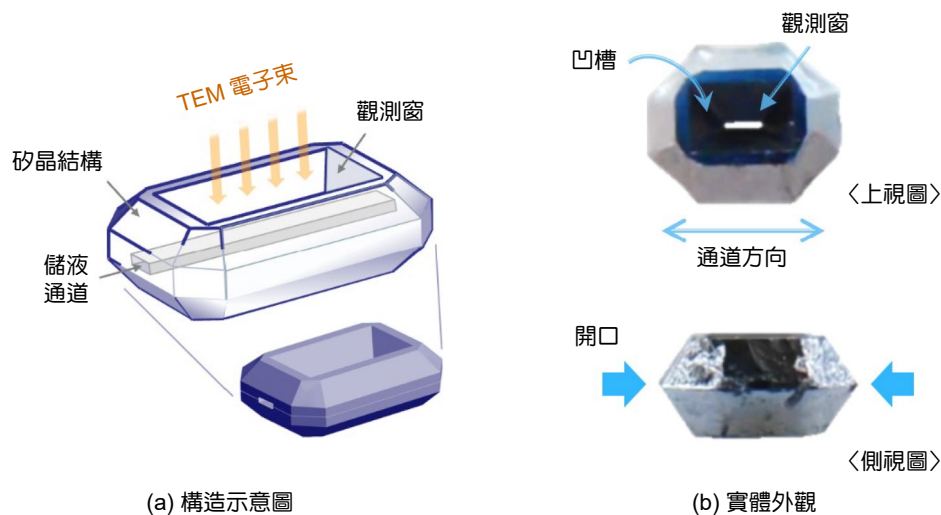


圖 6. K-kit 晶片的結構 (圖片來源：⁽¹⁶⁾)

微通道開口尺寸決定了可載入奈米粒子之大小，因此為滿足不同樣品的觀測需求，K-kit 產品提供了 6 種通道高度選項，分別為 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 $0.2\ \mu\text{m}$ 、 $0.5\ \mu\text{m}$ 、 $1\ \mu\text{m}$ 、 $2\ \mu\text{m}$ 及 $5\ \mu\text{m}$ 。此外，其觀測窗的氮化矽薄膜厚度，亦提供 $30\ \text{nm}$ 和 $100\ \text{nm}$ 兩種選擇。

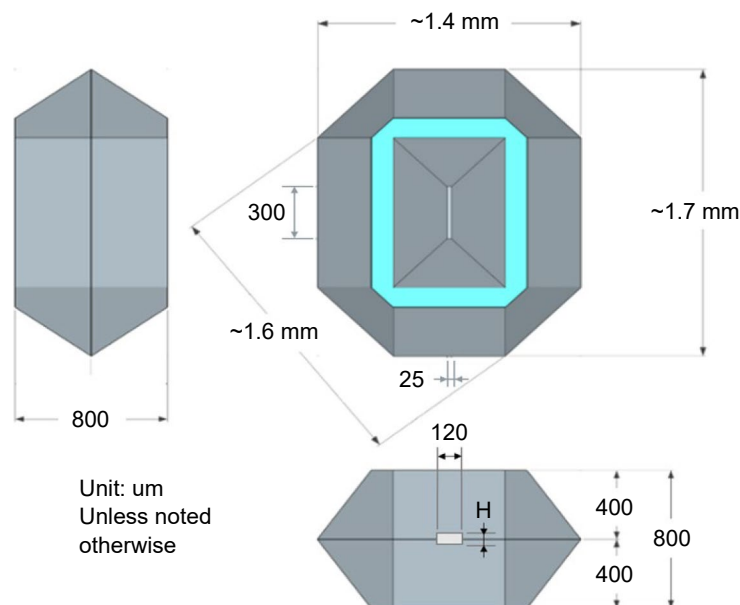


圖 7. K-kit 晶片尺寸。

如圖 8 所示，為了便利 K-kit 晶片的樣品製備操作，閎康科技也設計了一套專屬的 K-kit 工具盒，藉以提高使用者樣品製備之速度與可靠性。目前 K-kit 的出貨包裝盒有兩款，分別為四顆裝與六顆裝。另外，每顆 K-kit 在出貨時都配置一個基座 (carrier)，並以一透明塑膠蓋密封保護。而該基座底部內已預置一個 TEM 標準銅環，卸除底板後可取出使用。



圖 8. K-kit 工具盒與出貨包裝。

3.2 樣品製備流程

K-kit 的樣品製備方法十分簡單，如圖 9 所示。通常全新的 K-kit 兩端各有一密封塊，以維持微通道內的真空狀態，確保其內表面高度潔淨、藉以提升溶液載入效果。使用時，需先使用鑷子或通道開啟裝置 (channel opener) 移除密封塊，然後將微通道任一端開口輕觸液滴表面，使奈米溶液經毛細力作用 (capillary action) 吸入微通道內。溶液載入之後，接續進行兩端塗膠密封與承載銅環的黏貼。待膠材固化後 (建議可放置於簡易真空設備中加速乾燥)，即可將 K-kit 樣品裝載至 TEM 樣品桿上進行觀察。整個樣品製備過程約 30 分鐘即可完成。

K-kit 晶片的單體式結構設計，展現出相較於原位液態 TEM 樣品桿之獨特優勢。憑藉一體成型的設計，K-kit 能自適應溶液載入量，無需特別控制樣品液滴大小。此外，K-kit 內部極小的儲液通道可產生強大毛細作用力，即使是高黏性或油性樣品，通常也可直接加載，無需額外稀釋 (經過實測，即使黏滯係數超過 3,000 mPa·s 之溶液也可以順利載入)。此種設計確保了溶液載入的穩定性與可靠性，也大幅提升操作之便利性。

對於微通道開口的密封，建議可使用知名品牌 Torr-seal 真空膠。Torr-Seal 是一種環氧樹脂 (epoxy) 型真空密封膠，具有優異的密封性能，固化後不會釋放揮發性物質，因此適合於高真空環境使用。再者，該膠材穩定性高，且與多數化學溶液不反應，因此在密封時即使與 K-kit 內樣品溶液接觸，也不易產生污染，確保實驗觀察結果之可靠性。

K-kit 本體結構採用具抗酸鹼性的矽晶材料製成，並搭配對多數化學溶液具高穩定性的 Torr Seal 密封膠，因此能廣泛應用於各種常見化學溶液之觀測與分析。表 2 是將 Torr Seal 膠材浸泡於各類化學溶液 24 小時後，所進行的 FTIR 檢測分析 (判斷是否有成份溶解) 以及目視觀察結果 (評估膠材是否在溶液中擴散)。經長時間浸泡測試後，大多數溶液中皆未發

