



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

暗視野架構下利用光色相差效應於微管道內快速偵測
流動樣本深度之應用

Rapid Detection of Flowing Objects in Microchannel

Utilizing the Chromatic Aberration Effect under a

Dark-field Illumination Scheme

研究生：蘇歆宇 Shin-Yu Su

指導教授：林哲信 教授 Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 101 年 7 月

July 2012



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

暗視野架構下利用光色相差效應於微管道內快速偵測
流動樣本深度之應用

Rapid Detection of Flowing Objects in Microchannel

Utilizing the Chromatic Aberration Effect under a

Dark-field Illumination Scheme

研究生：蘇歆宇 Shin-Yu Su

指導教授：林哲信 教授 Dr. Che-Hsin Lin

中華民國 101 年 7 月

July 2012

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

研究生蘇歆宇（學號：M993020027）所提論文

暗視野架構下利用光色相差效應於微管道內快速偵測流動樣本深度之應用

Rapid Detection of Flowing Objects in Microchannel Utilizing the Chromatic Aberration Effect under a Dark-field Illumination Scheme

於中華民國 101 年 7 月 9 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 徐瑞鴻 徐瑞鴻 委員 林哲信 林哲信

委員 蘇威宏 蘇威宏 委員 李晁遠 李晁遠

委員 _____ 委員 _____

指導教授(林哲信) _____ (簽名)

誌謝

蘇家小女兒是一個幸運兒。

幸運地擁有樂天知足的傻老爸、精明可愛的俏媽咪，還有毒舌卻善良的機車笨蛋老哥，聯手把這任性妄為的蘇家小女兒寵的無法無天。因為這蘇家的小女兒也幸運地擁有一點小聰明，所以作了很多讓老媽難過、老爸傷神的事情。

於是，蘇家小女兒決定離家探險。這段期間，幸運地認識很多夥伴和指路人，一起走過很多地方，一起因為發現而愉悅，也一起因為失去而難過。

蘇家小女兒長大了很多，也想了很多。最後，幸運地了解每個看似理所當然的日常，是世界上最重要、最需要珍視的東西。

現在這個嬌縱的蘇家小女兒，終於要回家了。

現在這幸運的蘇家小女兒，正在回家途中，老爸正曬好暖呼呼的被子、老媽正燒完香噴噴的飯菜、老哥正修完髒兮兮的檔車：他們都期待著蘇家小女兒的歸來。

感謝每個出現在我人生的妳(你)們，讓這我這份幸運變的更完整。

摘要

本系統旨為發展一利用色相差機制進行 Z 軸方向深度偵測系統。近年微全分析系統(Micro-Total-Analysis-Systems, μ -TAS)快速發展，利用微流道整合多種微機械系統之晶片大為盛行，其中微流道內流體行為甚為重要，尤其是管道內流動之固體樣本行為，更高度引發研究者的興趣。傳統檢測方法多利用流場可視化技術，此種方式對於 X-Y 平面之檢測非常有效，但對於流動樣本之 Z 軸方向行為卻無法進行有效評估。部分研究利用數值模擬的方法進行預測，或使用外部機械(如自動掃描平台等)進行管道內之 Z 軸成像掃描，但此方式之偵測速度較慢，無法適用於高流速流動物體之 Z 軸深度偵測。

本研究利用一典型物理光學：色相差效應，結合一物鏡式暗視野顯微鏡系統，當流動物體通過色相差所成的偵測區域，透過分析其特定散射光波長的強度差異，即可解析微流動樣本之 Z 軸方向位置。色相差(chromatic aberration)主要發生於光穿越不同折射系數的介質時，因不同頻率的光束具有不同的折射係數，因此各個光波長將聚焦於特定深度位置，而造成不同 Z 軸深度物體會散射相對應的波長。利用此種特性，可對於流動物體進行軸向深度的檢測。為驗證此一想法，本研究初步利用具備連續波長光譜的氬氣燈作為光源，並使用低阿貝數(Abbe number)之壓克力(PMMA)透鏡作為色散插件。透過正規化光訊號後，建立其零位面，並選取 450 nm 及 670 nm 兩波長訊號作為散射光訊號中藍光以及紅光區域的消長指標，並進行運算得到深度以及其短、長波長強度比例關係，並以此建立波長強度比與深度位置之檢量線。於動態偵測中，將偵測物鏡定於零位面，利用光譜儀記錄流動樣本之散射光譜，並對照該檢量資料線即可快速獲得樣本於微管道內之深度。

實驗成果顯示，使用 20X 偵測物鏡，並以 PMMA 為色散插件透鏡時，適用樣本尺寸為 20~5 μm ，且其線性偵測範圍為 $\pm 15 \mu\text{m}$ ($R^2=0.9779$)；使用高阿貝數透鏡 BK7 時，因色相差程度較低，所以可得到較高的尺寸解析度，並可適用於較小的粒子尺寸(2~5 μm)，及較小的深度偵測範圍(約 $\pm 10 \mu\text{m}$)。由於光譜儀之光敏感度較

低，致使可量測之粒子流動速率受限，實驗結果顯示使用光譜儀作為光偵測端系統，可量測流速小於 0.5 mm/s 粒子之深度。本研究為偵測更高流速之粒子，系統改以兩支雪崩式光電二極體作為偵測端，配合一低通濾鏡(CWL=450 nm, ± 20 nm) 及一高通濾鏡(CWL=650 nm, ± 20 nm)，並最佳化光檔插件後，建構一新光偵測系統，以提高可偵測之粒子速度。量測結果顯示，該系統可成功偵測流速為 4.167 mm/s 之流動樣本深度，且偵測範圍增大至 $\pm 25 \mu\text{m}$ ($R^2=0.9929$)，且解析能力(throughput)可達 126 particles/s。此系統並成功解析於流速約為 2.778 mm/s 環境下，人類紅血球深度位置之測定，其可偵測流速約為一般 micro-PIV 對紅血球進行偵測的 5-8 倍，證實此系統確實可運用於生醫應用範疇。

本篇研究利用普遍在光學系統中被視為是缺陷之色相差，將其轉化成適用於 Z 軸微距改變量偵測之優勢系統。其可運用於對微機構或流道構造之性能評估、微管道內粒子流動 Z 軸位置動態分析，並可應用於生物細胞、組織增生量測等定點靜態偵測，本研究所發展之創新光學系統將提供未來生物醫學及微流體系統研究更廣泛之應用。

關鍵詞：動態深度測量，色散效應，暗視野照明，微流道系統，微流式細胞儀

Abstract

This research mainly develops a new z-position measurement based on the chromatic aberration effect. An objective-type dark-field illumination scheme is built to produce diascope chromatic aberration light, and aimed to enhance the signal-to-noise ratio. The xenon lamp is adapted to create white light with continuous spectrum, besides, lens with low Abbe number is needed to extend the degree of chromatic aberration, so lens made of PMMA is as a chromatic aberration component. In the proposed system, the depths of samples in micro-channel is illuminated by the dispersed light and scatter the optical signals, which are captured by a low numerical aperture (N.A.) objective lens. After the simple normalization, the intensity ratio of two selected wavelengths 450 nm (blue light) and 670 nm (red light) from the scattered spectrum becomes a reliable index for the depth information of the detecting objects. By means of establishing the relationship between depth and intensity ratio, every object flowing through diagnosed spot is able to be determined the depth level by cross-referencing the database. By using spectrometer as detector, delicate moving components for light filtering or electrical stage for light scanning can be excluded for high-speed z-position detection. Furthermore, in order to identify the depth level of sample with high flowing rate, avalanche photodiodes are adapted to achieve rapid detection.

The experimental results show that the relationship between depth and intensity ratio is a parabola curve, but in this research, the region which tends to behavior linearly is adapted. The proposed system provides a linear detection range of $\pm 15 \mu\text{m}$ for particles with a diameter of $20 \mu\text{m}$. The lens with high Abbe number only obtains $\pm 10 \mu\text{m}$ with linear detection range though, the resolution for size is better than PMMA. The BK7 lens is capable to discriminate the depth change of $2 \mu\text{m}$ micro-beads, note that there is no limitation of depth discrimination in this system, because of the measurement is achieved by cross-referencing the linear line. The use of UV-Vis-NIR spectrometer enable this system to analyze the depths of the samples in flow rate 0.5 mm/s . To gain the higher performance, the two avalanche photodiodes are utilized, and the short(CWL=450 nm, $\pm 20 \text{ nm}$) and long(CWL=650 nm, $\pm 20 \text{ nm}$) band pass filter are also equipped to represent enhancements of blue and red ray. The effective detection range extends to $\pm 25 \mu\text{m}$ and has high linearity($R^2=0.99285$) after the optimization of light stop. In high flowing rate detection, this system is able to identify the depth of sample when the flow velocity is 4.167 mm/s , the calculated throughput is 126 particles/s . It also successfully analyzes the depth of flowing human erythrocytes under the flow velocity is 2.778 mm/s , the velocity which the developed system is capable to analyze is about 5-8 folds to the conventional micro-PIV system.

With this novel and simple approach, there will be the quantified information from z-direction of flowing body for bio-analysis, and also benefits estimating the performance of micro structure or device in the microfluidic chip, also the analysis of flow field. Except for dynamical detection, this system also be capable to apply in a open and static situation, such as cell or tissue proliferation assay.

Keywords : Dynamical depth detection, Chromatic aberration, Dark-field illumination, Microfluidic channel, Micro flow cytometer



目 錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	iii
目錄.....	vi
圖次.....	viii
表次.....	x
符號表.....	xi
縮寫表.....	xii
第一章 緒論.....	1
1-1 研究動機.....	2
1-2 研究目標.....	3
1-3 論文架構.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
2-1 背景知識.....	5
2-1-1 流式細胞儀偵測方法.....	5
2-1-2 暗視野照明.....	8
2-1-3 色相差原理.....	9
2-2 相關文獻.....	13
2-2-1 PIV 系統於偵測微管道內粒子行為應用.....	13
2-2-2 色相差於深度探測應用.....	19
第二章 實驗架構以及偵測方法.....	22
3-1 實驗架構.....	22
3-1-1 色相差深度偵測設計概念.....	22
3-1-2 基本實驗架構.....	23
3-1-3 晶片製程.....	26

3-1-4 透鏡的材料選擇以及色散能力評估.....	28
3-2 偵測方法.....	31
第四章 實驗結果與討論.....	38
4-1 光譜儀於動態偵測的使用.....	38
4-1-1 系統對樣本尺寸解析能力.....	38
4-1-2 動態樣本之深度位置偵測.....	41
4-2 動態樣本之深度位置偵測.....	42
4-2-1 高速深度偵測系統架設及校正.....	42
4-2-2 快速深度位置偵測.....	46
第五章 結論與未來展望.....	52
5-1 結論及綜合討論.....	52
5-2 未來展望.....	53
參考文獻.....	57
附錄.....	63
作者自傳.....	66

圖次

圖 2-1	流式細胞儀工作原理示意圖[30].....	6
圖 2-2	微流道內溝槽結構設計示意圖[39].....	7
圖 2-3	(a)暗視野系統簡易示意圖 (b)明視野以及(c)暗視野所成影像.....	8
圖 2-4	利用 Axicon 透鏡創造暗視野成像光路設計示意圖[70].....	9
圖 2-5	不同波長對相異介質之折射係數圖[70].....	10
圖 2-6	白光穿越不同介質後於軸向產生焦距差示意圖.....	10
圖 2-7	各種材質光學鏡組其不同折射係數對阿貝數之對照圖[46].....	11
圖 2-8	(左)消色差透鏡 (右)複消色差透鏡結構示意圖.....	12
圖 2-9	傳統 PIV 技術之架構示意圖[49].....	13
圖 2-10	基本 micro-PIV 技術之架構示意圖[14].....	14
圖 2-11	於不同顯微鏡系統下稜鏡型 TIRF 之 PIV 架構 (a)正向式顯微鏡 (b)倒立 式顯微鏡[54].....	15
圖 2-12	(a)SDMC micro-PIV(b)Spinning disc 架構以及工作原理示意圖[59].	16
圖 2-13	(a) 利用三針孔所組成的三角形評估離焦程度判斷 Z 軸位置[62](b)像差造 成不同平面之相異成像評估 Z 軸位置方法[63].....	17
圖 2-14	標準 micro-PIV、三針孔離焦 DDPIV 及像差方法 SNR 比較圖[64]...	18
圖 2-15	(a)反射鏡整合入微管道內 micro-PIV 方法架構[65] (b)OFM 應用於微管道 內 micro-PIV 方法裝置[66].....	19
圖 2-16	彩色共軛焦顯微架構示意圖[72].....	21
圖 3-1	色相差式深度偵測系統設計簡圖以及塑料光檔圖騰.....	22
圖 3-2	(A)實驗設置簡圖 (B)實際治具與系統圖.....	24
圖 3-3	(左)鎢絲燈以及 (右)氙氣燈光譜圖.....	24
圖 3-4	(A)靜態未標定螢光之 20 μm 粒子於移動 Z 軸下模擬流動粒子於不同深度 之散射光變化影像與其(B)光譜行為.....	25

圖 3-5	微流式細胞晶片製作流程示意圖.....	26
圖 3-6	流道內尺寸設計以及實際晶片成品圖.....	27
圖 3-7	(A)PMMA 以及 (B)BK7 之穿透光譜.....	29
圖 3-8	軸向色相差數學模型推導各代稱示意圖.....	29
圖 3-9	暗視野照明聚、離焦之葉形光錐行為.....	32
圖 3-10	深度偵測之正規化流程圖.....	33
圖 3-11	450 nm 以及 670 nm 兩波長於不同深度位置之正規化後強度變化圖	33
圖 3-12	(A) $\pm 25 \mu\text{m}$ 深度位置對其強度比例值及 (B)有效線性範圍圖.....	34
圖 3-13	選定短、長波長範圍內進行波長選取之最佳化結果圖.....	35
圖 3-14	橫向色相差於不同 X-Y 平面位置對藍光、紅光區域訊號的影響.....	36
圖 4-1	PMMA 以及 BK7 透鏡其有效偵測範圍圖.....	38
圖 4-2	於參考點下(A) $20 \mu\text{m}$ 以及 (B) $5 \mu\text{m}$ 未標記螢光微粒子於 PMMA 以及 BK7 透鏡下之行為示意圖.....	39
圖 4-3	PMMA 透鏡系統對 $10 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 以及 $2 \mu\text{m}$ 微粒子之深度偵測.....	40
圖 4-4	BK7 透鏡系統對 $5 \mu\text{m}$ 、 $3 \mu\text{m}$ 以及 $2 \mu\text{m}$ 微粒子之深度偵測.....	40
圖 4-5	(A) $20 \mu\text{m}$ 未標定螢光粒子通過偵測端之時序圖以及 (B)所對應之深度位 置.....	42
圖 4-6	高速流動樣本深度偵測之系統設置示意圖.....	43
圖 4-7	上、中、下圖分別為使用 100° 、 80° 以及 60° 之光檔插件之資料線圖.....	45
圖 4-8	APD 系統下於有效偵測區域 $\pm 25 \mu\text{m}$ 對強度比值之線性關係圖....	46
圖 4-9	於流量(A) $0.5 \mu\text{l}/\text{min}$ (B) $1 \mu\text{l}/\text{min}$ (C) $1.5 \mu\text{l}/\text{min}$ 下紅光、藍光強度圖以及 其於微管道內相應之深度位置.....	47
圖 4-10	於流量 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ 下，對人類紅血球進行深度量測，由上至下分別為紅光、 藍光強度圖以及其於微管道內相應之深度位置。.....	50
圖 5-1	(A)長範圍深度位移量對強度比值圖 (B)深度範圍 $\pm 25 \mu\text{m}$ 對強度比值圖	55

表次

表 3-1	七種塑膠光學透鏡材質於六種波長下所對應之折射係數.....	28
-------	-------------------------------	----

符號表

V 阿貝數

D_n 深度位置

S_n 波長 450 nm 光強度

L_n 波長 670 nm 光強度

S_o 參考點位置，波長 450 nm 光強度

L_o 參考點位置，波長 670 nm 光強度

I_j 波長 450 nm 對波長 670 nm 強度比值

縮寫表

PIV	質點影像測速系統(particle image velocimetry)
LLS	雷射光頁(laser light sheet)
APD	雪崩式光電二極體(avalanche photodiode)
N.A.	數值孔徑(numerical aperture)
PAC	主軸向色相差(primary axial color)
SAC	二級軸向色相差(second axial color)
DOF	焦深(depth of focus)
DDPIV	離焦式數位質點影像測速系統(defocusing digital PIV)
SNR	信噪比(signal-noise ratio)
SDCM	轉盤式共軛焦顯微鏡(spinning disc confocal microscope)
OFM	光流體顯微鏡(optofluidic microscope)
PFM	擠壓流分級法(pinched flow fractionation)
AOD	聲光致偏器(acousto-optical deflector)
FWHM	半高寬(full width half maximums)
HMDS	六甲基二硅氮烷(hexamethyl disilazane)
OPs	塑膠光學透鏡(optical plastics)
PMMA	聚甲基丙烯酸甲酯(poly methyl methacrylate)

第一章 緒論

近年來，由於微機電系統(Micro-Electro-Mechanical-System, MEMS)技術的發展以及引入，可於小尺寸晶片內建立微米尺寸流道結構，使之於物理、化學或是生物分析等應用領域蓬勃發展[1-4]。相較於傳統的分析測定方法，單次檢測通常需要人力、物力以及時間，使作業流程繁雜且易有外界干擾。故將分析樣本中不同階段之操作流程與檢測端子微小化並整合入單一晶片，實現實驗室晶片(lab on a chip)的概念應運而生。在眾多微系統中，微流道裝置(microfluidic device)在樣本於流體中的運輸、儲存、混合以及反應扮演重要的角色[5-8]。而微全分析系統運用微流道系統於微小化晶片上可有效縮減樣本或試劑使用量、增加分析物其空間解析度、降低運行儀器的能量、提升偵測速度以及可平行化偵測，去除傳統循序單一步驟的費時，並替代傳統的分析方法[9, 10]。

於微流道系統中進行生物樣本的測定有多種方法，如利用電性分析、光學或是化學方法，適用於不同屬性的樣本或所需的偵測方式。而其中屬光學方法最為廣泛使用，其高穩定度、空間解析度以及對檢測樣本有極佳的分辨度，對於在微流道內的偵測有優異的表現。但光學系統最為之詬病的即為其偵測器具的體積大，並需要精細的光學組件配合，這使微晶片的整合有所困難；故降低光學元件組的使用，降低偵測端所需儀器之體積對於整合晶片為首要之務。另外，微流道系統中，主要以流體乘載樣本進行傳輸等其他功能，故於微流道系統內流體其流動行為為需要被測定甚至量化。配合光學偵測方法分析生物樣本於微管道內流動、分布行為為最普遍之作法並可獲得許多資訊，故有眾多學者致力於發展可於微管道內偵測樣本流動行為之系統。因於微流道系統內小於一般流場空間，其在微米環境下流場行為並不能以評估一般環境下流場之方式獲取其流場訊息，使微流道內流場之分析以及樣本流動行為更添困難。

質點影像測速技術(particle image velocimetry, PIV)為典型的觀察粒子流動速度、位置分布以及流場行為的方法[11]。主要為利用雷射所產生的光頁(laser light sheet,

LLS)進行方式進行掃描，而透過光頁平面上粒子的散射光，以及配合高速攝影的 CCD，便可進行對粒子的移動速度以及向量進行紀錄以及分析[12]。相對於 PIV 系統，micro-PIV 可偵測尺寸更小的樣本，多運用於觀測微管道內流場行為，對流場可視化有極大的幫助，可觀測微米等級的樣本以及提供極高空間與時間解析度[13, 14]。此行之已久的技術可於二維平面獲得精準的速度場或流場資訊，對於第三維的解析能力因需與共軛焦掃描系統結合，故受限於 Z 軸方向的掃描速度。另一亦以光學切片方式進行三維成像的顯微系統：共軛焦顯微鏡(confocal microscope)，其結合精細的移動掃描平台以及高速攝像系統即可建構其觀察物之三維影像[15-17]。近年內，更有利用色相差方法配合共軛焦顯微系統，藉由對焦個別色散波長可建構出不同 Z 軸圖像資訊，並結合繪構出 3D 真實影像[18, 19]。對於高速流體，共軛焦顯微鏡解析能力則受限於其掃描平台的所需時間，以及其高速攝相系統的取像速度也為一受限條件。

1-1 研究動機

現今利用微流道系統進行生物檢測越發重要，其樣本於流動狀態間之各項資訊，如位置分布、速度場行為皆為檢測之重要參數；或於微機械系統如微混合裝置或者微幫浦等都需要第三維流場或是流動粒子資訊以改進其裝置效率。對於流場可視化，第三維的量測較少被提及討論，PIV 系統雖可對樣本二維的位置以及速度場作精確的評估以及測量，但對於第三維的測量則受限於雷射光頁為 X-Y 軸平面，**無法同時對 Z 軸展開光頁而使同步進行量測有所困難**。雖於 micro-PIV 方法中已有對管道內流動樣本三維位置以及速度場已有文獻報導，利用兩隻雷射同時由 X-Y 平面，以及 X-Z 平面入射來取代單一光頁的使用；**但雷射對位問題卻嚴重影響取得影像的一致性**。另，結合共軛焦掃描系統的 micro-PIV 方法，受限於對 Z 軸方向掃描速度以及擷取影像系統的取像速度，**無法進行過高速信號擷取而限制偵測極限**。使用色相差原理結合共軛焦顯微鏡技術，雖可改善傳統共軛焦顯微鏡掃描平

台因點對點掃描而低落之掃瞄速度，但因使用單一波長對焦象徵特定軸向位置的解析方法，使整體可偵測距離極短。且其仍使用成像系統(CCD)逕行影像擷取後疊加，此舉依舊無法改善偵測速度。加以共軛焦偵測端體積大難以整合入晶片系統內、設備昂貴，以及需要精細之光學元件設置，使之較不普遍使用。綜合以上論述，發展一簡易、可快速偵測管道內流動物體之第三維深度系統，為本研究致力的目標。

1-2 研究目標

鑒於深度量測對於微管道內流場第三維資訊之獲得極為重要，本研究旨於發展一簡易之光學檢測方法，扭轉對於色相差效應於光學系統中為缺陷之觀念，將之視為本發展系統的偵測原則。本系統欲引用一連續光譜之光源，配合本實驗室已發展之暗視野照明系統，減去因背景散射光所帶來之干擾。使用一較低阿貝數之透鏡產生色相差行為，利用此建立偵測區域；配合高敏感度之光二極體收取通過偵測區域之樣本散射光，即可達到快速偵測的目標。故本研究由四大點為主軸，進行系統的建立以及改善：1)利用色相差機制為偵測原則，減少外部機械元件(掃描對焦裝置)的施用，拉升偵測速度。2)取代縮減體積過大之以及精細光學組件的使用，抽取小插件即可施用於不同目的之檢測，使系統具有多功能、彈性的使用。3)利用簡單數學運算建立特定波長與深度之關係，用以後動態量測交叉比照，可省去傳統使用單一波長象徵特定深度位置的分析方法，達到較廣的真測範圍。4)引入光二極體作為檢測端，可有效改善因利用影像擷取而無法拉升之記錄樣本速度以及處理時間，使系統擁對高速流動生物樣本的解析能力。

具有換取插件即可適用於不同檢測目的地之彈性系統、簡易之系統架設以及數學運算式可得之檢測方式，以及快速偵測動態流動樣本之偵測端；加以施用色相差效應之緣故，使本系統不顯縮於微管道的應用，亦可於開放環境下進行檢測，如表面輪廓解析，使其對生物檢測方式甚至於表面檢測有一大躍進。

1-3 論文架構

第一章

對微機電製程的微管道內流場第三維深度資訊的重要性作簡單介紹，並引入三維成像的方式：質點影像測速系統(PIV)以及共軛焦顯微系統作簡易的說明。後示明對此研究的動機以及目標，並且簡述此論文各章節概要。

第二章

此研究主要著重於利用**色相差效應**於微管道內**快速偵測粒子垂直軸之深度位置**，故將本章分為兩大部分進行解說：背景知識以及文獻回顧，背景知識旨在介紹本研究應用之基本技術，流式細胞儀、暗視野照明系統以及色相差原理。文獻回顧則針對本研究之目標進行相關研究文獻的報導亦分為兩個主題進行闡述，分別為 PIV 技術以及彩色共軛焦顯微系統對第三維位置之測量方式。

第三章

本章為介紹研究所發展的實驗架構以及其設計原理，對於光學元件材料的選取，以及利用數學模型的建立進行系統效能評估都有所介紹。晶片製程、樣本參數，以及使用簡易正規畫過程，建立深度位置與強度比例值的關係等分析方法亦於此章分別進行闡述。

第四章

此章節可粗略分為兩部分進行討論：首先使用光譜系統確立本研究所發展系統之特性以及效能測量，以及不同色散元件的使用對樣本尺寸所呈現的變化。後為達到快速偵測能力，利用雪崩光電二極體(avalanche photodiode, APD)作為偵測端，對系統作部分調整及光檔插件佳化；並對不同高流速環境下樣本進行深度分析。

第五章

最後於此章節總結本研究達到的目標以及貢獻，並提出此研究於未來可繼續發展或深入探討之處。

第二章 文獻回顧

2-1 背景知識

2-1-1 流式細胞儀偵測方法

近 55 年來，流式細胞儀(flow cytometer)已發展健全，成為細胞生物以及臨床藥理的標準檢測方式。傳統的流式細胞為體積相當大的實驗室儀器，於特殊的實驗訓練課程使用，由於其大尺寸的檢測系統，對於樣本以及試劑，甚至能源的消耗也相當龐大[20]。而在近十年間，微機電製程技術的蓬勃發展，使微流道系統可建構於晶片之內，其中微流式系細胞儀(micro flow cytometer)也於此應運而生。其微小化後減少試劑樣本使用量、可攜以及使用更加簡易等特點，在定點照護檢驗(point-of-care)市場中佔有一席之地[21]。於基因分析(genetic)、胚胎發育(developmental embryology)、臨床診斷(clinical diagnostic)以及細胞分析中扮演極為重要的角色[22-25]。隨著商業化的腳步，因應多種偵測需求的流式細胞儀也隨之發展，包括光學偵測[26]以及電阻抗偵測方法[27]，其中使用光學偵測的方式最為普遍。光學檢測方法主要是利用雷射入射至偵測區域，再收取其散射光，其可由散射光之強度大小、散射角度來快速檢視流經偵測區域之細胞數量、尺寸分類計量或者表面幾何型態。亦可於樣本(如基因)進行螢光標記後利用雷射激發後收取發射螢光訊號，配合多組雷射的使用可單次分析多種螢光，獲得不同標定螢光樣本的訊息。

