

江苏大学专著出版基金资助出版

光散射理论 及其应用技术

王亚伟 编著



科学出版社

光散射理论及其应用技术

王亚伟 编著

江苏大学专著出版基金资助出版

科学出版社

内 容 简 介

本书从光散射理论的起源到当今高科技的最新应用技术,较为系统地介绍了弹性光散射理论及其相关理论的主要应用。本书主要以生物细胞为应用对象,详细介绍散射理论(Mie 散射、Rayleigh 散射、衍射),生物细胞的建模方法及其近似散射理论,细胞散射特征分析,多体散射及其特征反演方法,虚拟仿真实验方法,透射光细胞相位成像理论及其应用技术,基于光散射理论下的流式细胞检测技术、尿沉渣检测技术、粒度分布分析仪等应用技术。

本书将弹性光散射理论、建模方法、虚拟仿真实验技术与细胞检测技术完整地融为一体,充分体现了本书的系统性、科学先进性和应用价值。本书特别适合从事医学诊断、环境检测等领域科学研究及其应用的科技人员阅读,也适合与此密切相关学科、专业、方向的师生阅读。

图书在版编目(CIP)数据

光散射理论及其应用技术/王亚伟编著. —北京:科学出版社,2013
ISBN 978-7-03-037756-2

I. ①光… II. ①王… III. ①光散射-研究 IV. ①O436.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 123975 号

责任编辑:周 丹 杨 锐 / 责任校对:张凤琴
责任印制:赵德静 / 封面设计:许 瑞

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 9 月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2013 年 9 月第一次印刷 印张:11 3/4

字数:245 000

定价:49.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

1869年,丁铎尔(Tyndall)发现,悬浮于气体中的细小颗粒在白光照射下会产生光散射现象;1871年,瑞利(Rayleigh)在详细研究了丁铎尔现象后,提出了著名的瑞利散射(Rayleigh scattering)理论(Rayleigh因研究与光散射有关的气体密度和发现稀有气体氦,获得了1904年诺贝尔物理学奖);1890年和1908年,洛伦兹(Lorenz)和古斯塔夫(Gustav Mie)分别利用麦克斯韦方程,通过求解各向同性的均匀球形粒子对平面电磁波的散射而提出了L-M理论(Lorenz-Mie theory, LMT),从而奠定了光散射理论的发展基础。从此,关于光散射建模方法、散射近似理论、散射分布计算方法等理论内容的研究迅猛发展。同时,由于通过散射光的测量可以了解散射颗粒的浓度、大小、形状及取向等特征,光散射理论应用技术的开发研究也应运而生。自1930年卡斯珀森(Casperrsson)和托雷尔(Thorell)开始的细胞计数技术到2001年的BD流式细胞工作站,在医学检验与诊断上发挥了越来越重要的作用;从20世纪50年代末白光散射尘埃粒子计数器(OPC)到今天的激光粒子分析仪,测量精确度提高了5个数量级;从1988年世界第一台高速摄像式尿沉渣分析仪到21世纪的流动池式尿沉渣定量分析工作站,大大提高了临床诊断质量和准确度。这些技术都把光散射理论的应用发挥到了极致状态,从而大大促进了高新技术的迅速发展。此外,随着全球经济和科学技术的高速发展,越来越多的生产加工和科学研究领域都需要对颗粒物质特征分布进行检测。例如,大气监测、环境检测、冶金工业、医学制药业、燃料喷射与燃烧效率的评定、集成电路加工、涂料、染料、黏合剂等材料加工业、国防和空间科学等,都要求对粒子的粒度和粒度分布参数进行准确的测量和研究,这也成为光散射理论进一步发展的重要动力之一。

光散射理论在细胞检测中发挥了重大作用,最近随着生命科学从描述性科学向定量性科学的发展,细胞光学定量检测技术已成为研究的热点。由于生物细胞的光透性,相位成像技术凭借其非侵入、无损伤和可定量的优点,为生物细胞的定量研究提供了一种有力的工具。近十多年来,各式各样的基于数字全息定量相位成像技术迅速发展。2005年,库薛(E. Cucho)课题组第一次把他们提出的数字全息相差显微技术用于培养皿中活细胞的定量研究。这种技术具有10ms的获取时间,获取速率只受CCD限制,能够获取细胞特征信息。该技术具有实时精确测量活细胞形态的能力,被广泛地应用于免疫学、神经生物学、血液学、细胞生理学和新陈代谢中。除了E. Cucho课题组,美国麻省理工学院激光生物医学研究中心波

佩斯库(Gabriel Popescu)课题组,在生物细胞相位显微成像技术方面的研究成就尤为突出,特别是2011年该研究小组开发了SLIM(spatial light interference microscopy)技术。该技术的红细胞形态分辨精度与原子力显微镜相当,相干光程分辨率可达 $0.03\mu\text{m}$,而处理速度是原子力显微镜的1000倍以上。为此,2011年8月中国教育部网站以题为“新成像技术有助阐明细胞增长方式”的新闻报道,指出这种方法将为生物细胞分析和特征识别等科学技术带来突破性的革命。由此可见,作为光散射理论的拓展,透射光相位成像理论在生物细胞精密、瞬态检测应用上大有作为。

