

3-5 聚焦光束之散射理論

由前所述，我們確實可以發現，藉由探測雷射光束的引入，我們可以調整探測雷射光束的聚焦位置，對應追蹤不同尺寸的微粒子。為了描述這樣的現象，我們便提出了利用延伸的米氏散射理論（Mie scattering），去討論探測雷射光束，受到不同尺寸的微粒子散射時的現象。

3-5-1 延伸的米氏散射理論與散射光斑

以目前針對球體的散射理論中，最詳細且適用範圍最廣的，便是米氏散射理論。^[22] 所謂米氏散射的觀念，是考慮一束平行光照射到一個任意大小的球體時，利用電磁學的邊界條件，將散射光場描述為一連串的貝賽耳函數（Bessel function）的級數展開，並解出這些函數係數。換言之，利用米氏散射理論結果，我們可以得到平面波光場所產生在不同角度與不同偏振的散射光場強度。另外，藉著富氏光學（Fourier optics）裡，可將空間中光場視為許多不同角度平面波之疊合的觀念，我們對聚焦入射的雷射光束進行富氏展開，同時帶入米氏散射的結果和座標旋轉的技巧，將聚焦光束所產生於不同角度與不同偏振的散射光場完整的計算出來。如圖 3.13，便是我們將入射光中的兩個平面波分量入射的概念圖。其中一束平面波的座標我們用實線標記，另一束平面波則以虛線標記。當他們入射到微粒子時，便會各自散射，而散射光則會干涉出我們所偵測的散射光斑。

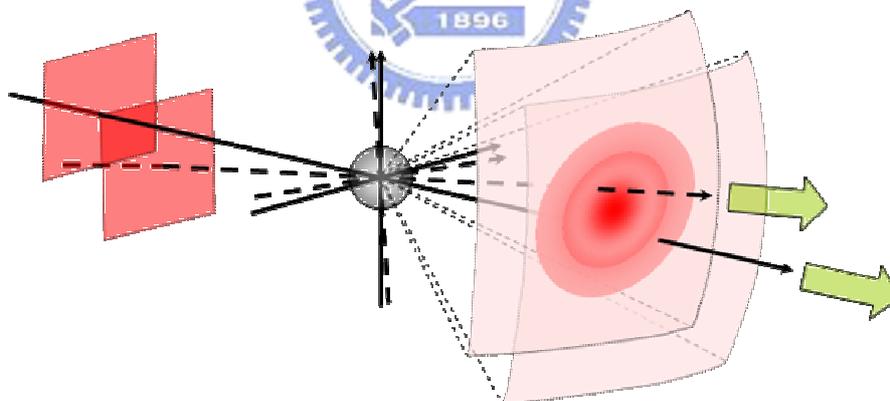


圖 3.13 延伸的米氏散射理論概念圖

從上面的觀念，我們應首先考慮，在單一粒子追蹤系統當中，聚焦光束的光場是如何分佈的。如同前面章節中所述，在雷射鑷夾系統的安排裡，為了產生穩定的捕捉陷阱，捕捉雷射光束在入射物鏡時，會先經由擴束，使其高斯分佈的光腰（beam waist）與物鏡的入瞳（entrance pupil）相同。而在使用探測雷射時，通常也會同樣符合相同的條件，而僅是藉由入射進物鏡時，光束是稍微聚焦或散焦的非平行狀態，來調整其相對捕捉光束在聚焦位置上的位移量（如圖 3.14）。

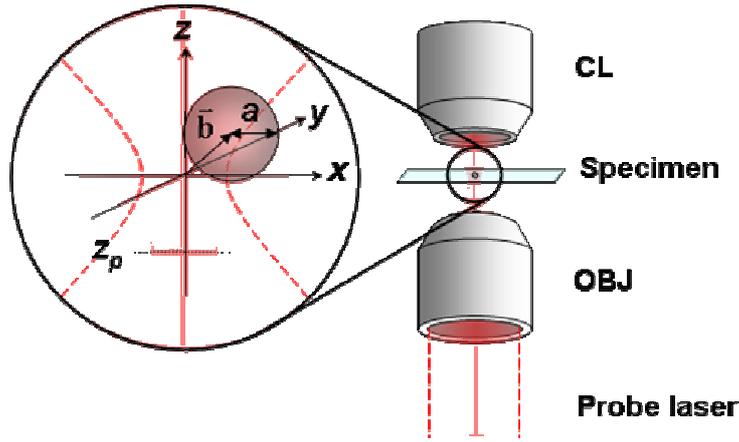


圖 3.14 探測雷射光束與微粒子位置圖

因此，由富氏光學的觀念，假設真空中波數為 k_0 的探測雷射，其在物鏡前的偏振在 x 方向上，且其焦點相對捕捉雷射焦點的位置為 z_p （靠近物鏡時， $z_p < 0$ ），我們可以得到通過數值孔徑為 NA_{obj} 的物鏡，在入射到微粒子之光場的角分佈，也就是對應不同角度的平面波分量係數，可以表示為：

$$\tilde{\mathbf{E}}_i(k_{ix}, k_{iy}) = \tilde{E} e^{-k_{i\perp}^2 / (k_0 NA_{obj})^2} e^{-ik_{iz} z_p} \bar{\mathbf{P}}_i(k_{ix}, k_{iy}), \quad (3.7)$$

其中， $\bar{\mathbf{k}}_i = [k_{ix}, k_{iy}, k_{iz} = (k_0 n - k_{i\perp}^2)^{1/2}]$ 為入射光場行進的方向向量、 n_m 為樣品溶液的折射率、 $k_{i\perp} = (k_{ix}^2 + k_{iy}^2)^{1/2}$ 。值得注意的是，由於物鏡在孔徑上的限制，因此， $k_{i\perp} \leq k_0 NA_{obj}$ 。而， $\tilde{E} = 2 [P_0 / (\pi k_0 NA_{obj} n_m c \epsilon_0)]^{1/2}$ ， c 、 ϵ_0 是空氣中的光速和介電係數、 P_0 為總探針雷射功率。另外，由偏振光折射的觀念（附錄二），可以求出對應不同行進方向的光場偏振函數為 $\bar{\mathbf{P}}_i$ 為

$$\bar{\mathbf{P}}(k_{ix}, k_{iy}) = \frac{1}{k_0 n} \begin{bmatrix} 1 - k_{ix}^2 / (1 + k_{iz}) \\ -k_{ix} k_{iy} / (1 + k_{iz}) \\ -k_{ix} \end{bmatrix}. \quad (3.8)$$