一般而言，基本的流式細胞儀主要為利用兩道邊鞘流(sheath flow)，於水平面 X-Y plane 壓縮中間樣本流，此利用雙邊鞘流壓縮樣本流對焦的方法於 2001 年由 McClain 等人揭露後便廣泛於顯微範疇使用[28]，而 Golden 等人使用非垂直角壓縮辦法，將邊鞘流道傾斜角度，更可使樣本流體有效對位[29]。因流體於微流到管道內皆成層流(laminar)，故不會與中間樣本流體混合，使於流體中亂置的樣本可排成直列，於管道內清楚界定出流動範圍，如圖 1-1 所示[30]。而為了達成更可靠的分析結果，其壓縮聚焦的樣本流寬度要與樣本直徑相近，避免於水平面方向樣本物

重疊或遠離偵測區域造成光訊號的誤差。對二維水平面的聚焦方法，Rodriguez-Trujillo 等人於 2007 年提出以 PDMS 以及玻璃為基板的微型細胞計數器製程，其利用邊鞘流的液流力(hydrodynamic force)對焦後，對不同尺寸混和樣本進行偵測[31]。另有使用電驅動力取代液流力將樣本流聚焦，透過強電場所造成之電滲流力(electroosmosis)或電泳力(electrophoresis)，且配合多管道的設計亦可達到多種尺寸樣本的偵測[32, 33]。使樣本聚焦方法除利用外力壓縮之外，亦可使用結構上的改變而達到此目標，例如噴嘴結構。但將管道內徑縮小的噴嘴結構，在多尺寸樣本混雜的流體易產生阻塞，使之無法通過偵測區域，故單一噴嘴必須對可使用的樣本尺寸大小有所界定，且流體流經狹窄管徑內所帶來之背壓(back pressure)以及剪力(shear stress)可能會損壞活體樣本。

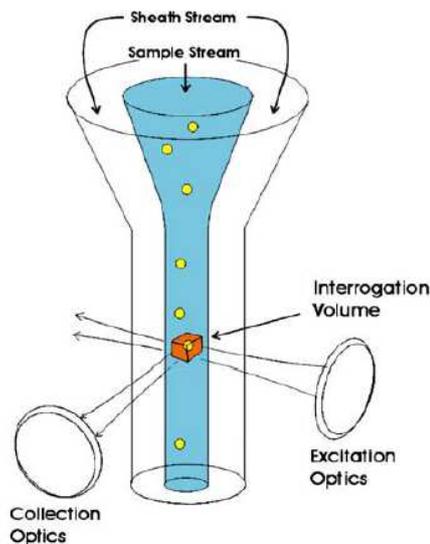


圖 2-1 流式細胞儀工作原理示意圖[30]

對樣本流二維平面的聚焦方式雖對連續流的樣本計數已十分普遍，但因現行技術的偵測方式為記錄樣本通過光聚焦區域所產生的光脈衝訊號，卻對同一尺寸的樣本有不均一的強度值出現，Fu 等人對紅血球進行計數時甚至出現 38% 的變異量，其對非平均尺寸生物細胞尺寸分類以及計量的測試有極大的影響[34]。此有可能因生物樣本其不均一或對稱的形狀所造成，亦有可能是其在垂直面(X-Z plane)未聚焦，使樣本於不同垂直高度發散出光訊號，故造成不同強度的光訊號出現。由此推測，其對樣本流體的聚焦不僅實施於水平面，垂直面的聚焦也吸引眾多學者的注意。

第三維的樣本聚焦，已有多篇利用介電泳力進行聚焦的文獻發表[35-37]。使用介電泳力聚焦的裝置下，於流向(streamwise)樣本因液流流，於展向(spanwise)因介電泳力而被侷限於微管道中央，如 Chu 等人研究中指出利用兩平板電極於流道兩側，施以適當電場，其樣本則會因正界電泳力效應流於一直立介電泳結構的上方，達到垂直面的聚焦[38]。另外，垂直面的聚焦亦可利用多層結構的組合達成，以 PDMS 為基底的雙層結構於 2007 年被提出[39]。一層為基本的二維聚焦方式，第二層為兩道邊鞘管道，以液流流向樣本流上以及下方流入後在垂直面對樣本流體擠壓使樣本流體於垂直面聚焦。利用流道內不同結構改變流場行為或直接影響樣本位置的方法亦被提出，Howell 等人使用有溝槽結構的流道進行三維的聚焦[40]，其結構如圖 2-2 所示。於水平面以兩對稱的邊鞘流道之液流力聚焦於管道中心，後通過具有溝槽結構部分時，因流場改變，使兩邊鞘流引流入樣本流體之上以及下方，垂直距焦樣本流體。Lee 等人亦提出於流道內創造連續且上下交錯的 micro-weir 結構，直接對樣本垂直面位置進行校正，並可有效分離不同尺寸之微粒[41]。

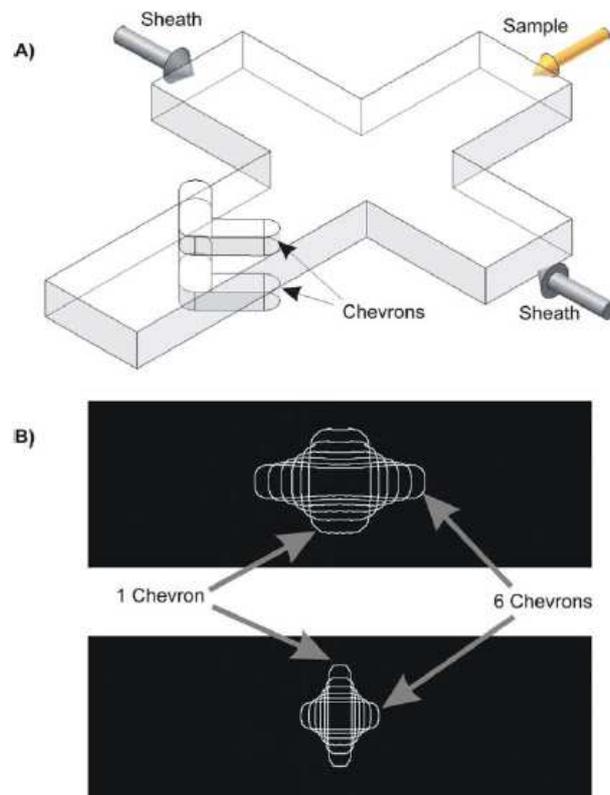


圖 2-2 於流道內建構之溝槽結構，可有效對樣本流體於第三維聚焦[40]。

有眾多文獻對流式細胞儀的對焦方式進行探討，並且提出眾多方法使流動樣本於第三維進行有效對焦，減少因未對焦使樣本錯位所造成的光強度差異。但因此種偵測方式多以目標物之散射光或是發射螢光訊號強度進行統計後，所觀察的一致性而大略推敲對焦程度，並未有直接測量其垂直面通過樣本之深度位置所得的量化數據。

2-1-2 暗視野照明

顧名思義，暗視野照明意指所觀察物之背景為深暗視場，相較於亮場顯微鏡，暗視野顯微鏡對於未染色、透明試件具有非常清晰的解析能力。當試件為水生有機物，抑或是浸泡在水中之細胞時，因其折射係數為 1.2~1.4，極接近水的折射係數，其折射係數梯度不高，故與背景視場對比度不強，致使傳統亮場照明所成像較難以觀測，就如同在白天觀測星星般；反之，暗視野照明由於其結構不同，而擁有對試件輪廓有清晰的映像。故暗視野照明系統多用於觀測擁有較低落光訊號，如螢光染色後之標定物或需清楚顯示邊界、缺陷之樣本物，其設置結構如圖 2-3(a)。

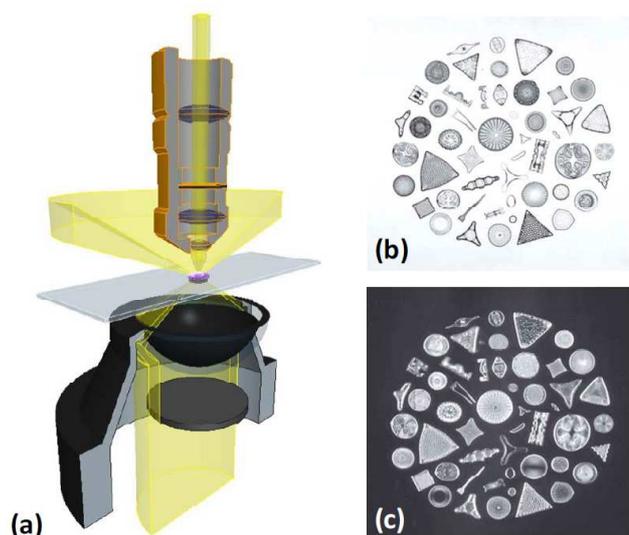


圖 2-3(a)暗視野系統簡易示意圖(b)明視野以及(c)暗視野所程影像。

在暗視野成像中，主要利用一不透明的光檔以及一簡易的折射聚光鏡所構成。光檔將中央直進光(zero order)擋住，只允許未聚焦的散射光由周邊的空隙通過，透

過聚光鏡將通過的光柱聚焦於一點，如同一空心圓錐，並投射於試件上。進光量取決於所使用暗視野光檔的數值孔徑(numerical aperture, N.A.)，即為中央光檔可通過光量的大小。在暗視野系統下，通常使用數值孔徑略小於暗視野光檔的物鏡進行觀測，為此，當試件置於觀測平台時，其光檔所產生空心光錐入射至試件，後其將所投射之光線散射，利用物鏡收集其散射光進行觀測；反之，若無任何試件置於平台，其光錐則聚焦後發散，其物鏡數值孔徑小於光檔，使得空心光錐無法被物鏡所收集，產生暗背景。相較於一般亮場顯微鏡，暗場顯微鏡主要是利用被樣本邊緣輪廓所散射之光線進行觀測，且為其視場為深暗背景，與樣本產生極高的對比度，所以使得暗場顯微鏡對於細部觀測十分優越，見圖 2-3(b)、(c)。除了此上述傳統的暗視野成像方法之外，亦有利用拋物或心臟線形狀之反射面作為聚光鏡，由此獲得較高的 N.A.值以及消除因折射光線所產生的像差現象。另有文獻報導使用 Axicon 透鏡取代其不透明光檔，如圖 2-4，此種作法可以保留大部分的光源亮度[42, 43]；以上方法均是使系統產生一空心光錐使試件的邊緣輪廓因散射光而更加清晰。另一種方法則是利用偏振技術，只偵測其邊緣所反射的散射光波，其原理同暗視野照明一般不接受任何來自光源的直進光[44]。

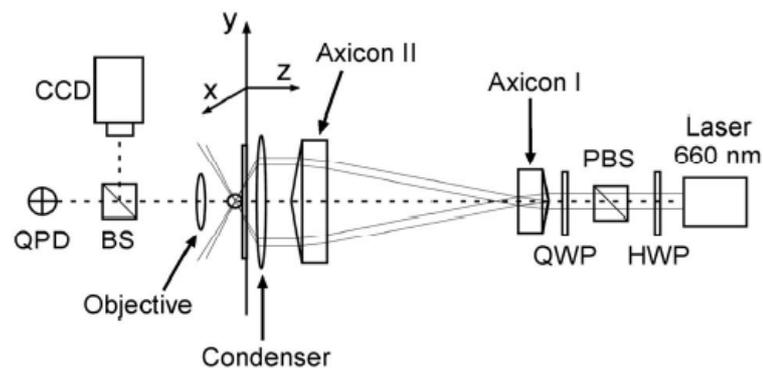


圖 2-4 利用一對 Axicon 透鏡創造一空心光錐以達到暗視野成像效果[41]。

2-1-3 色相差原理

像差(aberration)存在任何高斯光學系統中，主要可分為：色相差(chromatic aberrations)以及單色相差(monochromatic aberrations)，單色相差又可分為球面差

(spherical aberration)、彗差(coma)以及像差(astigmatism)；其中色相差主要發生於擁有多波長光源照明的系統下，於日常生活中各種光學系統更為普遍存在。其原理為各個頻率的光波在介質中擁有其對應不同的折射係數，隨著穿越介質的不同，折射係數也不同，如圖 2-5 所示，其各個不同頻率的光波所對應的折射係數，可由 modified Cauchy's dispersion formula[45]計算：

$$n_{\lambda} = A_1 + A_2\lambda^2 + \frac{A_3}{\lambda^2} + \frac{A_4}{\lambda^4} \dots$$

$A_1, A_2, A_3, A_4 \dots$ 為色散係數(dispersion coefficients)， λ 則為光波長，單位為微米(microns)。而因其所對應折射係數的不同，致使各個波長所聚焦的長度也有所不同。由於上述現象，使之在產生色光發生分散的現象。舉例來說，即當一白光入射至簡單的單透鏡(singlet lens)時，其白光中不同頻率的光波擁有其所對應的折射係數 $n(\lambda)$ ，不同的折射係數使之不同波長的光波擁有不同的焦距，沿軸產生空間性、如同彩虹般散開的區域，如圖 2-6。

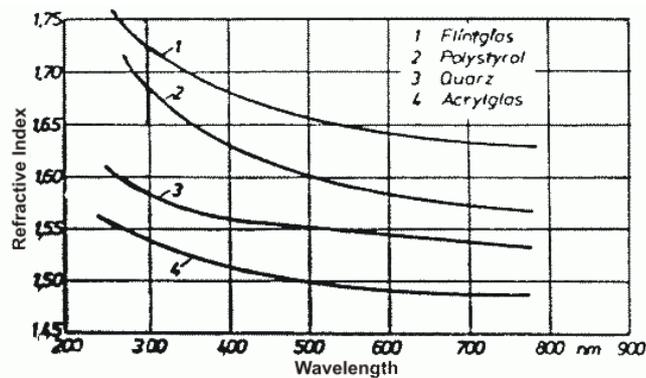


圖 2-5 不同波長對相異介質之折射係數圖[70]

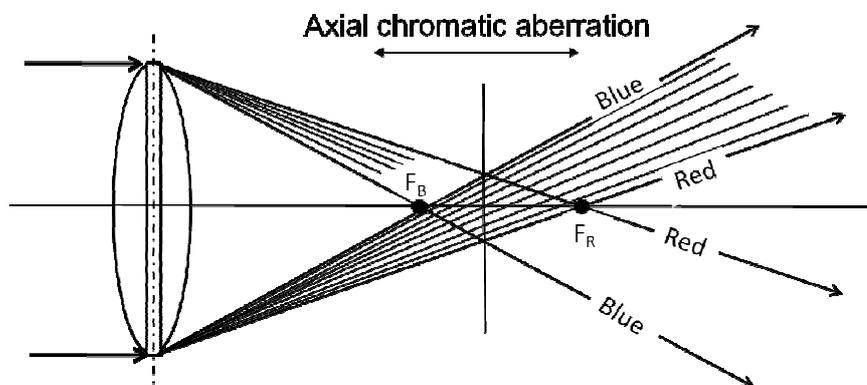


圖 2-6 白光穿越不同介質後於軸向產生焦距差示意圖

在一般透鏡中，藍光頻率較高，波長較短，擁有較大的折射係數，聚焦點較短；而較長波長擁有較小的折射係數，聚焦點也較遠，使白光分散為如同彩虹的光帶，此現象稱為光色散(dispersion)[46]；而因不同波長之焦距差會造成所成像有不同顏色的增強，其即稱為色相差。即若聚焦於中間波長(綠光)區域，所成像整體會偏向綠光，並在其周邊擁有紫色光暈(紅光與藍光混合)。因光穿越單透鏡造成不同波長之聚焦點，可作為光色散範圍的評估，其可由 lens-maker's formula 呈現：

$$\frac{1}{f} = (n_{\lambda} - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right)$$

n_{λ} 、 R_1 以及 R_2 分別為單透鏡之折射係數和曲率半徑，其中折射係數為波長的函數，同理，所導出的焦距長亦為波長的函數 $f(\lambda)$ 。色差現象可分為軸向色相差(axial chromatic aberration)以及橫向色相差(lateral chromatic aberration)，通常為相伴產生。雷同於軸向色差於成像面因不同波長焦距差所造成的模糊高度，橫向色差因離軸的光線因不同波長對折射係數的改變，造成各個波長有不同橫向高度上的成像，致使在白光成像時，樣本邊緣有不同色光的光暈。

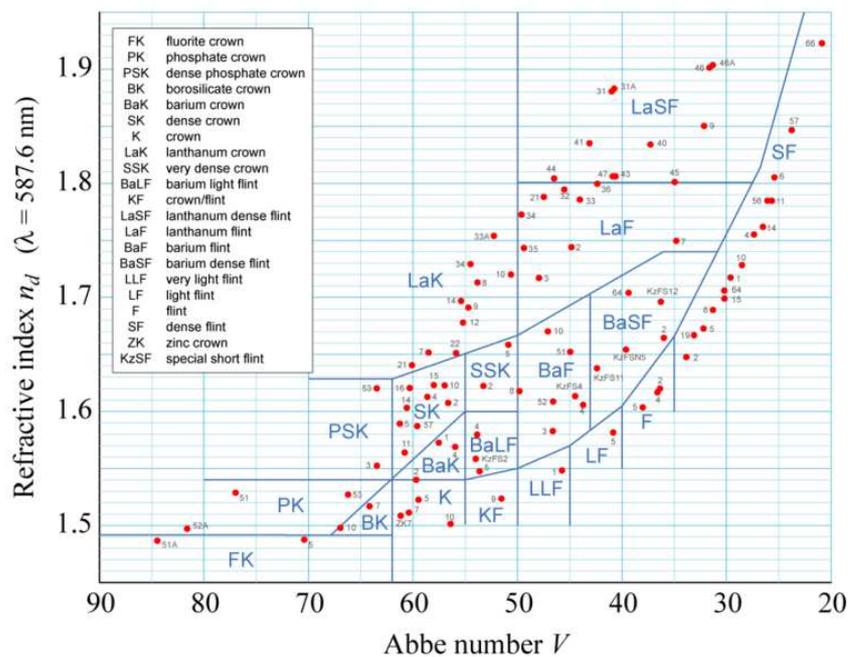


圖 2-7 各種光學鏡組的材質不同折射係數對阿貝數之對照圖。[46]

由於軸向色相差在對焦時會有特定色光的偏重，對於成像以及使用訊號之色彩比率進行分析的偵測系統都會帶來影像色彩上的失真以及影響分析訊號的可靠度，所以在一般光學成像系統中都會使用具有消除色相差的鏡組。針對光學鏡組在可見光譜的行為，可藉由一德國物理學家 Ernst Abbe 所定義的阿貝數(Abbe number)或是 V-number 作為評估透明材質色相差程度的一項準則，普遍作為光學系統內所使用的鏡組色差評估方式，主要是利用不同材質的透鏡所對應其不同的折射係數進行阿貝數的測定。阿貝數定義為[47]：

$$V = \frac{n_d - 1}{n_F - n_C}$$

n_d ， n_F ，以及 n_C 分別為夫朗和斐譜線 (Fraunhofer line) 中的 d-，F-以及 C-的波長 (587.6nm、486.1nm 以及 656.3nm) 所對應的折射係數，而阿貝數越大，其色差的行為就會越不明顯，圖 2-7 為不同材質的光學透鏡所對應的阿貝數。

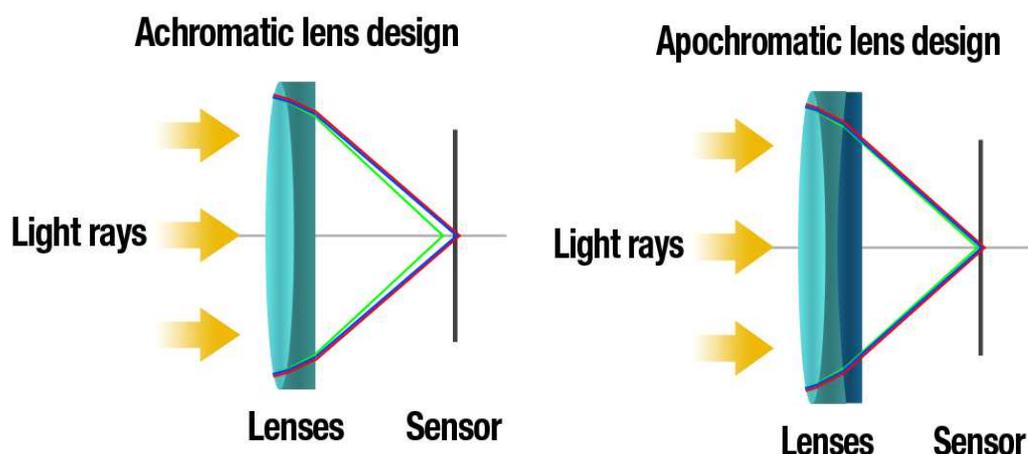


圖 2-8 (左)消色差透鏡 (右)複消色差透鏡結構示意圖。

為了達到最佳的影像解析效果，現行的光學系統內所使用的鏡組除了採用高阿貝數的材料外，另會配合不同阿貝數或是曲率之透鏡的組合來達到校正色散後之光路。對於主軸向色相差(primary axial color, PAC)的校正，早於十八世紀 John Dollond、Joseph Lister 和 Giovanni Amici 利用了冕玻璃(crown glass)以及鉛玻璃 (flint glass) 所成的消色差透鏡(achromatic lens)進行校正。因冕玻璃折射率較小，色差程度大；而鉛玻璃折射率小，色差程度約只有冕玻璃的一半，所以選擇正冕玻

玻璃透鏡以及負鉛玻璃透鏡搭配後即可調整 F-line 以及 C-line 至相同焦距，大大減少了軸向色相差的現象，如圖 2-8(a)所示。雖然雙合透鏡組合可以消除藍光以及紅光部分的焦距差，但在綠光部分焦距卻依舊無法進行校正，此焦距差現象稱為二級軸向色相差(secondary axial color, SAC)。利用引入螢石的冕玻璃以及反常鉛玻璃(abnormal flint glass)經過透鏡曲率、厚度以及折射係數等特性配合後所成的三合透鏡，即複消色差透鏡(apochromatic lens)[48]，可將綠光波長之焦距調整至與 F-line 以及 C-line 相同，如圖 2-8(b)，而複消色差透鏡亦可同時消除因透鏡成像所產生的球面差。

2-2 相關文獻

2-2-1 PIV 系統於偵測微管道內粒子行為應用

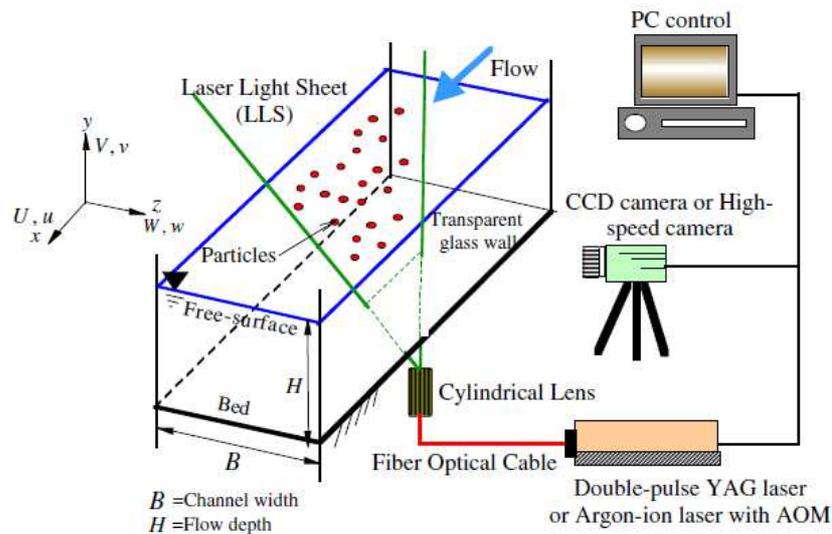


圖 2-9 傳統 PIV 技術之架構示意圖[49]

在生醫檢測越形重要及普遍的現日，量化流場可視資訊成為了了解複雜流場結構極為重要的工具，利用雷射、數位影像分析以及電腦控制運算的技術，使之可於可視化流場之影像分析粒子分布情形或是速度場。質點影相測速技術現為流道系統內最常用的診斷技術，主要為測量一平面上的追蹤質子於流場中 ΔX 以及 ΔY 的訊息，並且於質子移動時加以記錄其所對應的時間變化量 Δt 。而其速度場的建立，

是藉由上述對質子位移以及時間進行推斷，故選擇於流場中適當的追蹤質子才能夠精確的描述其整體的流場行為。

圖 2-9 為典型的 PIV 架構於水道內應用之示意圖。使用高敏感度的 CCD/CMOS 攝像機以及單色雷射作為光源，其雷射透過圓柱狀透鏡(cylindrical lens)後成為一平面的雷射光頁，而所形成的光頁需越薄越好，以去除偵測到脫焦質子所造成的干擾；Nezu 以及 Sanjou 使用 2W 氬離子雷射，並透過光纖傳導後形成一垂直厚度為 2 mm 之光頁[49]。後將光頁水平或以垂直地投射至體積溶液上，其兩方向(X-Y plane)的位移以及透過適當 PIV 演算方法後所獲得的速度場，可藉由光頁所照明之追蹤質子所得到的影像推斷而出。由於使用光頁方式照明所追蹤的質點，故光頁的垂直厚度則被定義為偵測追蹤質點之焦深(depth of focus, DOF)，故使傳統 PIV 偵測技術無法於微米尺寸的流體下進行偵測，肇於光頁之厚度無法小至 1-10 μm ，使脫焦樣本嚴重影響偵測訊號的可靠度。

