

第三章 實驗設計與規劃

3-1 實驗架構

實驗架構分成四部份：模仁之製備、多孔性薄膜之製備、薄膜之物性分析及薄膜之細胞測試。首先利用半導體製程技術製備圓柱陣列模仁，其線寬為 $50\mu\text{m}$ 、間距為 $50\mu\text{m}$ ，接著利用旋塗高分子於矽晶圓表面，並以微熱壓及模仁錯位對壓方式製備多孔性高分子薄膜，將製備好之薄膜進行物性分析及細胞測試，物性分析包括XRD成份分析、FTIR官能基鑑定、Contact Angle親疏水性判斷及SEM、OM薄膜形態觀察，細胞測試包括生物相容性評估及細胞成長情形觀察。圖3-1為整體實驗架構圖。



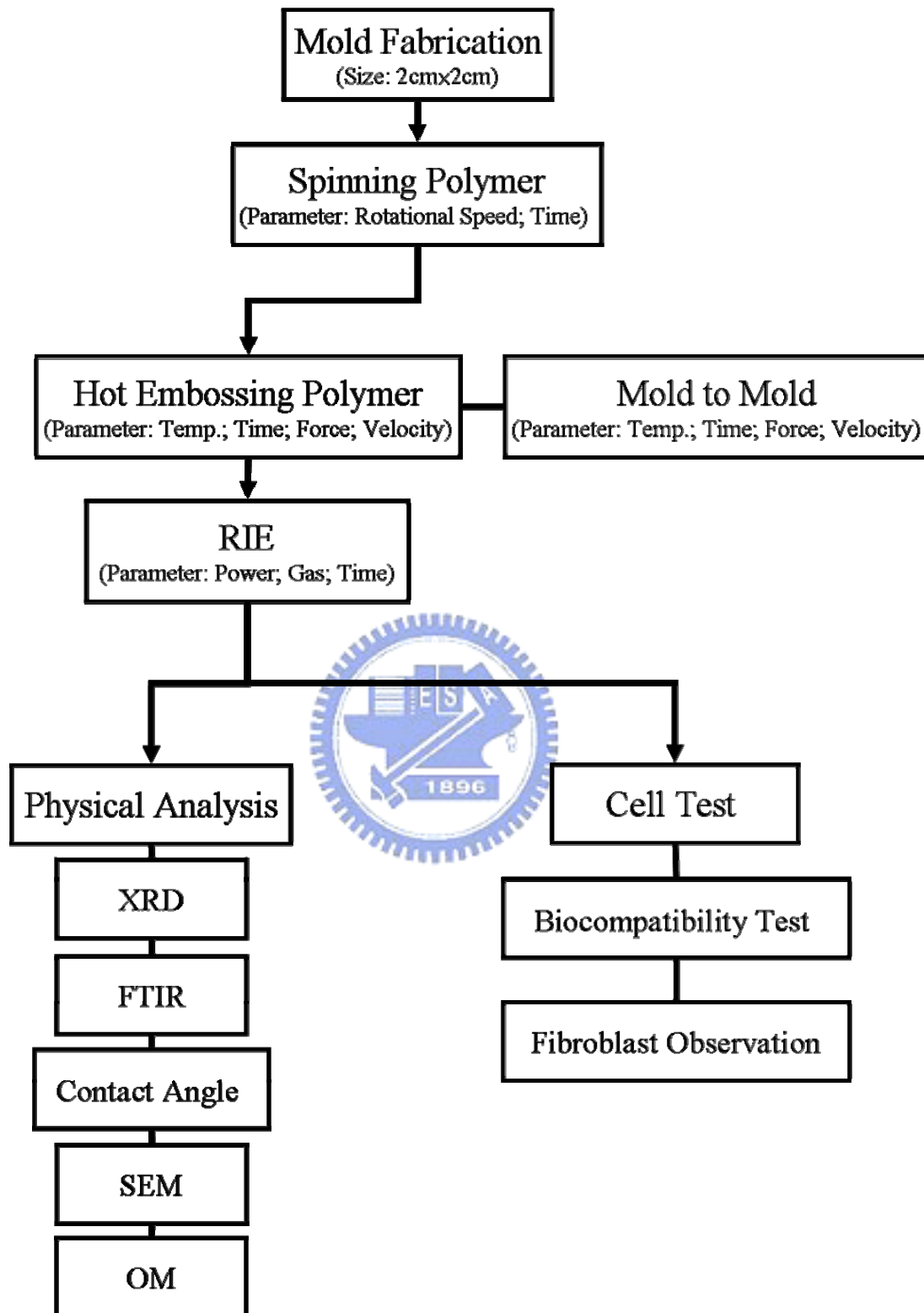


圖 3-1 實驗架構圖

3-2 模仁的製作

3-2-1 模仁之設計

利用構圖軟體(AutoCAD)繪製模仁圖，存出 DXF 檔，再利用轉檔軟體將 DXF 轉成 GDS-II 檔以便給 E-Beam System 判讀，圖 3-2 為設計之模仁圖。

