

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 微流體黏滯度分析系統之設計與研製

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2213-E-002-074-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學電子工程學研究所

計畫主持人：管傑雄

計畫參與人員：李漢隆

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 25 日

## 計畫名稱：微流體黏滯度分析系統之設計與研製

### 摘要：

本研究架構了正立式與倒立式的兩種內嵌光鉗差動共焦顯微鏡，詳細描述系統的架構與元件規格與光路設計。在正立式光鉗架構中，量得了光鉗的  $Q$  值，並進行了位移偵測的實驗，計算出光鉗的彈力常數  $k$ 。在倒立式光鉗差動共焦顯微鏡的架構中，使用了四象限二極體進行橫向位移偵測，結合差動共焦顯微鏡的縱向解析率，得到了小球三度空間的定位能力。校正結果顯示 X、Y、Z 三軸的解析率分別為 8 nm、10 nm 與 5 nm，同時各具有 1  $\mu\text{m}$  的動態範圍。而量測小球在光鉗中同時受布朗運動擾動的頻譜訊號，由勞倫茲分佈的擬合曲線截止頻率可推估水的黏滯係數，並與一般標準值誤差約在 1% 左右，驗證了本系統可以小球的動態頻譜分析，得到相當精準的黏滯度估算。

**關鍵詞：**內嵌光鉗差動共焦顯微鏡、黏滯係數

### Abstract

Upright and inverted configurations of optical tweezer embedded differential confocal microscopes are constructed. The  $Q$  value and the spring constant  $k$  of optical tweezer are characterized in the upright configuration system. In the setup constructed with inverted microscope, a quadrant photodiode is used to perform detection of lateral displacement. Combining with the depth resolution power of differential confocal microscope, three-dimensional positioning of a microsphere has been verified. Within 1- $\mu\text{m}$  dynamic range in three axes, the resolutions of X, Y, and Z axes are 8 nm, 10 nm, 5 nm, respectively. By measuring the power spectrum density of silica bead trapped in optical tweezer, the cut-off frequency of Lorentz distribution is fitted. With the cut-off frequency and the spring constant  $k$ , the coefficient of viscosity of water is estimated in the experiment, of the error within 1% from the standard value.

**Keywords:** optical tweezer embedded differential confocal microscopes are constructed、coefficient of viscosity

## 報告內容

### 一、 研究動機與目的：

在 1997 年，中研院原分所的汪治平博士與李超煌博士，提出了具有奈米解析等級的差動共焦顯微術。該技術利用共焦顯微術中訊號對樣品表面高度的反應曲線中的線性區，將樣品表面的微小高度變化作高倍率的線性放大，其縱向解析率高達 2 nm，而動態量測範圍達數微米（由物鏡的數值孔徑決定），同時是開迴路的系統設計，因此具有快速偵測樣品表面高度的能力，這些是與其他奈米顯微技術相較之下最大的優點。而差動共焦顯微術奠基於共焦顯微術的成像原理，因此與共焦顯微術能結合的雷射或光譜技術都可以以同樣應用於差動共焦顯微術中。而差動共焦顯微術在橫向解析率上與共焦顯微術相較並無明顯改進，如何結合橫向位移檢測元件而增進橫向的解析率，同時與光鉗結合，建立一套具有三維奈米級定位能力的實驗平台，並應用在微小球體的捕捉與位置偵測，以及流體黏滯特性的量測上，是本論文的研究動機與目的。

近年來，由於微循環系統的生醫領域研究以及微流體生物晶片的開發，探索生物流體的功能特性成為重要的研究課題<sup>[i]</sup>；而其中，又以黏滯特性的量測最受矚目。在微觀的生物環境中，黏滯度參與了許多生化反應的過程。以蛋白質為例，在其合成過程中，會經過一連串結構上的改變(摺疊與去摺疊)，依據Kramers的理論，環境的黏度越高，將導致蛋白質的這種結構改變能力越低，因而改變了與蛋白質有關的化學反應速率，並進一步影響其最後生成的形式。此外，在酵素的催化反應過程中<sup>[ii]</sup>，當其與鉗合物鍵結的時候，活化端上會產生結構的改變，而高黏度的環境則會抑制其變化、影響酵素催化反應的最大速率。而黏滯度亦直接影響生物分子運動，進而對細胞的基因表現、細胞在組織內的局部運動、與細胞分化產生

作用。透過活細胞局部黏彈特性的動態量測，可觀察到細胞骨架蛋白質分子運動的作用機制，並進行量化的評估。

由於傳統的機械黏滯度檢測方法，除受限於較高樣本量的需求外，也僅適用於均質的流體，缺乏對非均質的流體之空間辨析能力；因此，各種新式的探索技術正積極開發，以研究生物流體的微觀黏滯特性。目前在顯微尺度下研究黏滯特性的技術，主要是利用：光漂白後之螢光恢復 (fluorescence photobleaching recovery)、放射螢光之非等向性檢測<sup>[iii]</sup>、分子轉子的螢光放射強度、掃描式光鐳子之相位延遲、以及動態散射頻譜術。前三項技術均需外加螢光物質，可能因而導致生物流體本身的特性產生變化。

在本論文中，我們建立了差動共焦顯微術結合光鉗的實驗系統，並且以自行搭建的光學原型系統以及建立在倒立顯微鏡上的系統分別進行系統測試與量測。在微小球體捕捉與流體黏滯度量測的應用上，以差動共焦顯微術進行動態散射頻譜術的量測，觀察微球體在樣本液中的布朗運動所產生的散射光頻譜，藉以估計所採樣本之黏滯特性。在黏滯度較高的情況下，由於微球體布朗運動較不顯著，則以光鉗操控其運動，並依其響應推算黏滯度。

## 二、 原理與方法：

### 2.1 以光鉗及散射光頻譜研究微流變學

應用散射光頻譜術觀察流體中微粒的布朗運動，藉以估計流體的黏滯與彈力特性，以dynamic light scattering (DLS)與diffusion-wave spectroscopy (DWS)為立論基礎，由微球體在流體中的布朗運動軌跡，詮釋散射光擾動之頻譜；進而得到頻率範圍極寬的黏滯與彈力特性( $10^{-3}\sim 10^3$  rad/s)。由於微流變學研究所使用的樣本中，多半為高度散射的介質，因而這些研究的理論模型，泰半採DWS，而非單次散射為主之DLS理論。然而，利用DWS理論評估黏滯性必須奠基於事前對流體內散射參數的正確估計；而DLS則更可泛用於一般流體中。另一方面，B. Nemet等人則在微球體自身的布朗運動外，利用光鉗操控微球體、而達成顯微尺度的黏滯度造影術：利用共焦光鉗系統拖曳流體內的微粒，進行週期性的運動，並由散射的共焦訊號，計算微球體位移與光鉗運動間的相位延遲，以推估該區域的流體黏滯性；另方面，也可由此量測區域性的流體動態。

在大部份光鉗的應用中，光鉗的抓取能力，即焦點處所能產生的最大光學鉗住力，是一項最重要的數值，此值可用於評估一組光鉗所能使用的範圍及以及應用時的限制。若要利用光鉗作為光學作用力轉換器，則需進一步測量作用力的詳細分布，才能隨時監測光鉗對微粒的施力。此外，光學嵌住力與入射光束功率呈正比，一般為了方便描述光學嵌住效率，往往將嵌住力對雷射功率做歸一化，因此焦點處雷射功率的測量也是一項重要工作。

有關光學嵌住的理論模型已於第四章中介紹；而在實驗系統中測量光學嵌住力最常使用的方法是利用電動平移台，以一定速度拖曳樣本槽，帶動樣槽內的水，使水的黏滯力對被嵌微粒施力。根據 Stokes 定理，半徑  $r$  的光滑球體，在均勻流體中以  $v$  之速度移動時，球體所受黏滯力為

$$F = 6\pi\eta r v \quad (2-1)$$

因此，以馬達驅動平台拖曳樣本槽，將速度逐漸增加至微粒恰好脫離光鉗飄走，此時的速度即為逃脫速度 $v_c$ 。將 $v_c$ 帶入上式中求出 $F$ ，即為光鉗之最大嵌住力。

著眼於微觀流體系統中的黏彈特性探討，並根據流體特性的差異採用不同的技術分析其黏滯特性。針對黏滯度在一定範圍內( $\eta < 10$  cp)的生物流體，可對流體內微球體的布朗運動觀察，並根據動態散射頻譜術之理論推導出黏滯特性的估算。而對於黏滯度較高的樣本(以細胞膜周圍的黏度為例，其值約在 30~120 cp 間)，因小球在流體內的布朗運動較不顯著，則改以光鉗拖曳微球體，觀察微球體相對位移的速度及相位延遲，由此推估黏滯係數。