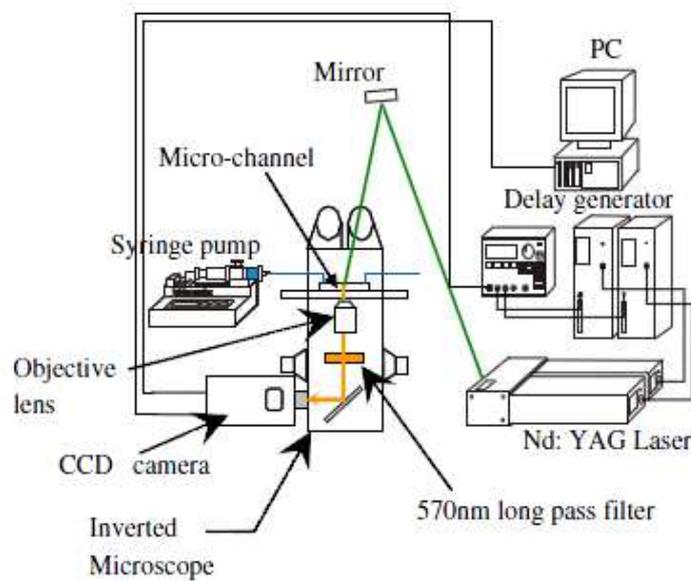


圖 2-10 基本 micro-PIV 技術之架構示意圖[14]

Santiago 等人於 1998 年使用 micro-PIV 系統對微米尺寸的流體進行偵測後[50]，於後十年此技術蓬勃發展，並且施用於多種應用，例如微米尺寸的墨水噴頭流場[51]、電驅動流場[52]亦或是電滲透流驅動[53]的微流道流場分析等。基本的 micro-PIV 系統如圖 2-10 所示，主要使用 Nd:YAG 雷射(波長 532 nm)為光源照明

追蹤質點，配合螢光聚苯乙烯粒子(吸收光: $\lambda=542\text{ nm}$, 發光 $\lambda=612\text{ nm}$)作為追蹤質點，加以高通($>570\text{ nm}$)濾鏡即可使用致冷式 CCD 擷取影像[14]。取代傳統大尺寸的質點分析所需要的光頁，於微管道內只需單一雷射即可達到質點追蹤的目的。為了達到更佳的空间解析度，亞微米的粒子多被使用，亦因如此，其粒子多小於可見光波長；藉由接收粒子的散射光方法以及配合濾鏡清除雷射所造成的反射光即可獲得清晰的影像。Micro-PIV 技術於近幾年廣泛應用至生醫分析如不同活體生物血液流動等，但為了可配合顯微技術以及多種生物樣本的分析，近微管道壁之奈米等級流體偵測技術應運而生，稱為 nano-PIV。由 Zrtner 以及 Yoda 先提出利用漸逝波(evanescent wave)結合 PIV 技術，可偵測近表面流之奈米等級粒子[54]。其後亦有利用物鏡型、稜鏡型內全反射顯微(total internal reflection fluorescent microscopy, TIRFM)系統所產生的漸逝波對微管道內奈米等級粒子的質點追蹤、電滲透流(electro-osmotic flow)行為或 λ -DNA 的觀測[55]。圖 2-11 為於不同顯微鏡系統下配合稜鏡型 TIRFM 系統的 nano-PIV 偵測架構。

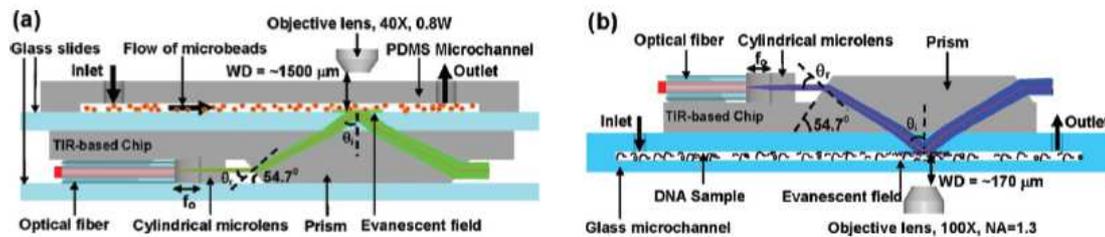


圖 2-11 於不同顯微鏡系統下稜鏡型 TIRF 之 PIV 架構 (a)正向式顯微鏡 (b)倒立式顯微鏡[54]

隨著多種微機構以及微管道結構的開發，微流體可視化的探討不再局限於二維平面，故三維的 micor-PIV 系統的開發隨之受到重視。原始的 micro-PIV 系統於粒子垂直方向(X-Z plane)位移的探測無法適用，因其收取來自質點的反射光或激發螢光，顯示其於焦深範圍內水平面(X-Y plane)的位置，但無法進行對於脫焦(defocusing)粒子的偵測，故無法測知於同一時間內體積流體之垂直方向訊息。要如何於獲取追蹤粒子第三維的資訊的同時，亦不被脫焦粒子的訊號所影響，此為各研究急欲解決的議題。

由於使用一般傳統的顯微鏡，整個流場範圍皆會被照明，使脫焦粒子訊號所帶來的強大背景雜訊影響追蹤質點的訊號，共軛焦顯微鏡的引入可輕易消除這些問題。共軛焦顯微鏡使用的光學切片(optical section)技術，其極淺的焦深可有效的截除脫焦粒子所帶來的背景雜訊，故取代了使用傳統顯微鏡作為 micro-PIV 平台[56, 57]。但對於流動的樣本的行為偵測卻受限於共軛焦顯微鏡的低落的掃瞄速度以及成像時間，傳統的共軛焦顯微鏡完成單一平面的掃描並產生完整影像約需要花上數秒的時間，故無法偵測流動粒子。由此，高速共軛焦掃描技術的發展解決過長的掃描時間，可於 0.5 ms 內完成單一截面的掃描，配合高速攝像器即可達到快速偵測的目的。配合轉盤式共軛焦顯微鏡(spinning disc confocal microscope, SDCM)，其優越的空間濾波技術以及多點成像系統，此系統可於光切片厚度約亞微米等級下得到高空間解析度的 3D 影像。其轉盤(Nipkow disc)分為兩層，上層為含有 20000 個微透鏡，下層則有 20000 個直徑約為 50 μm 的針孔(pinhole)，其可移除脫焦粒子所散射的光[58]。Lima 等人使用此法可偵測於 $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ 之微管道內流動之紅血球，流速約 0.52 mm s^{-1} ；且其光切片於 Z 軸的解析度可達 $1 \mu\text{m}$ [59]，圖 2-12 則為架構以及 SDMC 轉盤結構示意圖。

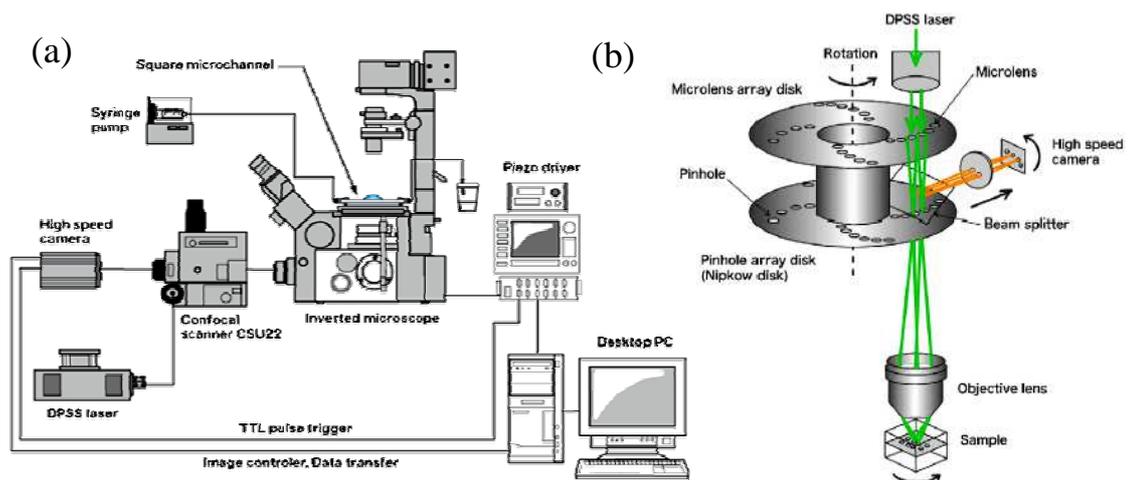


圖 2-12 (a)SDMC micro-PIV 系統架構 (b)Spinning disc 結構以及工作原理示意圖[59]

除了使用高速轉盤拉高掃瞄速度，以達成偵測流動粒子垂直軸位置的目的外，另有其他不使用共軛焦系統而可達到偵測粒子於垂直軸方向位置之方法：使用離

焦方式(defocusing digital PIV, DDPIV)[60]以及像差(astigmatism)[61]方法的三維 PIV 偵測方法。Yoon 以及 Kim 等人成功利用光罩上三個針孔所成的對稱三角型，將之置於物鏡前端，當粒子反射光並通過物鏡後，經由此三個針孔到達成像面[62]，如圖 2-13(a)所示。以聚焦的成像面為參考面($Z=0$)，粒子遠離參考面時，於成像面的三角型大小以及其虛、實像都會有所不同，故可從離焦行為於成像面所產生的三角型圖騰，來評估粒子於垂直方向(Z -direction)的位置。但對位問題於此系統內便為一重大議題，若對位不精準且使用高倍率物鏡時，其誤差會加倍放大，精細對位要求以及成像光路的計算，使此種分析方法以及系統架設都相當棘手。

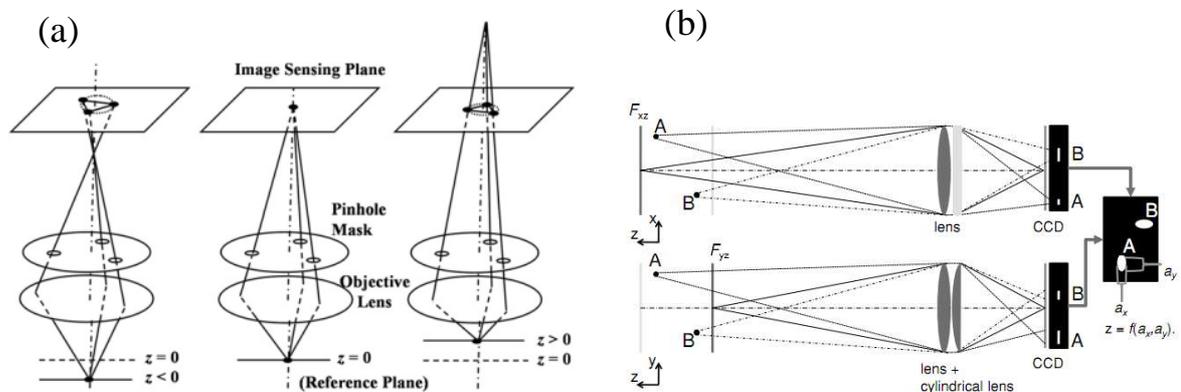


圖 2-13 (a) 利用三針孔所組成的三角形評估離焦程度判斷 Z 軸位置[62]
 (b) 像差所造成不同平面之相異成像評估 Z 軸位置方法[63]

像差的離焦方法，主要利用空間像差所造成的不同聚焦線：第一聚焦線(first focal line)以及第二聚焦線(second focal line)上的影像來同時判斷三維方向的位置。光學系統內若有像差產生時，其不同相位有不同的聚焦面，故所成的像會因不同平面 $Y-Z$ 以及 $X-Z$ 的扭曲而有不同的形狀。置放一柱面透鏡於 CCD 前便可將光整理為線狀，藉疊合兩不同平面所成的橢圓像寬度($Y-Z$ plane, a_y)或高度($X-Z$ plane, a_x)來確認其於二維以及 Z 軸方向的位置，如圖 2-13(b)所示。Cierpka 等人使用此方法並配合 a_x 對 a_y 的比值確認比對出粒子 Z 軸方向位置，其與已知實際深度位置誤差約 $1 \mu\text{m}$ [63]。有文獻報導此兩法對標準 micro-PIV 系統的比較，如圖 2-14 所示[64]。三針孔成像方式因針孔尺寸小($d=1.5 \text{ mm}$)，限制其進光量，導致其信噪比

(signal-noise ratio, SNR)普遍低落；標準 micro-PIV 方法於聚焦面的強度最強，可達 SNR=90，但脫焦區域(近管壁處)仍因其背景雜訊大而顯不佳。相對於像差方法，由於其無須通過任何光罩，故可引進較強的光亮度入射至感測端，且因非使用單一相成像故無脫焦所帶來之雜訊，其 SNR 表現於管道各處較為均一。

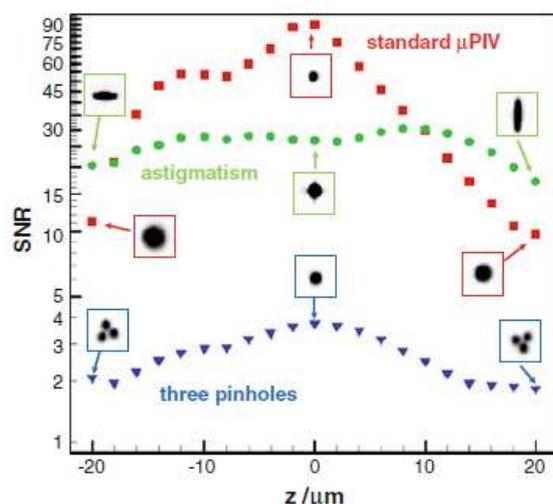


圖 2-14 標準 micro-PIV、三針孔 DDPIV 以及像差方法之 SNR 比較圖[64]

除了以上較為主流的研究方向外，亦有其他對三維 PIV 成像之不同方法以及結構被提出。如圖 2-15(A)，2009 年 Choi 等人提出將反射鏡埋入以 PDMS 所製成的微流道系統內，藉由傾斜 45° 角反射鏡所成之實像為上視(X-Y plane)影像，虛像則為側視(X-Z plane)影像，並根據這些光路徑長度(optical path length, OPL)對微管道內的粒子進行三維位置測定[65]。此法雖可省去許多光學元件的設置以及精密計算，但其反射鏡的擺放角度對位，以及其因 DOF 的問題導致側向影像模糊，仍為極大的問題。

還有使用光流體顯微鏡(optofluidic microscope, OFM)配合擠壓流分級法(pinched flow fractionation, PFF)可達到 on-chip 的 micro-PIV[66]，如圖 2-15(B)所示。OFM 主要為使用金屬薄膜(或是其他不透明材質)上蝕刻與 CCD 感測器圖陣列相對應的次微米孔洞作為入射光可通過的針孔，並於金屬膜針孔上方使用透明材料(玻璃或 PDMS 等)蝕刻出微流體通道，加以電場使流體通過針孔照射區域。利用物鏡將光訊號聚焦後映射於 CCD 後成像。加上使用 PFF 方法先對混合粒子進行尺寸分類外亦可對 Y 軸方向進行流動粒子位移量進行評估，而對 Z 軸方向的測量則是藉

由不同針孔所得穿透值(transmission)的大小進行篩選後得到正確值，再進行多參數的幾何計算獲得，可得到於 Z 軸分辨率約 $1.4 \mu\text{m}$ 以及量測流速為 0.08 mm/s 。此架構雖然簡易，亦可整合進入單一晶片，但對於 Z 軸的位置必須先通過訊號的過濾再進行繁複的計算才能獲得，且此裝置對於高流速的流體偵測略顯不足。

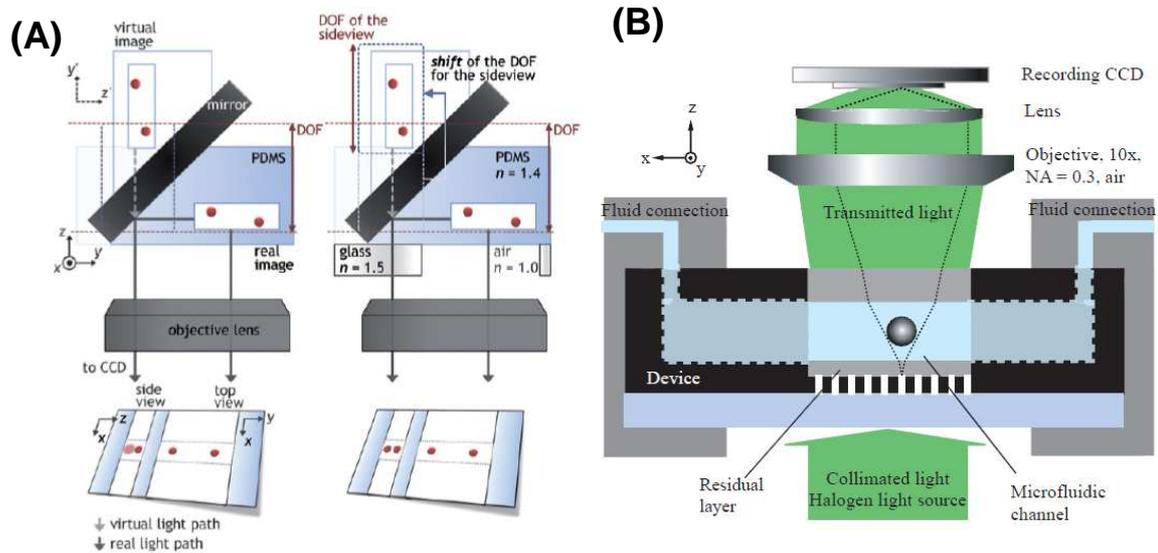


圖 2-15 (A)反射鏡整合入微管道內 micro-PIV 方法架構[65] (B)OFM 應用於微管道內 micro-PIV 方法裝置[66]

Micro-PIV 技術雖可獲得體積流場內的粒子的分布狀況，並且於二維平面的偵測可作到高流速的粒子的位置偵測；但第三維的量測則受限於焦深範圍、脫焦粒子的影響以及使用 CCD 取像的方法，導致對高流速的流動粒子有偵測上的困難。

2-2-2 色相差於深度探測應用

共軛焦顯微鏡為現最廣為人知的 3D 影像成像工具，其特別之處為一雙針孔的設置。一置於激發光源入射端前，另一置於偵測端前，此配置可對厚度及薄的透明樣本進行偵測，如組織切片等；接收端的針孔亦可有效阻隔脫焦的散射光干擾，得到解析度極佳之影像。而其獨特的光學切片能力使之對三維結構可視化或生物醫學等微結構的成像擁有強大的作用。傳統的共軛焦顯微鏡需要對樣本進行點對點的掃描，因此其掃描速度也相對低落，故多種架構被提出來解決此種問題。例

如使用帶有微透鏡陣列的轉盤，可於同一光學平面進行多點聚焦，並配合狹縫 slit 取代原始使用針孔所造成的照明度不足問題。同已於前節已提過的 Nipkow disc 的引入可有效降低掃描所需時間，於二維(X-Y)平面對流動的染色細胞進行動態偵測，其偵測速度可達 200 nuclei/s[67]。亦有文獻報導使用圓柱透鏡形成一面狀掃描區域，並使用聲光致偏器(acousto-optical deflector, AOD)作為二維平面掃描端，可達到於 512×512 pixel 的影像解析度下，191 frames/s 的取像速度[68]。於一般商業化通路中購得的共軛焦顯微鏡，一般成像速度約為 30 full frames/s，而配合 Nipkow disc 的系統可達 360 full frames/s 或更高；以上皆為於 X-Y 平面的掃描速度，但於第三維的掃描卻受制於 Z 軸步進馬達的移動速度以及解析度。共軛焦顯微術中除了需於掃描速度以及成像解析度中進行取舍外，第三維的掃描速度無法提高，以及 CCD 的成像速度更是使高速三維偵測或成像有所困難，故此系統施用於動態樣本的偵測現仍未有相關文獻發表。

另一極為有潛力的架構：彩色共軛焦顯微鏡(chromatic confocal microscope)的概念亦被提出[19, 69]。彩色共軛焦顯微鏡主要為結合色相差原理，運用透鏡(組)將白光色散後，其不同色光聚焦於不同軸向或是橫像面的特性進行影像建立。利用軸向色散，其長波長聚焦於 Z 軸深度較深處，而短波長聚焦於較淺處，而獲得有第三維參數的影像。相較於傳統使用掃描平台或是外部機械抬舉 Z 軸的方式，可減少其為系統所帶來的震動並加速掃描時間。UCSD 的研究團隊發展出利用菲涅耳透鏡(Fresnel lens)於彩色共軛焦顯微鏡的應用[70, 71]，因菲涅耳透鏡因製造方便、便宜，故可達到大孔徑的要求，且焦距極短、所成焦深極長，適合於共軛焦顯微鏡下產生色相差。配合不同物鏡的使用可達到不同色散範圍：於 100 nm 波長範圍內，40×物鏡可達 55 μm 的深度探測範圍，而 60×物鏡縮減為 25 μm ；空間解析度(full width half maximums, FWHM)分別為 2.52 μm 以及 2.23 μm 。彩色共軛焦顯微技術的效能主要倚靠對光色散程度的控制，故除了對色散的光學元件的探討外，所使用光源亦是個議題。使用雷射作為光源有斑點噪音(speckle noise)的問題，二極體光源頻寬不足限制其掃描範圍，故較寬的波長範圍光源對 Z 軸深度偵測範圍

較有利。有文獻指出利用超連續光譜(<6Db 範圍約 1000 nm)白光作為光源，將可偵測範圍增加[72]，架構如圖 2-16 所示。建構各像素(波長)所對應深度的線性關係，其可達到空間解析度為 1 μm 的 3D 影像。黃順洋等人使用 LED 三原色混成之白光光源，經過光學系統後產生軸向色相差，針對單一像素找出其對應的深度反應曲線(depth response curve)，經由兩色之深度反應曲線進行比值對應深度之線性關係，最後取得單張焦深範圍內之影像[73]。利用雷射干涉儀作為 Z 軸校正源，即可對影像上每一像素做比值對深度的運算，重建待測物表面輪廓，可達到解析度為：縱向 0.5 μm 、橫向 1 μm 。

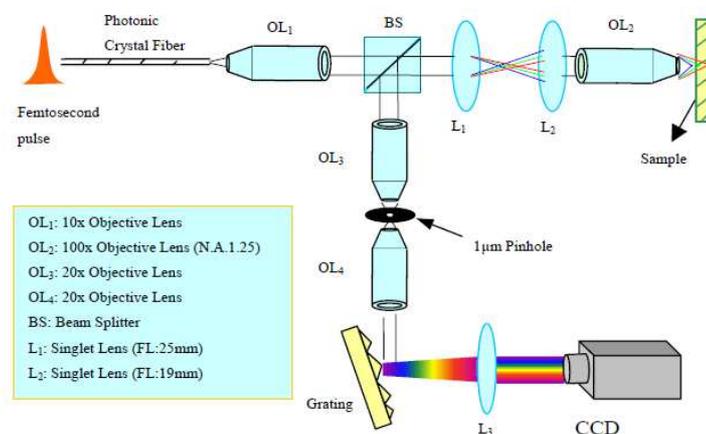


圖 2-16 彩色共軛焦顯微架構示意圖[72]

共軛焦顯微鏡的解析度決定於系統的 SNR，而有多種因素影響其大小，例如定量校正的方法、偵測端的敏感度以及系統穩定度。由於共軛焦顯微鏡運用的高速掃描機臺所產生的振動或慣性運動亦對系統穩定度帶來一定的影響。再者，雖以色散方式作為第三維深度的測量，取代以往使用機械式對焦產生光學切片的方式，可有效提升 Z 軸解析度；但彩色共軛焦系統使用單一波長象徵特定深度位置的方法，使所使用光源的光譜分布會牽制其可偵測範圍；另，其使用分析成像像素進行表面形態的建構，使之偵測速度頸縮於所使用的取像系統。彩色共軛焦顯微技術多用於靜態的 3D 表面形態建立，尚未有文獻報導於動態粒子的深度位置偵測，因共軛焦顯微鏡極為昂貴，且其精細的光學元件配置使之作為系統架設的基底需耗費大量成本以及設置或校正時間。

第三章 實驗架構以及偵測方法

3-1 實驗架構

3-1-1 色相差深度偵測設計概念

前章提及簡略提及色相差的行為，其因白光穿越光學鏡組所造成的色散效應會使所得影像色彩產生失真，亦會帶來不必要的雜訊，使之於一般光學系統內被視為嚴重的缺陷並且對此衍生而出多種校正方法。與其它感測器不同，本研究將此普遍視為光學系統缺陷的刻版印象扭轉，並視之為本發展系統的偵測原則。

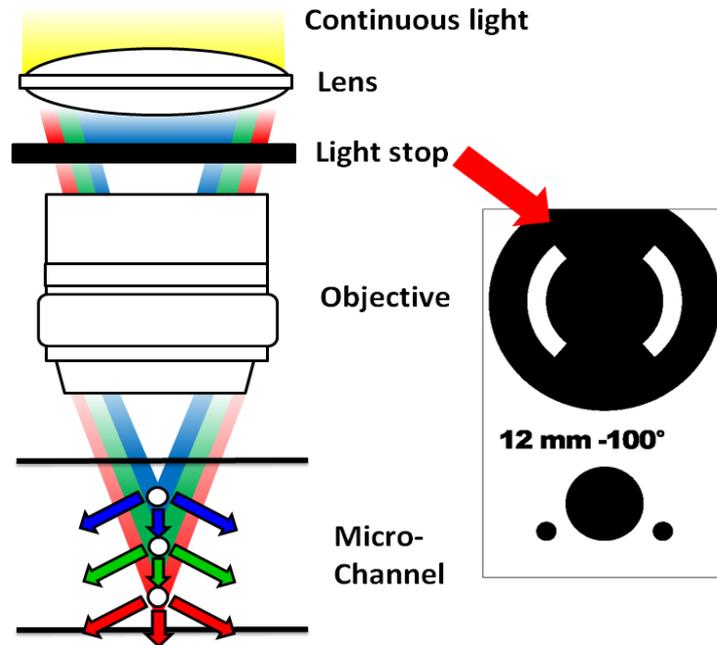


圖 3-1 色相差式深度偵測系統設計簡圖以及塑料光檔圖騰

因穿越介質後不同波長擁有相異折射系數的特性，可省去利用外加結構(如光柵)使單束白光分離為多波長的分布，自動於空間中展開類彩虹的色散區域。此色相差區域可藉由對焦不同波長之焦距來判別待測物軸方向之位置，於還原表面型貌、或是非接觸式的檢測表面缺陷等都有所應用；而於定點偵測區域內所展開的色相差範圍亦可對軸向深度位置進行判定，但至今仍無任何利用此法進行動態偵測的文獻發表。再，雖有眾多文獻對於微流式細胞儀之樣本流聚焦進行討論，但卻無任何對第三維(X-Z plane)的流體聚焦結果進行量化，使之無法對聚焦方法進行性能評估或最佳化；故利用色相差效應的偵測方法進行對微流式細胞儀內流動樣