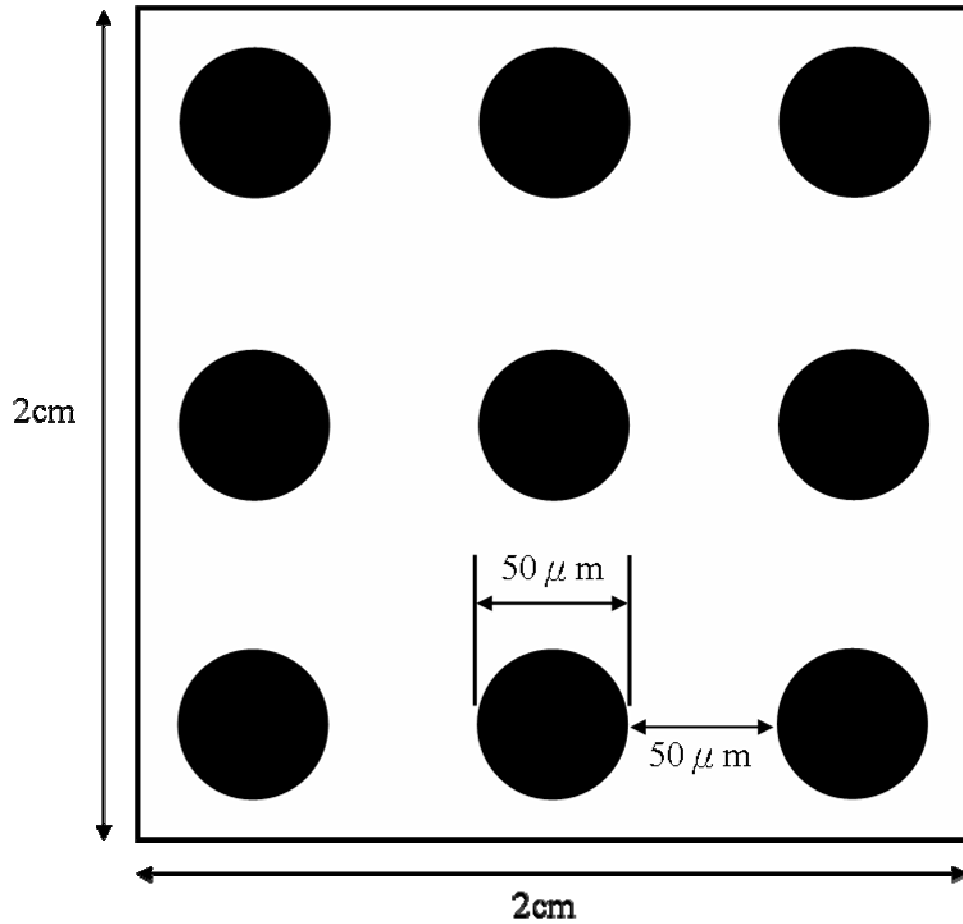


圖 3-2 設計之模仁示意圖

3-2-2 利用半導體製程技術製作矽晶圓模仁

其製作程序如下：

1. 矽晶圓清洗(RCA Clean)：

依據標準 RCA Clean 步驟對晶圓表面進行清洗，並去除寄生氧化層(Native Oxide)，其步驟如以下：



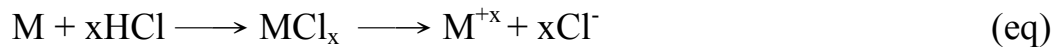
(1)SC1：以 $\text{NH}_4\text{OH} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1 : 5$ 的比例混合，並將溶液加熱至 75°C ，其目的在於：

a. 去除表面上之附著物。

b. 使晶圓表面金屬污染物由金屬轉變為金屬氫化物。

(2)SC2：以 $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O}_2 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1 : 5$ 的混合比例，並將溶液加熱至 75°C ，其目的在於：

a. 去除金屬污染物，使其形成金屬離子態被除去，其反應式如下：



b. 去除有機物。

2. 濺鍍鋁(Sputter Al)[27]：

濺鍍是藉著在兩相對應之金屬電極板(Electrodes)上施以電壓，將電極板間之部份離子化氣體(Partially Ionized Gases)，俗稱為電漿(Plasma)，以使離子對電極板表面進行轟擊(Bombardment)，轟擊後除了會產生二次電子外，還會把電極板表面之原子給打擊出來，此動作稱為濺擊(Sputtering)，被擊出之電極板原子將進入電漿內，利用擴散(Diffusion)方式，最後傳遞到晶圓表面，並因而沉積，圖 3-3 為濺鍍之原理示意圖。藉由濺鍍方式，在矽晶圓上鍍一層厚度為

1500Å 的鋁，目的為藉由鋁當阻擋層。

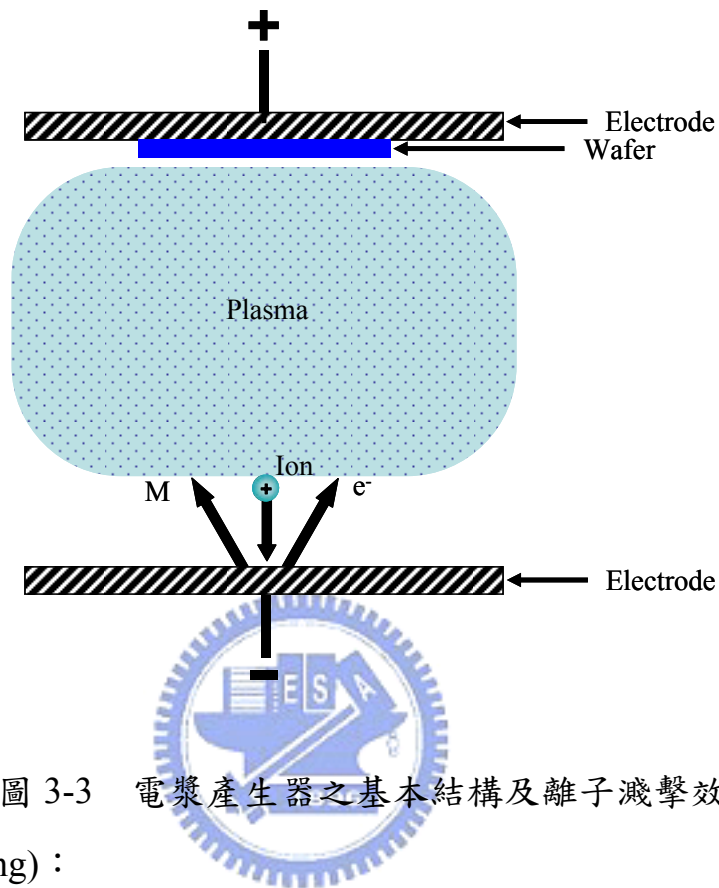


圖 3-3 電漿產生器之基本結構及離子濺擊效應

3. 塗底(Priming)：

以 Spin Coating 方式在矽晶圓表面 Coating 一層六甲基乙矽氮烷(HMDS)。塗佈 HMDS 主要目的是用來增加光阻與晶片表面之附著能力。

4. 光阻塗佈(Resist Coating)：

在經過塗底過程後之矽晶圓以 Spin Coating 方式在晶圓表面均勻塗佈一層負型光阻(Negative Resist)。

5. 軟烤(Soft Bake)：

軟烤亦稱為曝光前烘烤(Pre-Exposure Bake)是用來將晶片上的光阻層溶劑從光阻裡驅除的步驟，使光阻由原來的液態，經軟烤之後，而成為固態的薄膜。

6. 電子束曝光(E-Beam Exposure)：

原理為利用經高電壓加速之電子對阻劑(Resist)進行直寫，藉由電磁線圈來控制電子行進路線，可製作出各種包含週期性及非週期性等圖案。

在進行電子束曝光前，將欲曝之圖形進行大切割，此時所要曝的圖形，會被切割成小於或等於 $1200\mu\text{m}$ 的條狀區域(Stripe)，以符合主偏折系統之電子束偏折範圍，而這類的格式稱為 TZB 格式。大切割完後再進行細切，細切成電子束上成形孔隙形狀的組合格式稱為 RUN 格式，圖 3-4 為以英文字母 O 進行大切割及細切之示意圖。電子束的孔隙基本形狀包括矩形、傾斜 45° 之矩形、以及直角三角形三種，且尺寸必須介於 20 nm 至 $4\mu\text{m}$ 之間，切割的動作必須符合此原則，參考圖 3-5。