接下來簡介流體的黏彈特性以及布朗運動的模型。

### 2.1.1 流體的黏滯特性

對流體而言，其主要功能特性包含了彈性及黏滯度。若以一剛性的小球作為探測體，依其受力與位移的關係 $x(\omega) = \alpha(\omega)f_\omega$ 作流體黏滯特性的分析。其中， $f_\omega$ 為受力大小， $x(\omega)$ 為位移量；而 $\alpha(\omega)$ 則為一複數響應函數。則

$$\alpha(\omega) = \frac{1}{6\pi \cdot G(\omega) \cdot a} \quad (2-2)$$

其中 $a$ 為小球的直徑，而 $G(\omega)$ 則為與頻率相關的應力模數：

$$G(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (2-3)$$

而 $G'(\omega)$ 與 $G''(\omega)$ 分別為儲存模數(彈性項)與損耗模數(黏滯項)。對純黏性液體來說， $G = -i\omega\eta$ ( $\eta$ 為流體的黏滯度)，即可由此推演出 Stokes 定理之公式((2-1)式)。

### 2.1.2 微球體於流體中的布朗運動

在流體中，由於熱擾動所造成流體局部密度及濃度變化，使得懸浮於流體中的微粒作布朗運動。其運動模式，可以 Langevin 方程式表示：

$$m\dot{v}(t) = f_R(t) - \int_0^t \eta(t-t')v(t')dt' \quad (2-4)$$

其中  $m$  為懸浮粒子的質量， $v$  為其運動速度， $\eta$  為黏滯項，而  $f_R$  則為一高斯分佈、平均值為 0 之隨機變數。

布朗運動之激烈程度與液體之黏滯特性、溫度、及懸浮微粒大小有關，可以擴散係數  $D$  作為指標：

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2-5)$$

其中， $k_B$  為波茲曼常數， $T$  為環境溫度， $\eta$  為液體黏滯度， $a$  為微粒直徑。

### 2.1.3 微球體布朗運動與所產生的動態散射頻譜

為了計算散射頻譜與流體黏彈特性的關係，考慮在具有  $N$  個直徑為  $a$  的微球體的取樣空間內，入射一平面波；此入射波在遭微球體散射後所產生的電場為光檢測器所接收，

$$\vec{E}(t) = \sum_{j=1}^N \vec{E}_0 \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}_j - i\omega t] \quad (2-6)$$

為使問題簡化，考慮  $(\lambda/a) \gg 1$  的情形：此時  $\vec{E}_0$  僅與波長和微球體大小有關。而入射光受粒子散射之電場為  $E(t) = E_0 \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r} - i\omega t]$ ，其中  $\vec{q}$  為散射向量 ( $q = \vec{k}_o - \vec{k}_s$ ， $\vec{k}_o, \vec{k}_s$  分別表入射與散射波之波數)， $\vec{r}$  為微粒距參考點之位移。

加總後之強度為

$$I(t) = |\vec{E}(t)|^2 = |E_0|^2 \sum_{j,k} \exp[i\vec{q} \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_k)] \quad (2-7)$$

此強度  $I(t)$  會隨微球體的隨機移動所造成  $\bar{r}(t)$  的差異，作相應的變化。

為了描述此一變化，定義一機率函數  $P(\bar{r}', t'; \bar{r}, t)$ ，表示  $t$  時間位於  $\bar{r}$  處的物體於  $t'$  時出現在  $\bar{r}'$  的機率。由於此一機率與系統參考原點及時間無關，可將之表示為  $P(\bar{R}, \tau; 0, 0)$ 。其中  $\bar{R} = \bar{r}' - \bar{r}$ ， $\tau = t' - t$ 。此機率函數與微球體的大小、以及環境的黏滯度有關，可表示成

$$P(\bar{R}, \tau; 0, 0) = (4\pi D\tau)^{-3/2} \exp[-R^2 / 4D\tau] \quad (2-8)$$

其中  $D$  即為前一節所提之擴散係數。而其所相應之散射功率頻譜  $S(\omega)$  為

$$\begin{aligned} S(\omega) &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \iint I^*(t') I(t) e^{-i\omega(t'-t)} dt' dt \\ &= \int P(\bar{R}, \tau; 0, 0) S(\omega) d^3 \bar{R} \end{aligned} \quad (2-9)$$

由此，微粒群在流體中的布朗運動，會造成散射頻譜上一近似羅倫茲函數之分布(Lorentz function distribution)，

$$\langle S(\omega) \rangle = |E_o|^4 \left\{ 2\pi\delta(\omega) + \frac{4Dq^2}{(2Dq^2)^2 + \omega^2} \right\} \quad (2-10)$$

即可依此函數對訊號頻譜進行曲線擬合(curve fitting)，計算其對應之羅倫茲分佈。由另一種分析來看，當小球被光鉗所捕捉時，可視為一個二次諧波的位能井：

$$U_{(grad)} = \frac{1}{2} k \cdot r^2 \quad (2-11)$$

若將(5-4)式的 Langevin 方程式以另一種形式表示

$$m\ddot{x} = -\gamma\dot{x} - kx + F(t) \quad (2-12)$$

其中  $-\gamma\dot{x}$  代表黏滯力 ( $\gamma = 6\pi\eta a$ )， $kx$  代表光鉗位能井的彈力常數，而  $F(t)$  表示水分子布朗運動的隨機力。

若液體黏滯係數極低時，粒子的運動在各個時間中都很接近終端速度，由於量測或估算的時間通常遠大  $\tau = m/\gamma$  (一般實驗條件下， $\tau$  約為



$10^{-7}$  sec上下)，此時Stokes定理((2-1)式)近乎理想描述了小球的運動模型，而(2-12)式中的慣性量  $m\ddot{x}$  可以不被考慮。接著對(2-12)式兩側取傅立葉轉換

$$0 = -2\pi i \gamma f \bar{x}(f) - k \bar{x}(f) + F(f) \quad (2-13)$$

其中  $F(f)$  是屬於理想的白色雜訊(white light noise)。

由  $\overline{F(t)} = 0$ ， $|F(f)|^2 = 4\gamma k_b T$ ，則微粒陷在光鉗中的功率頻譜密度函數

$$P(f) = |\bar{x}(f)|^2 = \frac{|F(f)|^2}{(2\pi r^2)} \cdot \frac{1}{f^2 + f_c^2} = \frac{K_B T}{\gamma \pi^2 (f^2 + f_c^2)} \quad (1-14)$$

其中  $f_c \equiv \frac{k}{2\pi\gamma}$  ( $\gamma = 6\pi\eta a$ )。

因此，由功率頻譜密度分佈的截止頻率，可以得到小球直徑、液體黏滯係數和光鉗彈簧常數的關係。

## 2.1.4 以光鉗操控小球的微流體黏滯度分析

在黏滯度較高的液體中，或者是直徑較大的小球，其布朗運動相對不顯著，其散射頻譜之主要訊號落於低頻，受  $1/f$  雜訊影響較大；且函數擬合所得之羅倫茲頻寬甚窄，影響以動態散射頻譜術作黏滯度估計之準確性。因此可以利用光鉗，操控流體內的微球體，使之成週期性運動，並以其受力後的響應作為估算黏滯度的指標。

微球體之運動方程式可以下式表示：

$$6\pi\eta a \frac{dx}{dt} + \kappa[x - p(t)] = L(t) \quad (2-15)$$

其中  $x$  為小球位置， $\eta$  為流體的黏滯度， $a$  為微球體直徑， $p(t)$  為光鉗的中心位置， $\kappa$  表光鉗的彈力常數。而  $L(t)$  則是 Langevin 函數，描述布朗運動所受之隨機力；在此，由於其相對量值較小，可忽略其影響。

若我們設定光鉗使之作振幅  $a$ ，週期  $T$  的掃描(亦即  $p(t) = a \sin(\omega t)$ )，

$\omega = \frac{2\pi}{T}$ )，則微球體亦會以相同頻率作週期運動，但受黏滯力影響，其位置變化會有一相位延遲  $\phi$ 。由於  $\phi$  為光鉗的彈力常數與黏滯係數的函數，而光鉗的彈力常數為已知，即可從而推估流體於該空間內的黏滯度。

由以上描述，顯示了可以共焦信號及位移檢測為基礎，建構小球在流體中的光鉗式分析平台；量測小球位於光學嵌住的位能井中的散射頻譜或微球體位移相對於光鉗移動的相位延遲，進而達成微觀尺度的黏滯度分析。