由(3.7)式，我們可以得到，在相對於捕捉雷射焦點為 $\bar{\mathbf{r}}$ 的位置上之光場為

$$\bar{\mathbf{E}}_i(\bar{\mathbf{r}}) = \frac{1}{(2\pi)^2} \iint_{k_{i\perp} \leq k_0 NA_{obj}} \tilde{\mathbf{E}}_i(k_{ix}, k_{iy}) e^{i\bar{\mathbf{k}}_i \cdot \bar{\mathbf{r}}} dk_{ix} dk_{iy}, \quad (3.9)$$

接下來，對入射光場角分佈，也就是每一個具有各自偏振方向和行進方向的平面波，引入米氏散射理論。依據米氏散射理論，一個偏振在 x 方向上、朝 z 方向前進、電場大小為 E_0 的平面波光場，被在原點上的球體散射時，其散射光場角分佈可表示為

$$\tilde{\mathbf{E}}_{s,1}(\bar{\mathbf{k}}_s) = E_0 / (k_0 n_m) \cdot [\cos\varphi_s \cdot S_2(\theta_s) \hat{\mathbf{e}}_\theta + \sin\varphi_s \cdot S_1(\theta_s) \hat{\mathbf{e}}_\varphi], \quad (3.10)$$

其中， $\bar{\mathbf{k}}_s$ 為入射光場行進的方向向量，散射角 $\theta_s = \tan^{-1}(k_{sy}/k_{sx})$ 、 $\varphi_s = \cos^{-1}k_{sz}$ ， S_1

和 S_2 是對不同散射角的散射光，在平行與垂直散射面方向上分量的強度分佈函數（附錄三）。因此，如果考慮微粒子相對捕捉雷射焦點位置為 $\bar{\mathbf{b}}$ ，則我們可以由(3.9)式與(3.10)式，得到在捕捉雷射的焦平面上，散射光場的角分佈為

$$\tilde{\mathbf{E}}_s(k_{sx}, k_{sy}) = \frac{e^{-i\bar{\mathbf{k}}_s \cdot \bar{\mathbf{b}}}}{k_z / (k_0 n)} \iint_{k_{\perp} \leq k_0 NA_{obj}} \mathbf{R}_i^{-1}(\bar{\mathbf{k}}_i) \cdot \tilde{\mathbf{E}}_{s,1}[\mathbf{R}_i(\bar{\mathbf{k}}_i) \cdot \bar{\mathbf{k}}_s] \cdot e^{i\bar{\mathbf{k}}_i \cdot \bar{\mathbf{b}}} dk_{ix} dk_{iy}, \quad (3.11)$$

其中，由附錄二中的推導，我們可以由座標轉換得到對應不同入射角度的平面波光場，將 x 軸與 z 軸分別旋轉到其偏振方向與與行進方向的旋轉矩陣為

$$\mathbf{R}(\bar{\mathbf{k}}_i) = \frac{1}{k_0 n} \begin{bmatrix} 1 - k_{ix}^2 / (1 + k_{iz}) & -k_{ix} k_{iy} / (1 + k_{iz}) & -k_{ix} \\ -k_{ix} k_{iy} / (1 + k_{iz}) & 1 - k_{iy}^2 / (1 + k_{iz}) & -k_{iy} \\ k_{ix} & k_{iy} & k_{iz} \end{bmatrix}. \quad (3.12)$$

3-5-2 散射光斑與位移訊號

由前所述，我們已經得到了散射光場的分佈，接下來便可以計算出在偵測位置上的光強度分佈。而實驗系統中，針對前向干涉光斑的偵測時，偵測位置設置於焦距 f_{con} 和數值孔徑 NA_{con} 之聚光鏡的後焦平面，因此我們可以由富氏光學得到偵測位置上前向干涉光斑的光強度分佈為

$$I_f(\zeta_f, \eta_f) = \varepsilon_0 c \left| \tilde{\mathbf{E}}_i(\zeta_f, \eta_f) + \tilde{\mathbf{E}}_{s+}(\zeta_f, \eta_f) \right|^2, \quad (3.13)$$

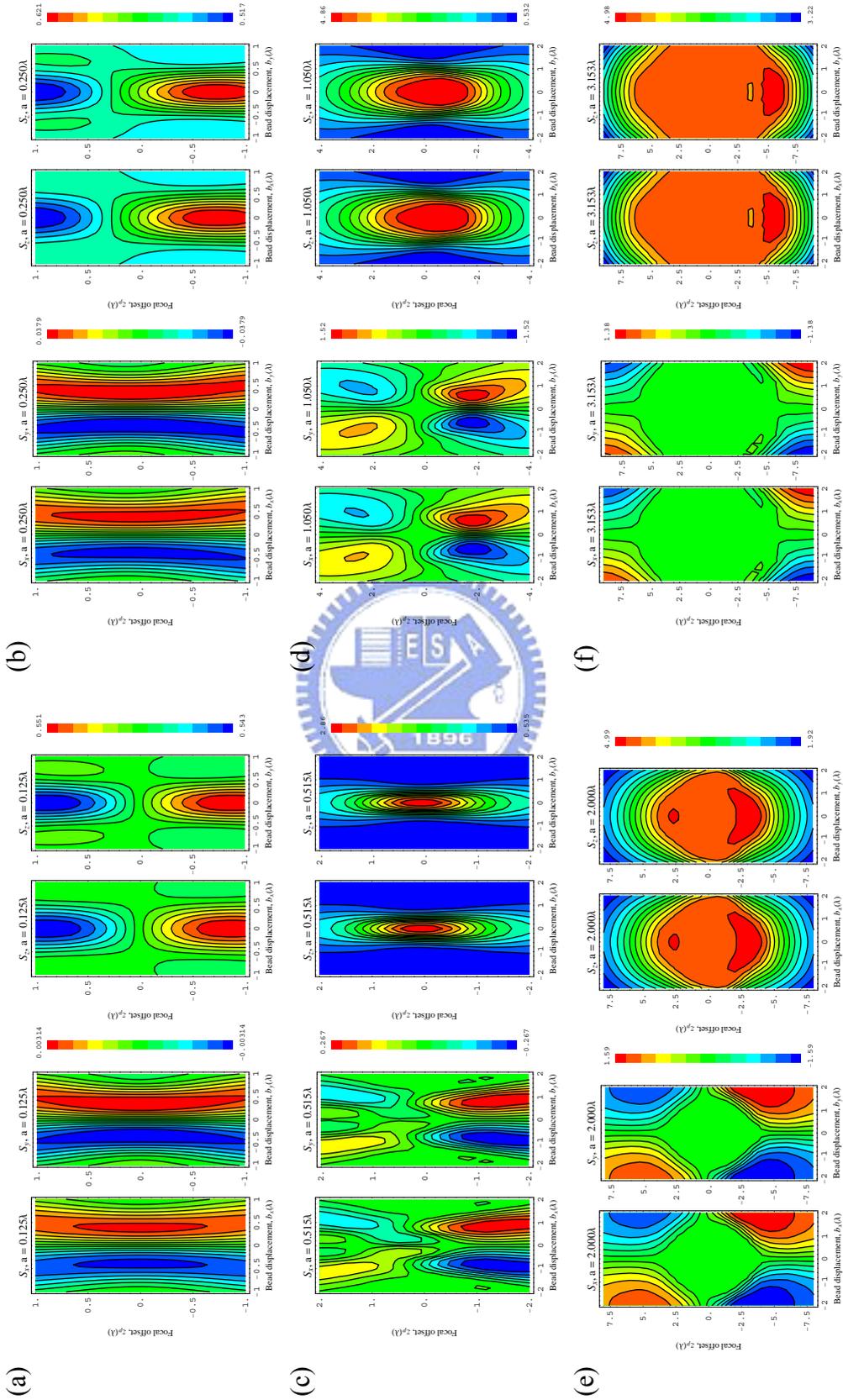
其中，下標 $s+$ 表示考慮 $k_{sz} \geq 0$ 。而 (ζ_f, η_f) 與 (x_f, y_f) 空間座標的關係為 $(\zeta_f, \eta_f) = (x_f / \lambda f_{con}, y_f / \lambda f_{con})$ 。由於聚光鏡收光角度的限制，因此當 $(\zeta_f^2 + \eta_f^2) \geq k_0 NA_{con}$ 時， $I_f = 0$ 。