作者于1998年攻读博士学位期间,开始了微粒粒度分析理论及其仪器开发的研究,从此潜心研究光散射理论及其应用技术。2003年博士后阶段,基于生物细胞光检测技术的重要应用意义,开始了细胞散射理论与技术的研究。2007~2008年,受国家留学基金管理委员会委派,作者到国际光学大师(如卡尔蔡司(Carl Zeiss)、阿贝(Abbe)等)的培育地——德国Jena大学物理系进行学习、访问。访问期间得到了国际虚拟光学名师弗兰克(Frank Wyrowski)教授的指导,了解和掌握了光学虚拟仿真实验技术,并进行了细胞光散射和透射光相位成像的仿真研究。从光散射基础理论到生物细胞检测应用技术,整个研究阶段经历了10多年,其研究工作分别得到了国家自然科学基金委员会、教育部、江苏省科技厅、江苏省教育厅、江苏省人事厅和江苏大学等若干基金的资助。在此,感谢上述各部门,正是有了它们的资助,才使作者在光散射理论及其应用技术方面取得了一些研究成果。

作者围绕生物细胞检测基础理论和应用技术的发展需要,将传统光散射理论、光散射近似理论、透射光相位成像理论、生物细胞建模方法、虚拟仿真光学实验技术、光散射应用技术和相位成像技术形成系统,结合作者的研究成果和国内外最新技术,形成了“光散射理论及其应用技术”的研究生课程讲义,在江苏大学光学工程和物理电子学等学科点授课。经过近10年来有关教材内容的不断丰富和完善,作者深感有必要将此讲义修改提高,形成论著,供同行学者和师生参考。本书的出版得到了江苏大学专著出版基金的资助,在撰写中得到了课题组成员的帮助,他们是徐媛媛博士(第2章、第3章部分)、卜敏博士(第3章部分)、季颖副教授(第5章部分)、吕翠红博士(第6章)、金卫凤博士(第7章)、尚学府博士(第8章)。同时感谢引文中的所有作者对本书的贡献,对于因疏忽未标注引文的作者,一并表示感谢和歉意。由于作者水平有限,书中不足之处在所难免,恳请广大读者不吝指正。

王亚伟

2013年9月于镇江

目 录

前言

第 1 章 光散射理论及其应用技术概论	1
1.1 光散射理论的发展简史	1
1.2 光散射理论的主要分类	2
1.2.1 弹性光散射	2
1.2.2 非弹性光散射	2
1.2.3 关于光散射的几个主要概念	3
1.3 光散射理论的主要应用	4
1.3.1 散射技术在细胞分类计数中的应用	4
1.3.2 光散射技术在尿沉渣检测中的应用	6
1.3.3 光散射技术在粒子计数中的应用	6
1.3.4 细胞分类识别的其他光散射应用技术	8
1.4 生物细胞光相位成像检测技术概况	10
1.4.1 定性相位成像技术	11
1.4.2 定量相位成像技术	11
参考文献	15
第 2 章 散射理论基础	19
2.1 麦克斯韦方程组	19
2.2 光波与介质相互作用	20
2.2.1 非耗散介质	20
2.2.2 耗散介质	21
2.3 散射相关的基本物理量	21
2.3.1 散射截面 C_{scn} 与散射系数 Q_{scn}	22
2.3.2 吸收截面 C_{abs} 与吸收系数 Q_{abs}	22
2.3.3 消光截面 C_{ext} 与消光系数 Q_{ext}	22
2.3.4 散射振幅函数、强度函数及其与诸系数的关系	23
2.3.5 颗粒群的散射截面和消光截面	24
2.3.6 颗粒散射与吸收的消光定律	24
2.3.7 光的偏振性	25

参考文献	26
第3章 散射理论	27
3.1 Mie 散射公式	27
3.1.1 光散射矢量波描述	27
3.1.2 球形颗粒 Mie 散射公式	28
3.1.3 高斯波束下的球形颗粒散射	30
3.2 Mie 散射算法	33
3.2.1 Mie 系数迭代计算的算法	33
3.2.2 散射振幅和光散射强度的算法	35
3.2.3 效率参数的算法	35
3.3 Mie 散射规律分析	37
3.3.1 光散射强度分布特征分析	37
3.3.2 偏振与波长的特征	37
3.3.3 散射理论的适用范围	40
3.4 Rayleigh 散射公式	40
3.5 衍射散射理论	41
3.5.1 衍射散射概述	41
3.5.2 基尔霍夫衍射理论	43
3.5.3 夫琅禾费圆孔衍射	44
3.5.4 巴比涅原理和多颗粒的衍射	46
3.5.5 从 Mie 散射到衍射散射	47
参考文献	49
第4章 光学建模及其散射近似理论	51
4.1 球形模型及其光散射	51
4.1.1 单球形模型及其散射近似	51
4.1.2 双球核式模型及其散射近似	53
4.2 椭球模型及其散射近似	54
4.2.1 椭球模型	54
4.2.2 单椭球模型下的近似理论及其散射分布特征	56
4.2.3 双椭球模型下的近似理论及其散射分布特征	61
4.3 有核双层偏心球模型及其散射	71
4.3.1 双层偏心球模型及其几何散射理论	72
4.3.2 双层偏心球模型下的光散射近似理论	74