## 2.2 內嵌光鉗差動共焦顯微鏡的架設

為了量測小球位於光學嵌住的位能井中的散射頻譜或微球體位移相對於光鉗移動的相位延遲，本論文搭建了兩種不同形式的內嵌式光鉗差動共焦顯微鏡。其中一種是在差動共焦顯微鏡上增加波長 1064 nm 波長的紅外線雷射光源，聚焦光路與原有 633 nm 氬氫雷射光源整合，也就是建立一套正立的反射式差動共焦訊號偵測架構，並量測了小球在光鉗下的最小捕捉力以及橫向位移動態分析。

而為了能夠量測散射的穿透訊號以及使光鉗的聚焦方向由下往上，我們也建立了以倒立式顯微鏡為主體的內嵌光鉗差動共焦顯微鏡，並結合位移偵測元件（四象限光二極體），進行小球的三度空間定位量測校正，以及微球體的在光鉗捕捉之下的動態頻譜圖。

### 2.2.1 以原型系統為平台的實驗架構

以高穩定度的氬氫雷射作為光源，並具有極高的系統訊噪比，經過測試與驗證，具有奈米級的縱向解析率。只要在光路上增加光鉗的大功率雷射光源，並將光鉗的雷射光束與原有光路整合，即可成為一套內嵌光鉗差動共焦顯微鏡。以未來可能捕捉生物樣品的緣故，系統選擇了波長 1064 nm 波長的紅外線雷射光源(CrystaLaser, IRCL-100-1064-L)，並將紅外線雷射光

束經由具波長遠選擇性的分光鏡(dichroic beamsplitter)導入 633 nm 的雷射光路。系統架構如圖 2-1 所示。

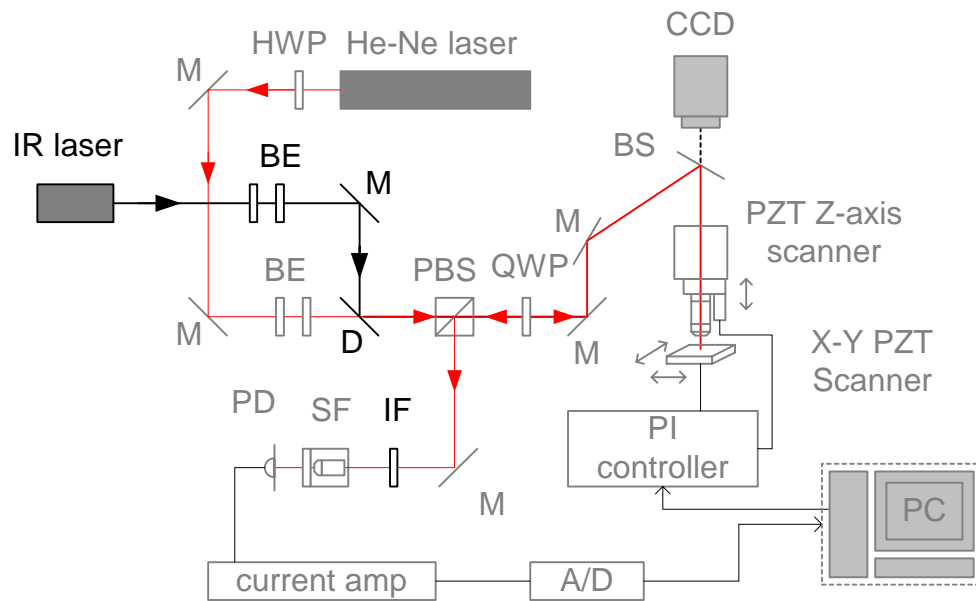


圖 2-1：以正立式差動共焦顯微鏡結合紅外線雷射光源的光鉗系統示意圖。

由圖 2-1 中可以看出，新增的元件除了紅外線雷射光源、反射鏡與分光鏡，另外就是一組供紅外線雷射光束擴束的擴束器 (beam expander, BE)，以及在回饋信號光路上的干涉式濾波片(interference filter, IF)。擴束器的原理於第四章已有描述，主要的作用就是讓光束半徑與聚焦物鏡的入射光瞳(entrance pupil)半徑相等，以獲得最大的聚焦角度。而光鉗實驗中，光鉗力量的大小與聚焦的立體角極為相關，因此擴束器與聚焦物鏡的匹配在光鉗光路的搭設上相當重要。而偵測光路上新增的濾波片是為了避免高功率的紅外線雷射光束在系統中所產生的雜散光，以及樣品表面反射、散射的紅外光訊號，被偵測器偵測到而影響了差動共焦訊號的品質。而由於 1064 nm 的紅外線雷射光源的波長與 633 nm 光源的波長相差近一倍，因此在小球附近聚焦時，焦點的高度必然會不同。然而差動術共焦顯微術的特點之一，是工作高度偏離物鏡焦點一定的距離；而第三章中提到光鉗的捕捉力量在焦點前方（以正立式光鉗而言，就是焦點的下方），因此紅外光雷射捕捉小球的最佳位置會在紅光雷射光束聚焦位置的下方，若採用大

小適中的小球，使其位置落在紅外線光束聚焦捕捉力量的最大處，而同時小球表面高度又落在差動共焦顯微鏡工作的共焦訊號線性反應區之內，那麼就可以順利量測到縱向位移的動態頻譜。而利用原有的三維壓電驅動平移台裝置，可以進行小球的移動與捕捉，並且量測橫向或縱向捕捉力量。而為了避免紅外線雷射光束的功率衰減，觀察小球的方式不再以 CCD 同步觀察（因為分光鏡會將部分功率耗損），而利用樣品平台下方的空間，進行散射光的投影觀測，如圖 2-2 所示。



圖 2-2：以正立式差動共焦顯微鏡結光鉗捕捉小球時的散射光投影照片。

一般市售小球的大小從數十微米、數微米到數十奈米都有，而材質包括了透明塑膠、玻璃與金屬等等。以數微米等級的透明小球來說，在顯微鏡下的散射投影，可以很容易的用來觀察小球被捕捉的情形。但由於平台下方的空間有限，無法搭設穿透式的散射光訊號偵測光路與裝置。若我們要量測小球的橫向位置達到奈米等級，必須採用位移檢測元件（如 quadrant photodiode, QPD），並配合放大電路使用。然而一般小球反射訊號相較於穿透訊號小了非常多，我們也嘗試在反射訊號的光路上搭設位移檢測元件，但量測品質無法提供所要的規格。而正立式光鉗雖然在架設上較為簡單，但是在 3.5.4 小節中提到此種架構的兩個主要的缺點：(1) 微粒通常沉在樣本槽底部，光鉗由上而下抓取，使聚焦雷射入水較深，水中雜質與物鏡像差將影響光鉗品質。(2) 由於光壓作用機制之故，微粒的平衡位置略偏向焦點之前，換句話說，操控微粒時向前推要比向後拉穩定。而正立式光

鉗必須向後拉以抵抗微粒重量的嵌住方式，操作時微粒較為不穩。因此我們建立了倒立式的內嵌光鉗式差動共焦顯微鏡，並詳述於下一小節中。

### 2.2.2 以倒立式顯微鏡為平台的實驗架構

倒立式顯微鏡在從被發明至今，被廣泛的運用在生命科學或流體力學等領域。倒立式顯微鏡的最大特色，就是聚焦物鏡由樣品平台下方向上聚焦觀察樣品，因此樣品上方可以作為其他工具的操作空間，而一般細胞或液體中的樣品會因為重力而沈於樣品槽（譬如蓋玻片與載玻片的中間空間）的底部，因此若將樣品的蓋玻片朝下，物鏡與所觀察樣品的距離將會比正立式顯微鏡來得短，這對於大數值孔徑物鏡的短工作距離而言，是極大的優點。此外，由於物鏡在樣品下方觀測，若觀察開放性（未包埋或封裝）的液體樣本時，可以直接由樣品下方觀測，不需如正立式顯微鏡一般必須將物鏡前端伸入液體中，除了增加浸入式物鏡的採購成本，並且成像品質較差。

此外，倒立式顯微鏡的物鏡架構設計由下往上，因此主體的光路結構較正立式顯微鏡來得低，機械結構設計也因此較正立式為更穩固。在增加使用者便利性方面倒立式顯微鏡的設計架構比較容易增加光路於顯微鏡系統之中，一般研究級的倒立顯微鏡通常會有三至五個光路（或光埠，optical port）可以使用，除了給使用者觀察的目光埠(eye port)，以及供 CCD 或影像擷取元件使用的上光埠 (upper port) 之外，還有通常供相機使用的前光埠(front port)，供螢光光源使用的後光埠(back port)，以及供其他光源或偵測器使用的側光埠(side port)，甚至有些具有底光埠(bottom port)。圖 2-3 則展示了以 IX 70 為平台，所搭建的倒立式內嵌光鉗差動共焦顯微鏡系統的架構示意圖。