另外，由於背向散射的偵測位置一般設置在顯微鏡的成像位置上，同樣的，我們也可以由富氏光學得到背向散射光斑的光強度分佈為

$$I_b(\zeta_b, \eta_b) = \varepsilon_0 c \left| \mathcal{F}^{-1} \{ \mathbf{R}_i(-\bar{\mathbf{k}}_s) \tilde{\mathbf{E}}_{s-}(k_{sx}, k_{sy}) \}_{\zeta_b, \eta_b} \right|^2, \quad (3.14)$$

其中，下標 $s-$ 表示考慮 $k_{sz} \leq 0$ ， \mathcal{F}^{-1} 是反富氏轉換。 (ζ_b, η_b) 與空間座標 (x_b, y_b) 的關係符合 $(\zeta_b, \eta_b) = (x_b / M, y_b / M)$ ，而 M 為顯微鏡的放大率。也由於物鏡的收光限制， $\tilde{\mathbf{E}}_{s-}$ 僅考慮 $(k_{sx}^2 + k_{sy}^2) \leq k_0 NA_{obj}$ 時有值。另外， $\mathbf{R}_i(-\bar{\mathbf{k}}_s)$ 是考慮散射光場通過物鏡時，偏振方向所做的改變。

最後，如(3.13)與(3.14)式，我們已經計算出在偵測位置上的散射光斑的光強度分佈，因此，若要計算出前面所提到的四象限光偵測器所量測到的訊號，便是將偵測位置上四個象限的光強度分別進行面積積分，便會得到四象限光偵測器的四個偵測器各自偵測到的光功率。並且，參考前面對位移訊號的定義與規一化的條件我們便可以計算出對於不同尺寸的微粒子，其位移與四象限光偵測器所量測的位移訊號的關係圖，如圖 3.15 與圖 3.16。