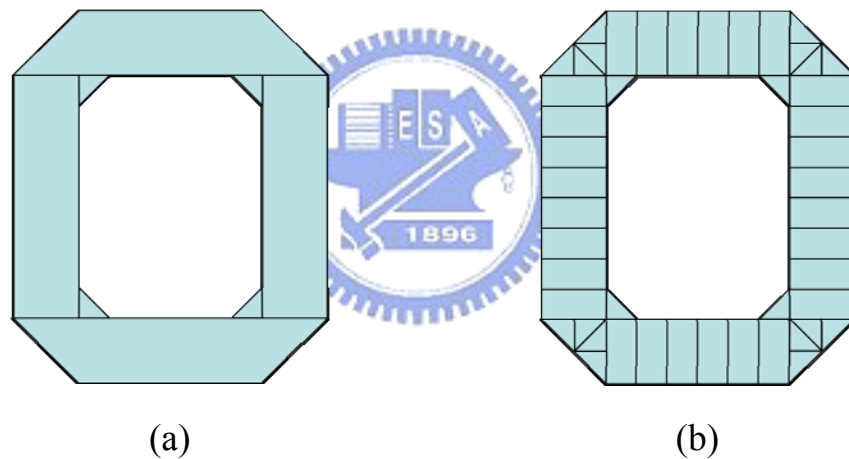


圖 3-4 (a)大切割後之 TZB 格式；(b)細切之 RUN 格式

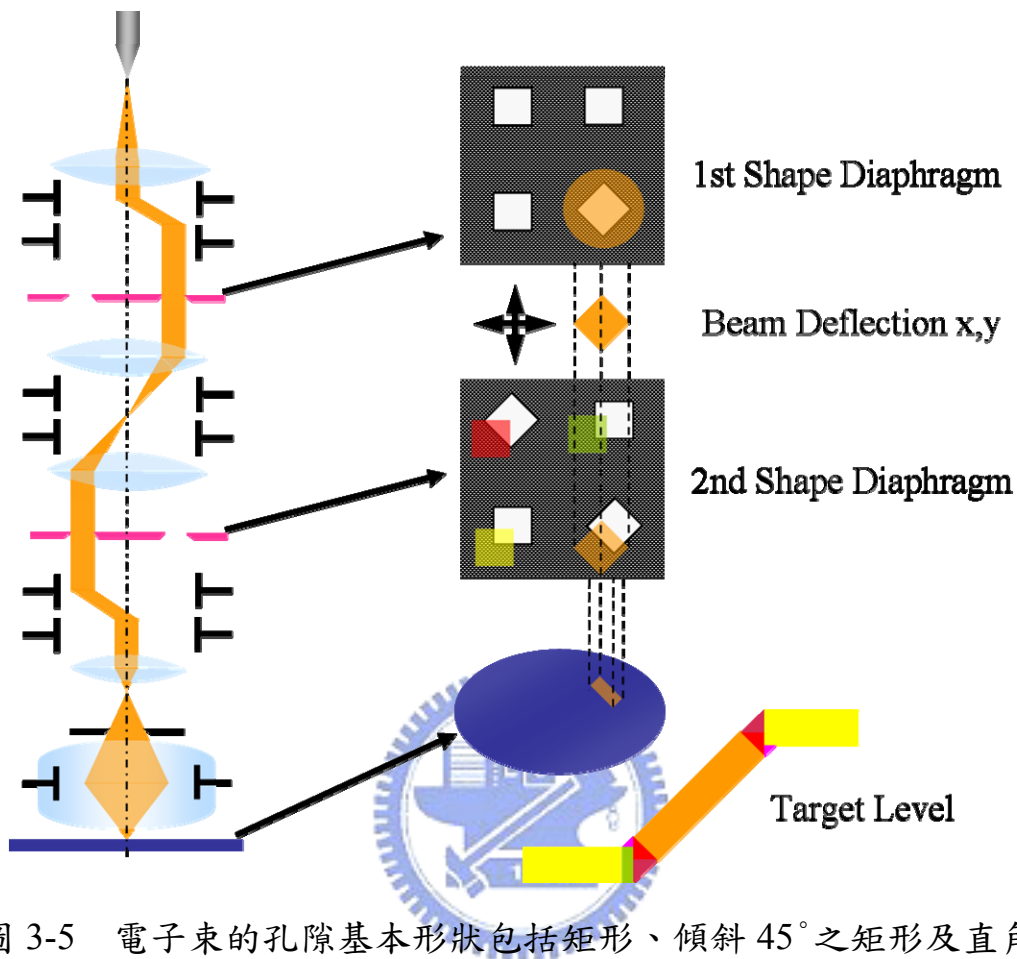


圖 3-5 電子束的孔隙基本形狀包括矩形、傾斜 45° 之矩形及直角三角形

7. 曝光後烘烤(Post Exposure Bake)：

經過這個烘烤步驟，可以使曝光過的光阻結構重新排列，主要目的為減少駐波(Standing Wave)現象。

8. 顯影(Development)：

經過曝光的光阻將成為羧酸，這種酸加鹼之後將被中和，而溶在鹼性溶液裡。經由此反應可以將光阻層所轉移的潛在圖案顯現出來。

9. 硬烤(Hard Bake)：

光阻經過顯影，必須再經過一次最後的烘烤，以進一步將光阻內所殘留的溶劑含量，藉著蒸發而降到最低。

10.光阻去除(Photoresist Stripping)：

利用金屬層乾蝕刻系統(Metal Etcher)，將晶圓表面經顯影後剩餘之光阻劑剝除，剝除光阻同時亦對無光阻阻擋之鋁做蝕刻，進一步達到以鋁當阻擋層之目的。

11.感應耦合式電漿蝕刻(ICP-RIE)：

所謂感應耦合式電漿(Inductive Coupled Plasma, ICP)，簡言之係利用 RF 所產生的感應磁場引發足夠的能量使氣體解離，其運作原理如圖 3-6 所示。由安培定律(Ampere's Law)及法拉第定律(Faraday's Law)得知，在線圈上加一高頻電源(RF Power Supply)，當線圈上之電流隨時間作變化時，可感應產生一隨時間變動的磁場。