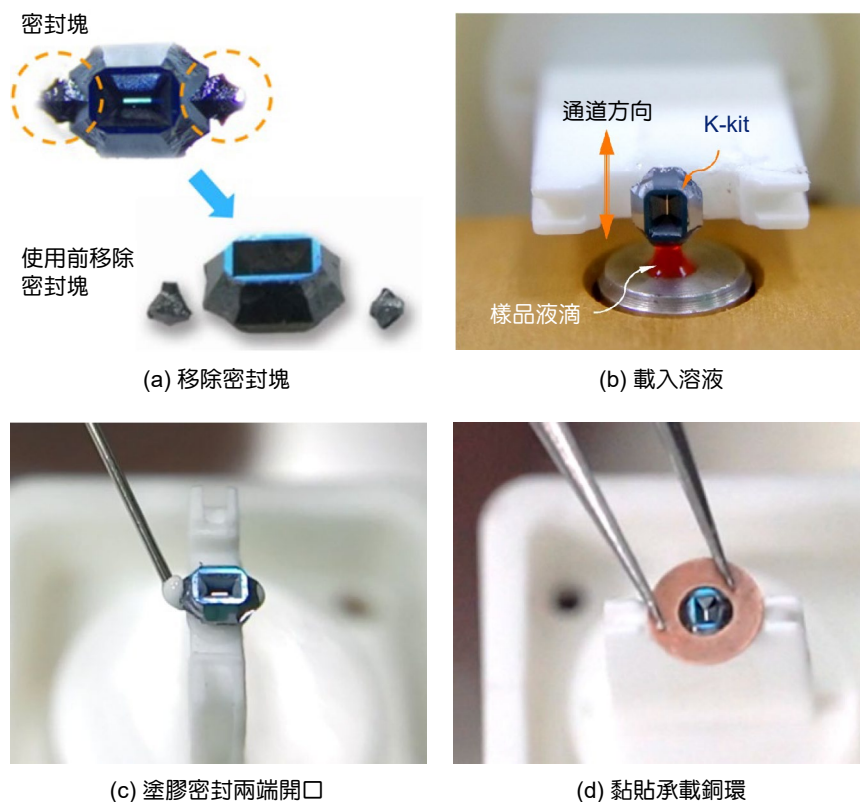


圖 9. K-kit 的樣品製備步驟。

現 Torr Seal 膠材有溶解或散佈現象。僅有少數溶液的 FTIR 檢測結果顯示膠材成份有微量溶出。然而，即便如此，Torr Seal 對這些特定溶液仍展現了良好的耐受性，可在短時間內（約數小時內）用於 K-kit 的密封操作，並順利完成影像觀測。

表 2. Torr Seal 膠材浸泡於各類化學溶液的測試結果⁽¹⁶⁾。

✓- Compatible (FTIR not detected) ▲-Use with care (FTIR detected)

Compatibility (FTIR)	Water	PEG400	DMSO	Ethanol	0.1N HCl	0.1N KOH
	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Toluene	NMP	ACN (CH ₃ CN)	Chloroform (CHCl ₃)	1% NH ₄ OH	0.1N HNO ₃
	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Hexane	IPA	Methanol	DCM	THF	Acetone
	✓	✓	✓	▲	▲	▲

在實際應用中，只要樣品溶液不與 Torr Seal 發生化學反應，即可使用 K-kit 進行影像觀測。根據實測經驗，即使是未經稀釋的強酸（如 pH 約為 1 的硫酸）或強鹼（如 pH 約為 12 的氨水）等溶液，亦可穩定封裝於 K-kit 中進行觀察。然而，於製備含強酸或強鹼樣品的過程中，仍須特別留意操作風險，確實穿戴適當的個人防護裝備，以確保使用人員安全無虞。

另外，為提升 K-kit 樣品製備效率，並避免因銅環與晶片黏附不良而在夾取過程中脫落，閎康科技運用專利技術開發出一款便利使用的 K-kit 開合式銅網 (K-kit folding grid)，如圖 10 所示。該銅網採用 MEMS 技術製造，具可摺疊設計，能精準對合上下兩半部結構。每一半部中央皆設置有凹槽，用於固定承載 K-kit 晶片，且凹槽底部具備中央開孔設計，當上下結構蓋合後，可供 TEM 電子束穿透，實現成像觀測。

原本 K-kit 的樣品製備須透過塗膠將其固定於 TEM 銅網，此作法不僅膠材固化需時較長，且塗膠過程若稍有不慎，可能導致膠材流入 K-kit 視窗內，造成氮化矽薄膜受到污染。透過該專用銅網的導入，不僅能顯著提升 K-kit 之使用便利性與樣品製備速度，更可有效避免塗膠不當造成之樣品製備失敗風險。並且，此銅網可重複使用多次，也在降低成本方面具有極大效益。

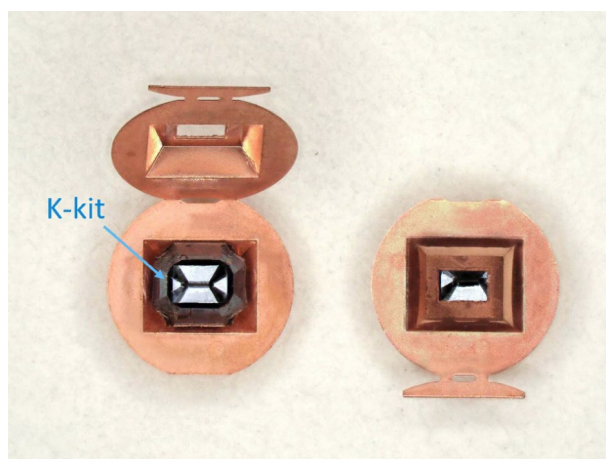


圖 10. K-kit 開合式銅網外觀。

3.3 溼式與乾式樣品製備

K-kit 採用單體式結構設計，在樣品製備方面展現出顯著的差異化特點。如圖 11 所示，透過適當的樣品製備方法，可在 K-kit 微通道內形成乾式與濕式兩類不同的載液狀態，且無論乾、濕狀態，皆能夠維持均勻一致的奈米粒子分布，確保穩定且高品質的觀測結果。

在 K-kit 樣品製備過程中，透過選擇適當的微通道尺寸，並控制從載入溶液至塗膠密封之間的時間間隔，可形成如表 3 所示的四種不同儲液狀態樣品。一般而言，建議使用通道高度較大的 K-kit (例如 $2\ \mu\text{m}$) 製備乾式樣品，而通道高度較小之 K-kit (例如 $0.2\ \mu\text{m}$) 則較適合用於製備溼式樣品。其主要原因在於通道高度較大的 K-kit 具備較大的開口端，液體在室溫下較易自然蒸發，或可在真空環境下迅速移除。因此，製備乾式樣品時，可不必要於通道兩端塗覆真空膠進行密封，即可確保溶液完全乾燥。

使用者可依據分析需求，選擇製備乾式或溼式之 K-kit 樣品。若僅需觀察溶液內粒子的形態、尺寸或團聚狀態，建議優先選擇乾式 K-kit，以獲得較佳的 TEM 影像品質。若研究目標為溶液內之化學反應 (例如 AuCl_4^- 溶液在電子束作用下的金還原反應)、或是需要有溶液維持於 K-kit 內 (例如觀測生物或有機粒子的真實形貌)，則適合採用濕式 K-kit。此外，有些樣品溶液在 TEM 電子束照射下容易產生氣泡或擾動，進而影響影像觀察的清晰度與穩定性者，則可採用乾式 K-kit 製備方法改善，藉由減少通道內之溶液量，降低電子束對樣品的影響。