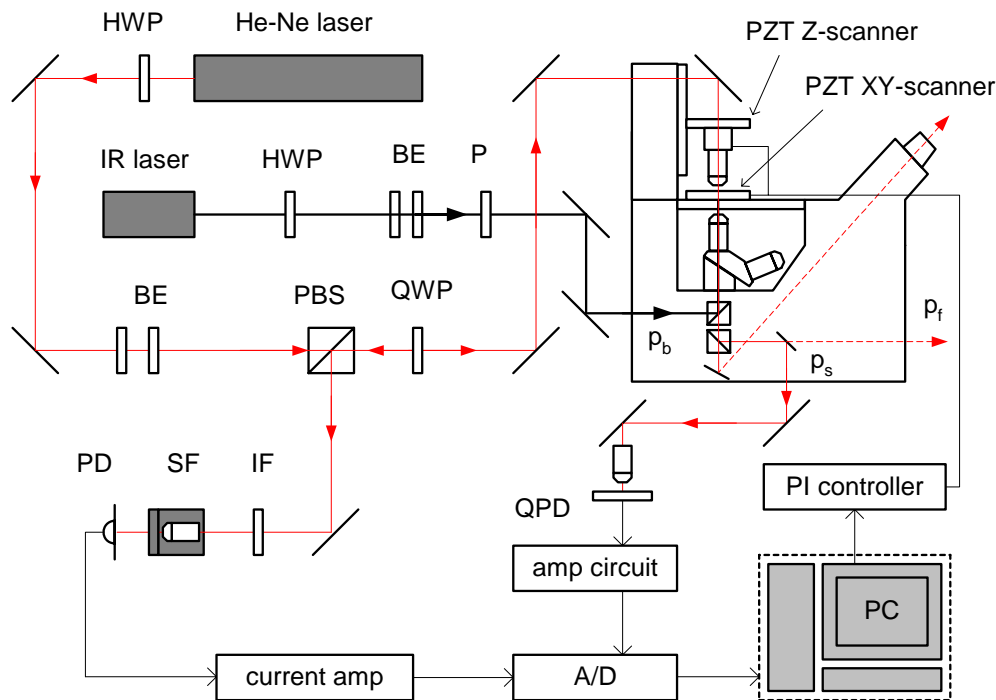


圖 2-3：結合光鉗與差動共焦顯微鏡架設於倒立顯微鏡的系統架構圖。為了讓標示簡化，除了特別標示的光學元件外，光路中不標示的反射元件都是反射鏡。而 $p_b$ ， $p_s$ ， $p_f$ 分別代表倒立顯微鏡的後光埠、側光埠及前光埠。

如圖 2-3 右上角所示，樣品置於 IX 70 的平移台上，因此可以利用倒立顯微鏡的物鏡進行光鉗的聚焦。而由於樣品下方的鼻輪與觀測平台間的空間不足，差動共焦顯微鏡所需要的壓電驅動平移裝置必須安置於觀測台的上方空間，因此在樣品上方設置了另一個聚焦物鏡以及機械結構。這樣設計雖然在架設與對光（兩物鏡需要同時垂直對準並調整聚焦位置）時較為困難，但可提供差動共焦顯微鏡的搭設需要，並且這樣架設方法提供了使用上的彈性，也就是系統可以調整導光鏡的光路，讓紅外線雷射光束可以從樣品的下方或者上方聚焦，甚至可以產生雙光束嵌住的架構。另外雙物鏡的設計，使得小球的穿透散射訊號可以被觀測到，利用該顯微鏡多道的光路彈性，可以將穿透散射訊號投影至位移檢測元件（如 QPD）上，而系統使用了側光埠來收集穿透散射訊號。圖 2-4 至圖 2-7 展示了系統架構上的部分照片。



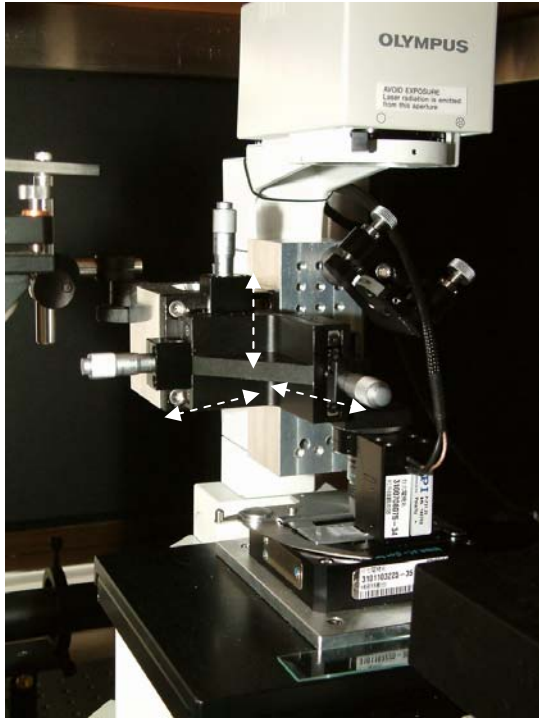


圖 2-4：樣品上方物鏡的導光元件以及自行增建的物鏡三維平移台架構。

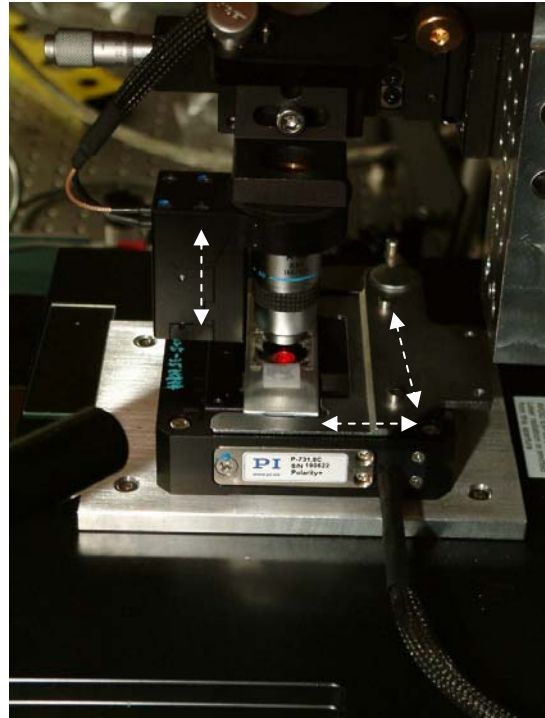


圖 2-5：樣品平移台上的二維壓電平移台以及物鏡的單軸壓電驅動裝置。

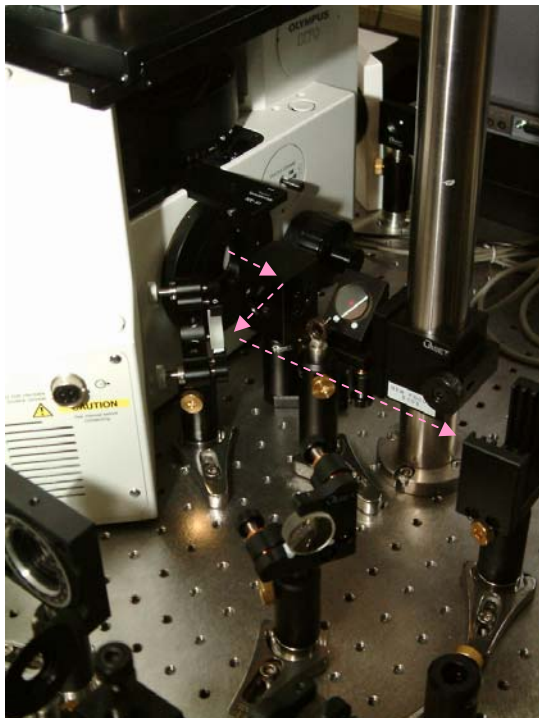


圖 2-6：樣品的穿透散射訊號由顯微鏡側光埠投射，再導光至偵測元件。



圖 2-7：紅外線雷射光束經擴束與抬升後，由後光埠導入至物鏡處聚焦。

### 2.2.3 液體中小球樣品的製備

系統所使用的小球樣品是Bangs Lab. Inc. 所生產的Silica bead，平均直徑為 5.08  $\mu\text{m}$ ，並以二次去離子水稀釋至  $10^{-3}$  至  $10^{-5}$  的重量百分比濃度使用。在進行正立式架構的實驗時，直接使用一般的載玻片，滴上 20  $\mu\text{l}$  至 30  $\mu\text{l}$  的樣品溶液，蓋上蓋玻片之後，在蓋玻片邊緣塗上透明指甲油。經共焦顯微鏡的反射訊號量測，這樣製作出來的樣本，上下玻片之間的空間高度大約為 15  $\mu\text{m}$  至 50  $\mu\text{m}$  不等，非常不一致。