(1)Ampere's law：

$$\nabla \times H = J + \epsilon_0 (\partial E / \partial t)$$

E:電場強度(Volts/m)

H:磁場強度(Amperes/m)

J:電流密度(Amperes/m²)

(2)Faraday's law：

$$\nabla \times E = - \mu_0 (\partial H / \partial t)$$

變動之磁場會感應一反方向之電場，而此電場會加速空氣中游離的電子。被加速的電子隨著電源供應器功率之提昇而能從中獲得足夠的能量與中性氣體分子碰撞發生解離進而產生電漿。而目標晶片置於距離線圈不遠處，且不會受到線圈產生之電場、磁場作用，由於晶片與線圈距離接近，所以只有少數的電漿損失，因此 ICP 蝕刻系統可以在低壓狀態下製造高密度電漿，圖 3-7 為 ICP 蝕刻系統之結構圖。

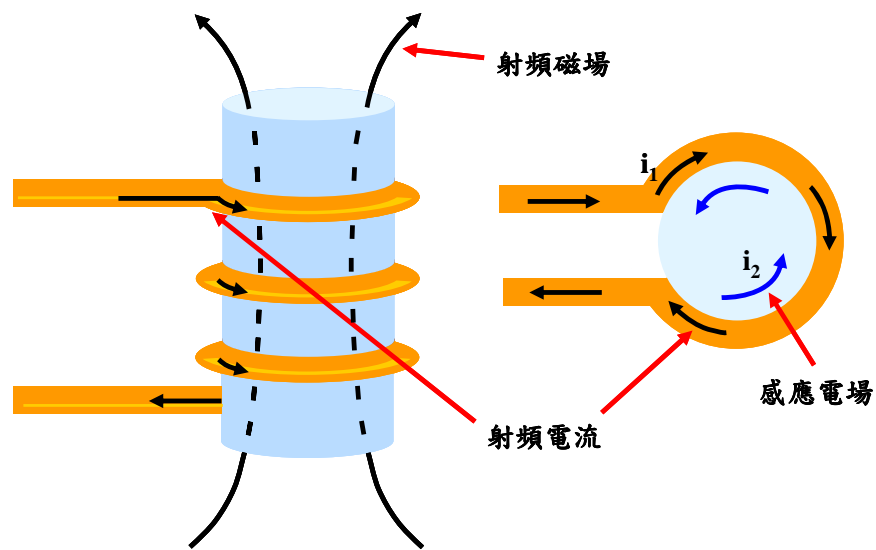


圖 3-6 感應耦合原理示意圖

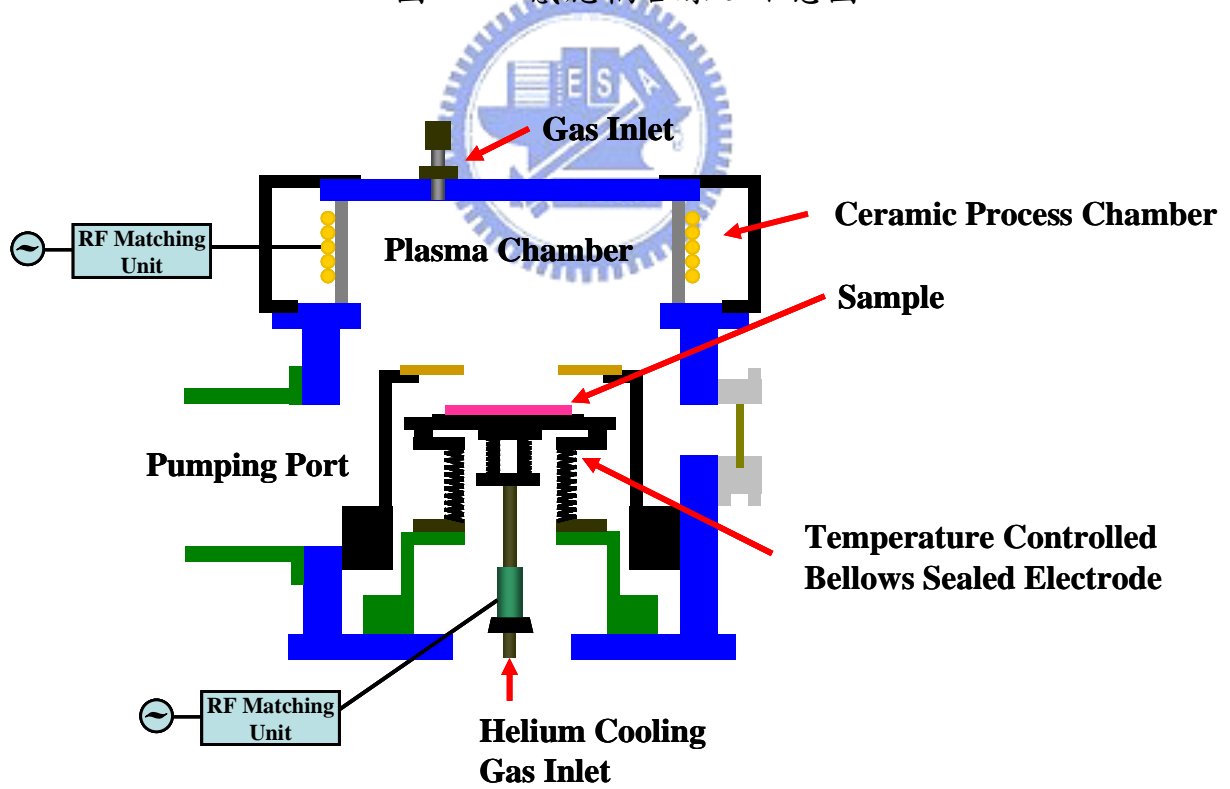


圖 3-7 ICP-RIE System 之結構圖

12. 去除鋁(Al Stripping) :