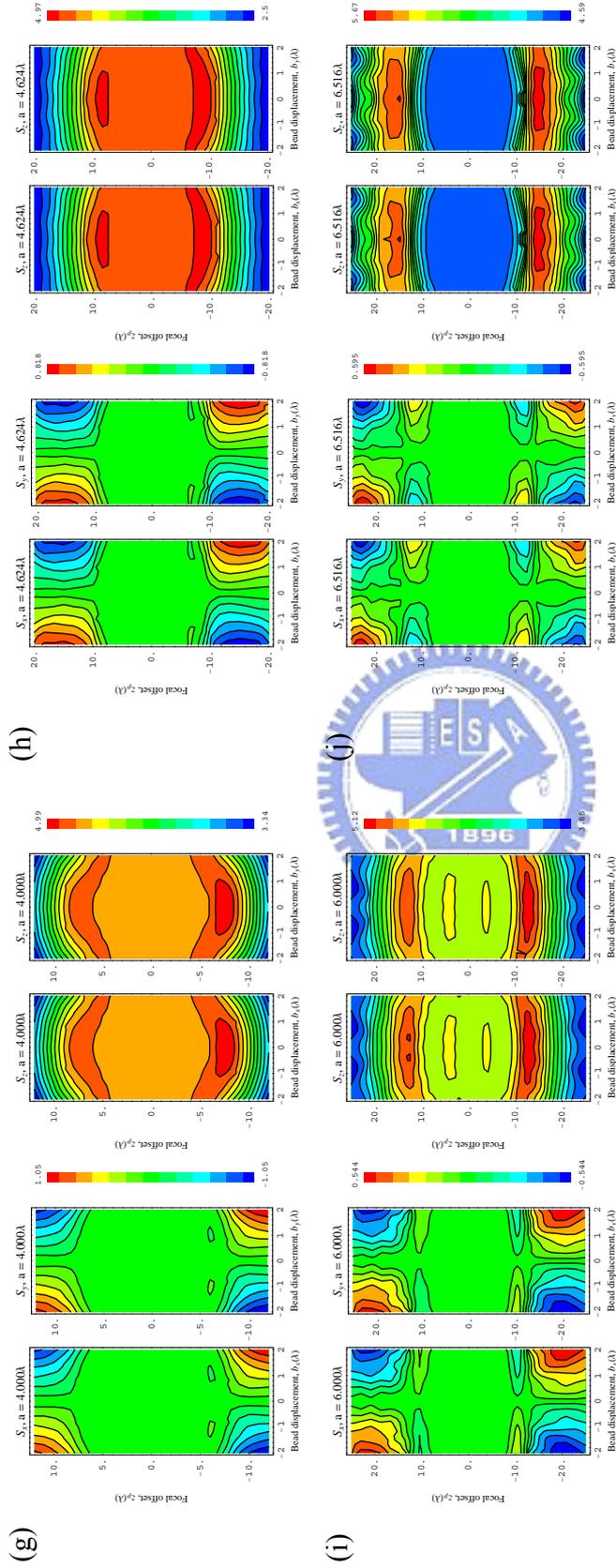
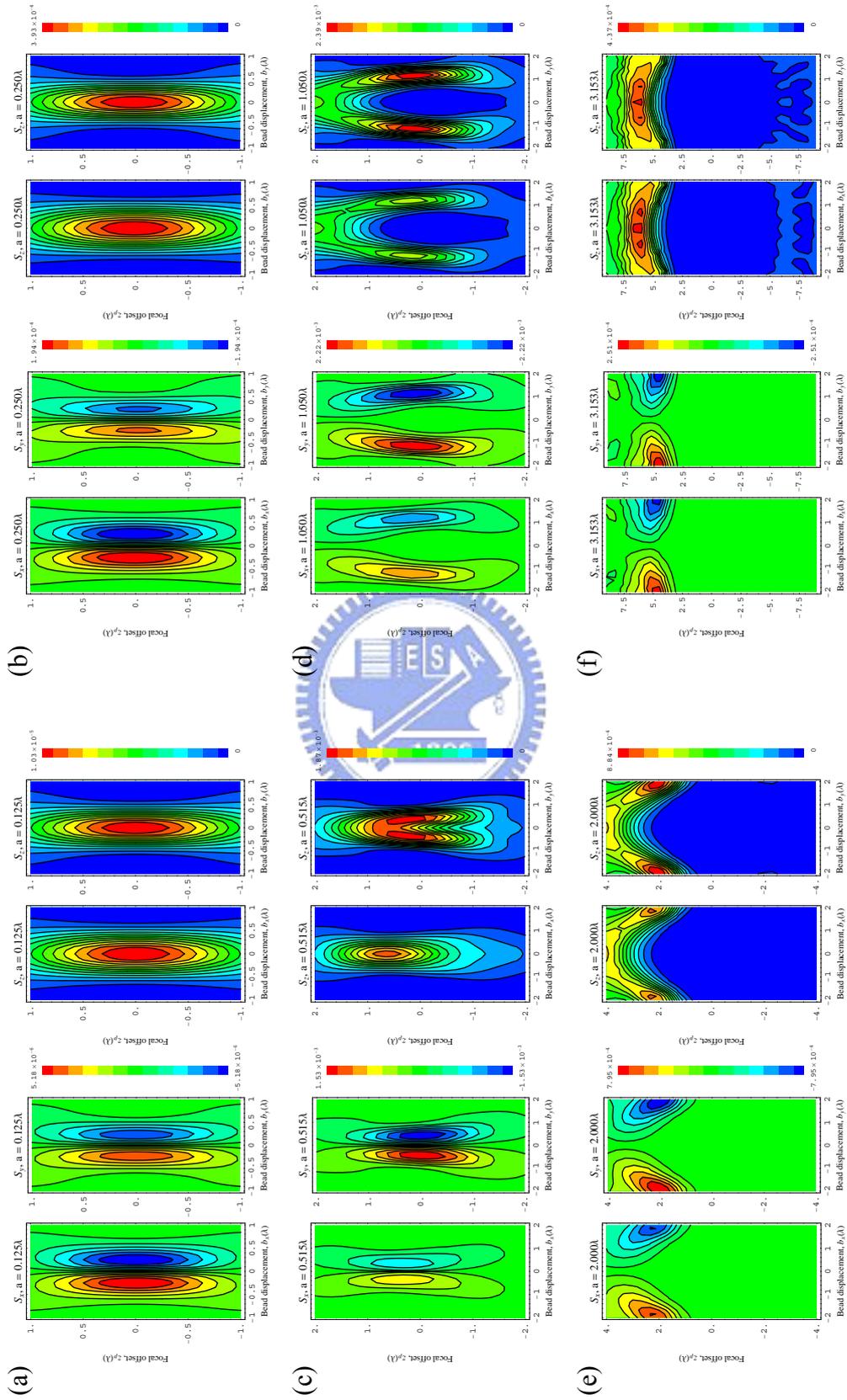