本測量其深度便是個極佳的實施例。流式細胞儀多採取偵測樣本通過光源所產生的散射光訊號方式，進行細胞或是其他生物樣本的計數或大小尺寸的分類，在傳統方式中光源多使用單色雷射；但若配合色相差效應的偵測方式，必使用白光或是多色混合之雷射或是 LED 光源。以使用一擁有連續光波分佈光譜之白光光源最為理想，較混成光源可省去光波長的選擇以及其所產生的干涉等問題，再者，擁有寬頻連續波長分佈光譜之光源，有助於其後特定波長的選取、評估。於光源入射處置入一透鏡將白光色散成多波長的型態，以形成偵測區域。白光照明方式有可能帶來 SNR 低落的可能，因所偵測的訊號為流動樣本的散射光，白光作為光源的亮場照明方式(bright-field illumination)其背景亦會產生散射，使所得訊號對比值下降，故本研究引入暗視野系統作為照明方式。利用本實驗室自行開發之暗視野照明，一塑料光檔片即可簡易產生暗視野[74]，其上圖騰可自由調整至適用的 N.A. 值，毋需另添購暗視野機構。

綜合以上討論，可歸納出系統的設計概圖，如圖 3-1 所示。配合一物鏡進行光源聚焦，入射至微管道內，**不同波長聚焦於不同軸向深度位置，當流動樣本通過偵測區域時，將散射的不同色光**，藉由分析這些不同色光增強的訊號，便可判別樣本流動的軸向位置。對於此設計的建構、元件的選取以及晶片的製作，將於以下三節內進行詳細的討論以及敘述。

3-1-2 基本實驗架構

本系統整合不同原件設施於一倒立式顯微鏡(Eclipse TE2000U, Nikon, Japan)，系統架構簡圖如圖 3-2(A)所示，以下將對不同元件的選擇進行評估以及分析。為了對系統設置以及其性能進行評估，引入光源需為擁有連續光波分布，實驗室常用光源有鎢絲燈、汞燈以及氙燈；其中汞燈於可見光範圍內多個特徵波峰，且波長範圍不廣，相較於鎢絲燈以及氙燈，汞燈不適用於本系統內。圖 3-3 分別為鎢絲燈以及氙燈的光譜行為，鎢絲燈雖擁有寬廣的波長範圍(約 400 nm~ 900 nm)，但整

體強度表現極弱，且於短波長處強度低落，不利於評估。而氬氣燈擁有寬廣的連續波長範圍(350 nm~1000 nm)，其強度表現極高，雖有特徵波峰出現，但集中於不可見光部分，對系統無影響；故本系統採用氬氣燈(100 W, Nikon)作為平行光源，產生較大範圍的色散行為。

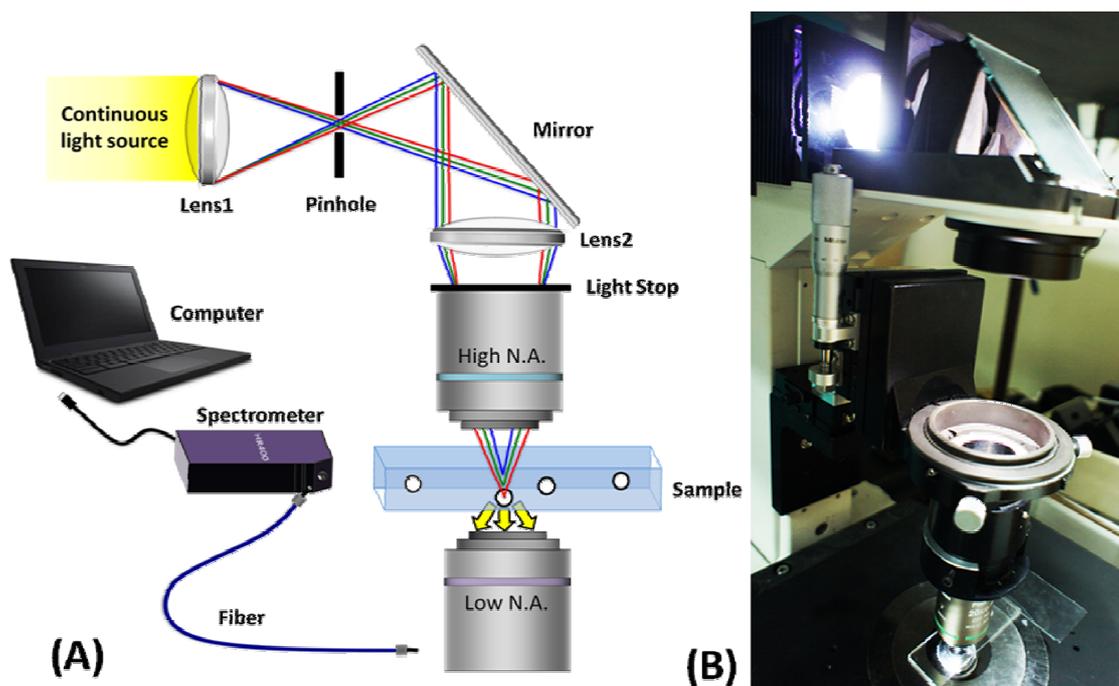


圖 3-2 (A)實驗設置簡圖 (B)實際治具與系統圖

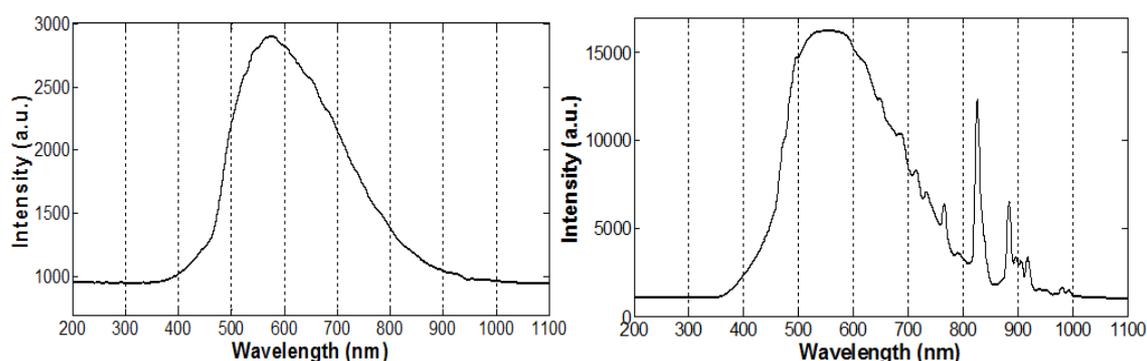


圖 3-3 (左)鎢絲燈以及(右)氬氣燈光譜圖

於平行光入射處放置一透鏡插件(Lens 1)，將入射白光色散為多波長組合。其透鏡的材質與色相差能力有極大的關係，為了拉長色散範圍，本系統引用較低阿貝數的光學透鏡，此光學透鏡的焦距需為 40 mm，直徑為 40 mm 以涵蓋入射光徑

並且聚焦於針孔處。其材質的選用利用數學模型進行色散能力的評估因篇幅較大，故於後小節進行討論。針孔直徑約為 1 mm，色散後的光經由反射鏡後入射至 Len2，將入射光聚焦整理使之通過光檔片。原設計為塑料光檔片，但因氙燈功率高，易將光檔片燒熔，故使用鉻金屬於玻璃上作圖騰遮罩。通過光檔片之色散光因中央直進光的移除形成空心光椎後入射至物鏡，上方採用高數值孔徑物鏡(CFI60 20×/0.75, Nikon, Japan)，使入射光量增加；下方則為低數值孔徑物鏡(CFI60 20×/0.45, Nikon, Japan)，降低其於外界光線所帶來之雜訊並偵測樣本因於管道內流動深度不同之反射光。後通過顯微鏡出口端進入緊配之多模石英光纖(P400-2-UV/Vis, Ocean Optics, USA)進入 UV-Vis-NIR 光譜儀(HR4000, Ocean Optics, USA)進行分析，配合處理軟體(OOIBase32, Ocean Optics, USA)產生光譜圖。

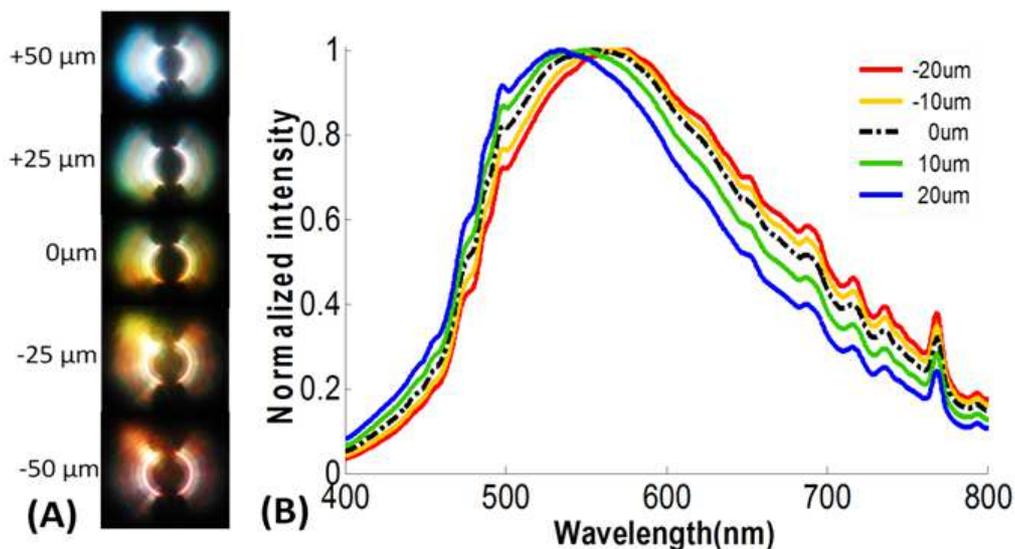


圖 3-4 (A) 靜態未標定螢光 20 μm 粒子於移動 Z 軸下模擬流動粒子於不同深度之散射光變化影像與(B)其光譜行為

其中，為能對此暗視野系統進行校正以及對焦，本系統車置了一 L 型板，並配置 Y 軸以及 Z 軸移動平台。為考慮治具車製時所產生的誤差而使入射光無法完全投射至暗視野系統，Y 軸平台可進行小距離的校正對位；Z 軸移動平台加載具有小解析度之分厘卡(resolution: 1 μm)，可於不同 Z 軸位置進行精度較高的移動，其實際圖如圖 3-3(B)所示。此治具的設計亦因應對此系統設置之可行性可作初步的試驗，藉由改變 Z 軸平台聚焦位置模擬流動樣本於微管道內不同深度位置時之行為，觀

察於微管道內靜置之微粒子(non-fluorescence polymer microspheres, 20 μm , Duke Scientific Corporation, USA)不同色光的增強以及光譜行為進行評估,如圖 3-4 所示。圖 3-4(A)為以對焦點為參考面(零位面),分別調整 Z 軸平台向上、向下移動利用 CCD 所拍攝之影像。而因為短波長因折射係數大,焦距短,故距離微管道上方多反射藍光;相反地,長波長因折射係數較小,所成的焦距長,於微管道下方反射紅光較多,故於可見光範圍內有如同彩虹般色光加重的行為。從圖 3-4(B)中光譜的改變亦可輔佐不同深度位置有相應光波長加重之行為。隨著 Z 軸的抬升,整體光譜行為產生藍移(blue shift)的現象;其中,於可見藍光區域,光強度有明顯增加的行為,紅光區域則有下降的行為。以上觀察可表示,此兩區域的光強度增減可作為樣本 Z 軸位置的指標。

3-1-3 晶片製程

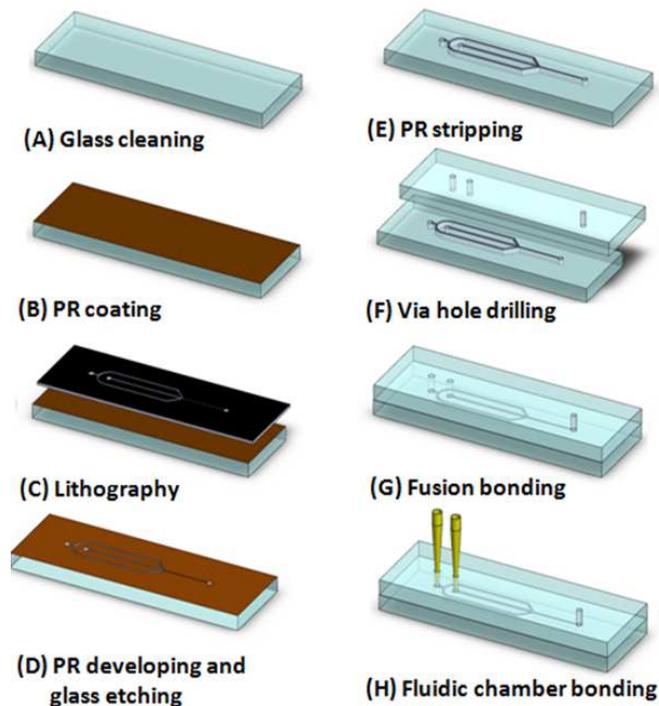


圖 3-5 微流試細胞晶片製作流程示意圖

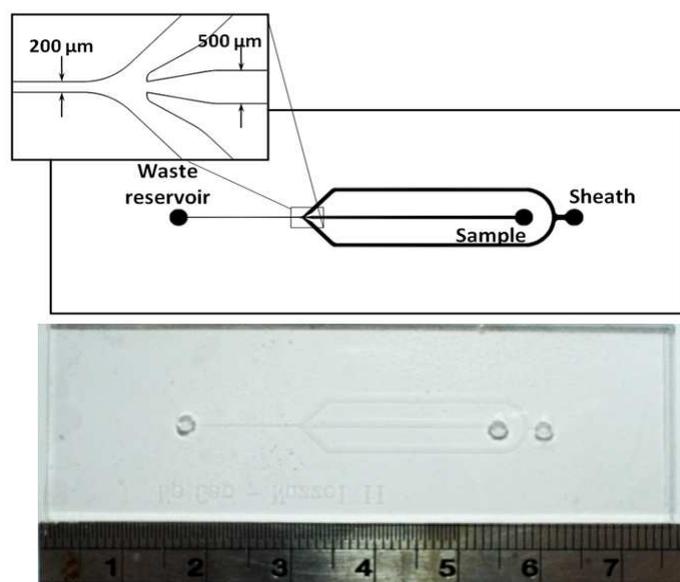


圖 3-6 流道內尺寸設計以及實際晶片成品圖

圖 3-5 演繹微流式細胞晶片的製作流程，配合配合一快速玻璃晶片製程技術[75]，以一般普遍可購得之載玻片(76×26×1 mm, Marienfeld, Germany)作為晶片基底並於此建構出微流道結構。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)。後蒸鍍一薄層之 hexamethyl disilazane(HMDS, J. T. Baker, USA)作為玻璃以及光阻之黏著層，接著旋佈厚約 3 μm 之正光阻(PR, AZ4620, Clariant, USA)於上，作為蝕刻玻璃之遮罩(圖 3-5B)。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 3-5C)。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)蝕刻 40 分鐘，獲得深度約 36 μm 之微管道(圖 3-5D)，其邊鞘以及前方流道其寬度皆為 500 μm ，後方聚焦流道寬為 200 μm ，如圖 3-6 上方所標示；此時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。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 3-5E)。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 3-5F)；將鑽孔後之空白載玻片與具微流道結構之載玻片對位後置入燒結烤箱以 670°C 持續 10 分鐘進行熱接合(圖 3-5G)，其實際晶片圖如圖 3-6 下方所示。為了易與後方注射幫浦(syringe pump)連接，剪下微量吸管尖端約 10 mm 並緊配黏著於流道入口(圖 3-5H)，後即可簡易插入細管與幫浦連接。

3-1-4 透鏡的材料選擇以及色散能力評估

本系統中位於 Len 1 位置的透鏡插件為控制色相差範圍最關鍵的部分，由於其材質的不同會影響其各個波長的折射係數，導致各波長焦距也隨之改變，故因應不同用途而選擇適當的透鏡材質可達到最佳的效果；於初步的系統架構中，將色散範圍拉大較利於評估系統能力。塑膠光學透鏡(optical plastics, OPs)在光學系統中多有應用，其因其質輕、易於機械加工製造且極為便宜，故多用於一般光學系統，如投影機等；但亦由於此材質之透鏡其造成色相差能力極強，此特性使之適用於本系統，表 3-1 列出 7 種塑料於不同波長所對應之折射係數[45]。其中以 PMMA(poly methyl methacrylate)的塑料的有機玻璃為材質的光學玻璃較為普遍，故以材質為 PMMA 之透鏡作為色差插件。

Wavelengths (nm)	435.8	486.1	587.6	703	833	1052
Material						
PMMA	1.502	1.497	1.491	1.486	1.484	1.481
PS	1.617	1.606	1.592	1.582	1.577	1.572
PC	1.612	1.599	1.585	1.575	1.570	1.565
Polyacrylate	1.507	1.500	1.494	1.491	1.489	1.486
Polycarbonate	1.597	1.587	1.572	1.565	1.560	1.555
Polystyrene	1.615	1.604	1.592	1.582	1.576	1.572
Acrylic	1.502	1.498	1.492	1.488	1.485	1.483

表 3-1 七種塑膠光學透鏡材質於六種波長下所對應之折射係數[45]

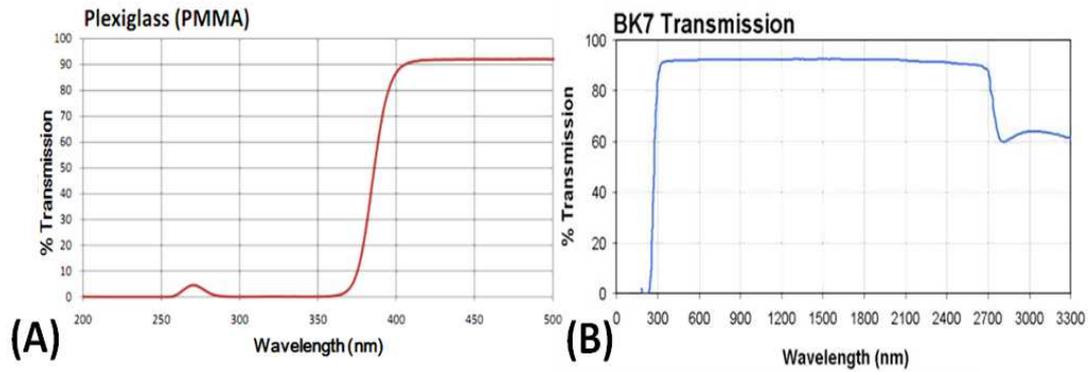


圖 3-7 (A)PMMA 以及(B)BK7 之穿透光譜

由其穿透光譜可知(圖 3-7A)，PMMA 材質的光學透鏡會吸收短波長，於波長 370 nm 後穿透率大於 50%；但不致影響可見光範圍的色相差功能。其阿貝數可利用前章以介紹過之 Cauchy's dispersion 方程式計算出 587.6 nm、486.1 nm 以及 656.3 nm 之對應折射係數後，帶入阿貝數公式得知。PMMA 之色散係數分別為： $A_1=2.399964$ ， $A_2=-8.308636E-2$ ， $A_3=-1.919569E-1$ ， $A_4=8.720608E-2$ ， $A_5=-1.666411E-2$ ， $A_6=1.169519E-3$ ，利用 Matlab 運算軟體計算出 n_d 、 n_F 以及 n_C 分別為 1.4914、1.4973 以及 1.48796，帶入阿貝數表示式可得 $V=52.60$ ，屬於相當低阿貝數的光學玻璃。另亦對系統中為聚焦功能的 Lens2 透鏡，其材質為 BK7 進行分析計算，於 300 nm 之後擁有極佳的穿透率(圖 3-7B)，計算所得之阿貝數為 $V=64.17$ ，說明其色相差範圍低於 PMMA 材質之透鏡。

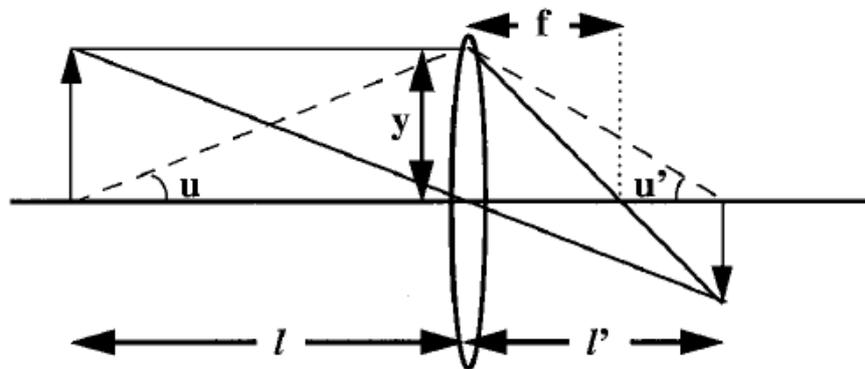


圖 3-8 軸向色相差數學模型推導各代稱示意圖

選定材質後，藉由建立數學模型對 PMMA 材質透鏡進行色散能力的理論評估。因針對軸向深度位置的偵測，故於本研究軸向色散能力為主要探討部分，於橫向色散部分就不多作著墨。透鏡焦距以 f 作為表示，物體至透鏡前距離為 l ，像至透

鏡距離為 l' ；入射光線高為 y ，與軸至外側光線角度 u 可近似此等式 $y=lu=l'u'$ ，如圖 3-8 所示。透鏡成像中物與像距離關係藉由 Gauss formula[76]來表示：

$$\frac{1}{l'} - \frac{1}{l} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) = (n - 1)c = \frac{1}{f} \dots\dots\dots E1$$

其中 n 為透鏡之折射係數，而 R_1 、 R_2 為透鏡雙面之曲率，後將其簡化為 c 表示。為了評估於可見光範圍內，像因色散所造成之於 F 藍光以及 C 紅光之焦距差，故將 E1 式分別以紅光以及藍光波長 l_C 、 l_F 作相減處理表示：

$$-\frac{1}{l_C'} + \frac{1}{l_F'} + \frac{1}{l_C} - \frac{1}{l_F} = (n_F - n_C)c \dots\dots\dots E2$$

$$\frac{l_C' - l_F'}{l'^2} - \frac{l_C - l_F}{l^2} = (n_F - n_C)c \frac{n_d - 1}{n_d - 1} = \frac{1}{fV} \dots\dots\dots E3$$

於上式中 $l'^2 = l_C' l_F'$ ， $l^2 = l_C l_F$ ；另因阿貝數為 $V = (n_d - 1)/(n_F - n_C)$ ，故 $\frac{1}{f} = 1/(n_d - 1)c$ ， n_d 代表黃光帶之折射係數，其頻帶約於可見光中央。入射光束高度會改變距焦位置，故於 E3 式左右邊同乘 $-y^2$ ：

$$L_{ch}' \left(\frac{y^2}{l'^2} \right) - L_{ch} \left(\frac{y^2}{l^2} \right) = -\frac{y^2}{fV} \dots\dots\dots E4$$

$$L_{ch}'(u'^2) - L_{ch}(u^2) = -\frac{y^2}{fV} \dots\dots\dots E5$$

於 E3 式中帶入 $y=lu=l'u'$ 等式，故得。 L_{ch}' 為紅光 C 以及藍光 F 所成像焦距差，若於消色差透鏡中，紅光 C 以及藍光 F 之焦距差應為零；於 E5 式亦可說明單一透鏡是無法達到完全消色差之功能，組合不同的透鏡可達到消除色差，亦可能產生更大的色差，故其色差程度是具有疊加效應，若有 j 組透鏡，則色差可表示為：

$$L_{ch}'(u'^2) - L_{ch}(u^2) = -\sum_{i=1}^j \frac{y_i^2}{f_i V_i} \dots\dots\dots E6$$

於本系統，物體為一平行光源，故物體至透鏡距離為 l 為無限大， $L_{ch}(u^2) = 0$ ，故可簡化為：

$$L_{ch}'(u'^2) = -\sum_{i=1}^j \frac{y_i^2}{f_i V_i} \dots\dots\dots E7$$

由 E7 式可知，影響色差程度除了已知之透鏡阿貝數外，亦有入射光之對軸高度以及透鏡焦距。本研究所用之平行光源其外側光對軸高度與 PMMA 透鏡半徑相同，

為 20 mm，焦距為 40 mm，阿貝數為 52.60，計算後得知其可見光之色差為 190.11 μm 。而焦距為 50 mm 之 BK7 透鏡，阿貝數為 64.17，其色差範圍為 124.67 μm ，其色相差程度只有 PMMA 透鏡 0.656 倍，故本系統採用以 PMMA 作為材質之塑料材質之透鏡作為色差透鏡。

3-2 偵測方法

現已提出利用色相差方法進行 Z 軸方向位置偵測的方法中，多以單一波長與所對焦相應深度位置關係進行分析，此法施行於全波長偵測中無法辨別出單一波長的增強，且偵測範圍會直接受制於色差鏡組之阿貝數。針對於此，本研究提出強度比值對深度位置關係之偵測方法；調整聚焦物鏡之 Z 軸方向，對管道內靜止粒子進行觀測，利用其特定短波長以及長波長之強度比值(intensity ratio)來表示其於不同深度位置時色光增強或弱化行為，並建立此兩者之關係線，於動態偵測中將流動樣本之強度比值對照已建立的資料線後可快速診斷出深度位置。於此偵測方法中，1)排除非色散所造成的強度變化變因以及 2)選取恰當之波長表示強度比值為主要探討的主題。