而參考了其他實驗群的作法<sup>[iv]</sup>，在上下玻片之間增加塑膠薄膜或是玻璃紙的厚度，並在蓋上玻片之後稍微加壓，那麼每次製作出來的樣品厚度會比較一致。塑膠薄膜或玻璃紙的厚度可以在反覆折疊後，量得一定張數厚度並加以平均，可量得三種不同薄膜的厚度分別約為 20  $\mu\text{m}$ 、30  $\mu\text{m}$ 、50  $\mu\text{m}$ 。

由於新增了一層薄膜，樣品製作的程序有些不同。在下層的玻片上，先塗上薄薄一圈方形的指甲油，趁未乾之前將事前裁切好的方形框狀薄膜固定在玻片上，接著在沿著薄膜再塗一圈透明指甲油，然後滴上 20  $\mu\text{l}$  至 30  $\mu\text{l}$  的樣品溶液，蓋上蓋玻片之後，利用兩片載玻片加以略微施壓，使指甲油與薄膜之間能夠密合。樣品備製前的薄膜裁切與製作好的樣品，如圖 2-8 與圖 2-9 所示。

在圖 2-9 左方，則是為了雙物鏡架構所設計的樣品放置片。由於光鉗或差動共焦顯微鏡需要大數值孔徑物鏡的聚焦，而其工作距離極短，若小球樣品上下玻片中有一面是載玻片，則無法使用短工作距離的大數值孔徑物鏡。而長工作距離的物鏡成本較高且效果不如正常工作距離的物鏡，因此我們在製作樣品上，改採上下兩面皆為蓋玻片（22 mm x 22 mm，厚度 170  $\mu\text{m}$ ）的架構，並為了此種樣品設計了鋁製放置片，除了在表面設計剛好與樣品大小相符的凹槽之外，並以膠帶將樣品加以固定。



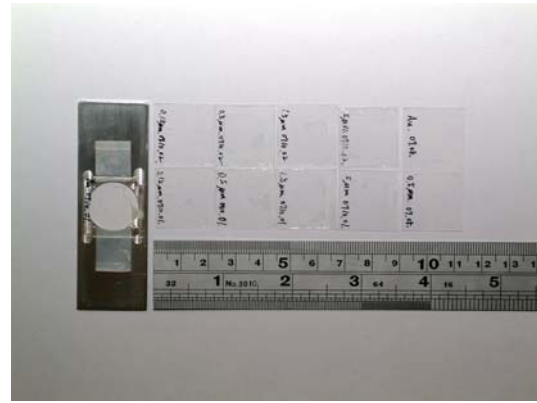
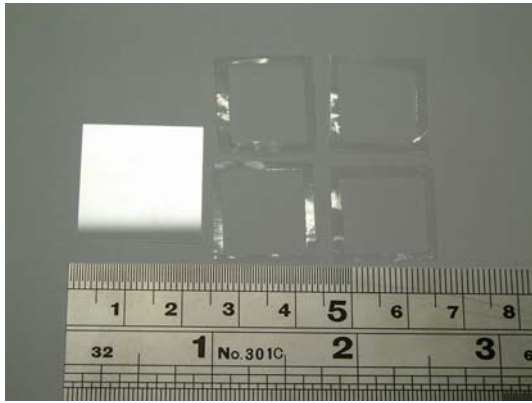


圖 2-8：蓋玻片與裁切過的塑膠薄膜。 圖 2-9：樣品放置片以及數枚樣品。

### 三、 結果與討論

#### 3.1 三維定位校正

首先進行三維定位校正，以換算 QPD 訊號輸出與樣品橫向位移之間的關係，並確認系統的三度空間解析率。校正實驗使用  $5\ \mu\text{m}$  的小球為樣品，將小球溶液滴上玻片，於乾燥後置於樣品平移台上進行量測。將小球的空間位置調整至下方物鏡(40X,  $\text{NA} = 0.85$ )的聚焦點，讓穿透散射訊號投射到 QPD 的正中心，然後微調上方物鏡(40X,  $\text{NA} = 0.65$ )，使得上下兩枚物鏡同時聚焦在小球的位置上。以縱向壓電驅動器微調上方物鏡的高度，使共焦訊號落在線性區域，並利用 QPD 所搭配的二維平移台，一邊讀取 X 與 Y 的差動位置訊號，一邊微調 QPD 的空間位置，使得小球的散射光投影正好落在 QPD 的中心 (X 及 Y 訊號皆為零)，並且調整 QPD 前方的物鏡，使得投影直徑約為 QPD 直徑的二分之一 (此投影量大小可以有最好的橫向解析率)。

以壓電驅動平移台對小球作 X-Y 軸方向的掃瞄，一次掃瞄一軸，第三次則移動 Z 軸的壓電驅動器。掃瞄的點距是  $10\ \text{nm}$ ，以小球原始位置為起點定義，掃瞄範圍為  $-10\ \mu\text{m}$  至  $10\ \mu\text{m}$ ，每次共 2000 點。掃瞄時同時量測投影至 QPD 的橫向位移訊號 (系統直接讀取 A、B、C、D 四個輸出值，可以微調權重，並進行 X 與 Y 值的計算) 以及小球表面反射的差動共焦

訊號。

圖 3-1 中，二維驅動平移台掃瞄 XY 兩軸的結果顯示，小球位置的投影量可以作為二維定位的依據，也就是 QPD 確實可以偵測到小球的橫向空間移動。而系統對橫向位移量測的線性區域約為  $1\ \mu\text{m}$ ，經過歸一化的訊號雜訊分析（如圖 3-2 所示），可以得到小球的 X、Y 兩軸位移訊號，動態範圍內的其線性回歸均方根誤差與解析率如表 3-1 所示。而圖 3-3 呈現了 Z 軸掃瞄結果，線性區域的歸一化線性回歸圖如圖 3-4 所示。由圖 3-3 可以看出小球的雙層反射訊號，而量測的線性動態範圍與均方根誤差於表 3-1 中。

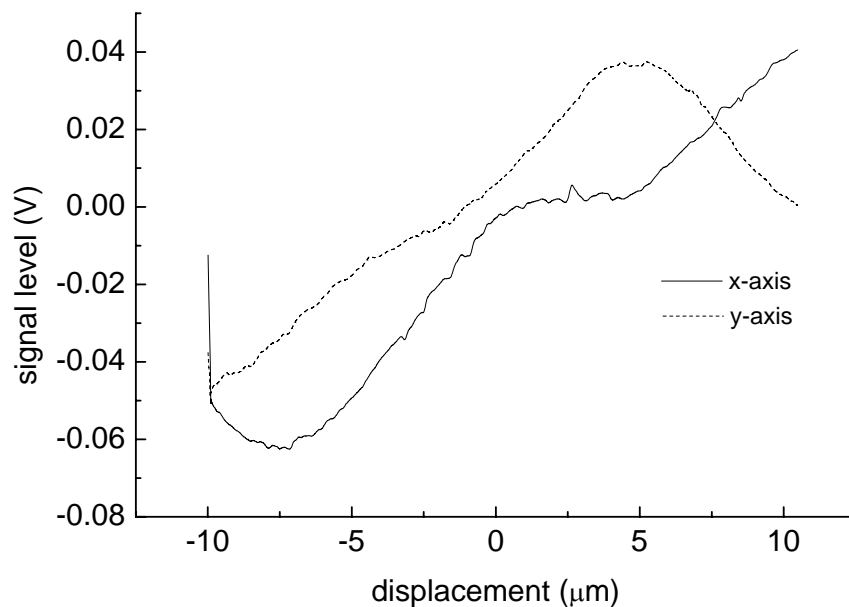


圖 3-1：以小球進行橫向定位校正的掃瞄結果圖。

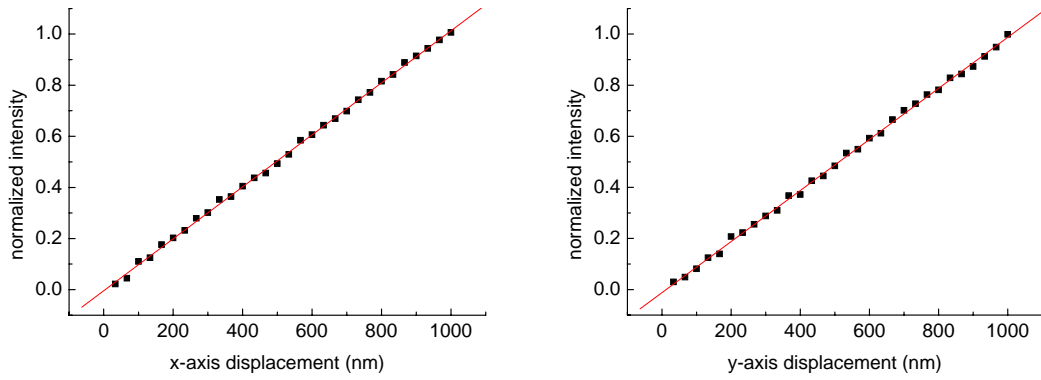


圖 3-2：圖 3-1 中兩軸位移線性區的線性回歸圖，左方為 X 軸，右方為 Y 軸。

表 3-1：校正掃瞄所得的三軸動態範圍與解析率。

axis	dynamic range	$\Delta E_n$	resolution
X	1 $\mu\text{m}$	7.8 %	8 nm
Y	1 $\mu\text{m}$	10.1%	10 nm
Z	1 $\mu\text{m}$	4.5 %	5 nm