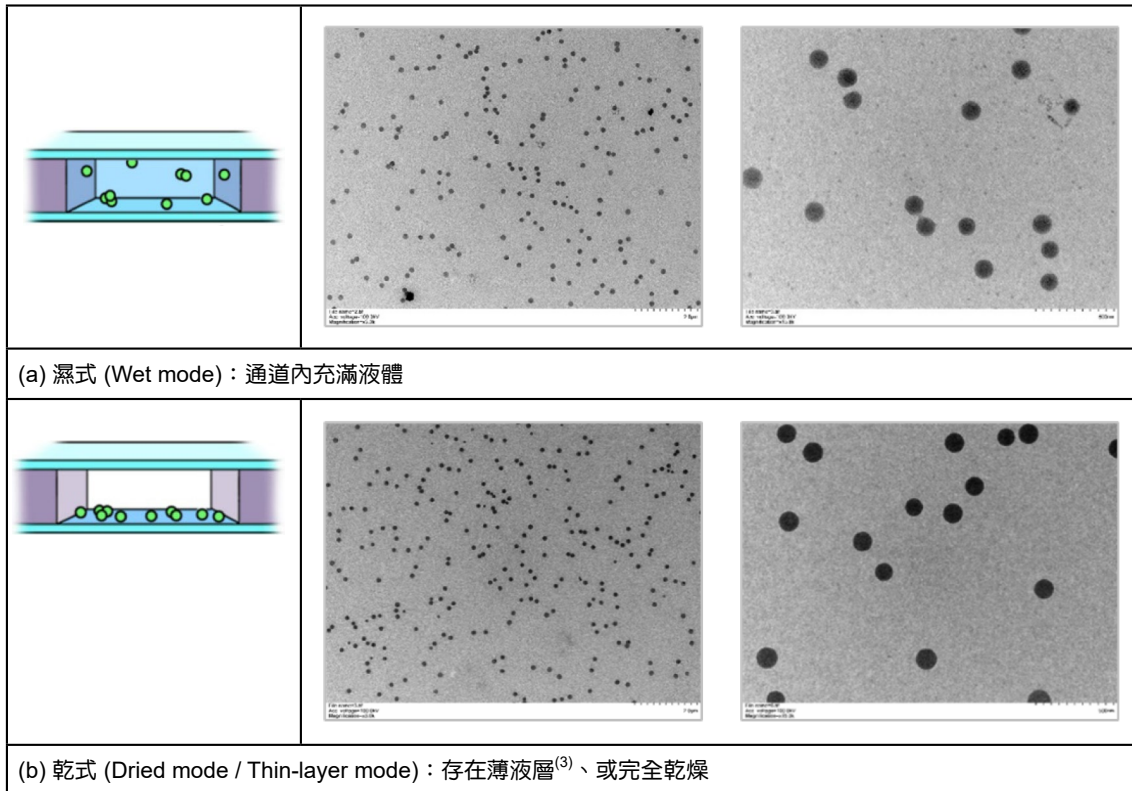
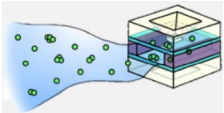
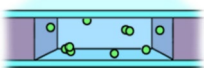
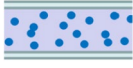
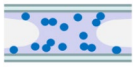
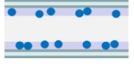
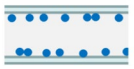


圖 11. 濕式與乾式 K-kit 的 TEM 影像觀察結果。本例 K-kit 載入之樣品為 NIST 100 nm 聚苯乙烯粒子 (polystyrene spheres)。

表 3. K-kit 樣品製備可實現的不同儲液態樣。

K-kit 樣品製模式	濕式 (Wet)	乾式 (Thin Layer)
	存在液體 	乾燥 
影像解析度	良好	極佳
適用通道尺寸 (μm)	0.1, 0.2, 0.5	0.5, 1, 2, 5
可載入樣品粒子尺寸 (nm)	< 500	< 3,000
樣品粒子外形	原始樣貌	潛在輕微變形的可能性
電子束作用時潛在發生化學反應、或是粒子受到破壞的風險	高	低
K-kit 可形成的內部狀態	 完全充滿液體  部份充滿液體	 壁面存在薄液層  乾燥狀態

乾式模式之 K-kit 樣品製備，可使通道內完全乾燥、或於壁面形成奈米厚度的薄液層^(3, 4)，有效提升影像觀察品質，這也是 K-kit 相較於市場上其它液態池晶片產品之主要優勢之一。

3.4 濕式負染與多次載入

基於獨特的單體式結構，K-kit 同時也是市場上唯一可實現多次載入 (multiple loadings) 及濕式負染 (wet negative staining) 應用的微型液池晶片。此優勢對於低影像對比度的生物樣品觀察、或是免疫電子顯微學 (immunoelectron microscopy) 研究等，皆可提供相當大的助益。

K-kit 可應用於例如觸媒反應機制研究、或免疫檢測技術開發等，需要執行多次載入不同樣品溶液的實驗研究，如圖 12 所示。此獨特功能是市場上其它類型產品，如兩片組合式液態池晶片、或原位液態 TEM 樣品桿等所無法實現的。



圖 12. 利用 K-kit 可執行多次樣品載入操作，且重複載入次數無限制。

圖 13 是 K-kit 應用於免疫檢測的研究案例⁽⁵⁾。本例將經過分離處理的血小板 α 粒子，透過 K-kit 重複進行多次樣品載入，成功獲得奈米金標定 α 粒子 (α Granules) 之 TEM 清晰影像。該免疫學樣品的 K-kit 製備過程如下：首先，透過 K-kit 分別載入不同溶液進行內部清潔與表面處理，接著依次載入初級抗體 Mouse monoclonal anti-P-selectin antibody 和二級抗體 6-nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG antibody，並在加熱至 37 °C 環境培養約 2 小時，使抗體發生反應。由於電子顯微鏡無法偵測螢光訊號，此免疫金標記方法藉由將金粒子與抗體結合，利用金在電鏡影像中的高對比度，清楚標定出所有血小板釋出之 α 粒子位置。

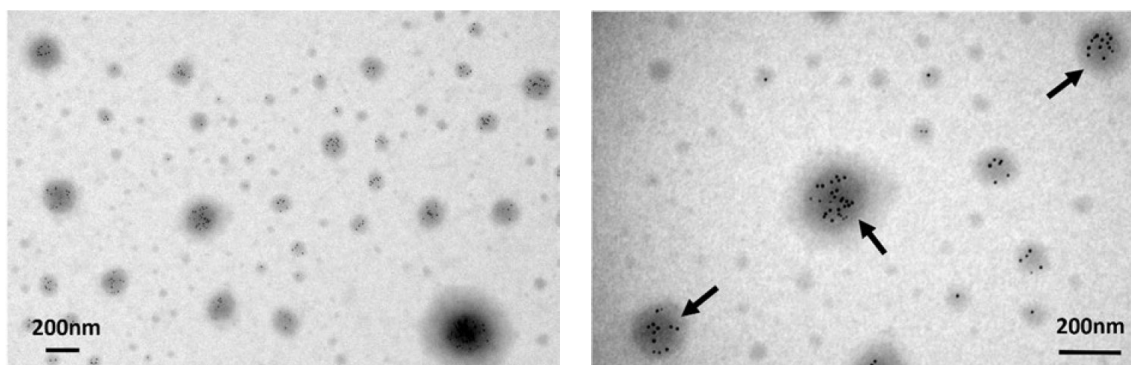


圖 13. 利用 K-kit 經過多次載入步驟，成功以 6 nm 奈米金標定血小板釋出物 α 粒子的 TEM 影像結果。(圖片來源：⁽⁵⁾)

對於較低對比度的生物樣品，例如病毒、細菌、微脂體 (liposomes) 或外泌體 (exosomes) 等之電子顯微鏡觀測，一般常用的影像改善方法是進行所謂負染 (negative staining) 處理。負染的原理是通過將重金屬染劑堆積在奈米樣品周圍，從而加深影像背景，進一步突顯出該樣品之形貌。傳統負染作法是將染劑滴加於已放置樣品的銅網上，靜置乾燥之後，再將銅網載入電子顯微鏡進行觀察。然而，此一乾燥過程中，有機樣品常因水分流失而發生結構塌陷，尤其是微脂體或外泌體等囊泡型態的生物樣品，極易導致原應呈現圓球狀之樣品粒子外觀塌陷、並堆積染劑。閎康科技基於豐富的生醫樣品分析經驗，開發了獨特之 K-kit 濕式負染技術，可在「濕」的溶液狀態下同樣達到樣品負染效果，成功實現低對比度生物樣品在液態環境的電子顯微鏡清晰影像觀測。