由於本系統採用連續光譜作為光源，其光譜表現可於前節圖 3-3 所見，其藍光表現弱於紅光區域，呈一高斯分布。此原生差距使觀察藍光與紅光間改變量所成之比值變得不明顯。而系統所使用之暗視野照明方式，其兩葉片狀(blade-shape)之光罩所造成的光錐於聚焦以及離焦時所造成的光訊號落差會相當可觀。如圖 3-9 所示，Z 軸移動平台使高數值孔徑之物鏡可進行上下位移，調整聚焦位置。隨著 Z 軸平台下移，兩葉片型光錐會逐漸向對方靠攏，直至聚焦處，兩葉片型光錐會交會，產生強度最高之光訊號；後隨著 Z 軸方向持續下移，兩光錐亦會遠離對方，使光強度直落。由此可知，於靜態偵測時，藉由移動 Z 軸平台所觀察到之強度變化，除了因色相差所造成不同色光聚焦外，另有一部分是因於暗視野系統聚、脫焦所造成的。而在 raw data 中可能因參考點的選取，使不同次實驗中，整體光強度

的不同。因聚、脫焦所造成的光強度改變為系統整體行為，故於進行強度比值的計算中，就已涵蓋其所造成的影響。但為去除後者所造成的誤差，使強度比值精確表現色散於深度改變量的影響，本研究利用兩次正規化過程(normalization)，配合簡易的數學運算即可有效的去除此變因並且獲得有效的強度比例值。

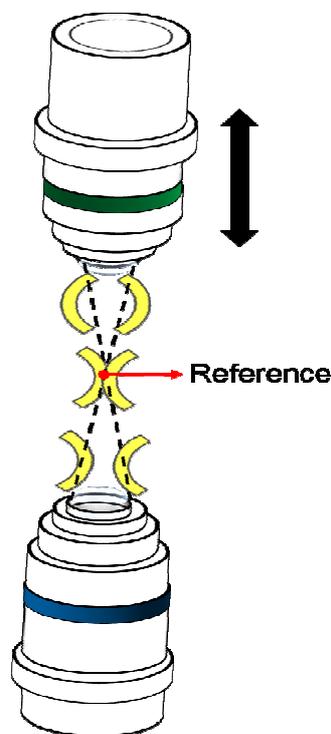


圖 3-9 暗視野照明聚、離焦之葉形光錐行為

正規化過程可由圖 3-10 演繹，其過程以 Matlab 寫為程式進行運算。首先，樣本於不同深度位置(D_n)所散射之光訊號由光譜儀偵測後以波長對強度之全光譜顯示，其中選取特定單一波長作為短波長代表，並將其於不同 D_n 之強度儲存為 S_n ；另於長波長區亦選取一波長，並將其不同深度之強度儲存為 L_n 。如同前述，此時兩波長於不同 D_n 之強度變化，可能因每次參考點選取而造成誤差；為了去除此，進行第一次的正規化(Normalization 1)。取光訊號最強之聚焦點作為參考點(reference)，並將兩波長之強度變化 S_n 、 L_n 值分別除以參考點處之強度 S_0 、 L_0 得到兩資料列 S_j 、 L_j 。此時兩波長之強度變化皆為相對於參考點所成的比例值，消除因每次參考面選取的誤差，造成絕對強度不同的問題；另亦將參考點作為零位面， S_j 、 L_j 表現出不同深度位置相對於零位面之兩波長強度變化。第二次正規化(Normalization 2)的目的地為呈現以兩波長之強度比例值，兩波長之強度值相除可將

雙變數簡化為單變數，可得 $S_j/L_j = I_j$ ，使深度資料線的建立更為簡單。 I_j 即為相對於零位面，各 Z 軸深度位置因色散所造成的強度比例。零位面下方藍光低落，紅光散射強度高， I_j 值低；於零位面上方其藍光表現較強，紅光低落， I_j 值較高，於微流道內 Z 軸位置由低至高，與 I_j 值預期呈現一正成長關係。此檢量線於後期動態偵測時，可藉由流動樣本所呈現的 I_j 值對照此資料線即可得其相對應之深度位置。檢量線的建立除了可使用交叉比對的方式進行解析，達到更寬的偵測範圍的目的外，期間因系統聚、脫焦所造成強度變化、入射光照射樣本所造成的繞射... 等可能會造成訊號有誤差的光學現象，都於建立檢量線的計算過程中涵蓋。

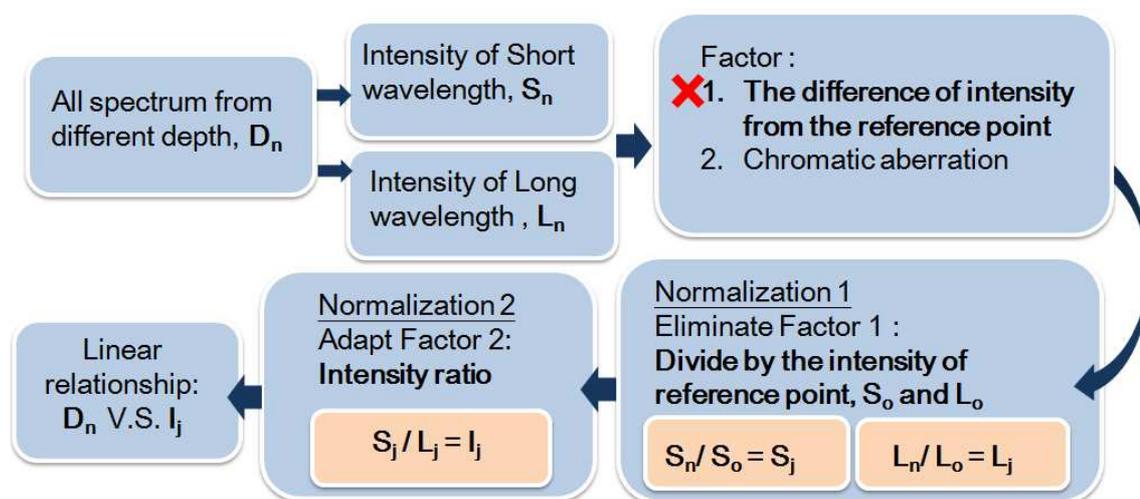


圖 3-10 深度偵測之正規化流程示意圖

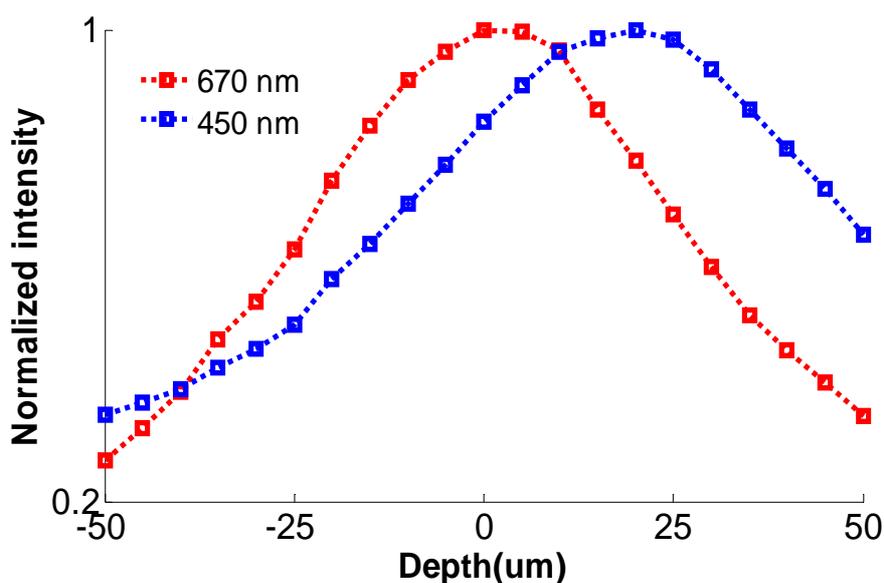


圖 3-11 450 nm 以及 670 nm 兩波長於不同深度位置之正規化後強度變化

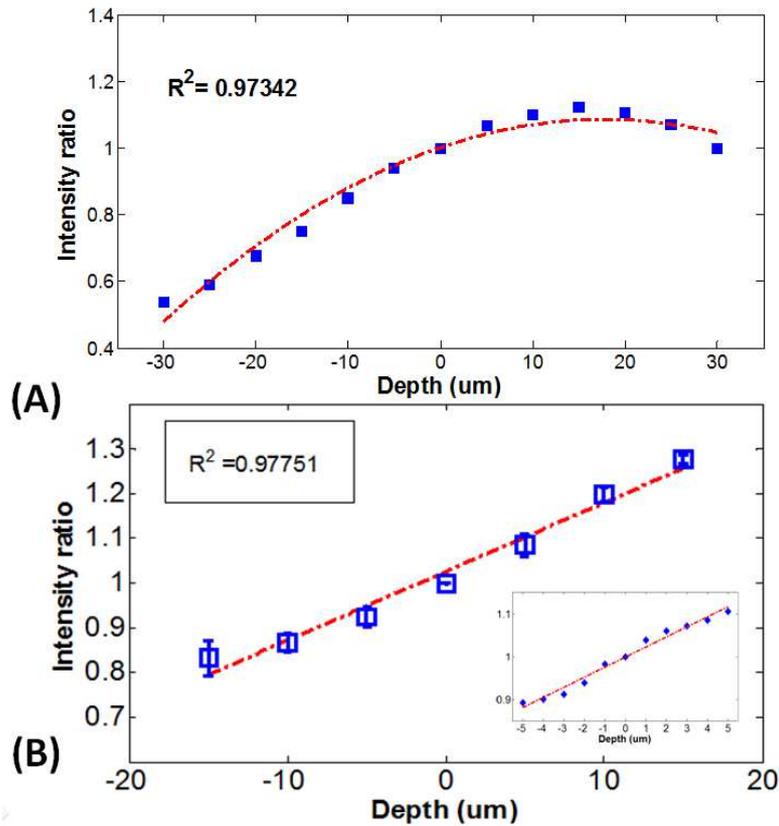


圖 3-12 (A) $\pm 25 \mu\text{m}$ 深度位置對其強度比例值 (B)擷取有效線性範圍 $\pm 15 \mu\text{m}$

確立偵測方法後，選取適當波長作為強度比例值的評估是極為重要的。於可見光範圍內，本系統先以 450 nm 作為藍光區域強度增減行為代表，670 nm 作為紅光區代表進行假設性評估。圖 3-11 顯示兩波長於不同深度位置時強度改變量，可明顯看出近於零位面時，670 nm 強度最高，可約略估計 670 nm 之焦距約於 0~5 μm ；而 450 nm 約於 20 μm 處其強度表現最高，其焦距約為 20~25 μm 間。綜合以上觀察，此兩波長之峰對峰間距約 20 μm ，取兩者比值所成之線性範圍估計至少 20 μm 。但由圖 3-11 亦可發現於零位面上方位置以及下方位置，其 450 nm 以及 670 nm 差距越來越大，造成非對稱之分布。將深度位置以及其所對應之兩波長強度比例值繪於圖 3-12(A)，可見其成長趨勢約為二次曲線關係。其因隨著靠近管壁上方 (D_n)，此時藍光強度增強，與深度改變成正比 $D_n \propto x$ ；紅光強度減弱，與深度改變量成反比 $D_n \propto 1/x$ ，故強度比值可表為 x^2 ，故深度改變對強度比值行為同二次曲線。其中，於 $\pm 15 \mu\text{m}$ 區間有趨近線性分佈關係。故對 450 nm 以及 670nm 兩波長之強度比例

值下，本研究取其有效線性範圍為 $\pm 15 \mu\text{m}$ ，共 $30 \mu\text{m}$ 之有效偵測範圍作為檢量資料線，同圖 3-12(B)所示。小圖為以 $1 \mu\text{m}$ 作小尺寸採點之線性關係，其線性度可達 0.97751。

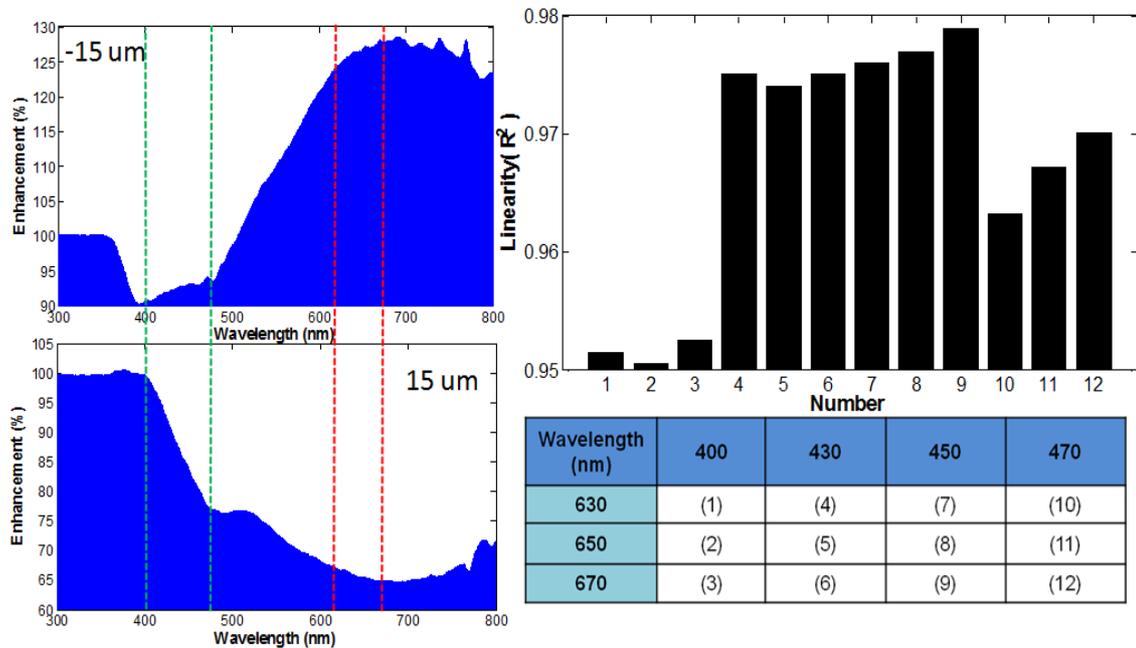


圖 3-13 短波及長波強度增強區域，以及其選定短、長波長範圍內進行波長選取之最佳化結果

從上段敘述可知，所選定的波長強度比值會影響其線性度，雖已知 450 nm 以及 670 nm 之強度比例值可達到極佳的線性度，但未能確認於可見藍光以及紅光區域是否有其他波長組合可以達到更高之線性關係。為達到系統最佳化，本研究亦於一縮小範圍內作搜尋比較。為省去評估時間，先於管道深度上方 $15 \mu\text{m}$ 以及下方 $-15 \mu\text{m}$ 位置記錄各波長之光訊號增強度，並於其中歸納出於可見光內其增減反應較明顯的波長區域，以縮小搜尋範圍。圖 3-13 左上方顯示相對於零位面，於 $-15 \mu\text{m}$ 之深度位置其各波長之強度增強值；下方則為 $15 \mu\text{m}$ 之增強度。比較上下兩圖，深度為 $15 \mu\text{m}$ 處可見藍光區域約於 400 nm 至 450 nm 有明顯的增強行為，而可見紅光區域，其光訊號強度則於 630 nm 至 670 nm 有明顯的下降。故於藍光區域粗略取 400 nm、430 nm、450 nm 以及 470 nm；於紅光區取 630 nm、650 nm 以及 670 nm 作組合，對其進行深度以及強度比值線性關係的建立，進一步評估線性度之高低來決定最佳之波長組合。圖 3-13 右下方為選定藍光波長以及紅光波長組合之編

號，通過正規化過程後處理出於深度位置 $\pm 15 \mu\text{m}$ 之線性度。由圖 3-13 右上方可見，其波長組合其線性度皆超過 0.95，但於 400 nm 對 630 nm、650 nm 以及 670 nm 之比值，其線性度都極為低落；而 450 nm 對各紅光波長皆可達到較高之線性度；於 470 nm 表現又顯低落。其中，以 450 nm 對 670 nm 之線性度為最佳，故系統使用此兩波長確實可達到較高線性度。

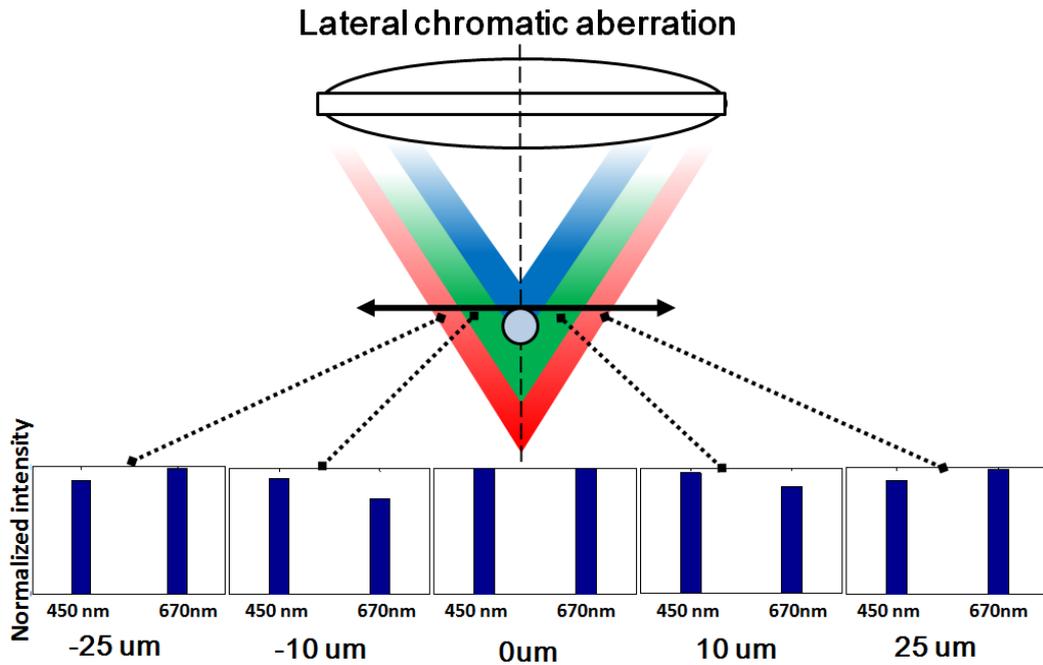


圖 3-14 橫向色相差於不同 X-Y 平面位置對藍光、紅光區域訊號的影響

考慮色相差是於空間中展開軸向以及橫向的影響範圍，其兩方向平面的色相差是相伴產生。雖於初始設計概念中主要採取軸向色相差作為工作原理；但其共伴產生的橫向色相差所造成的誤差，極有可能影響訊號，同圖 3-14 所示，於系統中進行橫向色相差所影響範圍進行評估。通過針孔後投射至管道內，聚焦光點像直徑約為 $50 \mu\text{m}$ ，故其橫向色相差影響範圍，約為距離樣本中心 $\pm 25 \mu\text{m}$ 處。可發現於同軸向位置時，橫向距離中心軸位置越近，藍光區域(450 nm)光強度高於紅光(670 nm)訊號；反之，於外圍位置其紅光強度高於藍光。表示其橫向色差確實會影響所偵測的訊號。但於相同軸向深度位置時，改變 $1 \mu\text{m}$ 橫向平面位置，於藍光訊號之變異量只有 0.136%；而在紅光訊號中亦只有 0.434%，其影響的程度相當小。且本研究是在於一微流細胞儀晶片中進行流動樣本的偵測，細胞儀中兩邊鞘流可

有效的限制流動樣本的 X-Y 平面位置，使每個流動樣本皆以相同 X-Y 平面位置通過偵測區域，故因橫向色相差所造成的訊號誤差微乎其微。

此章介紹實驗架構的設立，並且對色散元件之材料利用數學模型進行了評估；同時確立偵測方式，以簡易的數學運算進行正規化過程，確定零位面。加以小範圍內的選定波長最佳化，使系統的施行更加可靠。將於下章以此確立系統進行一連串的測試並且對動態偵測有更進一步的探討。

第四章 實驗結果與討論

4-1 光譜儀於動態偵測的使用

4-1-1 系統對樣本尺寸解析能力

在利用此色相差原理為基礎之深度偵測系統進行動態偵測前，首先須針對系統對流動樣本的尺寸大小是否有辨別度進行測試。本研究所使用之暗視野系統，是使用高數值孔徑之20倍物鏡聚焦光源，故對於小於一定尺寸之樣本有解析上的困難；再，尺寸的差異對於有效散射光之表面積有絕對的影響，故其強度比例上的差異度亦是須被評估的一環節。

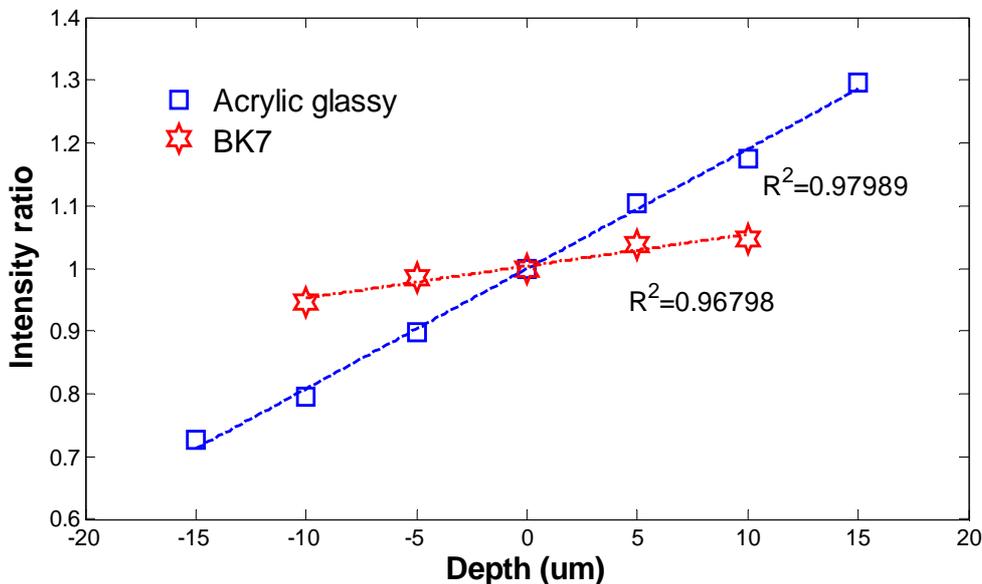


圖 4-1 PMMA 以及 BK7 透鏡其有效偵測範圍圖

系統中Lens1區域為可抽換不同材質透鏡的插件，同前章所提及，不同材質之透鏡會造成程度不同的色相差範圍：標準光學玻璃(BK7)所造成的色相差程度，相對於本系統所使用之PMMA材質之雙凸透鏡只有其65.6%。如圖4-1所闡明，對靜止於管道內20 μm 未標記螢光微粒子進行偵測。BK7透鏡之有效偵測範圍確實受到其較高校正色相差能力透鏡所影響而下降，約為 $\pm 10 \mu\text{m}$ 。另，其斜率亦小於PMMA透鏡，此代表其深度對整體色相差改變量影響小於PMMA透鏡。造成此現象的原因可由圖4-2(A)解釋，圖中入射光皆已聚焦於參考點(零位面)；由於BK7透鏡於較短距離內色相差出與PMMA透鏡相同的可見光波，也就是於相同深度範圍內BK7

透鏡較PMMA透鏡跨越了更多光波長。PMMA透鏡於前章計算出其F至C光波長內，軸向色散為 $190.11\ \mu\text{m}$ ，BK7透鏡則為 $124.67\ \mu\text{m}$ ；故PMMA透鏡改變 $1\ \mu\text{m}$ 深度位置時，跨越平均約 $0.89\ \text{nm}$ 的波長，而BK7則涵蓋了約 $1.365\ \text{nm}/\mu\text{m}$ 的波長改變量。假設將PMMA透鏡系統之入射光向Z軸上移至綠光聚焦處，相同深度位移下，BK7系統卻可能已進入紅光影響區域。此種情形會造成所選定的 450nm 以及 670nm 之強度比值失去對深度改變量應有的行為，使SNR下降，偵測範圍頸縮，同時亦使其強度比值改變量下降，故使斜率變小。故於大範圍深度偵測時，使用低阿貝數透鏡可達到較好的效能。

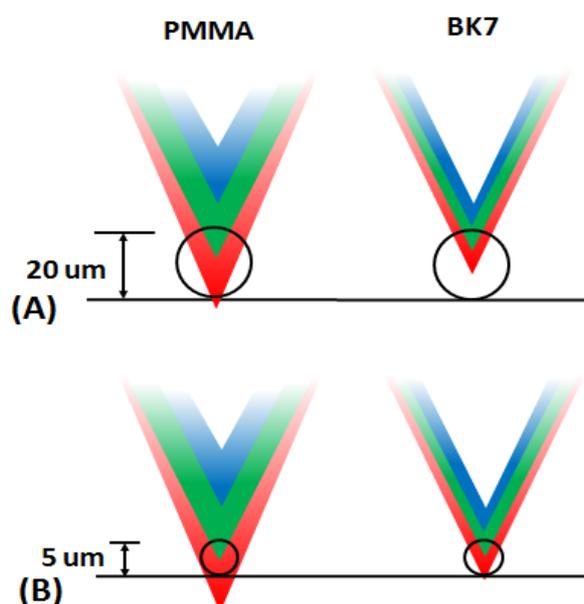


圖 4-2 於參考點下(A) $20\ \mu\text{m}$ 以及(B) $5\ \mu\text{m}$ 未標記螢光微粒子於 PMMA 以及 BK7 透鏡下之行為示意圖

雖然高阿貝數透鏡不利於較長距離之偵測，但其於定深度距離內所跨越較多波長的特性卻於小尺寸樣本的偵測有較大的優勢。如圖4-2(B)所示，BK7透鏡所造成的色相差區域，波長與波長間的焦距差較小，故於相同Z軸位移下，BK7透鏡系統估計對小尺寸的樣本有較高的解析度。簡而言之，低阿貝數透鏡可達到較廣之色散範圍，較低解析度；高阿貝數透鏡僅能達到低色散範圍，卻可獲得較高解析度。為驗證此假設，本研究分別使用PMMA透鏡以及BK7透鏡，於微管道內靜止之不同尺寸之微粒子進行測試。