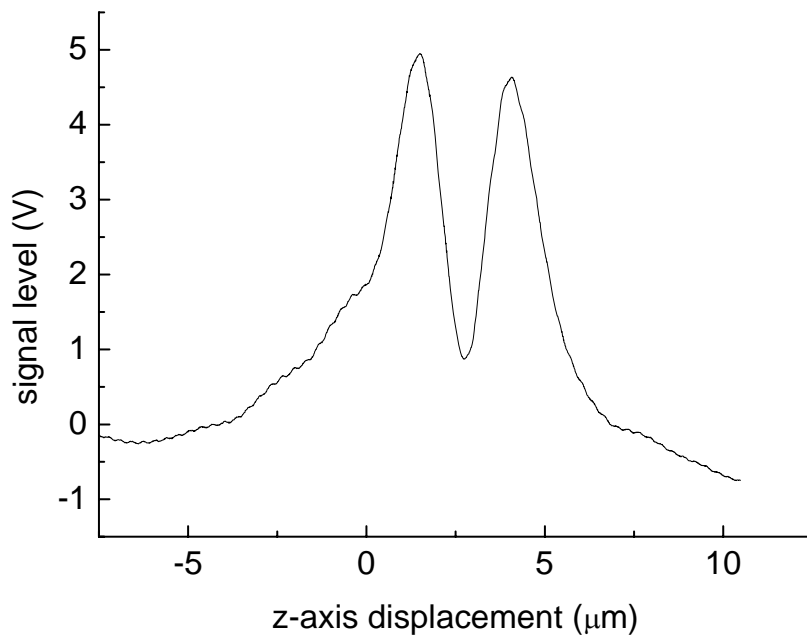


圖 3-3：以小球進行縱向定位校正的掃瞄結果圖。

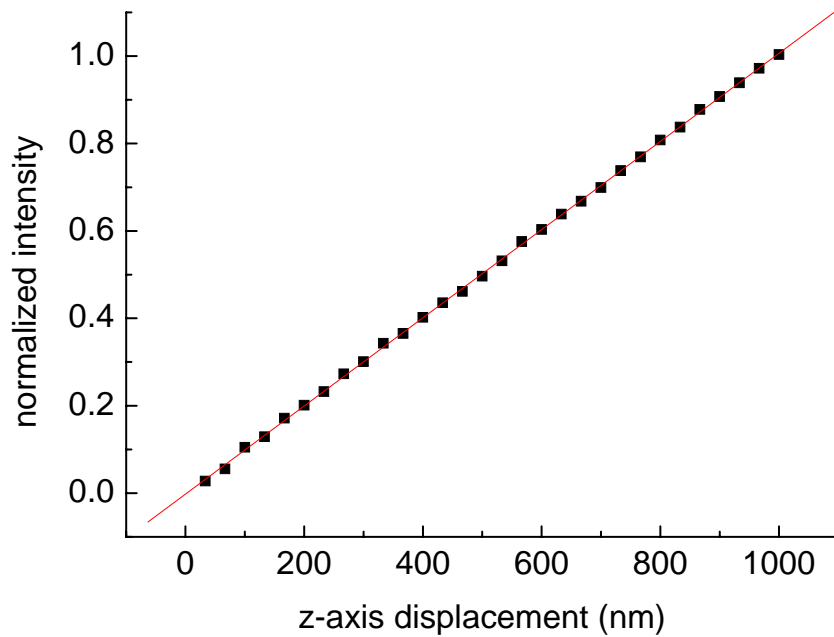


圖 3-4：圖 3-3 中縱向位移線性區的線性回歸圖。

由上述的校正結果可已得到 X、Y、Z 三軸的解析率分別為 8 nm、10 nm 與 5 nm，同時三軸都具有 1  $\mu\text{m}$  的動態範圍。以系統的訊噪比來說，這樣的結果還有改進的空間，尤其是 X-Y 方向，理論上可以達到 5 nm 甚至更好的橫向解析率，若採用更高倍率的物鏡，並將四象限光二極體的放大電路加以修改，根據文獻，類似的系統架構，單純以四象限光二極體的偵測元件方式，配合偵測器前方的適當光圈與放大物鏡，可以達到 3 nm 以下的三度空間解析率。

### 3.2 光鉗縱向力的量測與分析

接著以正立式架構的光鉗來估計光鉗的縱向捕捉力（散射力）。在正立式的光鉗架構下，小球的最小被捕捉力（向上），應該等於重力（向下）減掉小球在液體中所受的浮力（向上），也就是

$$F_{\text{gravity}} - F_{\text{buoyancy}} \leq F_{\text{trap}} \quad (3-1)$$

而觀察小球在光鉗下的運動，並改變雷射功率（利用二分之波長板以

及極化分光器)，在光鉗幾乎無法移動小球時，此時小球所受的捕捉力即為最小的光鉗捕捉力。以實驗所量測的 5  $\mu\text{m}$  玻璃小球，體積  $6.86 \times 10^{-17} \text{ m}^3$ ，折射率 1.5，密度約為 2 g/ml，重量為  $1.37 \times 10^{-13} \text{ kg}$ 。而以  $\text{NA} = 0.85$  的物鏡計算，球內的折射角為  $34.5^\circ$  左右。

由以上資料計算可得  $F_{\text{gravity}} = 1.34 \times 10^{-12} \text{ Nt}$ ， $F_{\text{buoyancy}} = 6.72 \times 10^{-13} \text{ Nt}$ ，因此

$$F_{\text{trap (min)}} = 6.67 \times 10^{-13} \text{ Nt} \quad (3-2)$$

可以捕捉到小球的最小聚焦後雷射功率為 2 mW

$$\bar{F} = Q \frac{n\bar{P}}{c} \quad (3-3)$$

並將  $n = 1.33$  與  $c = 3 \times 10^8 \text{ m/s}$  帶入，可得正立式光鉗的  $Q$  值為 0.075。

$\text{NA} = 0.85$  的空氣物鏡最大的  $Q$  值為 0.2。與實驗結果約有 2.6 倍的差距。造成誤差的原因包括了正立式的架構下，聚焦點入水較深，且由於使用空氣物鏡的關係，會有球面像差以及空氣至玻璃的反射問題。後者可以使用浸油物鏡，在物鏡前端與蓋玻片之間滴入物鏡專用油（折射率與物鏡及蓋玻片材質的折射率接近），使得聚焦後的光束在通過物鏡前端與蓋玻片之間不會有反射的問題。但是不論是空氣物鏡或浸油物鏡，由於正立式光鉗的聚焦點深度較深，都必須考慮光束入水後，因折射率不匹配而產生的球面像差問題。

在一般實驗條件下，空氣折射率為 1，玻璃（蓋玻片）與物鏡油大約為 1.515，水（小球溶液）為 1.33。由於光束經物鏡聚焦至蓋玻片前與穿過蓋玻片的物質折射率未必相同，因此常會產生球面像差的問題。為了獲取大數值孔徑，常使用的浸油物鏡，若與浸水物鏡相比，在對水中的聚焦點大小來說，後者具有更好的表現。圖 3-5 中展示了浸油物鏡與浸水物鏡對水中聚焦的球面像差示意圖。因此若要讓系統的光鉗效率提高，可以改採浸水物鏡。或者，使用倒立式的架構，讓光鉗可以聚焦在離下方玻片較近的位置，由於光束穿過水的部分較短，而使得球面像差問題較不嚴重。