K-kit 濕式負染方法非常簡單，通常可使用 2% 醋酸鈾鹽 (uranyl acetate, UA) 溶液作為負染劑，將 10 μL 的樣品溶液與 10 μL 的負染劑均勻混合後，直接載入 K-kit 進行觀察即可。建議使用者可依實際測試結果適當調整負染劑與樣品溶液的混合比例，以獲得最佳負染效果。圖 14 是人造膠原蛋白纖維束 (collagen fiber) 在銅網與 K-kit 上的負染觀察結果。如圖 14(b) 所示，K-kit 濕式負染處理後，可在溶液狀態下清楚觀察到膠原蛋白樣品的束狀結構影像。圖 15 是兩種極低影像對比度的生物樣品微脂體與外泌體⁽⁵⁾，其負染處理後的 K-kit 影像觀測結果。

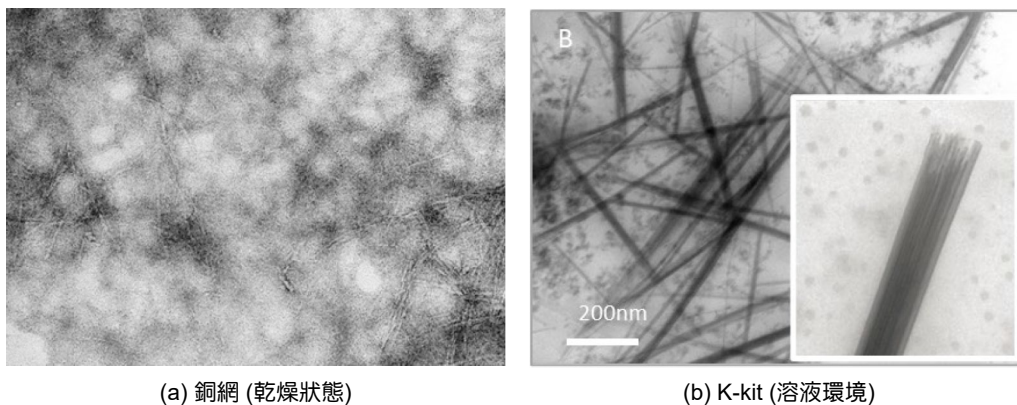


圖 14. 膠原蛋白纖維束在銅網與 K-kit 上的負染影像結果。

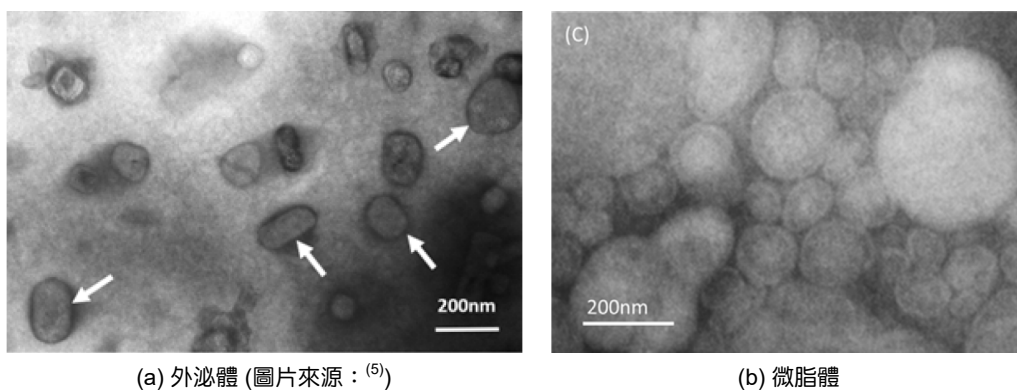


圖 15. 低影像對比度生物樣品的 K-kit 濕式負染觀察結果。

3.5 其它產品特點

K-kit 除了可應用於各種品牌的 TEM 設備進行觀測外，它也是市場上唯一可同時適用於掃描電子顯微鏡及聚焦離子束－掃描電子顯微鏡 (focus ion beam- scanning electron microscopy, FIB-SEM) 觀測的微型液態池晶片產品。圖 16 是 K-kit 利用 TEM 及 FIB-SEM 觀測液態環境下 100 nm NIST 聚苯乙烯 (polystyrene) 粒子之影像比較結果。

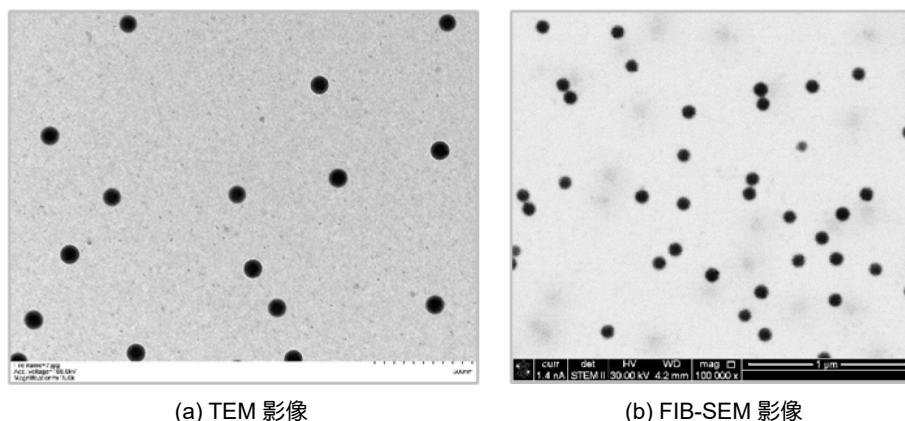


圖 16. 利用 TEM 與 FIB-SEM 觀測 100 nm 聚苯乙烯粒子之 K-kit 影像比較結果 (本例使用之觀測設備分別為 Hitachi HT7700 TEM 與 FEI Helios 400 FIB)。

此外，K-kit 的觀測視窗由極薄 (約 30 nm) 的氮化矽薄膜組成，其不僅可提供電子顯微鏡之電子束穿透成像，還能對奈米粒子進行包括能量散射 X 射線譜 (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX) 成份及晶格繞射等分析。圖 17 為 FIB-SEM 觀測載入 K-kit 之氯金酸 (AuCl_4) 溶液，經電子束還原反應後所形成金粒子的影像與對應之 EDX 元素分析結果。而圖 18 則是 K-kit 內奈米金粒子樣品的 TEM 晶格繞射圖形 (lattice diffraction pattern) 觀察結果。