圖 3.15 微粒子位移與前向散射位訊號模擬關係圖



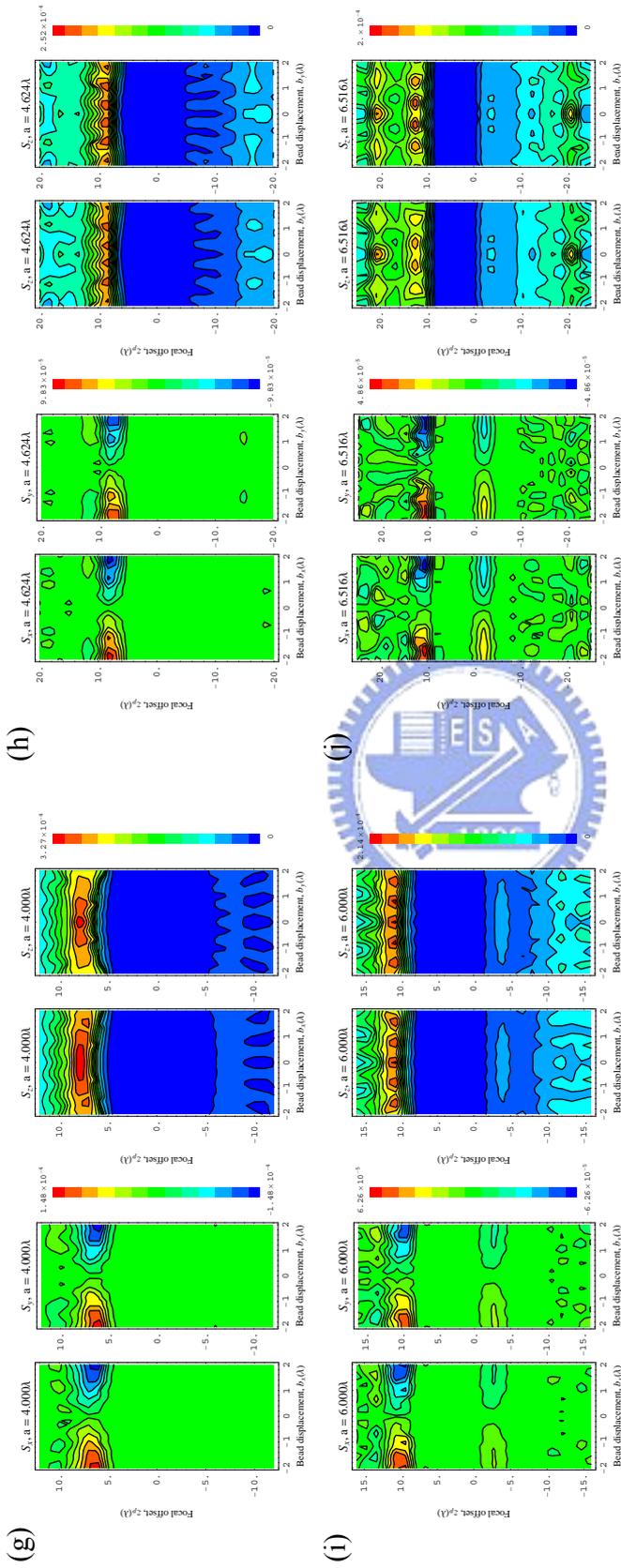


圖 3.16 微粒子位移與背向散射位訊號模擬關係圖

與圖 3.11 與圖 3.12 相似地，在圖 3.15 與圖 3.16 中，我們分別計算了前向散射與背向散射的微粒子位移與位移訊號的模擬關係圖。其中，我們不僅計算了實驗中所使用尺寸的微粒子，同時，也額外計算了微粒子半徑為 0.125λ 、 0.25λ 、 2λ 、 4λ 與 6λ 的情形作為比較。而我們也確實可以發現，雖然理論計算的結果稍有不同，不過，也都會在相近的離焦位置上得到適合單一粒子追蹤量測的狀態。

3-5-3 球差對入射光場之影響

對於理論模擬與實驗結果的差異，最主要的原因是由於在我們前面的計算中，是考慮入射雷射光束是完美聚焦的情形，但在現實的實驗中，卻會因為像差的存在，而無法達到完美聚焦。而像差畢竟隨系統的架設有所不同，因此並不容易完全考慮。不過，由於我們所考慮的雷射光聚焦是在光軸上，而微粒子位移範圍，在整體尺度上，也很接近光軸，所以，我們便可以先避開一些離軸的像差，而僅先考慮球差 (spherical aberration) 的影響。不過即使是指考慮球差，其來源依然和系統有關，因此在這裡我們考慮，由於蓋玻片玻璃與樣品溶液間的折射率變化 (refractive index mismatch) 所造成的球差作為範例。而這樣的球差在一般使用油鏡作為聚焦物鏡的系統中，是很常見的，也較具有代表性。

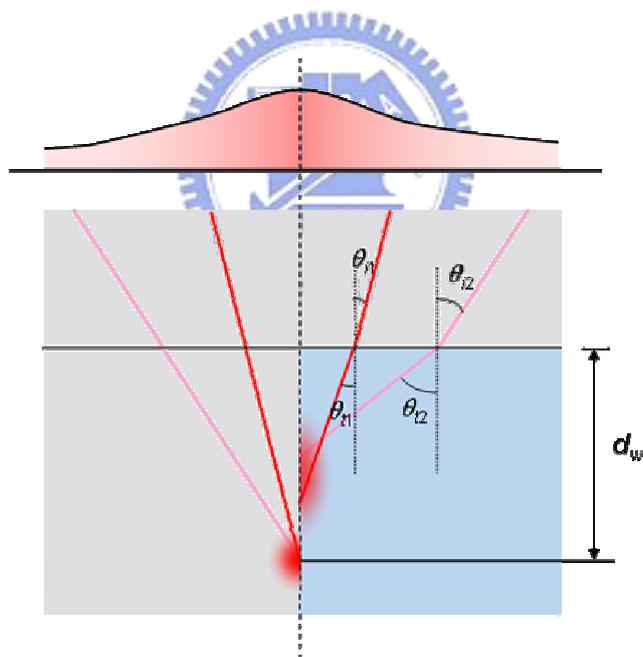


圖 3.17 球差對雷射光束聚焦影響之示意圖

由蓋玻片玻璃與樣品溶液間折射率變化而產生球差的概念，如圖 3.17 中所示。當在徑向上強度變化雷射光束被物鏡聚焦時，假設，在均勻介質的情況下(如圖左側)，雖然光行進的角度不同，但內側與外側的光線都會匯聚到相同的位置，而形成理想聚焦的焦點。可是，在一般的顯微鏡系統中，由於樣品其實是在溶液中，且利用蓋玻片與載玻片承載樣品以供觀察。於是，實際的情形便會類似圖 3.17 右側的描述。而在這樣的情況下，因為外側與內側的光線，入射介面時，兩

者的入射角不同，也就會各自匯聚在光軸上不同的位置，於是聚光焦點便會比理想聚焦的情形稍微分散。不過，我們還是可以藉由聚焦光點在光軸上光強度的分佈，找到強度最高的位置，定義出聚焦位置。但是，若我們將光線視為前面所提到的富氏展開下，不同行進角度的平面波，則這些平行光在聚焦位置上的相位便會出現差別。於是，這也就與(3.7)式中的入射光場角分佈的定義有些差別。若我們稱呼(3.7)式中的光場角分佈為 $\tilde{\mathbf{E}}_{i,ideal}(\bar{\mathbf{k}})$ ，則考慮前面所述的球差下的入射光場角分佈 $\tilde{\mathbf{E}}_{i,sa}(\bar{\mathbf{k}})$ 可以求得為^[22]

$$\tilde{\mathbf{E}}_{i,sa}(\bar{\mathbf{k}}) = \tilde{\mathbf{E}}_{i,ab}(\bar{\mathbf{k}}) \exp[i d_w (\cos\theta_i - \cos\theta_t)], \quad (3.15)$$

其中， d_w 為完美聚焦時，焦點與介面間的距離； θ_i 與 θ_t 則為光線入射介面時的入射角與折射角。

藉由(3.15)式，當有如前所述的球差發生時，我們可以對聚焦光束進行修正，同時，也可以計算出，這樣的現象對微粒子位移與位移訊號之關係的影響。如圖3.18，便是一個半徑為0.5 μm 的微粒子，在探針雷射光束於不同 d_w (由0至 7.5λ ，間格 1.25λ)時，所計算出的微粒子位移與位移訊號的關係。

由圖中，我們可以發現，和理想聚焦($d_w = 0$)的情形相比，這樣的球差確實會嚴重的影響微粒子位移與位移訊號之間的關係。不論是訊號強度或是訊號的趨勢，都會與球差有很大的關係。不過，由圖上，我們卻也可以發現，當我們考慮探測雷射光束最適合的離焦位置時，並不明顯受到這樣的球差影響。在理想聚焦的狀況下所得到的最適合離焦距離，套用在不同程度的球差下，都仍是合適的離焦距離。