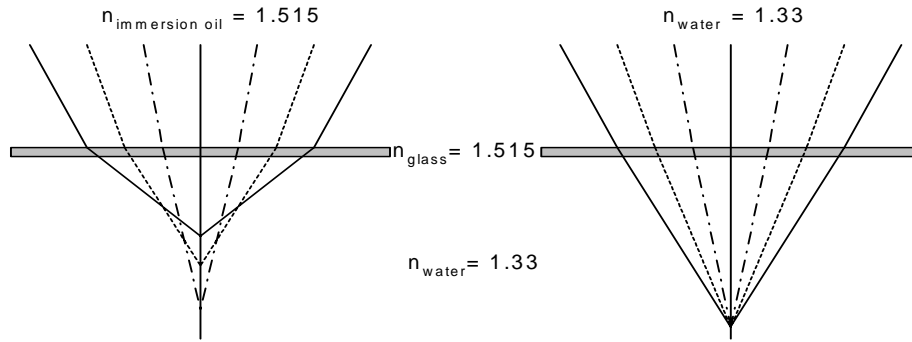


圖 3-5：浸油物鏡與浸水物鏡對水中聚焦的球面像差示意圖。

### 3.3 光鉗橫向力的量測與分析

小球在光鉗捕捉下，若將小球由光鉗下移開，那麼小球會在光鉗橫向力（梯度力）的牽引之下，回到光束的聚焦點位置；而小球的位置可以由差動共焦顯微鏡量測其反射訊號，以得知是否回到光束聚焦點位置。由回復到聚焦點的時間可以計算光鉗彈力常數 $k$ ，並以 $k$ 值來估計光鉗的橫向梯度力。以正立式架構進行估計光鉗的縱向捕捉力（散射力）。接下來進行小球的動態頻譜量測。使用直徑  $5\ \mu\text{m}$  的玻璃小球，去離子水稀釋至為  $10^{-5}$  重量濃度，而樣品製備程序如 5.2.6 所述。以 40X, NA = 0.85 的物鏡作為光鉗的聚焦物鏡與共焦反射訊號的收集物鏡。而光鉗的雷射光束功率在聚焦物鏡下為 20 mW（物鏡的穿透率為 40%，此時雷射光束在物鏡入射光瞳的功率為 50 mW）。實驗步驟如圖 3-6 所示：

- (1) 首先將小球捕捉在樣品位置中間，離上下玻片至少各  $10\ \mu\text{m}$  的位置。
- (2) 確定並調整小球的反射訊號強度，試著將小球以平移台拉離光鉗位置。
- (3) 將小球以固定距離從光鉗下拉開來回十次，紀錄其反射訊號並平均之。
- (4) 以不同雷射功率進行(2), (3)步驟。
- (5) 改變拉開距離，重複(1)至(4)步驟。

如以上步驟所述，而得到了如圖 3-7 與圖 3-8 的結果。

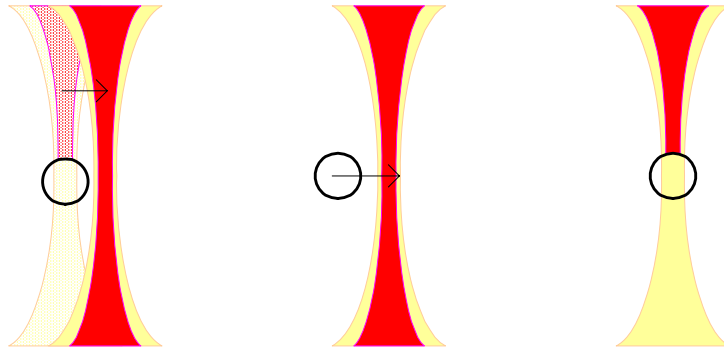


圖 3-6：將小球拉開後，小球回復至聚焦位置的實驗示意圖。

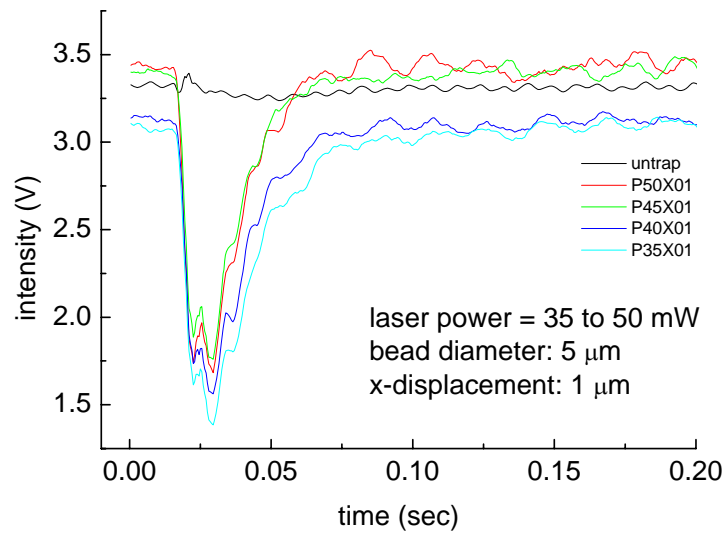


圖 3-7：以 1  $\mu\text{m}$  距離拉開小球，在回復過程中所得到的共焦反射訊號圖。

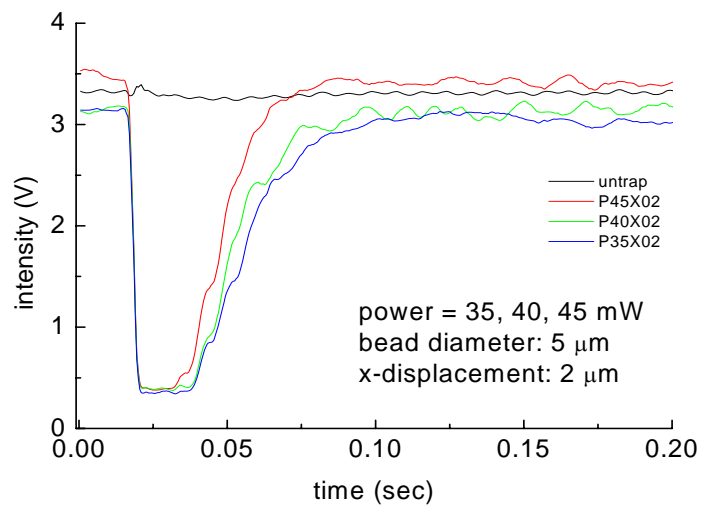


圖 3-8：以 2  $\mu\text{m}$  距離拉開小球，在回復過程中所得到的共焦反射訊號圖。

如同 2.1.4 節所述，當小球被光鉗所捕捉時，可視為一個二次諧波的位能井：

$$U_{(grad)} = \frac{1}{2}k \cdot r^2 \quad (3-4)$$

而(2-12)式的運動方程式  $m\ddot{x} = -\gamma\dot{x} - kx + F(t)$ ， $-\gamma\dot{x}$  代表黏滯力( $\gamma = 6\pi\eta a$ )， $kx$  代表光鉗位能井的彈力常數， $F(t)$  表示水分子布朗運動的隨機力。由於小球被拉離的距離遠大於布朗運動所造成的擾動，因此可將  $F(t)$  項忽略。也就是

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = 0 \quad (3-5)$$

而彈力常數  $k$  值可由小球的回復時間（以訊號強度回到 90% 的時間長度來估計）而估算，如表 3-2 所示（表中所標示的雷射功率為入射光瞳處的量測值，聚焦後在物鏡下約為此功率的 40%）。

表 3-2: 小球在光鉗功率改變下，由往復訊號所得到的彈力常數  $k$  (單位為 Nt/m)。

laser power displacement	35 mW	40 mW	45 mW	50 mW
1 $\mu\text{m}$	$1.81 \times 10^{-5}$	$2.06 \times 10^{-5}$	$2.24 \times 10^{-5}$	$2.51 \times 10^{-5}$
2 $\mu\text{m}$	$1.56 \times 10^{-5}$	$1.78 \times 10^{-5}$	$1.92 \times 10^{-5}$	NA

由表 3-2 所列的彈力常數  $k$ ，可以繼續推估出光鉗的橫向梯度力

$$\begin{aligned} F_{k@1\mu\text{m}} &= -kx = 2.51 \times 10^{-5} \text{ Nt/m} \cdot 1 \times 10^{-6} \text{ m} \\ &= 2.51 \times 10^{-11} \text{ Nt} \rightarrow (F_{\text{gradient(max)}@1\mu\text{m}}) \end{aligned} \quad (3-6)$$

$$\begin{aligned} F_{k@2\mu\text{m}} &= -kx = 1.92 \times 10^{-5} \text{ Nt/m} \cdot 2 \times 10^{-6} \text{ m} \\ &= 3.84 \times 10^{-11} \text{ Nt} \rightarrow (F_{\text{gradient(max)}@2\mu\text{m}}) \end{aligned} \quad (3-7)$$

而由 3.2 的量測所得的縱向力（散射力） $Q$  值，可以得到

$$F_{\text{scattering(max)}} = 6.67 \times 10^{-12} \text{ Nt}$$



若與上述兩個不同拉離位置的橫向梯度力相比，的確符合在光鉗成立時，橫向梯度力必須大於縱向散射力的條件。也驗證了本系統具有量測橫向與縱向光鉗力大小，以及利用小球動態行為來估算彈力常數的能力。