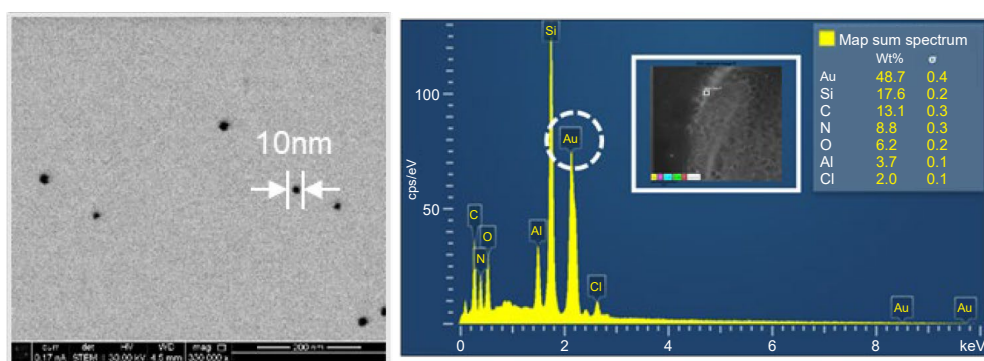
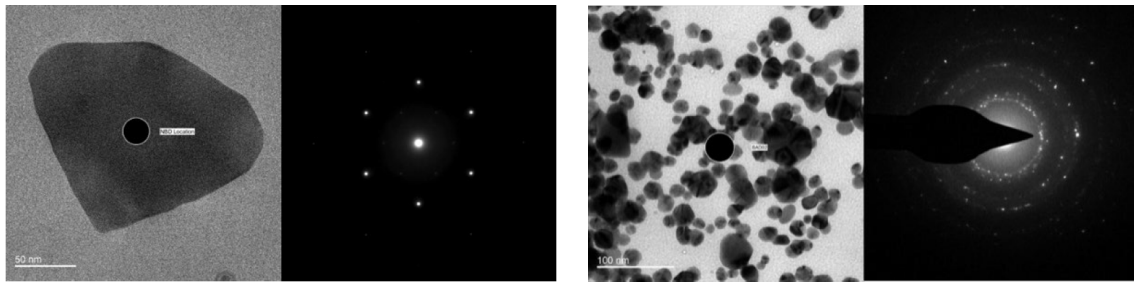


圖 17. 使用 FEI Helios 400 FIB-SEM 觀測 K-kit 內的金粒子影像及其 EDX 分析結果 (圖片來源：⁽¹⁶⁾)。

3.6 K-kit 應用實例

K-kit 在液態樣品的電子顯微鏡觀測中展現出高度的應用潛力，能支援多領域的分析需求。例如，在電子產業中，可應用於液態奈米材料的開發與製程品管；在生醫領域，適用於於



(a) 奈米束電子繞射 (nano-beam diffraction, NBD)

(b) 選區電子繞射 (selective area diffraction, SAD)

圖 18. K-kit 內奈米金粒子的 TEM 晶格繞射分析結果 (圖片來源：⁽¹⁶⁾)。

新藥研發與病理機轉研究；於食品與飲料產業，可用在分析產品中添加劑的成份與分佈。此外，K-kit 亦可應用於美妝產品，檢驗如防曬乳或含奈米成份的化妝水等^(6, 13)，提供高效正確之全面性奈米溶液檢測方案。圖 19 應用案例是將半導體製程使用的化學機械研磨溶液 (CMP Slurry)，直接載入 K-kit 進行 TEM 影像觀察及粒子尺寸分佈定量分析。圖 20 則是分析市售防曬乳產品內添加氧化鈦 (TiO₂) 奈米顆粒之實際範例。

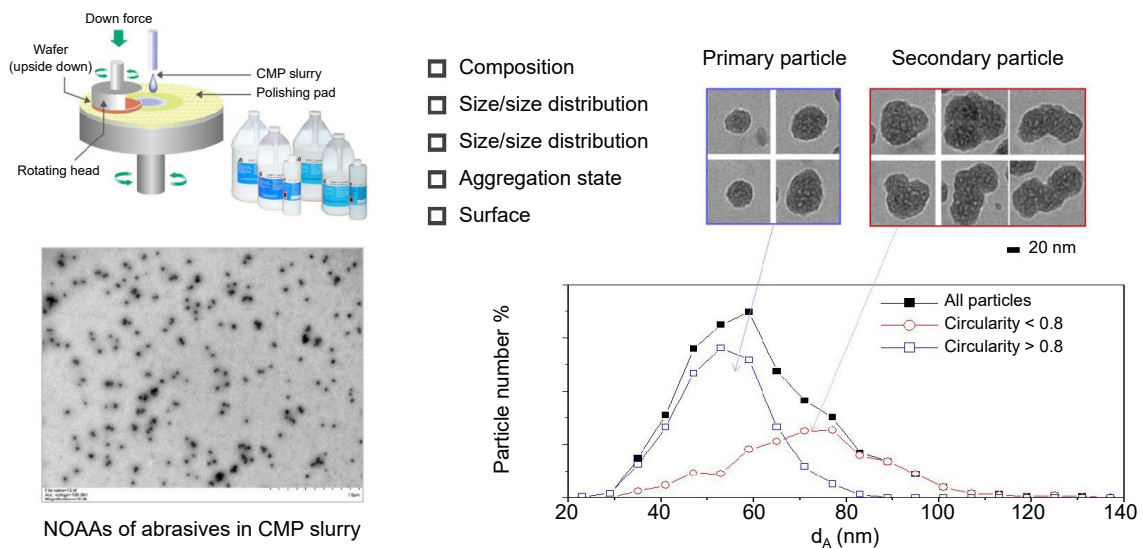


圖 19. K-kit 載入CMP 溶液進行 TEM 影像分析之結果。

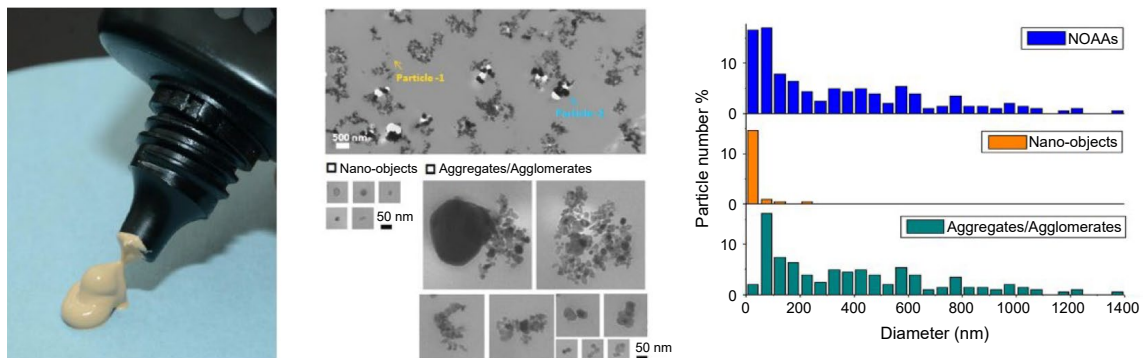


圖 20. 市售防曬乳產品添加 TiO₂ 奈米顆粒的 K-kit 影像分析結果。

特別是在奈米醫療相關領域，K-kit 也展現出卓越的應用價值。其可使用於新藥開發、生物醫學研究、疾病檢測、血液篩檢等，提供具體直觀的液態樣品電子顯微鏡影像，助力醫療診斷與科研之發展。圖 21 為使用 K-kit 分析 Abraxane[®] 藥液中的蛋白質顆粒尺寸分布結果之實際案例。