這樣的現象，也確實驗證了我們的實驗結果。經由實驗所得到的微粒子位移與位移訊號之間的關係，雖然在強度與趨勢都與探測雷射光束理想聚焦下的理論模擬不同，但是，最佳的離焦距離並不受到影響，而依然在接近的位置。而這也可以表示，當我們利用理想具焦的情況所得到的離焦距離預測結果，即使在不同的系統，有不完全相同之球差的情況下，這個預測依然是可以適用的。也就是說，當我們需要架設一個探測光束式的單一粒子追蹤系統時，只要決定了系統中所需要使用的微粒子尺寸，我們便只需要藉由理想情況下的理論模型，即可預測所需要的探測雷射離焦距離。而這對架設一套可以適應多種微粒子尺寸的雷射鐳夾單一粒子追蹤系統來說，是一個非常方便的方式。

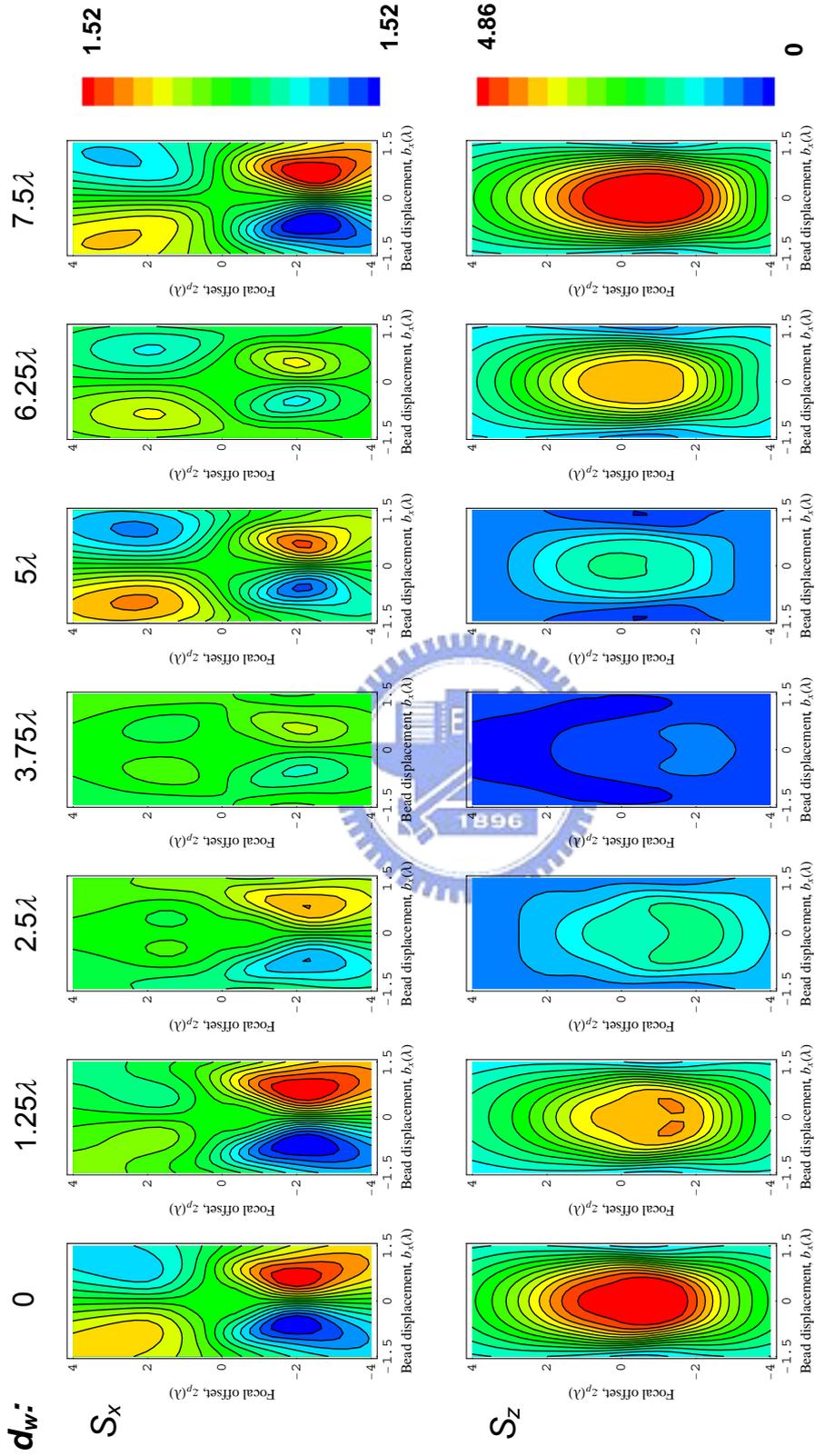


圖 3.18 入射光球差對微粒子位移與位訊號之影響

3-6 探針雷射光束離焦距離的最佳化與粒子追蹤效能

在前面的內容中，我們已經藉由實驗與理論模型的方式，驗證了利用離焦的探測光束確實是可以針對不同尺寸的微粒子，減少位移訊號受不同方向位移耦合的現象，提供正確的追蹤量測。而且，由微粒子位移與位移訊號的關係圖，則可以估計適合的探測雷射光束離焦距離。在本節當中，則以數學定義的方式，分析前文中所得到的微粒子位移與位移訊號關係圖，尋找到最佳的離焦距離。同時，也藉此比較採用最佳化的離焦距離相對於沒有離焦探測的情況下，對於不同尺寸的微粒子，在追蹤效能上的差別。

3-6-1 探針雷射光束離焦距離的最佳化

在進行單一粒子追蹤時，最重要的兩個位移訊號追蹤效能便是對微粒子位移的靈敏度與可偵測的位移範圍。因此，我們便針對此二重要的參數以決定最佳化的離焦距離。

我們首先經由數學方式定義量化的位移訊號對微粒子位移的靈敏度與可偵測的位移範圍。由於，受雷射鐳夾捕捉時，微粒子位移 $\bar{\mathbf{b}}$ 的範圍幾乎都在捕捉雷射光束焦點附近，所以，針對特定的探測雷射光束離焦距離 z_{p0} 來說，便可以定義位移訊號對於微粒子位移靈敏度 $\bar{\mathbf{V}}(z_p)$ 為

$$\bar{\mathbf{V}}(z_p) = \left(\frac{\partial S_x}{\partial b_x}, \frac{\partial S_y}{\partial b_y}, \frac{\partial S_z}{\partial b_z} \right) \Bigg|_{\mathbf{b}=(0,0,0)} \quad (3.16)$$

其中，由於我們考慮微粒子與探測光束焦點的相對位置時，當在光軸方向向上移動 b_z 時，卻也可以想像成是探測雷射光束的離焦距離向下移動 b_z 。所以，實際上，探測雷射光束的焦點與微粒子間的相對位移 $z_{p0} = z_p - b_z$ 。於是，在之前的將微粒子固定在樣品中，對探測光束進行掃瞄所得到的位移訊號 $\bar{\mathbf{S}}(b_x, b_y, z_p)$ 來說，便可以將 $\partial S_z / \partial b_z$ 替換為 $-\partial S_z / \partial z_p$ 。