利用金屬層乾蝕刻系統，將做完 ICP-RIE 後之晶圓表面殘留之 Al 移除。
經由以上 12 個步驟製作出矽晶圓模仁，圖 3-8 及圖 3-9 為其製程總流程。

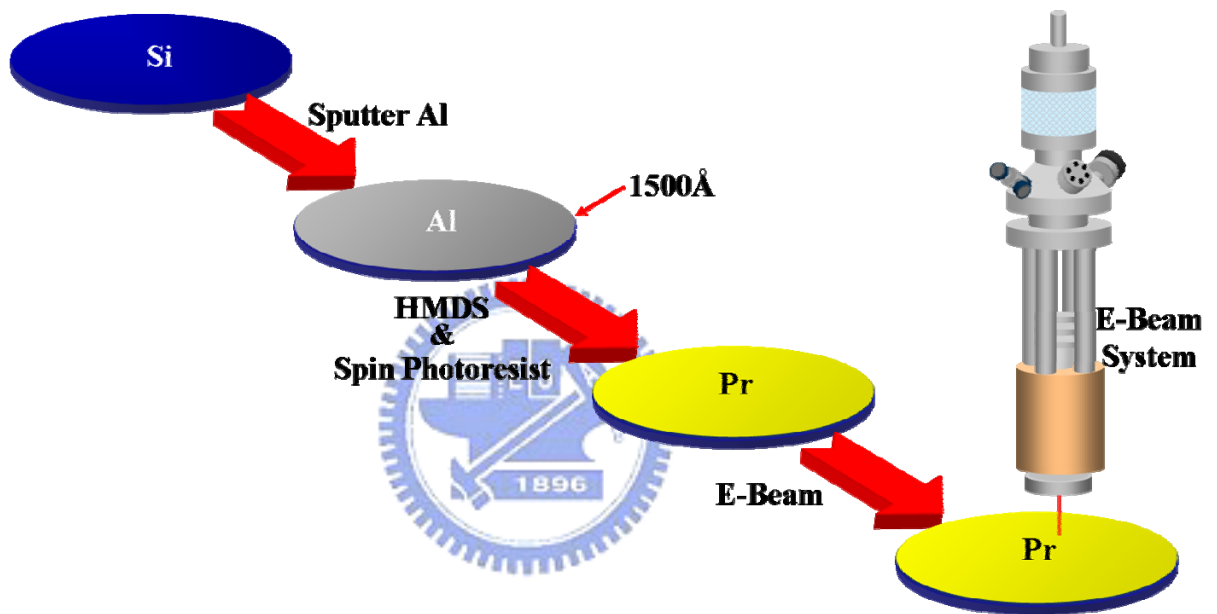


圖 3-8 模仁製作流程 1

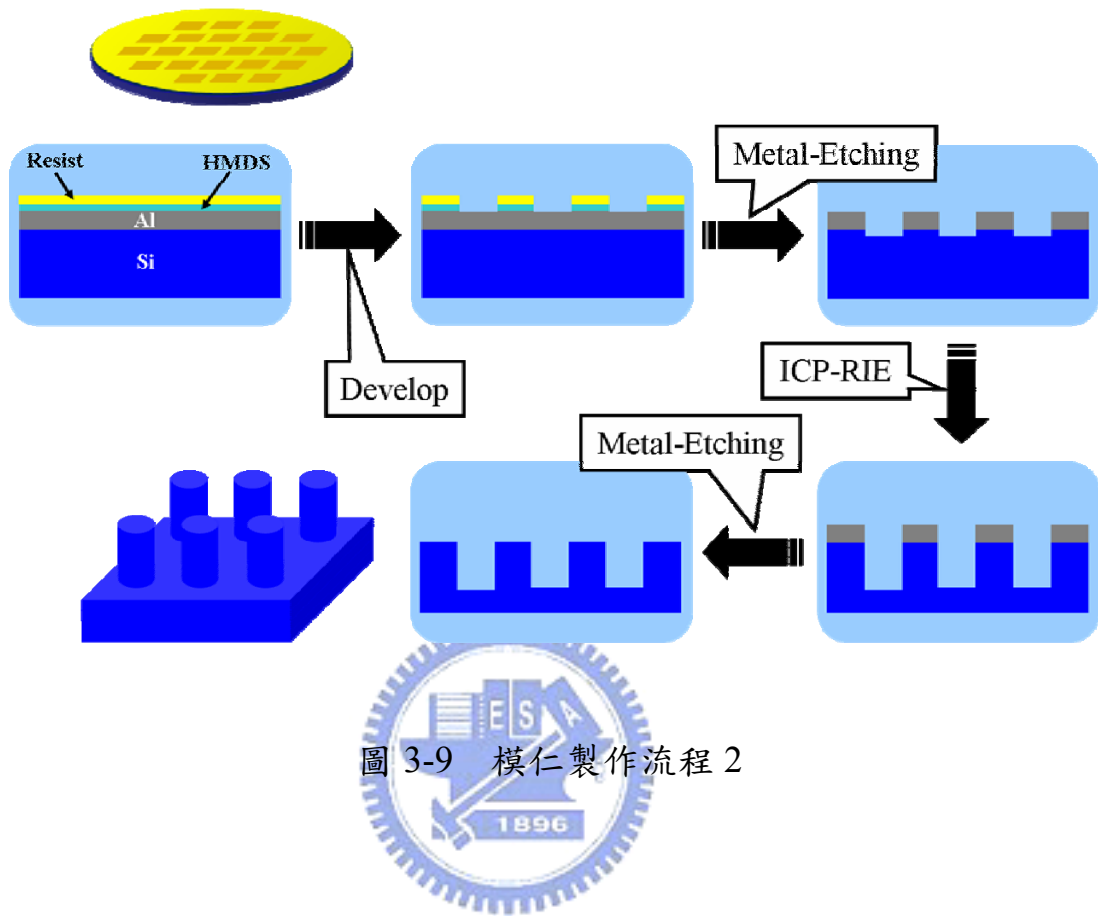


圖 3-9 模仁製作流程 2

3-3 多孔性 HA/PLLA 薄膜之製備

3-3-1 PLLA 及 HA 之製備

1. 泡製 PLLA 高分子溶液：

將 50g 之 PLLA9020 聚合物溶於 400ml 之 95% CH_2Cl_2 中，調配成 14%wt 之 PLLA/ CH_2Cl_2 溶液。

2. 泡製 HA 高分子溶液：

- (1) 以 1M 之 NaH_2PO_4 (磷酸二氫鈉) 粉末，PH：5.35 (原料來源：SIGMA，MS04-1) 及 1M 之 Na_2HPO_4 (磷酸氫二鈉) 粉末，PH：5.35 (原料來源：SIGMA，MS04-2) 加 D. D. Water (二次水)，阻值：18.1M Ω 調配成 1M