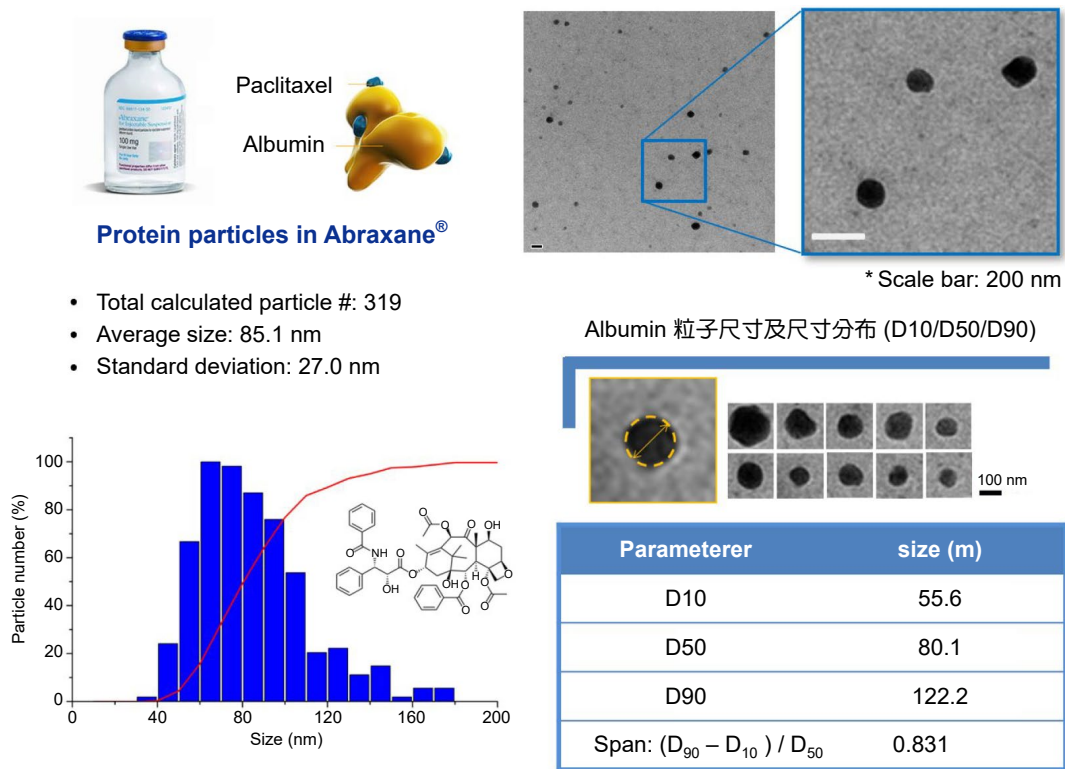


圖 21. 使用 K-kit 分析 Abraxane[®] 藥液中的蛋白質顆粒影像分布情形。

早在 2008 年，已有研究團隊率先利用 K-kit 實現液相環境中活細胞的電子顯微成像觀察⁽⁷⁾。該研究成功以 K-kit 觀察到活體大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 細胞、如圖 22 所示，以及肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 進行亞碲酸鹽還原的過程。此外，研究亦顯示，K-kit 中的肺炎克雷伯氏菌與酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 在連續 TEM 觀測下可分別存活長達 14 秒與 42 秒。此實驗研究不僅大幅簡化了液相 TEM 樣品製備流程，更實現了最早的活細胞電子顯微成像研究成果。儘管該技術在解析度與自由基防護方面仍有侷限，然而其創新應用至今仍被視為液相生物成像領域的重要里程碑⁽¹⁰⁾。

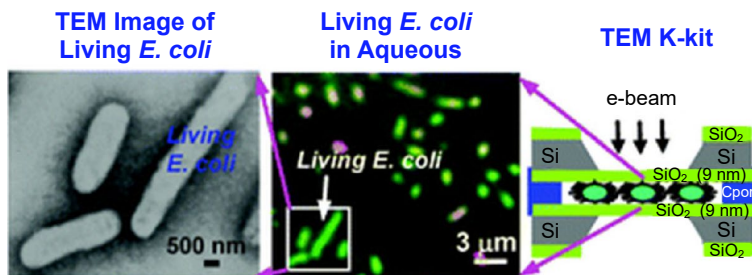


圖 22. 利用 K-kit 成功觀察到活的大腸桿菌細胞 (圖片來源：⁽⁷⁾)。

另外，透過液態池晶片 K-kit 的應用，也能對生物「體外 (in vitro)」或「體內 (in vivo)」處於原液環境的血液樣品所含之奈米顆粒，進行完整的物理化學特性分析。此在人體對於藥物的吸收、分布、代謝 (metabolism) 及排泄 (excretion) 等藥物動力學 (pharmacokinetics) 研究或物質毒性 (toxicity) 評估等方面，展現出高度的應用潛力。2012 年時，學者以 K-kit 進行此類相關實驗研究⁽⁸⁾，其將經過檸檬酸鹽 (citrate) 與聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 等不同聚合物修飾的金奈米粒子與血液混合，分別載入 K-kit 中，觀察該金粒子之分散情形。同時，此研究亦將 cPEG5k 修飾之金奈米粒子注射至小鼠體內，追蹤其在血液中的濃度隨時間變化情形，並將結果與電感耦合電漿質譜儀 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 所測得的數據進行比較。如圖 23 所示，K-kit 的影像觀察結果與 ICP-MS 測得的金粒子濃度變化趨勢高度一致，顯示 K-kit 同時具有定性及定量分析的實際應用潛力。

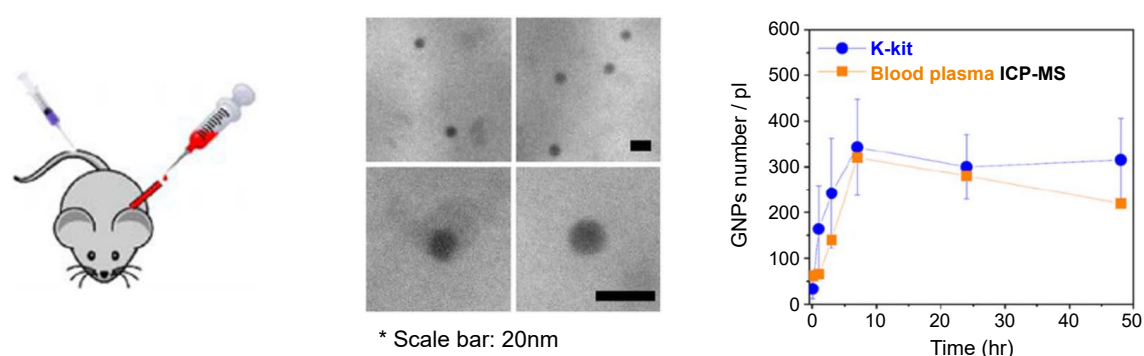
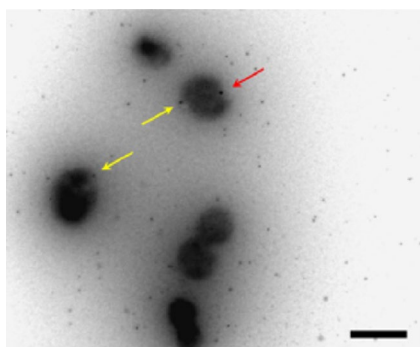


圖 23. 將 PEG 修飾之金奈米粒子注射至小鼠體內，並分別以 K-kit 與 ICP-MS 分析其在血液中金粒子濃度隨時間變化的趨勢，並比較兩者之分析結果 (圖片來源：⁽⁸⁾)。

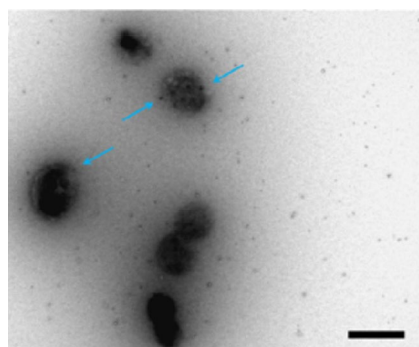
2022 年時，學者利用 K-kit 首次觀測到穀胱甘肽 (glutathione) 分解醋酸菌 (*A. aceti*) 的動態發展過程⁽⁹⁾。如圖 24 所示，此研究藉由 K-kit 清楚觀察到穀胱甘肽分解醋酸菌的四大階段，包括附著與內部化、早期破壞、顯著破壞、及完全破壞之完整變化影像，展現了 K-kit 在微生物動態研究中的應用潛力。