### 3.4 動態頻譜的量測與黏滯度的估算

小球在光鉗捕捉下，由布朗運動所造成的動態頻譜，可以推算液體的黏滯係數。使用直徑  $5\ \mu\text{m}$  的玻璃小球，以去離子水稀釋至  $10^{-5}$  重量濃度，樣品製備程序如 5.2.6 所述。以  $40\times$ ,  $\text{NA} = 0.85$  的物鏡作為光鉗聚焦物鏡，而以  $40\times$ ,  $\text{NA} = 0.65$  的物鏡收集共焦反射訊號。光鉗的雷射光束功率在聚焦物鏡下為  $20\ \text{mW}$  至  $14\ \text{mW}$ （入射光瞳處為  $50\ \text{mW}$  至  $35\ \text{mW}$ ）。

為了取得  $1\ \text{kHz}$  的傅立葉轉換頻譜，取樣頻率至少需要  $2\ \text{kHz}$ ，而量測的取樣點數為  $2048$  點，每次遍測量連取十次。除了紀錄時域訊號，系統所開發的程式可以即時進行傅立葉轉換，得到十筆頻譜後加以平均，得到如圖 3-9 的小球在  $20\ \text{mW}$  功率的光鉗捕捉下的動態頻譜圖；圖下方為背景雜訊頻譜。由勞倫茲擬合曲線所得到的截止頻率(cut-off frequency)為  $86.3\ \text{Hz}$ 。

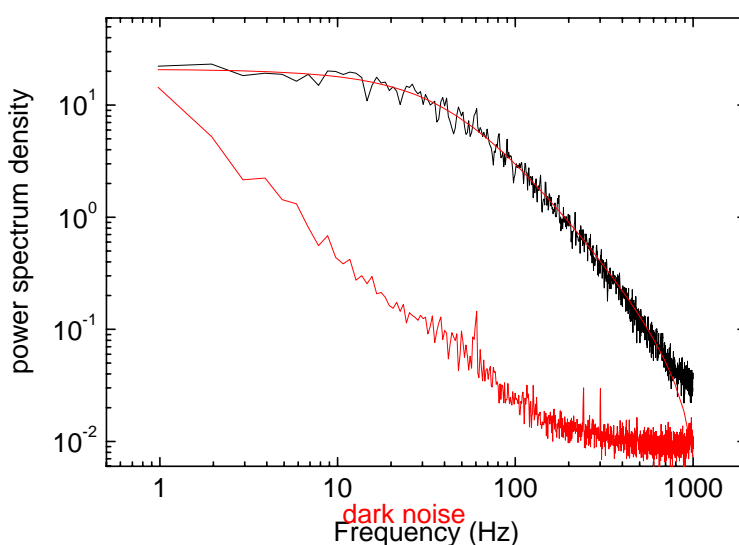


圖 3-9：以差動共焦顯微鏡量測  $5\ \mu\text{m}$  小球在光鉗捕捉下的動態頻譜。

上方是小球動態頻譜與勞倫茲分佈擬合曲線，下方是背景雜訊頻譜。

由 5.1.4 的推導，Langevin 方程式若以下面形式表示

$$m\ddot{x} = -\gamma\dot{x} - kx + F(t)$$

其中  $-\gamma\dot{x}$  代表黏滯力， $kx$  代表光鉗位能井的彈力常數，而  $F(t)$  表示水分子布朗運動的隨機力。若液體黏滯係數極低時，由 2.1.4 推導，最後可得則微粒陷在光鉗中的功率頻譜密度函數

$$P(f) = |x(f)|^2 = \frac{|F(f)|^2}{(2\pi r^2)} \cdot \frac{1}{f^2 + f_c^2} = \frac{K_B T}{\gamma \pi^2 (f^2 + f_c^2)}$$

其中  $f_c \equiv \frac{k}{2\pi\gamma}$ 。由  $\gamma = 6\pi\eta a$ ，可得液體的黏滯係數

$$\eta = \frac{\gamma}{6\pi a} = \frac{k/2\pi f_c}{6\pi a} = \frac{k}{12\pi^2 a \cdot f_c} \quad (3-8)$$

將小球 ( $a = 2.54 \times 10^{-6}$  m) 在不同功率的光鉗捕捉下，所得到的動態頻譜截止頻率  $f_c$ ，以及將表 5-4 所得的  $k$  值（以  $1 \mu\text{m}$  位移實驗來估計），還有兩者所得出的  $\eta$  值，列表如表 3-3 所示：

表 3-3：小球在光鉗功率改變下，由布朗運動所造成的動態頻譜截止頻率。

laser power	35 mW	40 mW	45 mW	50 mW
$f_c$ (Hz)	62.3	70.1	76.7	86.3
$k$ (Nt/m)	$1.81 \times 10^{-5}$	$2.06 \times 10^{-5}$	$2.24 \times 10^{-5}$	$2.51 \times 10^{-5}$
$\eta$ (Kg-s/m <sup>2</sup> )	$9.66 \times 10^{-4}$	$9.77 \times 10^{-4}$	$9.71 \times 10^{-4}$	$9.67 \times 10^{-4}$

將四種功率下所得水的黏滯係數加以平均，得到  $9.70 \times 10^{-4}$  Kg-s/m<sup>2</sup>。而在 70°F (21.1°C) 時，水的黏滯係數約為  $9.82 \times 10^{-4}$  Kg-s/m<sup>2</sup> [v]。若水溫以 21°C 估計，則誤差約 1.22%。實際上水溫若接近室溫 22°C，誤差將小於 1%（水的黏滯係數與溫度成負相關）。由此驗證了本系統可以得到相當精準的黏滯度估算。

### 3.4 結語

本研究建立了內嵌光鉗差動共焦顯微鏡，並分別架構了正立式與倒立式的架構。在正立式的架構中，我們量得了光鉗力量的  $Q$  值，並進行了位移偵測的實驗，利用小球動態行為來估算了光鉗的彈力常數，並估算了縱向與橫向光鉗力的大小。而在倒立式架構中，由於使用了四象限二極體進行橫向位移偵測，結合差動共焦顯微鏡的縱向解析率，可以得到對小球三度空間的定位量測。校正結果可已得到 X、Y、Z 三軸的解析率分別為 8 nm、10 nm 與 5 nm，同時三軸都具有 1  $\mu\text{m}$  的動態範圍。而量測小球在光鉗中同時受布朗運動擾動的頻譜訊號，勞倫茲分佈的擬合曲線截止頻率約為 86 Hz，可以推估水的黏滯係數，並與一般公認的標準值誤差約在 1% 左右，驗證了本系統可以小球的動態頻譜分析，得到相當精準的黏滯度估算。

### 參考文獻

- [<sup>1</sup>] T. G. Mason, H. Gang, and D. A. Weitz, “Rheology of complex fluids measured by dynamic light scattering,” *J. of Molecular Structure* **383**, 81 (1996).
- [<sup>2</sup>] T. G. Mason, H. Gang, and D. A. Weitz, “Diffusing-wave-spectroscopy measurements of viscoelasticity of complex fluids,” *J. of Opt. Soc. of Amer. A - Optics Image Science and Vision* **14**, 139 (1997).
- [<sup>3</sup>] D. J. Durian, “Accuracy of Diffusing-Wave Spectroscopy Theories,” *Phys. Rev. E* **51**, 3350 (1995).
- [<sup>4</sup>] G. Popescu, A. Dogariu, and R. Rajagopalan, “Spatially resolved microrheology using localized coherence volumes,” *Phys. Rev. E* **65**, 041504 (2002).
- [<sup>5</sup>] UDT sensors, Inc., 12525, Chadron Ave., Hawthorne, CA 90250, USA.  
Application Note: AN13 Non Contact Optical Position Sensing Using Silicon Photo Detectors, p.4  
([http://www.udt.com/Datasheets/App\\_Notes/app\\_notes\\_13.pdf](http://www.udt.com/Datasheets/App_Notes/app_notes_13.pdf)).

[<sup>6</sup>] 陳永昇，“光鉗的製作與其特性的瞭解”，國立成功大學，物理研究所，碩士論文，2001年7月。

[<sup>7</sup>] A. Rohrbach, H. Kress, and E. H. K. Stelzer, “Three-dimensional tracking of small spheres in focused laser beams: influence of the detection angular aperture,” *Opt. Lett.* **28**, 411 (2003).

[<sup>8</sup>] Absolute or Dynamic Viscosity of Water, from the web of The Engineering Tool Box: [http://www.engineeringtoolbox.com/21\\_575.html](http://www.engineeringtoolbox.com/21_575.html)

---