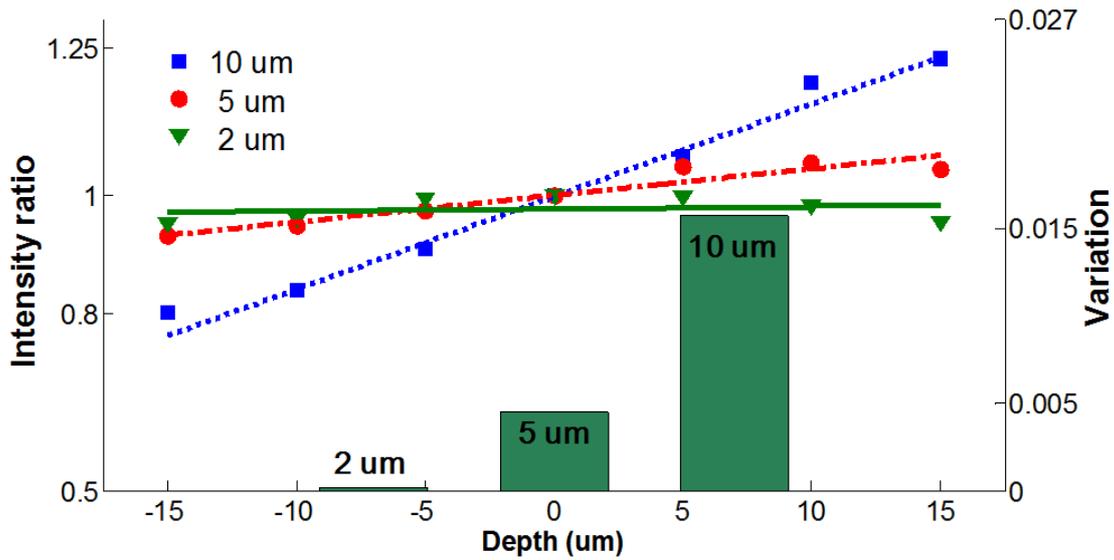


圖 4-3 PMMA 透鏡系統對 10 μm 、5 μm 以及 2 μm 微粒子之深度偵測

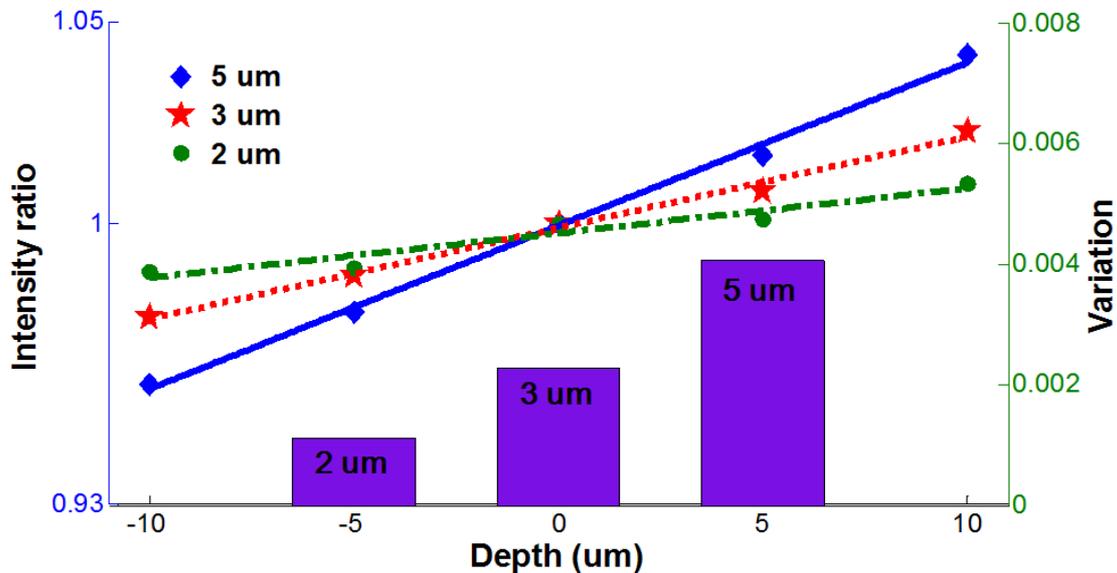


圖 4-4 BK7 透鏡系統對 5 μm 、3 μm 以及 2 μm 微粒子之深度偵測

如圖4-3所示，於PMMA透鏡系統下，分別對尺寸較大之10 μm 、5 μm 以及2 μm 靜止微粒子進行觀測。可發現整體斜率隨著尺寸縮小而下降，其主要因有效反射光面積縮小影響，致亮度下降。其中，10 μm 以及5 μm 微粒子於線性度表現皆同，但於小尺寸2 μm 微粒子卻以明顯表現出現失去線性度，代表強度比例值以無法表現出深度位移量。各尺寸斜率，於此稱強度比值之變異量(variation)分別為0.016、0.005以及0.0003，其中2 μm 微粒子變異量極小。期可能因PMMA透鏡對小尺寸樣本解析能力不足所造成，故使用解析度較高之BK7透鏡對小尺寸樣本5 μm 、3 μm 以及2 μm 進行偵測，如圖4-4所示。雖有效偵測深度降至 ± 10 ，但可圖中發現小尺寸

之樣本線性表現極佳，且變異量由大尺寸至小分別為0.004、0.002以及0.001。其中，於2 μm 其變異量遠大於PMMA透鏡系統下的變異量，說明BK7透鏡系統可對小尺寸樣本有較佳的解析能力，與假設結果相符。雖於BK7透鏡系統可對小尺寸樣本進行解析，但整體變異量依舊偏低，此則肇因可能為已達所使用的20倍物鏡之解析極限，若欲進行更小尺寸樣本的解析，可更換倍率更高之物鏡以達到較大變異量的偵測結果。

4-1-2 動態樣本之深度位置偵測

動態偵測主要為利用一已色散成多波長型式之偵測區域，當流動樣本通過時，其因粒子於不同Z軸位置之X-Y平面流動，會散射不同色光。因使用光源為具連續光譜之白光，故光譜約略呈高斯分布；也因如此，不同深度位置之樣本所散射之光譜因相對應色光的增強，並不表現出單一波長的增強，而是整體藍光或紅光帶之強度有增長或是低落的反應。以450 nm以及670 nm作為藍光、紅光區域之指標，並取其強度比值對照前章已建立的資料線，即可得到所對應的深度位置

在以光譜儀作為感測端的系統中，施用PMMA透鏡插件進行動態的深度偵測。以20 μm 未標記螢光微粒子稀釋至濃度約 4×10^5 beads/mL水溶液，並設定注射幫浦以流量為0.18 $\mu\text{L}/\text{min}$ (流速約為0.5 mm/s)注入微流式細胞儀晶片中，而光譜儀之取樣速度則設定為20 Hz。於偵測開始前，將高數值孔徑之物鏡調設至零位面(參考點)，後所偵測之深度位置皆為與此零位面的相對位置。其結果同圖4-5所示，圖4-5(A)為粒子通過之時序圖；無粒子通過時，暗視野使之光訊號為零，而當粒子通過時則散射光訊號，其訊號強弱可能因粒子流經近聚焦(參考點)區或遠離所造成，亦有可能因粒子非均一尺寸抑或是粒子形狀等皆有可能對強弱有所影響，但因不與深度偵測有直接關係，在此就不多加以著墨。圖4-5(B)則為圖4-5(A)中通過粒子之相對應深度位置，此因管道內深度約為30 μm ，而使用樣本尺寸為20 μm ，使其可移動量較少，改變量皆於 ± 5 μm 範圍內移動；其同時驗證此系統對於微小的Z軸差異

量亦可解析。經計算後其處理能力(throughput)約為12 particles/s，此處理能力於低流量的狀態下還算堪用。因光譜儀較不敏感且取樣速度慢，故無法對高流速樣本進行偵測。為達到更高流速的動態偵測，偵測端可施用感度極高且取樣速度極快之光電二極體，其系統的調整以及評估將於下節進行。

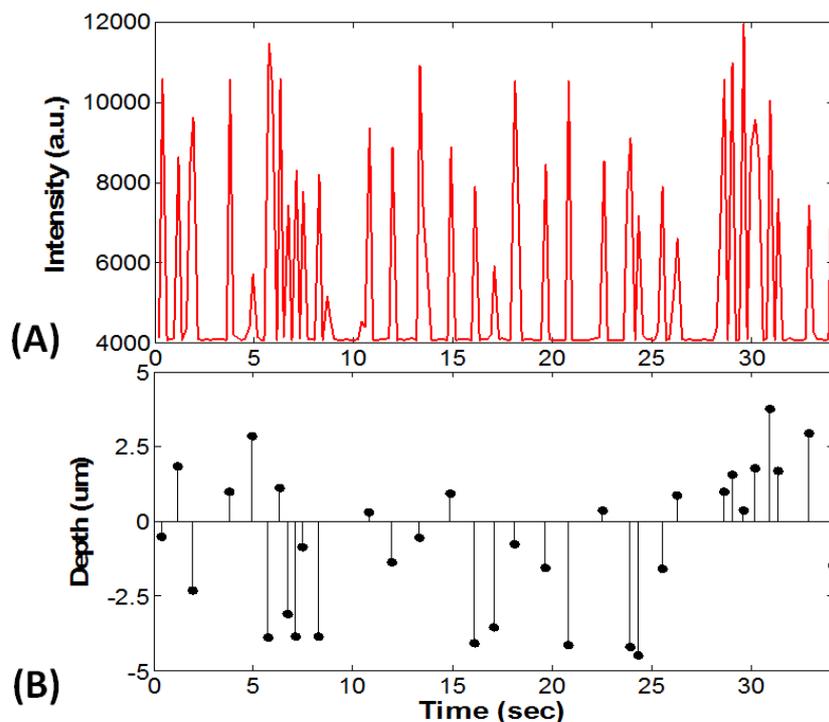


圖 4-5 (A)20 μm 未標定螢光粒子通過偵測端之時序圖以及(B)所對應之深度位置

4-2 高速流動樣本之深度偵測

4-2-1 高速深度偵測系統架設及校正

使用光譜儀作為檢測端主要針對於初步系統特性以及性能評估，對於動態偵測，因其光訊號敏感度以及取樣速度不足，使之無法應用於較高流速之深度偵測。為增加偵測速度，使用高敏感度且取樣速度極快之光電二極體作為檢測器確實較為可靠；為配合不同偵測器的使用，其裝置將作小幅度的改變，並且對調整後系統進行可行性的測試以及對高速流動樣本的偵測能力。系統主要還是建立於倒立式顯微鏡，並配合物鏡型暗視野照明方式進行偵測；樣本散射光訊號由於顯微鏡左側出口。原始使用光譜儀的系統因輸出訊號為全光譜，故可於一次訊號的收取獲

得兩種光波(450 nm、670 nm)之強度；但若使用光電二極體，其輸出訊號為電訊號，無法單次記錄多特定光波，故若意欲引用光電二極體必須設置一新治具以及分光方式進行單次偵測卻可同時獲得多特定光波長強度。

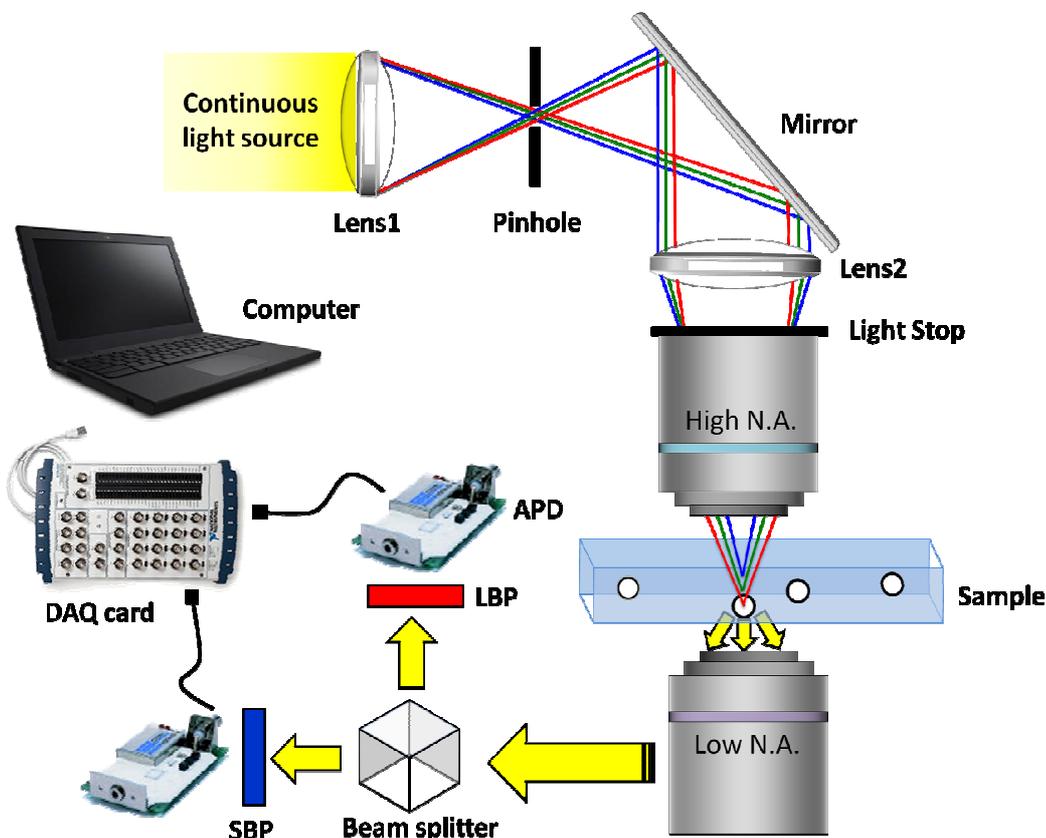


圖 4-6 高速流動樣本深度偵測之系統設置示意圖

為解決於單一光訊號中解析兩種光波長強度之問題，本系統使用穿透與反射分別為 50% 之分光鏡(400 nm-700 nm, 50:50 non-beam splitter cube, ThorLabs)，將從顯微鏡出口處之單一光訊號略平分為兩道光，並車置三通管，將分光鏡至於其中，使光路不受外界其他光雜訊干擾。考慮到光電二極體極為敏感，故於三通管兩道光訊號出口處設置一直徑約 0.5 mm 之針孔，屏蔽非偵測處之散射光所造成的雜訊。現欲將兩道光訊號一視為藍光訊號，另一則為紅光訊號之來源，故分別於其出口端設置低帶通濾光鏡(Short Bandpass Filter, SBF, CWL=450±8 nm, FWHM=40±8 nm)作為藍光訊號出口，以及高帶通濾光鏡(Long Bandpass Filter, LBF, CWL=650±8 nm, FWHM=40±8 nm)作為紅光訊號出口。兩台雪崩式光電二極體(C5460-01, HAMAMATSU, Japan)分別置於藍、紅光出口，分別偵測其強度。兩雪崩式光電二

極體(avalanche photodiode, APD)將所得到之光訊號強度轉為電訊號輸出後，配合多輸入口之資料擷取卡(NI USB-6259, 16 input, 16 bit, 1.25 MS/s, National Instruments, UAS)，接於個人電腦，以 LabVIEW 寫出程式使之即時顯示訊號變動以及控制取樣速度進行資料的儲存，以上設置如圖 4-6 所示。其中光電二極體通常對特定波長有特別敏感之特性，於 HAMAMATSU 原廠說明書中指出於 800nm 左右有最高之敏感度，而 650 nm 之光子敏感度約為 450 nm 二至三倍左右，故於紅光輸出會高於藍光輸出。

確立系統後，需進行資料線的建立。因現系統所得之藍、紅光強度訊號皆為一寬帶(40 nm)之平均值，非使用光譜儀系統時採取之單支波長強度比值，故須重新評估其線性關係。較光譜儀而言，高敏感度的光電偵測器需將可能影響訊號之背景雜訊盡可能去除。系統所引入之物鏡型暗視野系統中控制光通量之光檔插件，其葉片狀光通區域所張開之角度會影響光通量以及於管壁邊散射光量；於定內外徑下，張角越大可帶來較高之光通量，同時亦會照明管壁邊造成不必要的散射光。因光譜儀較不敏感，為顧及較高光通量可帶來較高光強度，故施用夾角較高之光檔插件。但現採取敏感度極高之 APD 作為偵測端，故須採取適當小夾角之光檔插件減少管壁散射光以獲得較佳之訊號值，建立線性度較高之資料線。由圖 4-7 為使用不同夾角度 100°、80°以及 60°之光檔插件進行深度對強度比例值之資料線的建立，並於遠離參考點約 10 μm 處拍攝離焦時管道散射光情形。使用夾角 100°光檔下，可發現因夾角較大使管壁仍受到光源照明而產生極大的散射光，其嚴重影響線性表現。而於夾角 80°光檔下，可有效減少管壁散射光，但仍有部分來自管壁散射光存在；於管道較低處因管壁散射光減少，使其紅光區域散射雜訊下降而得到線性校正，但於管道較高處仍受雜訊影響。夾角 60°光檔則可有效去除管壁散射光而達到背景全黑的效果，使 SNR 佳化；其亦反應於線性表現上，相較於夾角 80°光檔其管道較高處亦獲得校正，達到最佳之線性度。由以上測試可歸納出使用夾角 60°光檔插件可得到最佳線性度之資料線。

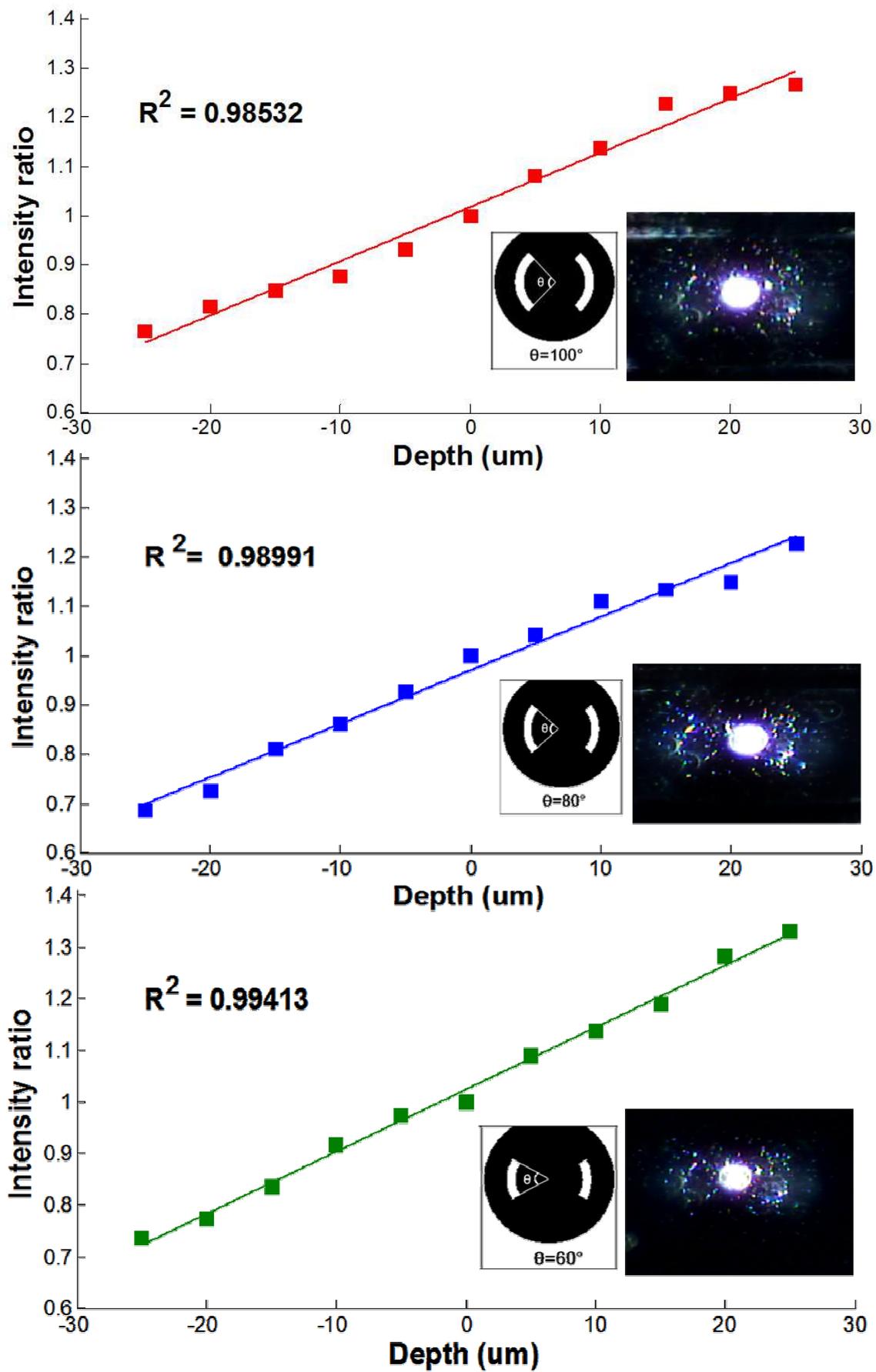


圖 4-7 上、中、下圖分別為使用 100°、80°以及 60°之光檔插件之資料線圖

藉由以上系統之佳化，建立一完整之深度對強度比例值之資料線，如圖 4-8 所示。相較於光譜移作為偵測端、選取兩單支波長作為藍紅光區域消長行為指標的方法而言，確實可以達到線性關係度極高($R^2=0.99285$)之資料線且其偵測範圍增廣為 $\pm 25 \mu\text{m}$ ，共 $50 \mu\text{m}$ ，高於光譜儀系統約 1.7 倍。其線性度以及偵測範圍增加的原因除使用較低角度之光檔插件外，亦是因為因應 APD 的加載所設計之分光系統所帶來之好處。使用帶通濾光鏡的情況下，使輸出強度為一寬帶區域強度之平均值；相對於使用單一波長作為藍、紅光區域因深度變化所產生之行為指標，此法確實更能表現出消長行為，且可降低誤差產生，使線性度表現更佳。獲得佳化之資料線後，即可著手高速動態深度位置偵測，其方法亦同光譜儀系統相同，獲得強度比值後對照資料線即獲得於微管道內相對應之流動深度位置。

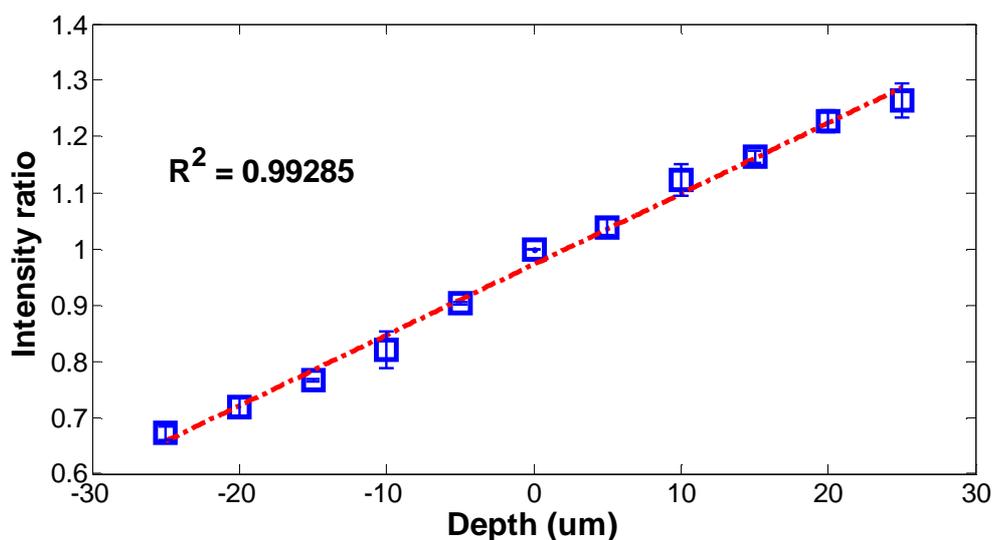
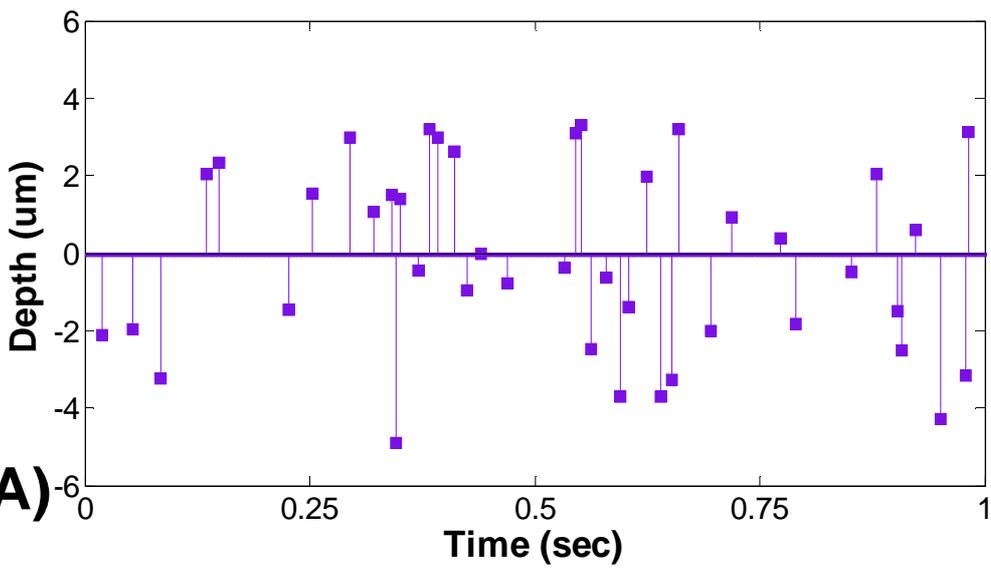
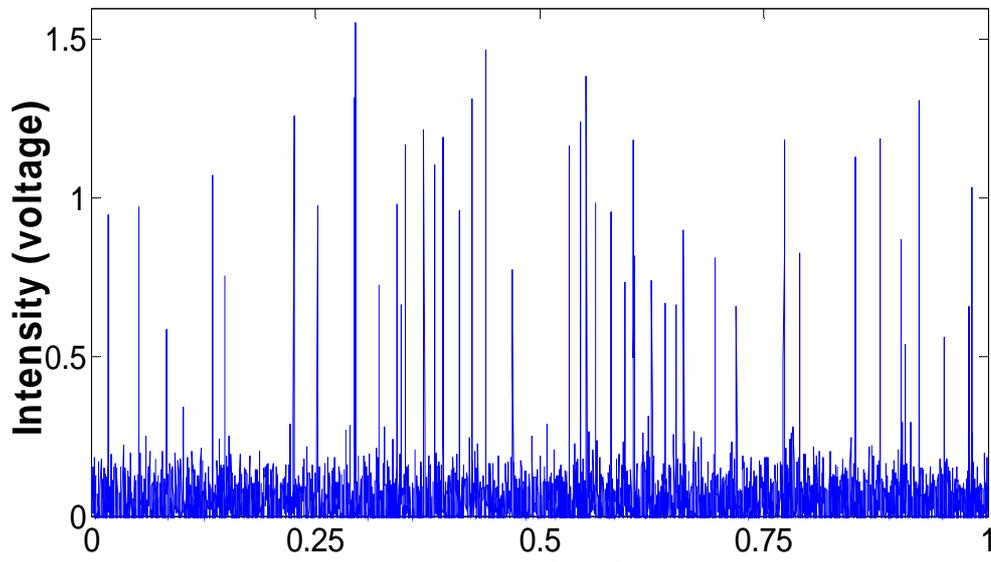
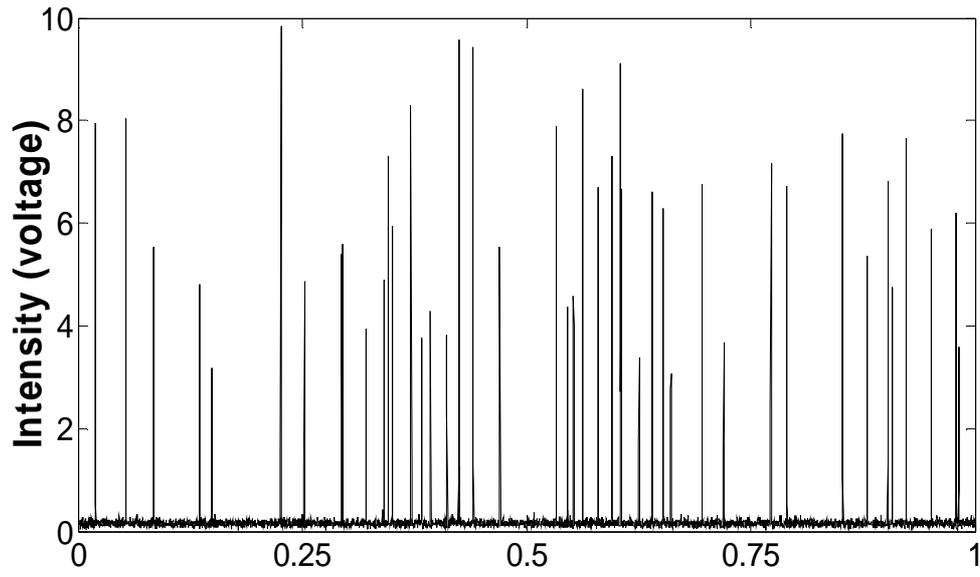