在 2024 年，研究團隊藉由結合 K-kit 液池晶片應用，成功開發出一套快速電子斷層掃描 (electron tomography) 技術，實現在原位液相環境中對內部含有奈米金粒子的小尺寸膠體組裝體 (small colloidal assemblies) 進行定量三維 (3D) 結構分析之創新方法⁽¹¹⁾。膠體組裝體是由奈米或微米等級的膠體粒子透過自組裝、自聚集或外力操控所形成的有序或非有序結構體。這類結構體具有高度可設計性與多功能性，廣泛應用於例如藥物傳遞及生醫材料、光電與光子晶體、催化和感測器、功能性薄膜與塗層等重要領域。

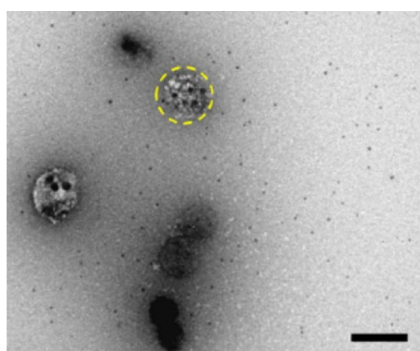
電子斷層掃描技術已廣泛應用於奈米材料的三維結構研究，其特別適用於膠體奈米粒子的組裝體分析。然而，傳統電子顯微鏡觀測必須在高真空條件下進行，導致以濕式膠體化學法製備的樣品，在觀測前需先經過溶劑蒸發與沉積至固態基材等前處理程序，這些步驟往往會改變奈米粒子的原始排列結構。為克服此限制，該研究團隊提出一項創新技術，如圖 25 所示，可在保留樣品液態原位環境之情況下進行電子斷層掃描觀測。該方法利用市售的 K-kit 液態池晶片，搭配快速影像採集流程及專屬的影像對位與三維重建演算法，有效解決



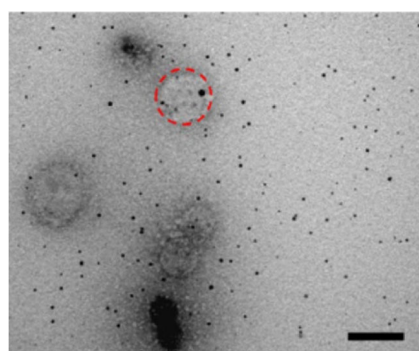
(a) 附著與內部化 (黃色箭頭：GSH-AuNCs 附著於細菌膜上；紅色箭頭：GSH-AuNCs 穿透 *A. aceti* 細菌內部)



(b) 早期破壞 (藍色箭頭：GSH-AuNCs 分佈於細菌膜周圍)



(c) 顯著破壞 (黃色圓圈：細菌出現崩解跡象)



(d) 完全破壞 (紅色圓圈：細菌完全被破壞)

圖 24. 利用 K-kit 觀察穀胱甘肽修飾金奈米簇 (GSH-AuNC) 處理後的 *A. aceti* 細菌完全破壞之過程 (比例尺：2 μm)。本例影像拍攝時間分別為：GSH-AuNCs 與 *A. aceti* 共培養後 (a) 80分鐘、(b) 86分鐘、(c) 96分鐘與 (d) 114分鐘。(圖片來源：⁽⁹⁾)。

了液相條件下斷層觀測所面臨之技術挑戰。此技術同時具備高效率與高解析度的結構解析能力，為膠體奈米粒子組裝體的原位觀測與定量分析開啟了嶄新的技術路徑。

除此之外，近期多項重要的應用研究還包括：使用 K-kit 在 TEM 電子束下誘導成長晶體並重建其三維影像⁽¹²⁾、探討美妝產品中活性奈米粒子的分佈與特性⁽¹³⁾、以及抗癌藥物奈米晶體研究觀察及製備方法開發⁽¹⁴⁾等。這些研究主題內容廣泛且多元，充份展現出 K-kit 在生醫應用領域中的高度潛力。

四、K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的應用限制及技術比較

事實上，K-kit 在液態樣品的電子顯微鏡觀測方面仍存在一定的應用限制。相較於原位液態 TEM 樣品桿方案，K-kit 其內部儲液通道為封閉腔體，因此僅適用於靜態溶液觀測，難以實現流動液體的動態研究分析。此外，由於 K-kit 尚未內建電路、電極或感測元件，也難以進行例如微區加熱觀察、或電化學反應等相關研究。