之 Sodium Phosphate Buffer，PH：5.35。

(2)將調配好之 1M Sodium Phosphate Buffer 以 D. D. Water 稀釋至 0.3M。

將 0.3M 之 Hyaluronic Acid 粉末(原料來緣：SIGMA，Potassium Salt From Human Umbilical Cord，H1751)與 0.3M 之 Sodium Phosphate Buffer 溶劑以 3mg：1ml 之比例調配，調配成即為 HA 高分子溶液。

3.混合 PLLA 及 HA 溶液：

將泡製好之 PLLA 溶液及 HA 溶液以 1：7 之比例混合並加以攪拌，待攪拌均勻後放置一天，讓因攪拌後所產生之氣泡消失即完成。

3-3-2 旋塗 HA/PLLA 薄膜

將一片空晶圓片吸附於旋塗機上，將泡製好之 HA/PLLA 溶液 5ml 滴至晶圓表面，並進行旋轉塗佈，其過程分兩階段：

1.Step1：轉速 500rpm、時間 5sec，主要讓晶圓表面佈滿 HA/PLLA 溶液。

2.Step2：轉速 1500rpm、時間 30sec，主要讓 HA/PLLA 均勻的塗佈於晶圓表面。

塗佈完成之 HA/PLLA 薄膜厚度約為 $25\pm 2\mu\text{m}$ 。

3-3-3 利用微熱壓機壓印 HA/PLLA 薄膜

將製備好之模仁置於經旋塗 HA/PLLA 之矽晶圓表面，隔熱板則將加熱平板與壓模機隔開，以上加熱板與隔熱板之重量置於矽晶圓上，並施加壓力，開啟加熱系統，利用加熱平板將高分子加熱至成形溫度，上壓板往下施加壓力，待壓印時間到達後，壓力降至保壓力，並將加熱平板與溫度控制器關閉，以自然降溫方式，冷卻至脫模溫度，除去保壓力，上升上壓板，即製備完成多孔性 HA/PLLA 薄膜。圖 3-10 為微熱壓機之示意圖；圖 3-11 為壓印流程圖。

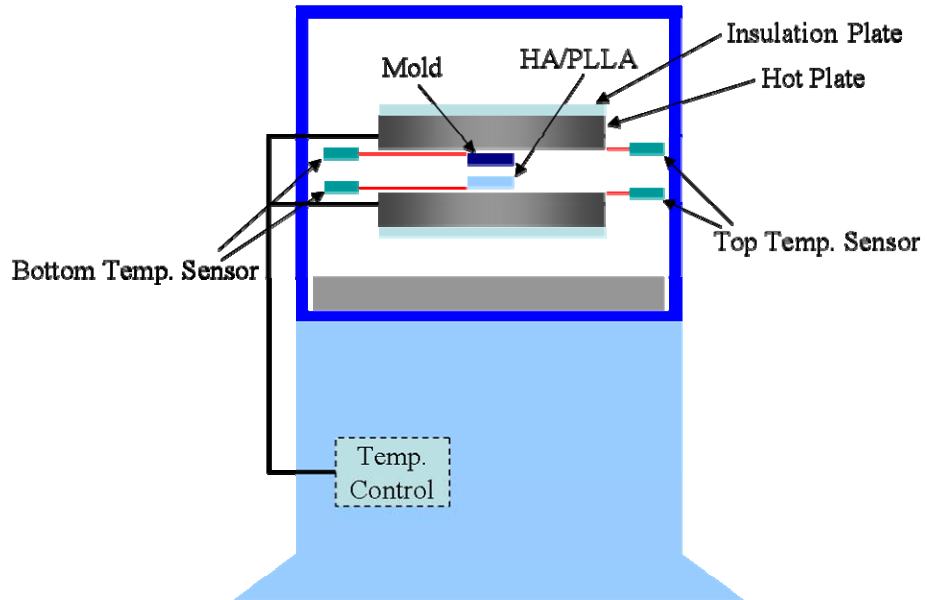


圖 3-10 微熱壓機之示意圖

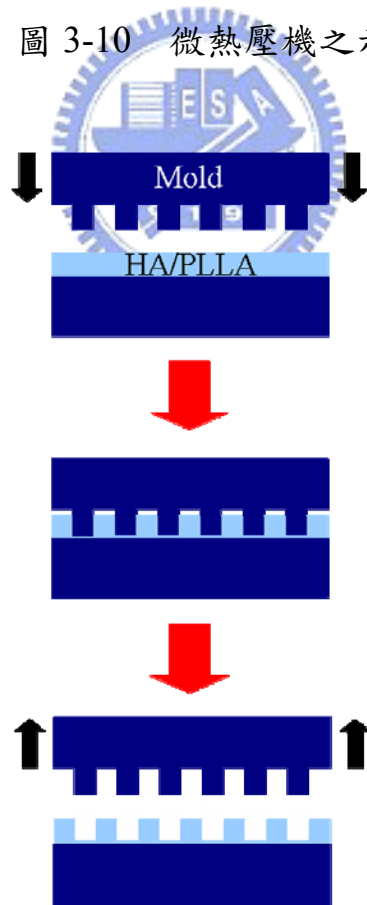


圖 3-11 微壓印流程圖

3-3-4 利用 RIE 進行薄膜穿孔處理[28]