至於，可偵測微粒子位移範圍的定義則必須包含兩個條件：一個是在範圍內訊號響應必須正比於微粒子位移；另一個條件則是此時的位移訊號也必須不與其他方向的位移有耦合的現象。因此，在假想 z_p 與 (b_x, b_y, b_z) 彼此獨立的情形下，可偵測微粒子位移範圍 $b_{i,max}(z_p)$ 便可以定義為符合以下條件的最大值：

$$\left[S_i(b_i, z_p) \Big|_{b_j=0} - b_i V_i(z_p) \right] / S_i(b_i, z_p) \Big|_{b_j=0} \leq 5\% , \quad (3.17)$$

且

$$\left. \frac{\partial S_i(b_i, z_p)/b_j}{\partial S_i(b_i, z_p)/b_i} \right|_{b_j=0} \leq 5\% , \quad (3.18)$$

其中， i 與 j 為 x 、 y 與 z ，但 $j \neq i$ 。也就是說，在(3.17)與(3.18)式的條件裡，不僅要求實際之位移訊號與以線性方式估計的差距比需誤差在 5% 之內。同時，也要求某一方向的位移訊號受其他方向位移的影響，也要在其受本身方向位移影響的 5% 以內。

由前所定義的位移訊號對微粒子位移靈敏度與追蹤範圍，我們便可以分析下，不同的探測雷射光束離焦距離所具有的追蹤效能。而為了同時顧及此靈敏度 \bar{V} 與偵測範圍 \bar{b} ，以最佳化雷射光束離焦距離，我們便針對在不同位置下兩者的乘積，我們稱為工作範圍 $\bar{W} = (V_x b_{x,max}, V_y b_{y,max}, V_z b_{z,max})$ 的最大值，以決定不同微粒子移動方向下，最佳的雷射光束離焦距離。

如圖 3.19 便是我們所計算出來針對不同尺寸的微粒子最佳的探測光束雷射光束離焦距離。其中，(a)~(c)依序是在 x 、 y 、 z 方向上，在前向散射偵測下的情形；而(d)~(f)則是在 x 、 y 、 z 方向上，針對背向散射偵測的結果。在每一組微粒子尺寸與最佳的探測光束雷射光束離焦距離關係中，也同時標示了理論模擬的情形（以灰色線條連接的實心圓點），以及實際的實驗結果（實心方塊）。

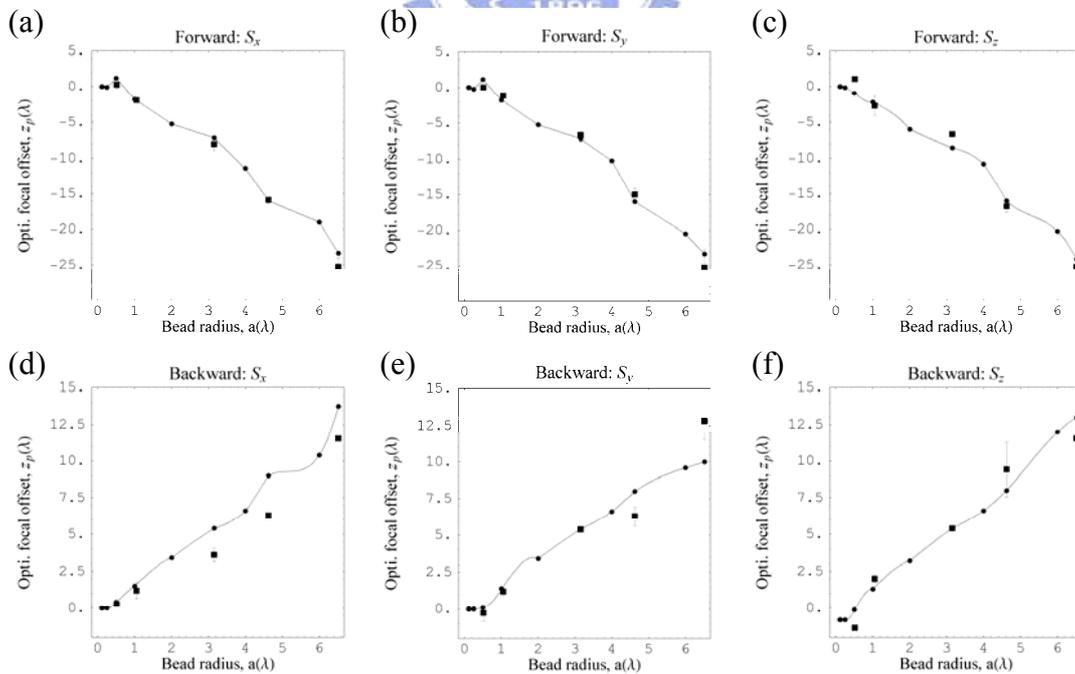


圖 3.19 微粒子尺寸與最佳探測光束雷射光束離焦距離關係圖

由圖中，我們可以發現，理論模擬與實際實驗的分析結果在趨勢上是相符的，而且數值上的也非常接近，差距都在數百個奈米之內。這樣的分析結果，與之前直接觀察微粒子位移與位移訊號關係圖，所得到的結論是可以應證的。另外，我們可以發現，當微粒子的半徑小於波長時，最佳的離焦距離幾乎為零。其實，這也就是直接使用捕捉雷射光束進行微粒子追蹤適用的範圍。但，當微粒子的半徑大於波長時，最佳的離焦距離便會隨著微粒子尺寸的增加而增大，這也象徵了直接使用捕捉光束追蹤已不再適用。

不過，我們也可以發現，最佳的離焦距離便隨著微粒子尺寸增加而增大的趨勢，可以粗略的估計為線性的關係。對前向散射偵測來說，最佳的離焦距離大約在相對捕捉中心，靠近物鏡方向上，3.3 倍微粒子半徑的距離。而對背向散射偵測的情形，最佳的離焦距離則大約在相對捕捉中心，遠離物鏡方向上，2 倍微粒子半徑的距離。這樣的結果，對需要調整使用不同尺寸的微粒子進行偵測時，便非常地方便。在調整時，只要將探測光束的焦點移動至估計的位置上，在針對附近約數百奈米的範圍尋找適合系統的最佳位置即可，而不需要在數至數十個微米的範圍中尋找。