相較之下，原位液態 TEM 樣品桿具備更強大的功能，能夠通入流動液體，進行液相環境下的動態觀測，例如奈米顆粒成長、電化學反應、生物分子運動等。另外，其組合式液池

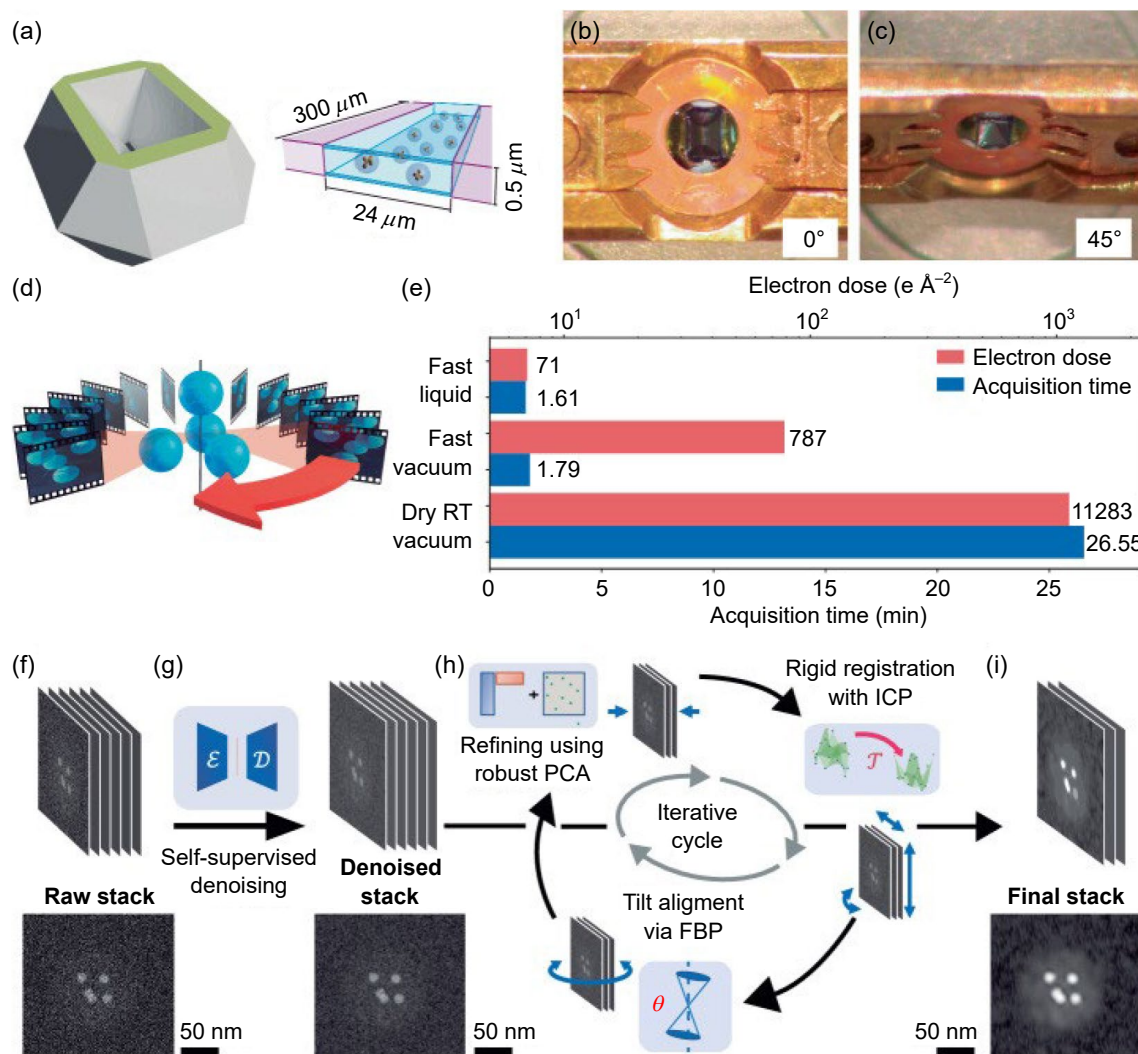


圖 25. 本例之研究利用 K-kit 液態池晶片建立快速電子斷層掃描技術，並在原液環境下對小型膠體組裝體進行定量三維結構分析。(a) 用於實驗研究的 K-Kit 液態池晶片示意圖；(b-c) 裝載在單軸斷層掃描支架上的 K-Kit 晶片外觀，其傾斜視角分別為 0° 與 45°；(d) 液相快速電子斷層掃描的傾斜序列採集方法：持續傾斜樣品，同時記錄樣品的投影影像；(e) 比較在液體與真空中進行快速電子斷層掃描，以及在真空中進行常溫乾式電子斷層掃描所需的時間與電子劑量；(f-i) 快速電子斷層掃描傾斜序列的前處理流程；(g) 使用自監督學習的卷積自編碼器 (CAE) 進行去噪處理的示意圖；(h) 所採取的重建流程概述；(i) 最終處理後的堆疊影像，已完成精煉、對齊與去噪。(圖片來源：⁽¹¹⁾)。

晶片上也多已配置電極設計，可在液體環境中施加電場，研究電池電極材料的充放電過程、電催化反應機制等，並可透過電極進行局部加熱，探討溫度變化對材料溶解、結晶及相變化等影響。因此，原位液態 TEM 樣品桿特別適合應用於較深入的學術研究。

然而，在需要快速獲取分析結果的產業應用、或需處理大量測試樣品的研究場景下，僅依賴原位液態 TEM 樣品桿亦難以全面滿足需求。因此，建議使用者可根據分析目的選擇最適合的技術，或結合 K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的產品技術優勢，相互搭配使用，以建立兼具效率與全面性的液態奈米材料檢測方案。表 4 比較了 K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的技術特點，供使用者參考。

表 4. K-kit 與原位液態 TEM 樣品桿的技術特點比較。

產品技術	K-kit	原位液態 TEM 樣品桿
晶片尺寸	1.7mm x 1.4mm (Fit in with Ø3 mm grids)	> 2.4 mm × 2.4 mm
適用特定設備	否	是
價格	≤ US\$200	~ US\$100,000
優勢	• 簡單、快速、便宜 • 可使用 SEM 觀測 • 可適用各種化學溶液分析 • 無交叉汙染問題 (一次性) • 可量化分析粒子分佈 • 可載入黏性液體 (毛細力) • 可進行負染及多次載入 • 適用溫度 -196 °C to 120 °C	可研究液體流動及電化學現象
缺點	• 僅適合靜態液體的分析 • 無法通電 (無電極設計)	• 價格昂貴 • 需要清潔及組裝 • 有溶液洩漏風險 • 有交叉汙染疑慮 • 不適用黏性液體
客戶群	產業界及學術界	僅適合學術界

五、結論

K-kit 的應用可實現高品質之液態樣品電子顯微鏡影像觀測，無論針對液態樣品在最終產品的實際樣態、或是一般乾燥樣品，皆可直接觀察、分析奈米物體與其群聚團聚現象。K-kit 具有方便使用、檢測快速及適用性高等優勢特點，且能因應分析需求，製備多種不同儲液型態樣品，並可實現包括溼式負染、多次載入、晶格繞射、成份分析等獨特功能，是市場上唯一適合同時應用於具有複雜測試條件的學術研究、及產業相關奈米溶液分析的最佳選擇。此外，K-kit 也可應用 SEM 或 FIB-SEM 來進行樣品分析。目前 K-kit 產品在全世界超過 20 家以上的知名電鏡耗材通路商進行銷售，同時閎康科技也基於此獨家專利技術，對外提供全面性的液態樣品分析服務。

參考文獻

1. Pu, S., Gong, C., & Robertson, A. W., *Royal Society Open Science*, **7** (1), 191204 (2020).
2. Heide, H. G., *Journal of Cell Biology*, **13**, 147 (1962).
3. Lai, S. E., Hong, Y. J., Chen, Y. T., et al., "Direct-Writing of Cu Nano-Patterns with an Electron Beam", *Microsc. Microanal.*, **21**, 1639, (2015).
4. Hong, Y. J., Tai, L. A., Chen, H. J., et al., "Stable Water Layers on Solid Surfaces", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **18**, 5905 (2016).
5. Trang, N., Chang, J., Chen, W. A., et al, *Applied Sciences*, **10** (14), 4946 (2020).
6. Lu, P. J., Fang, S. W., Cheng, W. L., et al., *Journal of Food and Drug Analysis*, **26**, 1192 (2018).
7. Liu, K.L., Wu, C.C., Huang, Y.J., et al., *Lab on a Chip*, **8**, 1915 (2008).
8. Tai, L.A., Kang, Y. T., Chen, Y. C., et al, *Analytical Chemistry*, **84**, 6312 (2012).
9. Kuo, J. C., Tan, S. H., Hsiao, Y. C., et al., *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **10**, 1, 464 (2022).
10. Kaczmarczyk, O., Augustyniak, D. & Zak, A., *ACS Nano*, **19**, 12710 (2025).

11. Arenas Esteban, D., Wang, D., Kadu, A., et al., *Nature Communications*, **15** (1), (2024).
12. Das P. P., Cookman, J., Pérez, A. G., et al., *Microscopy and Microanalysis*, **28**, S1, 854 (2022).
13. Ilett, M., Naveed, E., Roncal-Herrero, T. et al., *Journal of Nanoparticle Research*, **25**, 122 (2023).
14. Sharma, S. K., Palanikumar, K. L., Pasricha, R., et al., *Pharmaceutics*, **16** (11), 1471 (2024).
15. Kawamoto, H., Wakui, A. & Tamura, K., et al., "Image sharpening by the ES-Corrector for TEM observation of specimen in-liquid," *In proceedings of 13th Asia Pacific Microscopy Congress*, Brisbane, Australia, February 2-7, (2025).
16. "MA-tek K-kit Services." MA-tek Inc., please refer to the website: www.matek.com/services/index/K-kit. Accessed May 8, (2025).
17. "Hummingbird Scientific Homepage." Hummingbird Scientific Inc., please refer to the website: www.hummingbirdscientific.com/. Accessed May 8, (2025).
18. "Protochips Solutions." Protochips Inc., please refer to the website: www.protochips.com/solutions/. Accessed May 8, (2025).

作者簡介

陳弘仁先生為國立成功大學航空太空工程研究所博士，現為閎康科技科技股份有限公司研發中心處長。

Hung-Jen Chen received his Ph.D. in the Institute of Aeronautics and Astronautics from National Cheng Kung University. He is currently serving as the Director of the R&D Center at MA-tek Inc.