RIE(Reactive Ion Etching, RIE)，中文名稱為反應離子蝕刻，其工作原理與 ICP 類似，主要是藉由將通入之氣體離子化後，以離子去撞擊靶材，來達成蝕刻之目的。進行完微壓印之薄膜圓孔為盲孔，因此藉由 RIE 進行薄膜表面蝕刻，以打通盲孔成通孔狀態。圖 3-12 為 RIE 進行薄膜表面處理之示意圖。

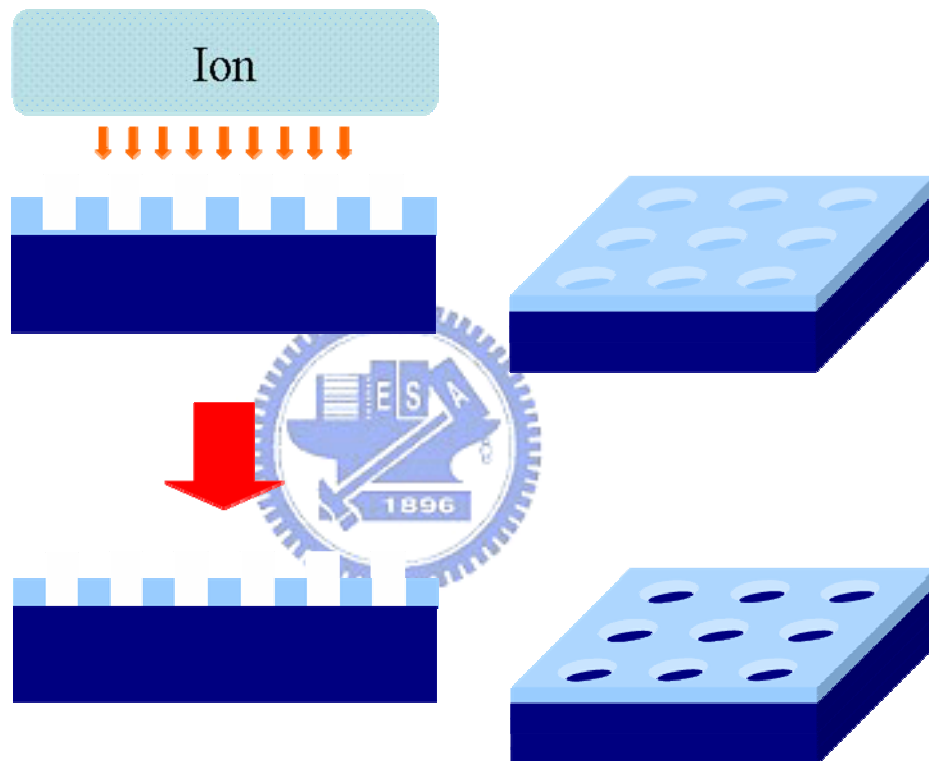


圖 3-12 RIE 進行薄膜穿孔處理處理示意圖

3-4 HA/PLLA 薄膜之生物相容性評估

生醫材料直接或間接與人體接觸，基於安全考量，在發展階段或製成品材料及製程有改變時，都必須通過適當的生物相容性評估，方可進行量產發售。

生物相容性評估一般可分為體外(In Vitro)和體內(In Vivo)兩方面，而本實驗則針對體外來進行生物相容性評估。

3-4-1 纖維母細胞(Fibroblast Cell, NIH-3T3)的培養

實驗採用 NIH-3T3 細胞，NIH-3T3 細胞為一纖維母細胞(Fibroblast-Like Cell)，細胞來源：食品工業發展研究所菌種中心，國家衛生研究院細胞庫，Osteogenic Sarcoma, Interferon Producer; Human。所使用的培養基是根據 1995 年 Martin 在 Journal of Biomedical Materials Research 所使用的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)，其含 10%的 Fetal Bovine Serum(FBS)。

3-4-2 纖維母細胞覆植(Seeding)到薄膜

用消毒過的夾子夾出HA/PLLA薄膜，置入已用胎牛血清蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)塗佈的培養皿中，再將纖維母細胞與培養液之混合液滴在培養皿內薄膜中，置入 37°C、5% CO₂之恆溫箱內培養。

3-4-3 細胞形態的觀察

本實驗採用 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的細胞密度，將其均勻覆植(Seeding)於HA/PLLA薄膜上，並以Plastic culture disc作為Positive control，分別在第 1 天、第 2 天、第 3 天培養後，先將試片以 2M之Phosphate-Buffered Saline(PBS)清洗，清洗後再以 2.5% 之Glutaraldehyde固定液固定半小時，以 1M的PBS緩衝液清洗三次，每次五分鐘，緩衝液PH值調整在 7.3-7.4 之間，後固定使用 1% 之OsO₄固定半小時，再以 1M的PBS清洗三次，每

次五分鐘，接下來以梯度酒精 70%、75%、80%、85%、90%、95%及無水酒精進行脫水，等待乾燥後，以掃描式電子顯微鏡觀察細胞的形態。

3-5 HA/PLLA 薄膜表面性質分析與鑑定

3-5-1 觀察細胞之成長情形

以光學顯微鏡 OM(Optical Microscope)觀察，在一般的操作下，由於肉眼的鑑別率僅約 0.2 mm，當光學顯微鏡的最佳解析度只有 0.2 μm 時，理論上的最高放大倍率只有 1000 倍，故其解析度有限，所以在同一次的觀察區域中，視野是各種成像系統中最大的，這說明了光學顯微鏡的觀察事實仍能提供許多初步的結構資料。在實際應用上，幾乎沒有試片製備的需要，變化光源的照射方向，或取部份折射的光線作成暗視野成像，凸顯某種材質的對比，或以偏極化光源(Polarizing Illumination) 作為入射粒子束，都有加強對比的效果。故本計畫將以光學顯微鏡來初步觀察細胞之成長情形，圖 3-13 為本實驗培養之纖維母細胞 OM 圖。

3-5-2 薄膜表面形態觀察

利用場發射掃描式電子顯微鏡，觀察高分子薄膜表面型態。場發射掃描式電子顯微鏡(Field Emission Scanning Electron Microscopy, FE-SEM)是以電場發射原理產生電子，場發射槍為鎢針尖，當施加一負偏壓於電子槍時，強大的電場會集中在針尖，藉此游離電子，再將游離的電子聚焦，用電子束撞擊材料表面，以偵測二次或背向散射電子。SEM 主要是用來看物質表面的影像，解析度可達 15Å。本實驗使用 Hitachi S4000 場發射電子顯微鏡，加速電壓 25kv 來觀察薄膜表面形態。