3-6-2 最佳化的探測雷射光束離焦距離與追蹤效能

為了驗證引入離焦的探測雷射光束的效果，我們也將實際實驗時，離焦最佳化與未離焦情形下的微粒子位移解析度與可追蹤範圍，進行比較，如圖 3.20。其中，我們求得解析度的方式是將微粒子沒有位移的情況下所得到的位移訊號範圍視為雜訊，而將雜訊除以位移靈敏度，便會得到追蹤微粒子位移時的解析度。由圖中，我們可以發現，當微粒子的半徑並不遠小於波長時，引入離焦的探測雷射光束，並最佳化離焦距離，不論是偵測微粒子位移時的解析度，或是可追蹤的範圍，都確實較不使用的情況下，在效能上大幅提昇。其中，最小的解析度可以由大於 15 nm 提升為小於 10 nm，甚至小於 5 nm，而線性範圍則可以由小於 20 nm 增加至大於 50 nm，甚至是超過 150 nm。

另外，我們也實際利用雷射鑷夾的捕捉光束捕捉微粒子，並利用探測光束追蹤微粒子的位移，而藉由微粒子的位移情形，以功率頻譜密度 (power spectral density) 分析法 (附錄四)，我們也可以分析出此時雷射鑷夾的捕捉光彈力常數，^[23] 如圖 3.21。在本實驗中，捕捉雷射通過物鏡的功率為 8 mW。我們可以發現，當未離焦時，所偵測到的光彈性係數，隨著不同大小的微粒子，並沒有明顯的差異。而這一點是非常不合理的。因為由前一章的理論模型中，我們已經可以知道，當微粒子半徑遠小於波長的情況下，隨著微粒子的光彈性係數會隨著微粒子的體積而線性增加。但當微粒子的尺寸進入幾何光學的範疇內時，光彈性係數卻會與微粒子的半徑成反比。因此，在我們量測的微粒子尺寸中，雖然並不包含遠小於波長的情形，也尚未到達遠大於波長的尺度，但是也確實包含光彈性係數隨著半

徑上升，而出現上升又下降的範圍。而這在離焦最佳化的情形下，也確實很明顯地看到這樣的趨勢。也就是說，當微粒子的尺寸並不遠小於波長時，使用離焦的探測光束，也才會偵測到正確的偵測響應。

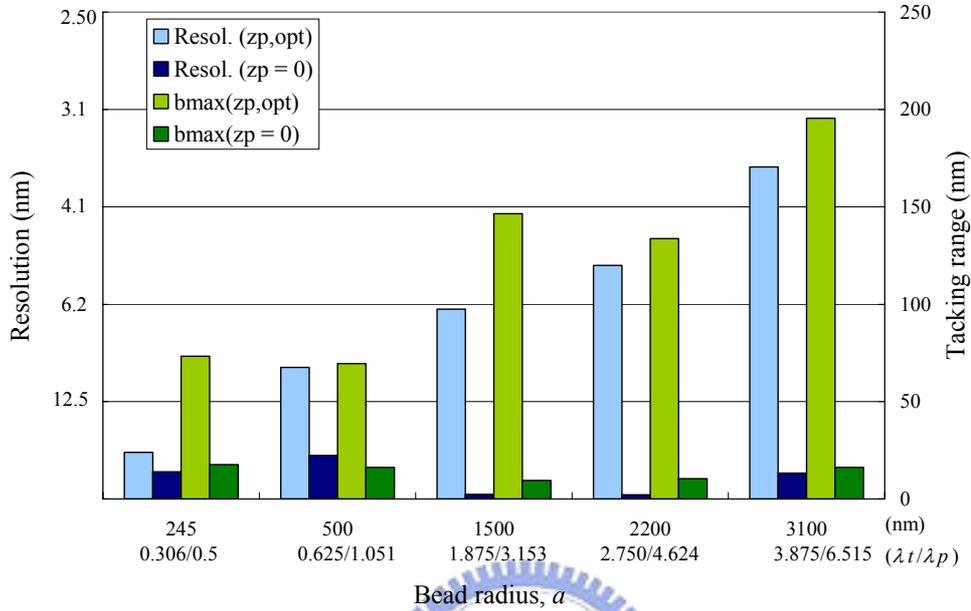


圖 3.20 最佳化探測雷射光束離焦距離與追蹤效能

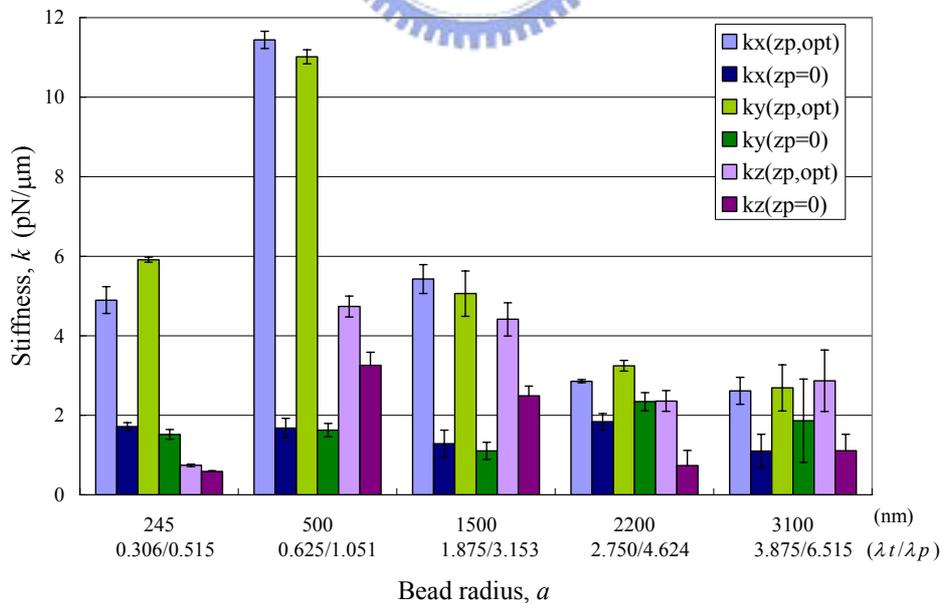


圖 3.21 不同尺寸微粒子之光彈力係數量測

總和來說，對於使用微粒子的尺寸遠小於波長的系統說，雖然可以直接利用捕捉雷射光束進行追蹤，但便會犧牲了在相同功率下所能產生的捕捉力。而，使用離焦的探測光束，則可以在提供與使用捕捉雷射追蹤小尺寸的微粒子相同的追蹤效能的情況下，增加微粒子的適用尺寸範圍，產生較大的捕捉力，以供研究的需要。