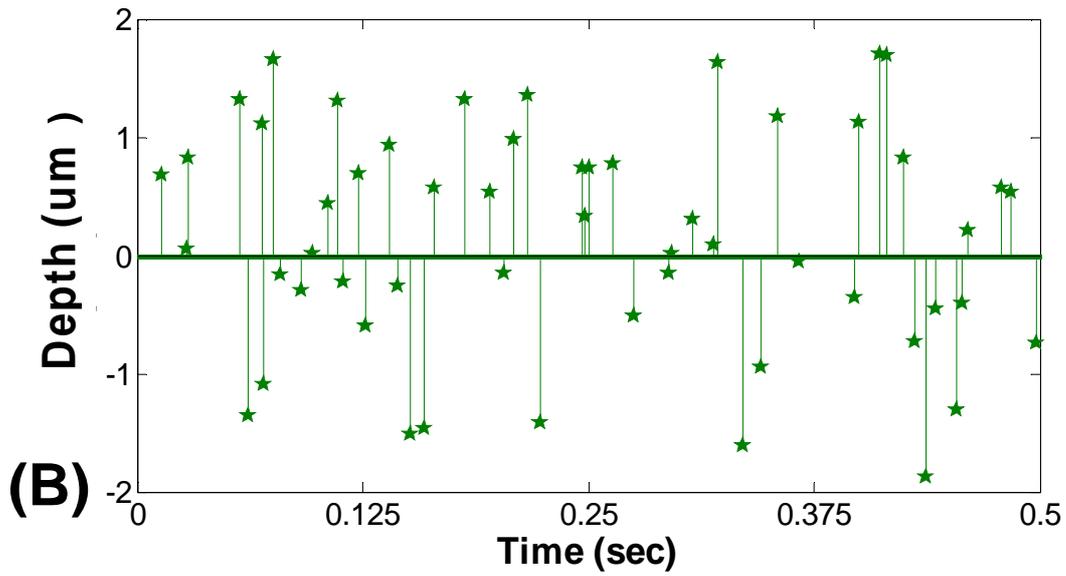
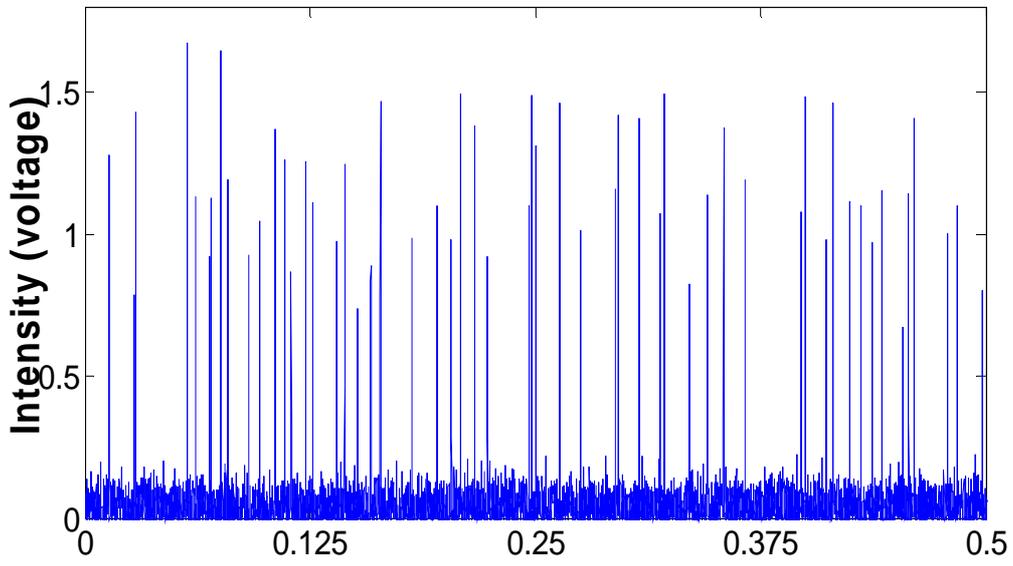
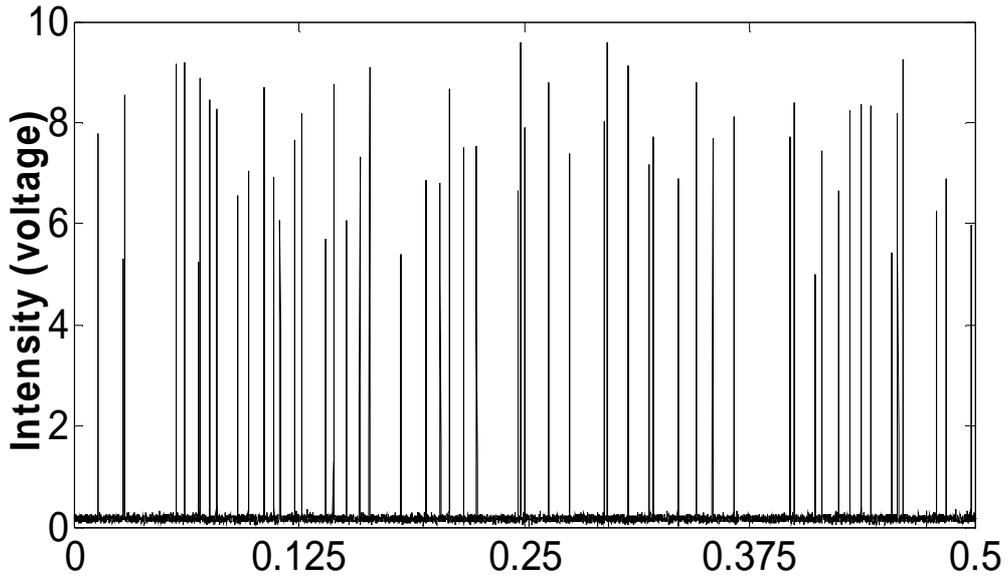
圖 4-8 APD 系統下於有效偵測區域 $\pm 25 \mu\text{m}$ 對強度比值之線性關係圖

4-2-2 快速深度位置偵測

配置 APD 於偵測端其主要用意為拉升偵測速度，以適用於各流速狀況下之樣本深度偵測，其擷取樣本數最高可達 $100,000 \text{ samples/s}$ 。為測試高流速狀況下系統能力，本研究設定注射幫浦為三種流量情況，分別為 $0.5 \mu\text{l/min}$ 、 $1 \mu\text{l/min}$ 以及 $1.5 \mu\text{l/min}$ ；並施用於微流式細胞儀晶片中，其管道 X-Z 面寬為 $200 \mu\text{m}$ ，深度為 $30 \mu\text{m}$ ，可計算出其平均流速為 1.389 mm/s 、 2.778 mm/s 以及 4.167 mm/s 。



(A)



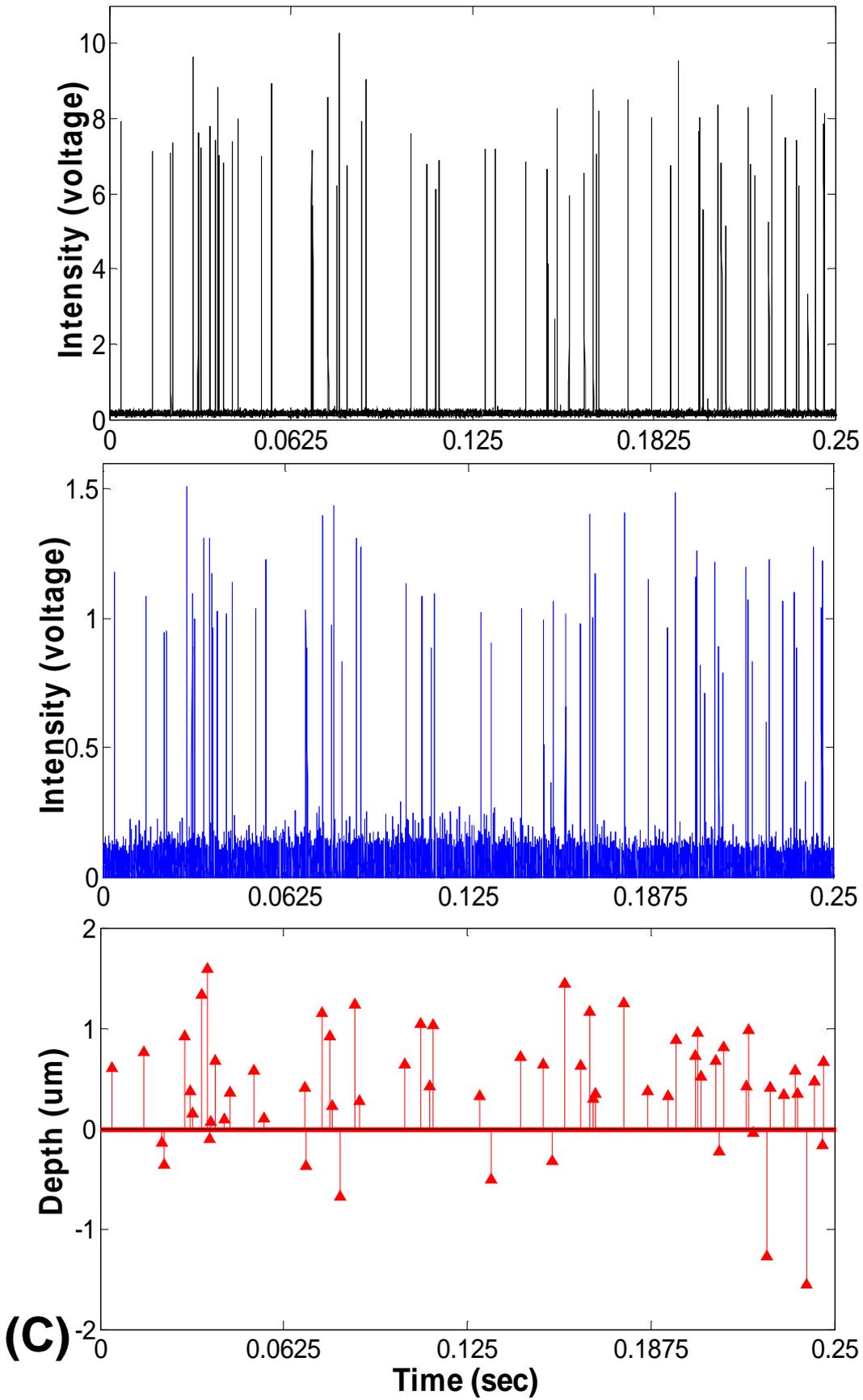


圖 4-9 於流量(A) 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (B) 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (C)1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 下紅光、藍光強度圖以及其於微管道內相應之深度位置

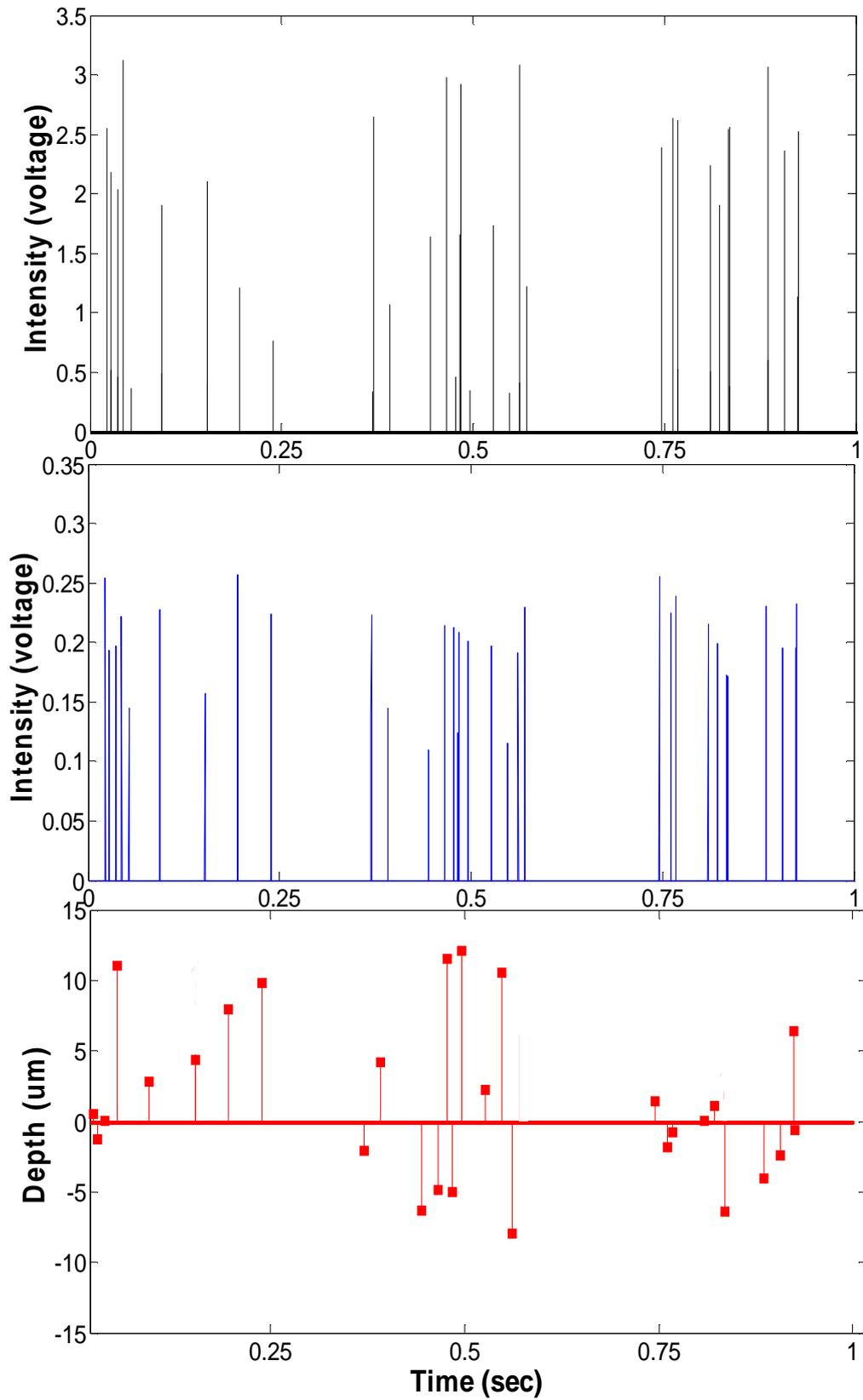


圖 4-10 於流量 $1 \mu\text{l}/\text{min}$ 下，對人類紅血球進行深度量測，由上至下分別為紅光、藍光強度圖以及其於微管道內相應之深度位置。

於此系統之動態偵測中，同樣使用 PMMA 透鏡插件以及 20 μm 未標記螢光微粒子作為模擬生物樣本，並稀釋為濃度 5×10^6 beads/mL 水溶液後注入。將物鏡調整至參考點後固定，於定點展開色散區域對流動樣本進行診斷。圖 4-9(A)(B)(C) 分別為此三種流速下所測得之深度位置，組圖上方為紅光訊號區域輸出之電訊號，中間則為藍光訊號輸出之電訊號，下方則為於微管道內流動樣本所對應之深度位置。於流量 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (流速為 1.389 mm/s) 中，設定取樣速度為 10,000 Hz，其計算後解析能力約為 42 particles/s，於組圖下方其流動粒子於 Z 軸分布於 $\pm 5 \mu\text{m}$ 位置，變動量較大。而加大流量至 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ (流速為 2.778 mm/s)，取樣速度也增加至 15,000 Hz，解析能力約可達 84 particles/s，而深度變動量明顯縮小至 $\pm 2 \mu\text{m}$ 。繼續加高流量至 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (速度為 4.167 mm/s)，取樣速度調整為 20,000 Hz，計算出解析能力可高達 126 particles/s。其中，粒子於微管道內於 Z 軸流動位置的變動量明顯縮小，表示其流量大小會影響其深度變化量。以上驗證此系統對動態偵測的可行性，亦可成功地於極高流速樣本中解析深度位置。其中，因光學特性的限制，使所使用的樣本有所限制；因收取來自樣本的散射光進行分析，故應盡量避免使用具可見光吸收光譜的樣本，使所分析的散射光強度不因樣本對特定波長的吸收，而造成光強度訊號的失真。在本研究中，所使用的樣本都為透明塑膠(polymer)或玻璃微粒，而在生物分析應用中，細胞、組織等多為透明體，故並無吸收波長問題。為確認此系統對實際生物樣本的解析能力，故對人類紅血球(erythrocyte)進行於流式細胞儀中進行第三維的深度偵測。將抽取出的血液，以離心的方式分離出紅血球樣本，並以生理食鹽水稀釋至濃度約 2×10^3 cells/ μL 。設定注射幫浦流量為 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，速度為 2.778 mm/s 的環境下進行測量。而紅血球尺寸約為 7 μm ，故將所偵測到的強度比值與 7 μm 的檢量線進行比對後獲得深度位置，結果同圖 4-10 所示。其中因所取得的原始紅血球密度極高且生物樣本易有群聚的特性，故除了將紅血球樣本稀釋外，並設定於高流速的環境下測量，減少樣本互相沾黏的現象。

第五章 結論與未來展望

5-1 結論及綜合討論

本研究旨於發展一深度偵測系統，盼可運用於微機電系統中各微裝置或微流道結構內對流動樣之動態偵測分析。扭轉一般對於色相差為光學系統中棘手缺陷的概念，於本系統中轉化為系統設計原理。當光穿越透鏡時因各波長擁有不同之折射系數之，不同波長聚焦於不同軸向位置，產生一波長散置型態；運用此不同波長擁有相對應之軸向位置特性，使本系統可實現深度偵測的目標。

引入本實驗室自行開發之暗視野系統為照明方式，以提升 SNR；並配合擁有連續光譜之氬氣燈作為光源。對色差元件材料進行評估後，採用 PMMA 材質之透鏡作為色散插件；通後端使用 UV-Vis-NIR 光譜儀分析於色散偵測區域之粒子深度位置。於初步測試中可發現於深度位置或上或下進行 Z 軸位移時，其光譜有藍移或紅移現象產生，故推斷藍、紅區塊之強度變化與深度位移有二次曲線關係。故選取兩單支波長其強度改變可作為藍、紅光區域消長之指標，通過正規劃過程後可消除因零位面選取所造成的誤差，並且確立分析方式。其中選取驅於線性發展之區域作為檢量線，最佳化後發現 450 nm 以及 670 nm 之強度比值可得到最佳之線性度($R^2=0.97751$)，有效偵測範圍為 $\pm 15 \mu\text{m}$ 。為使系統更能精準表現出於管道內不同樣本之深度位置，亦對系統中不同材質色散元件進行測試：低阿貝數 PMMA 以及高阿貝數 BK7 透鏡分別呈現較長偵測範圍以及對樣本尺寸擁有高解析度之特性。於動態偵測中，可成功以流經診斷區粒子所散射之光強度比值，對照資料線獲得其相對應深度，解析能力約為 12 particles/s。但因光譜儀敏感度低、取樣速度慢等因素，不適用於高流速偵測。

為達成適用於高、低流速偵測之目的，本研究施用雪崩式光電二極體，並對系統作調整以達到更優化之系統。配合 50：50 分光鏡，可將單一光訊號拆分成兩道光束，並分別通過低帶通以及高帶通濾鏡即可過濾出光訊號內藍、紅光強度值；同時因使用帶通濾鏡，所得之強度值皆為一定波長範圍($\pm 40 \text{ nm}$)的強度平均值，其

比使用單支波長更能表示藍紅光區消長行為。為減少管道散射光對高敏度光電偵測器訊號所造成之干擾，故對光檔插件之入射角度進行調整，於夾角 60° 下可有效減去對管壁的照明，得到較高之 SNR。結合以上對系統調整，可達到更廣偵測範圍 $\pm 25 \mu\text{m}$ ，相較於彩色共軛焦顯微系統的有效偵測區間 ($7 \mu\text{m}$ - $15 \mu\text{m}$) 更加廣大，且線性度表現高達 0.99285，使之於後續動態偵測中樣本深度有更精確的演繹。於高流速 (4.167 mm/s) 下，可成功的解析出 $20 \mu\text{m}$ 粒子深度位置，其解析能力約可達 126 particles/s 。此系統亦實現對透明生物樣本進行深度偵測，於速度 2.778 mm/s 的環境下，亦成功解析出人類紅血球之深度位置，相較於傳統 micro-PIV 的系統可偵測的流速高約 5-8 倍。而因雪崩式光電二極體的使用，本系統定可達到更高速的偵測。且本系統因採取建立資料線進行強度比值對照之方法，故無 Z 軸深度差異度之解析極限；相對於使用單一波長對焦相對深度之方法，可省去使用微距致動器所造成的偵測極限。

綜合以上實驗結果，本系統成功使用短、長波強度比值對深度變化之關係，比照趨近線性的資料線，對微流道中流動樣本深度進行偵測分析。施用光電二極體更使本系統可達到快速偵測的目的。同時，減卻大量的精密光學組件，可於各顯微鏡下使用簡易插件，即可實施對高流量速樣本流體深度量測。並可藉由更換不同色散插件來達到不同偵測距離以及尺寸解析度的偵測需求，使得系統可彈性運用於各種目的的測量，於需同時分析多變因之生醫樣本或流場資訊等可為一強大的偵測、分析工具。

5-2 未來展望

而於本研究中，仍有部分要點須提出改進或加深討論：

1. 系統調整以及簡化的可能性

- 光源的使用：本研究使用頻譜較寬的連續光譜作為光源，主要考慮評估可用光波段的選取以及取得較為便利；後經本研究最佳化過程後，以選定波長之強度

比值作為分析方法。若於後使用所選定波長之混成單色光，例如雷射作為光源較為直觀，且省去帶通濾鏡的使用，減少光學元件的負累。而此時雷射的波段的選取將為另一重要討論的項目，其使用雷射波長對相互干涉以及其深度對強度比值線之性度表現兩種情形進行評估以及取捨。

- **色差透鏡選取**：本研究主要挑選兩種較易取得之透鏡：PMMA 以及 BK7 進行不同阿貝數透鏡的討論，但於通路上可獲取的光學透鏡，隨著阿貝數的增加其價錢越高，同時裝置於系統內需要短焦距的透鏡，具此兩種特性的光學透鏡通常需要訂製且價格愈加不斐。若使用菲涅耳透鏡或繞射透鏡(Diffractive lens)可經設計其上之波紋而達到較長焦深的目的，並且其質輕易於塑造，相較於選取材質進行色相差範圍的改變，使用不同繞射透鏡可簡易達到不同目的的使用。另亦可跳脫單純使用色相差作為偵測原則的系統，使用球面鏡所造成的球差作為偵測原則，因球差擁有極長的焦深範圍，更可有效拉寬偵測範圍。
- **物鏡倍率更換**：系統對於不同尺寸之解析確實可經由色散透鏡插件的選取而達成，但其最終限制於物鏡對一定尺寸的解析能力。更換高倍率的物鏡可達到更小尺寸樣本的觀測，考量到系統所使用的光檔插件，除其物鏡後方之入光孔徑要與插件之圖騰互相配合外，亦要求極高之數值孔徑。故系統若可搜尋至較高倍率、高數值孔徑同時配合光檔插件之設計圖騰，可對小尺寸樣本進行偵測。