3-5-3 待測物的成分與結構分析

低掠角 X 光繞射儀(GIXRD)是以高能量的電子撞擊材料表面來產生 X

光，不同成分與結構的材料會有其特性的 X 光光譜。利用實驗所得到的特性光譜與國際性粉末繞射標準委員會(Joint Committee on Powder Diffraction Standards, JCPDS)所建立的粉末繞射資料庫(Powder Diffraction File, PDF)比對，則可得出待測物的成分與結構。本實驗利用 XRD 來鑑定薄膜之成分結構。

3-5-4 觀察薄膜之親疏水性

以接觸角(Contact Angle)的測量，觀察不同材質之薄膜之親疏水程度。將 PLLA、HA 及 HA/PLLA 等不同材質之薄膜置入觀察位置，並觀察其接觸角的差異。以微量滴管(Micropipet)滴入 2 μ l 之二次水，待一分鐘後觀察量測接觸角，重複在不同的地方量測十次後平均所得值，即為欲測薄膜表面接觸角值。觀察條件 25 $^{\circ}$ C、相對濕度 65%。

3-5-5 鑑定 HA/PLLA 薄膜表面的官能基

以霍氏全反射紅外線光譜儀(FTIR-ATR)進行 PLLA、HA 及 HA/PLLA 之官能基分析。取真空乾燥後之高分子薄膜，裁成 2cm \times 2cm 固定於光譜照射槽，抽真空、對光後做霍氏全反射紅外光譜分析。實驗條件：解析度 2cm $^{-1}$ ，掃描光區 600cm $^{-1}$ ~4000cm $^{-1}$ 。

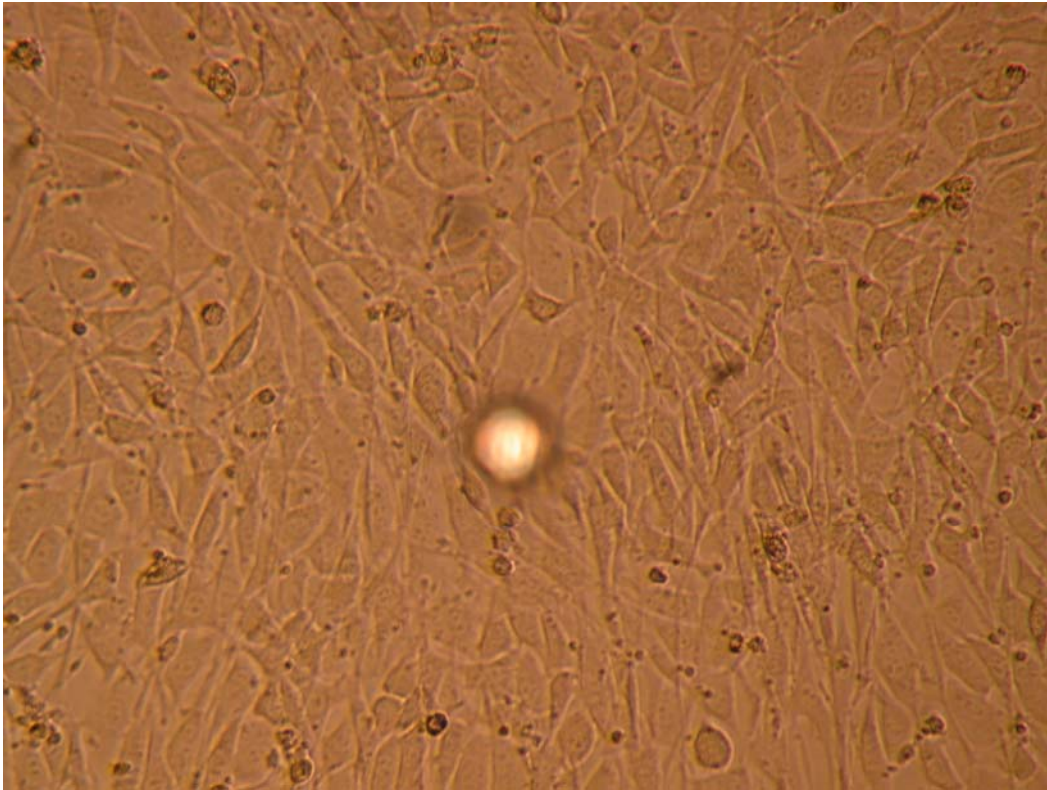


圖 3-13 實驗培養之纖維母細胞 OM 圖，中間光點為下光源點

3-6 實驗設備

表 3-1 實驗儀器一欄表

實驗設備	規格	位置
清洗蝕刻工作台 (Clean Bench)	美國 SANTD CLARA PLASTICS Model 1100B	國家奈米元件實驗室 (新竹)
金屬濺鍍系統 (Sputter)	台灣慶康 Duratek system	國家奈米元件實驗室 (台南)
自動化光阻塗佈及顯影系 統 (Track)	日本 TEL Clean Track MK-8	國家奈米元件實驗室 (新竹)
電子束直寫系統 (E-Beam Direct Writing)	Leica E-beam Weprint 200	國家奈米元件實驗室 (新竹)
金屬層乾蝕刻系統 (Metal Etching)	日本 Anelva ILD-4100 helicon wave etcher	國家奈米元件實驗室 (新竹)
感應耦合式電漿蝕刻系統 (ICP)	英國 Oxford Plasmalab System 100	國家奈米元件實驗室 (台南)
旋塗機 (Spin Coater)	Laurell technology corporation	國家奈米元件實驗室 (新竹)
奈米微壓印機 (Nano-Imprinting)	SUSS MicroTec NPS300	龍華科技大學機械所
高密度活性離子蝕刻系統 (HDP-RIE)	慶康科技	交通大學奈米中心

接觸角量測系統 (Contact Angel)	PENTAD FTA-125	交通大學機械所
紅外線光譜儀 (FTIR)	美國 ASTeX PDS-17 System	國家奈米元件實驗室 (新竹)
X 光繞射儀 (XRD)	日本 Rigaku D/Max-RC	台灣科技大學材料所
場發射掃瞄式電子顯微鏡 (SEM)	HITACHI S-4000	國家奈米元件實驗室 (新竹)