2. 相對以及真實深度位置

本系統於正規劃過程中，設定物鏡距焦處(光亮度最高處)為參考點，即為零位面，故後所測得之深度皆相對於零位面之位置，並非絕對位置。由於晶片需經熱接合製程，故接合後管道尺寸會由於高溫融合後有所變異，無法確信其真實尺寸；亦因如此，於管道內創造一真實深度位置之平台有其難度。若此系統運用於管道內微機構性能或設計的測試，絕對或相對位置的測量並無差別，故於本研究中並無對真實深度的測量進行探討。而針對開放空間的深度測量，其真實零位面的設置就無困難之處，記錄真實零位面之光訊號作為參考點，即可偵測待測樣本真實 Z 軸位移或深度位置。

3. 深度改變量與強度比值關係

於本系統中，以取用定深度範圍內行為趨近線性部分作為有效偵測區域，於微系統內之偵測已相當足夠。而其於長偵測範圍內可明顯觀察出二次曲線行為，如同 5-1(A)所示。其中於 Z 軸位置較高處(>20 μm)以及於較低處(< -25 μm)，產生逆成長現象，表示此時藍光以及紅光強度增量已逐漸失去規則性，表示以選取波長(450 nm、670 nm)強度比值已無法作為超過此區間的範圍的指標。以 $\pm 25 \mu\text{m}$ Z 軸位移範圍內進行二次曲線的 fitting，可得最佳之關係度，如 5-1(B)所示。若於長 Z 軸位移的偵測，可使用二次曲線作為資料線進行比對後獲得 Z 軸位置。

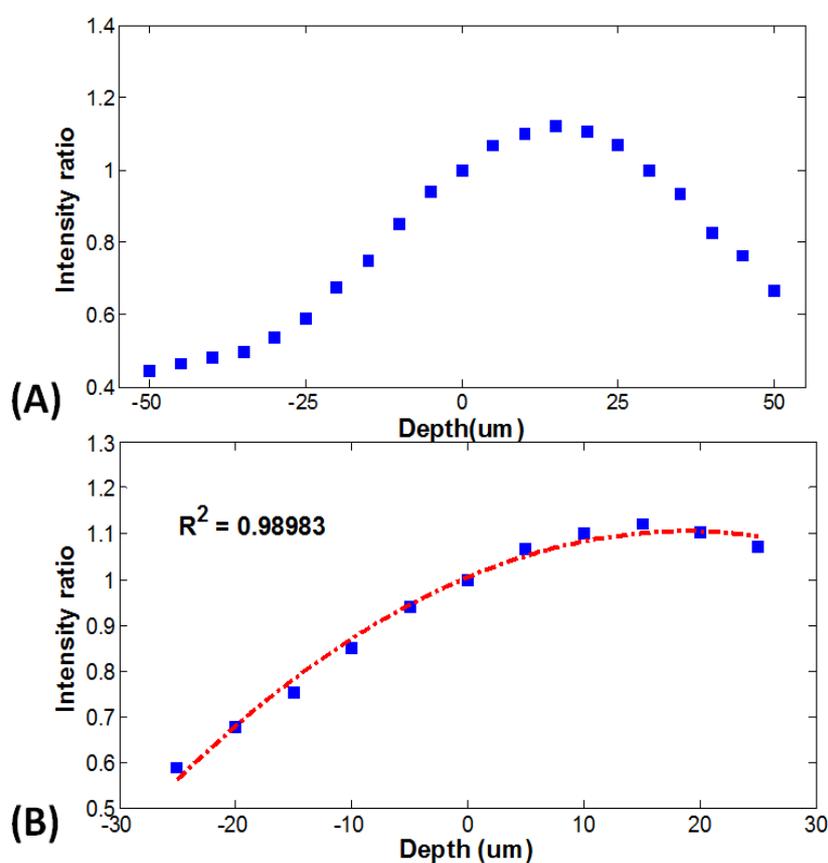


圖 5-1 (A)長範圍深度位移量對強度比值圖(B) 深度範圍 $\pm 25 \mu\text{m}$ 對強度比值圖

本系統成功以色相差方式對微流道中樣本深度位置進行偵測，配合不同色差透鏡插件、不同角度光檔插件達到不同尺寸解析度以及最佳之線性表現。加以建立數學模型完成正規過程，於動態偵測時，與此簡單的強度比值方法所建立之資料線互相對照，即可獲得相應的深度位置。且引入光電偵測器後，使系統有效於

更高流速情形下進行偵測。整體而言，此發展系統達到預期效果，且插件的設計，使其擁有於各種顯微鏡下實現的可能，相對於其他光學檢測系統，限制性以及花費大為下降。

其應用如於微管道流體行為的觀測有絕對的優勢；一般 PIV 系統下對 Z 軸的掃描須借助外部機械掃描平台，或有因使用兩束雷射所造成的對位問題，再，若管道深埋於不透明基板上，則無法對 X-Z 平面進行偵測。近年對於管道內非牛頓流體行為之研究興起，本研究可藉由對溶液中流動樣本 Z 軸位置的偵測，分析管道內非牛頓流體之速度場分布。除了高流速的動態偵測，本系統對靜態試件亦可進行偵測；一般共軛焦掃描平台皆往高速掃描方像進行改進，以達到高速成像的目的，但對於需較長時間靜態觀測較為不利。而本系統單純使用色散光投射於試件上，故未有因較長時間觀測而造成機械過熱、震動等問題，**可於細胞培養、**以及其增升速度等進行偵測；加以使用二次曲線作為資料線的使用，其偵測範圍可大為增廣，同時，利用資料線的比照方法，使系統具備解析微距變化量之能力。以上特點使本系統同時擁有對靜、動態物體，高、低速度流動樣本，長距離以及微距變化量偵測能力，可彈性使用於各種偵測環境。

針對前節於現階段系統提出的改進方向，大約可歸納出一更為直觀之系統：使用三色雷射，或三色 LED 混成白光後，入射至色差透鏡後，直接投射於待測物後偵測。因使用三種單色光，相較於連續光譜之白光，無非選定波長對光訊號的干擾，故可省去暗視野系統之使用，使系統變得更簡易。而單色綠光可作為參考點，其固定焦距更省去白光系統內因參考點的選取所造成的偵測誤差，以及真實位移的確認。但對於單色光波長的選取、混成光路設計、選定單支波長較頻帶無法成為藍紅波長消長的指標、以及實際對生物樣本測試效能等問題，皆須進行更深入的實驗以及測試。現因經費以及時間限制，無法於此篇論文內展示此構想系統的架設以及評估，望於後能投入時間以及人力進行討論。

參考文獻

- [1] C. M. Ho and Y. C. Tai, "Review: MEMS and its applications for flow control," *Journal of Fluids Engineering-Transactions of the Asme*, vol. 118, pp. 437-447, 1996.
- [2] F. Cepolina and R. C. Michelini, "Review of robotic fixtures for minimally invasive surgery," *International Journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery*, vol. 1, pp. 43-63, 2004.
- [3] N. C. Tsai and C. Y. Sue, "Review of MEMS-based drug delivery and dosing systems," *Sensors and Actuators a-Physical*, vol. 134, pp. 555-564, 2007.
- [4] Z. S. Guo, Z. Feng, S. C. Fan, D. Z. Zheng, and H. H. Zhuang, "Research development of measuring methods on the tribology characters for movable MEMS devices: a review," *Microsystem Technologies-Micro-and Nanosystems-Information Storage and Processing Systems*, vol. 15, pp. 343-354, 2009.
- [5] E. Verpoorte and N. F. De Rooij, "Microfluidics meets MEMS," *Proceedings of the Ieee*, vol. 91, pp. 930-953, 2003.
- [6] S. E. Ong, S. Zhang, H. J. Du, and Y. Q. Fu, "Fundamental principles and applications of microfluidic systems," *Frontiers in Bioscience-Landmark*, vol. 13, pp. 2757-2773, 2008.
- [7] K. K. Liu, R. G. Wu, Y. J. Chuang, H. S. Khoo, S. H. Huang, and F. G. Tseng, "Microfluidic Systems for Biosensing," *Sensors*, vol. 10, pp. 6623-6661, 2010.
- [8] J. Yang, C. W. Li, and M. S. Yang, "Lab-on-a-chip (microfluidics) technology," *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, vol. 34, pp. 117-123, 2002.
- [9] T. Chovan and A. Guttman, "Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing," *Trends in Biotechnology*, vol. 20, pp. 116-122, 2002.
- [10] C. L. Xu, B. X. Li, and Z. J. Zhang, "Recent developments in detectors for micro total analysis systems," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 31, pp. 1520-1526, 2003.
- [11] S. Kurada, G. W. Rankin, and K. Sridhar, "Particle-Imaging Techniques for Quantitative Flow Visualization - a Review," *Optics and Laser Technology*, vol. 25, pp. 219-233, 1993.
- [12] A. K. Prasad, "Particle image velocimetry," *Current Science*, vol. 79, pp. 51-60, 2000.
- [13] R. Lindken, M. Rossi, S. Grosse, and J. Westerweel, "Micro-Particle Image Velocimetry (μ PIV): Recent developments, applications, and guidelines," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 2551-2567, 2009.
- [14] S. J. Lee and S. Kim, "Advanced particle-based velocimetry techniques for

- microscale flows," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 6, pp. 577-588, 2009.
- [15] M. Laurent, G. Johannin, H. Leguyader, and A. Fleury, "Confocal Scanning Optical Microscopy and 3-Dimensional Imaging," *Biology of the Cell*, vol. 76, pp. 113-124, 1992.
- [16] K. Reynaud, D. Nogueira, R. Cortvrindt, R. Kurzawa, and J. Smitz, "Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology," *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, vol. 39, pp. 75-85, 2001.
- [17] X. Y. Xu, "Development and applications of optical imaging techniques in cancer diagnosis: Diffuse optical tomography and microendoscopy," *Current Medical Imaging Reviews*, vol. 4, pp. 125-133, 2008.
- [18] M. A. Browne, O. Akinyemi, and A. Boyde, "Confocal Surface Profiling Utilizing Chromatic Aberration," *Scanning*, vol. 14, pp. 145-153, 1992.
- [19] J. H. Frank, A. D. Elder, J. Swartling, A. R. Venkitaraman, A. D. Jeyasekharan, and C. F. Kaminski, "A white light confocal microscope for spectrally resolved multidimensional imaging," *Journal of Microscopy*, vol. 227, pp. 203-215, 2007.
- [20] G. B. J. Dubelaar and P. J. F. Geerders, "Innovative technologies to monitor plankton dynamics - Scanning flow cytometry: a new dimension in real-time, in-situ water quality monitoring," *Sea Technology*, vol. 45, pp. 15-+, 2004.
- [21] G. Blankenstein and U. D. Larsen, "Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 13, pp. 427-438, 1998.
- [22] C. H. Tsai, H. T. Chen, Y. N. Wang, C. H. Lin, and L. M. Fu, "Capabilities and limitations of 2-dimensional and 3-dimensional numerical methods in modeling the fluid flow in sudden expansion microchannels," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 3, pp. 13-18, 2007.
- [23] L. M. Fu and C. H. Lin, "A rapid DNA digestion system," *Biomedical Microdevices*, vol. 9, pp. 277-286, 2007.
- [24] N. T. Tran, I. Ayed, A. Pallandre, and M. Taverna, "Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods: An update," *Electrophoresis*, vol. 31, pp. 147-173, 2010.
- [25] T. F. Hong, W. J. Ju, M. C. Wu, C. H. Tai, C. H. Tsai, and L. M. Fu, "Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO2 laser," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 9, pp. 1125-1133, 2010.
- [26] K. B. Mogensen, N. J. Petersen, J. Hubner, and J. P. Kutter, "Monolithic integration of optical waveguides for absorbance detection in microfabricated electrophoresis devices," *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 3930-3938, 2001.
- [27] S. Gawad, L. Schild, and P. Renaud, "Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing," *Lab on a Chip*, vol. 1, pp.

- 76-82, 2001.
- [28] M. A. McClain, C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey, "Flow cytometry of *Escherichia coli* on microfluidic devices," *Analytical Chemistry*, vol. 73, pp. 5334-5338, 2001.
- [29] J. P. Golden, J. S. Kim, J. S. Erickson, L. R. Hilliard, P. B. Howell, G. P. Anderson, M. Nasir, and F. S. Ligler, "Multi-wavelength microflow cytometer using groove-generated sheath flow," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 1942-1950, 2009.
- [30] D. A. Ateya, J. S. Erickson, P. B. Howell, L. R. Hilliard, J. P. Golden, and F. S. Ligler, "The good, the bad, and the tiny: a review of microflow cytometry," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, pp. 1485-1498, 2008.
- [31] R. Rodriguez-Trujillo, C. A. Mills, J. Samitier, and G. Gomila, "Low cost micro-Coulter counter with hydrodynamic focusing," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 3, pp. 171-176, 2007.
- [32] X. C. Xuan and D. Q. Li, "Electroosmotic flow in microchannels with arbitrary geometry and arbitrary distribution of wall charge," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 289, pp. 291-303, 2005.
- [33] R. J. Yang, C. C. Chang, S. B. Huang, and G. B. Lee, "A new focusing model and switching approach for electrokinetic flow inside microchannels," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 15, pp. 2141-2148, 2005.
- [34] L. M. Fu, R. J. Yang, C. H. Lin, Y. J. Pan, and G. B. Lee, "Electrokinetically driven micro flow cytometers with integrated fiber optics for on-line cell/particle detection," *Analytica Chimica Acta*, vol. 507, pp. 163-169, 2004.
- [35] C. H. Lin, G. B. Lee, L. M. Fu, and B. H. Hwey, "Vertical focusing device utilizing dielectrophoretic force and its application on microflow cytometer," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 13, pp. 923-932, 2004.
- [36] J. J. Zhu and X. C. Xuan, "Dielectrophoretic focusing of particles in a microchannel constriction using DC-biased AC electric fields," *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 2668-2675, 2009.
- [37] J. S. Kim and F. S. Ligler, "Utilization of microparticles in next-generation assays for microflow cytometers," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, pp. 2373-2382, 2010.
- [38] H. Chu, I. Doh, and Y. H. Cho, "A three-dimensional (3D) particle focusing channel using the positive dielectrophoresis (pDEP) guided by a dielectric structure between two planar electrodes," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 686-691, 2009.
- [39] C. C. Chang, Z. X. Huang, and R. J. Yang, "Three-dimensional hydrodynamic focusing in two-layer polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels," *Journal of*

- Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, pp. 1479-1486, 2007.
- [40] P. B. Howell, J. P. Golden, L. R. Hilliard, J. S. Erickson, D. R. Mott, and F. S. Ligler, "Two simple and rugged designs for creating microfluidic sheath flow," *Lab on a Chip*, vol. 8, pp. 1097-1103, 2008.
- [41] H. C. Lee, H. H. Hou, R. J. Yang, C. H. Lin, and L. M. Fu, "Microflow cytometer incorporating sequential micro-weir structure for three-dimensional focusing," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 11, pp. 469-478, 2011.
- [42] N. Noda and S. Kamimura, "A new microscope optics for laser dark-field illumination applied to high precision two dimensional measurement of specimen displacement," *Review of Scientific Instruments*, vol. 79, 2008.
- [43] M. Lei and B. L. Yao, "Multifunctional darkfield microscopy using an axicon," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 13, 2008.
- [44] D. P. Biss, K. S. Youngworth, and T. G. Brown, "Dark-field imaging with cylindrical-vector beams," *Applied Optics*, vol. 45, pp. 470-479, 2006.
- [45] S. N. Kasarova, N. G. Sultanova, C. D. Ivanov, and I. D. Nikolov, "Analysis of the dispersion of optical plastic materials," *Optical Materials*, vol. 29, pp. 1481-1490, 2007.
- [46] E. Hecht, *Optics*, 4th ed. Reading, Mass.: Addison-Wesley, 2002.
- [47] H. Tsuchida, N. Aoki, K. Hyakumura, and K. Yamamoto, "Design of Zoom Lens Systems That Use Gradient-Index Materials," *Applied Optics*, vol. 31, pp. 2279-2283, 1992.
- [48] P. Hariharan, "Achromatic lens combinations: A novel design approach," *Optics and Laser Technology*, vol. 29, pp. 217-219, 1997.
- [49] I. Nezu and M. Sanjou, "PIV and PTV measurements in hydro-sciences with focus on turbulent open-channel flows," *Journal of Hydro-Environment Research*, vol. 5, pp. 215-230, 2011.
- [50] J. G. Santiago, S. T. Wereley, C. D. Meinhart, D. J. Beebe, and R. J. Adrian, "A particle image velocimetry system for microfluidics," *Experiments in Fluids*, vol. 25, pp. 316-319, 1998.
- [51] C. D. Meinhart and H. S. Zhang, "The flow structure inside a microfabricated inkjet printhead," *Journal of Microelectromechanical Systems*, vol. 9, pp. 67-75, 2000.
- [52] E. B. Cummings, "An image processing and optimal nonlinear filtering technique for particle image velocimetry of microflows," *Experiments in Fluids*, vol. 29, pp. S42-S50, 2000.
- [53] M. J. Kim, A. Beskok, and K. D. Kihm, "Electro-osmosis-driven micro-channel flows: A comparative study of microscopic particle image velocimetry measurements and numerical simulations," *Experiments in Fluids*, vol. 33, pp.

- 170-180, 2002.
- [54] C. M. Zettner and M. Yoda, "Particle velocity field measurements in a near-wall flow using evanescent wave illumination," *Experiments in Fluids*, vol. 34, pp. 115-121, 2003.
- [55] N. C. H. Le, R. Yokokawa, D. V. Dao, T. D. Nguyen, J. C. Wells, and S. Sugiyama, "Versatile microfluidic total internal reflection (TIR)-based devices: Application to microbeads velocity measurement and single molecule detection with upright and inverted microscope," *Lab on a Chip*, vol. 9, pp. 244-250, 2009.
- [56] J. S. Park, C. K. Choi, and K. D. Kihm, "Optically sliced micro-PIV using confocal laser scanning microscopy (CLSM)," *Experiments in Fluids*, vol. 37, pp. 105-119, 2004.
- [57] R. Lima, T. Ishikawa, Y. Imai, M. Takeda, S. Wada, and T. Yamaguchi, "Measurement of Individual Red Blood Cell Motions Under High Hematocrit Conditions Using a Confocal Micro-PTV System," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 37, pp. 1546-1559, 2009.
- [58] J. S. Park and K. D. Kihm, "Use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) for depthwise resolved microscale-particle image velocimetry (μ -PIV)," *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 44, pp. 208-223, 2006.
- [59] R. Lima, S. Wada, K. Tsubota, and T. Yamaguchi, "Confocal micro-PIV measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel," *Measurement Science & Technology*, vol. 17, pp. 797-808, 2006.
- [60] C. E. Willert and M. Gharib, "3-Dimensional Particle Imaging with a Single Camera," *Experiments in Fluids*, vol. 12, pp. 353-358, 1992.
- [61] C. E. Towers, D. P. Towers, H. I. Campbell, S. J. Zhang, and A. H. Greenaway, "Three-dimensional particle imaging by wavefront sensing," *Optics Letters*, vol. 31, pp. 1220-1222, 2006.
- [62] S. Y. Yoon and K. C. Kim, "3D particle position and 3D velocity field measurement in a microvolume via the defocusing concept," *Measurement Science & Technology*, vol. 17, pp. 2897-2905, 2006.
- [63] C. Cierpka, M. Rossi, R. Segura, and C. J. Kahler, "On the calibration of astigmatism particle tracking velocimetry for microflows," *Measurement Science & Technology*, vol. 22, 2011.
- [64] C. Cierpka and C. J. Kahler, "Particle imaging techniques for volumetric three-component (3D3C) velocity measurements in microfluidics," *Journal of Visualization*, vol. 15, pp. 1-31, 2012.
- [65] S. Choi, S. H. Kim, and J. K. Park, "Optical path-length modulation for three-dimensional particle measurement in mirror-embedded microchannels,"

- Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 335-340, 2010.
- [66] A. L. Vig, R. Marie, E. Jensen, and A. Kristensen, "Optofluidic microscope with 3D spatial resolution," *Optics Express*, vol. 18, pp. 4158-4169, 2010.
- [67] M. Kozubek, S. Kozubek, E. Lukasova, E. Bartova, M. Skalnikova, P. Matula, P. Matula, P. Jirsova, A. Cafourkova, and I. Koutna, "Combined confocal and wide-field high-resolution cytometry of fluorescent in situ hybridization-stained cells," *Cytometry*, vol. 45, pp. 1-12, 2001.
- [68] K. B. Im, S. M. Han, H. Park, D. Kim, and B. M. Kim, "Simple high-speed confocal line-scanning microscope," *Optics Express*, vol. 13, pp. 5151-5156, 2005.
- [69] D. N. Fuller, A. L. Kellner, and J. H. Price, "Exploiting chromatic aberration for image-based microscope autofocus," *Applied Optics*, vol. 50, pp. 4967-4976, 2011.
- [70] P. C. Lin, P. C. Sun, L. J. Zhu, and Y. Fainman, "Single-shot depth-section imaging through chromatic slit-scan confocal microscopy," *Applied Optics*, vol. 37, pp. 6764-6770, 1998.
- [71] S. D. Cha, P. C. Lin, L. J. Zhu, P. C. Sun, and Y. Fainman, "Nontranslational three-dimensional profilometry by chromatic confocal microscopy with dynamically configurable micromirror scanning," *Applied Optics*, vol. 39, pp. 2605-2613, 2000.
- [72] K. B. Shi, P. Li, S. Z. Yin, and Z. W. Liu, "Chromatic confocal microscopy using supercontinuum light," *Optics Express*, vol. 12, pp. 2096-2101, 2004.
- [73] 黃順洋, "多波長共焦顯微鏡之探頭研製," 碩士, 臺灣大學機械工程學研究所學位論文, 臺灣大學, 2009.
- [74] S. W. Lin, J. H. Hsu, C. H. Chang, and C. H. Lin, "Objective-type dark-field system applied to multi-wavelength capillary electrophoresis for fluorescent detection and analysis," *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 25, pp. 450-455, 2009.
- [75] C. H. Lin, G. B. Lee, Y. H. Lin, and G. L. Chang, "A fast prototyping process for fabrication of microfluidic systems on soda-lime glass," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 11, pp. 726-732, 2001.
- [76] H. B. Wach, E. R. Dowski, and W. T. Cathey, "Control of chromatic focal shift through wave-front coding," *Applied Optics*, vol. 37, pp. 5359-5367, 1998.

附錄

於本研究中，由於資料量極為龐大，故提取資料，強度比值計以及檢量線的建立皆以Matlab計算軟體依照下列code進行運算以及繪製資料圖。

```
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n50 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n45 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n40 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n35 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n30 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n25 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n20 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n15 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n10 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
n5 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
```

```

n0 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p5 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p10 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p15 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p20 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p25 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p30 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p35 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p40 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p45 = AllData.data;
[FileName,PathName] = uigetfile('*.Scope','Select the Scope-file');
AllData = importdata([PathName, FileName]);
p50 = AllData.data;

b=[n50(960,2);n45(960,2);n40(960,2);n35(960,2);n30(960,2);n25(960,2);n
20(960,2);n15(960,2);n10(960,2);n5(960,2);n0(960,2);p5(960,2);p10(960,
2);p15(960,2);p20(960,2);p25(960,2);p30(960,2);p35(960,2);p40(960,2);p
45(960,2);p50(960,2)];
r=[n50(1811,2);n45(1811,2);n40(1811,2);n35(1811,2);n30(1811,2);n25(181
1,2);n20(1811,2);n15(1811,2);n10(1811,2);n5(1811,2);n0(1811,2);p5(1811

```

```
,2);p10(1811,2);p15(1811,2);p20(1811,2);p25(1811,2);p30(1811,2);p35(1811,2);p40(1811,2);p45(1811,2);p50(1811,2)];
```

```
B=b./n0(960,2);
```

```
R=r./n0(1811,2);
```

```
L=B./R;
```

```
S=-50:5:50;
```

```
figure(1)
```

```
plot(S,L,'sb');
```

作者自傳

蘇歆宇 Shin-Yu Su

Department of Mechanical and Electro-Mechanical Engineering

National Sun Yat-sen University

Kaohsiung 804, Taiwan

Tel: 07-5252000 ext.4275

E-mail: shinyusu@gmail.com

Education :

- Bachelor of Science, Department of Mechanical and Electro-mechanical Engineering, National Sun Yat-sen University, Taiwan, 2006~2010
- Master of Science, Department of Mechanical and Electro-mechanical Engineering, June, National Sun Yat-sen University, Taiwan, 2010~2012

Conference paper :

1. Shin-Yu Su, Che-Hsin Lin, “Rapid detecting Z-position of moving Objects in microchannel utilizing a novel chromatic aberration effect under a dark-field illumination scheme”, The 25th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Paris, France, 29 January – 2 February, 2012.
2. Shin-Yu Su, Che-Hsin Lin, “Dynamically Detecting Depth of Moving Samples in Microchannel Utilizing a Chromatic Aberration Effect Under a Dark-field Illumination Scheme”, 2012 Conference on Precision Machinery and Manufacturing

Technology, Kenting, Taiwan, 18-20 May, 2012.

3. **Shin-Yu Su**, Che-Hsin Lin, “Design and Method Thereof for Rapid Depth Detection of Moving Objects in Microchannel Utilizing Chromatic Aberration”, IEEE SENSORS 2012, Taipei, Taiwan, 28-31 October, 2012.
4. Yi-Chi Wei, **Shin-Yu Su**, Lung-Ming Fu, Che-Hsin Lin, “Electrophoresis separation and electrochemical detection on a novel line-based microfluidic device”, The 25th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Paris, France, 29 January – 2 February, 2012.