4.3.3 算法流程及参数选择	77
4.4 光散射调制与细胞物理参量的关系	79
4.4.1 单核细胞光散射调制及其物理机理	79
4.4.2 次低频调制与细胞形态的关系	81
4.4.3 高频调制与细胞形态的关系	83
参考文献	84
第5章 多体散射及其反演方法	87
5.1 基于 Shifrin 变换下的颗粒群尺度分布测试法	87
5.1.1 密集颗粒群的近前向散射	87
5.1.2 基于 Shifrin 变换下的反演方法	88
5.1.3 扩展衍射法测量下限的半经验方法	89
5.1.4 颗粒群粒径分布反演理论的实现方法	92
5.2 颗粒群特征概率分布函数及反演方法	94
5.2.1 EPO 面半椭圆组合模型及其散射理论	94
5.2.2 形貌概率分布函数 $P_{(\eta)}$ 和形貌影响因子函数 $T_{(\eta)}$	96
5.2.3 粒径、形貌概率分布函数 $P_{(d,\eta)}$ 及其反演方程	97
5.3 其他反演方法及其理论概述	99
5.3.1 积分变换法	99
5.3.2 病态方程求解法	101
5.3.3 遗传反演算法	104
5.4 基于辐射传播方程的复散射理论	105
5.5 任意形体颗粒群的多重光散射	107
参考文献	109
第6章 光散射虚拟仿真应用技术	112
6.1 虚拟仿真系统	112
6.1.1 虚拟仿真系统概述	112
6.1.2 虚拟仿真系统的基本理论	113
6.1.3 虚拟仿真系统基本功能模块	115
6.2 仿真实验方法及其结果分析	118
6.2.1 劈尖与圆盘模型的相位仿真与结果	118
6.2.2 球模型的散射仿真与结果分析	120
6.2.3 核式模型的散射仿真与结果分析	123
6.3 虚拟仿真的其他应用范例	125

6.3.1 红细胞模型及其仿真结果	125
6.3.2 白细胞模型及其仿真结果	129
参考文献	136
第7章 生物细胞成像理论与技术	138
7.1 细胞相位成像检测技术应用概况	138
7.2 相位成像主要理论及其技术	140
7.2.1 同轴定量相位成像	140
7.2.2 离轴定量相位成像	141
7.2.3 傅里叶变换光散射技术	143
7.3 细胞相位成像仿真计算	144
7.3.1 物光波的建立	145
7.3.2 干涉图的记录	146
7.3.3 相位的再现	147
7.4 相位成像与光散射技术的关系	149
参考文献	151
第8章 光散射理论的重要应用技术	155
8.1 流式细胞仪	155
8.1.1 流式细胞术基本原理	155
8.1.2 流式细胞仪基本结构	157
8.1.3 流式细胞术的数据分析	158
8.1.4 流式细胞仪的主要应用及发展	160
8.2 激光粒度仪	164
8.2.1 激光粒度仪原理	164
8.2.2 激光粒度仪光学结构	165
8.2.3 激光粒度仪的主要应用	168
8.3 尿沉渣分析仪	170
8.3.1 流式细胞术尿沉渣分析仪原理	171
8.3.2 流式细胞术尿沉渣分析仪的结构	171
8.4 其他光散射技术的应用	172
8.4.1 蒸发光散射检测器	172
8.4.2 拉曼散射及其应用	173
参考文献	175

第 1 章 光散射理论及其应用技术概论

一束光通过介质时,其中一部分光偏离主要传播方向的现象称为光散射^[1]。光散射是自然界中非常普遍的物理现象。从本质上来看,散射现象是由于入射电磁波与介质中的粒子相互作用而产生的^[2],介质中的带电粒子在外来电场的作用下受迫振动,从而产生振荡的偶极矩。该偶极矩向各方向发射电磁波,即散射波。散射波携带着有关介质的信息。因此,随着科学技术的发展,光散射理论在各种检测、监控、评价、探索等科学研究和技术开发应用方面,越来越得到重视。例如,各种工业加工过程中与微粒尺寸分布检测相关的质量监控研究与应用,大气科学中悬浮粒子、雨滴、冰晶的检测,生命科学与医学应用中的细胞特征检测和识别,化学与化学工程中的反应状态特征量检测,流体力学中的流场分析,环境检测与监控,军事应用中的跟踪与隐身技术等。此外,在照明、显示、新能源和功能材料等各个新兴科学技术发展领域,光散射技术都有着极其重要的应用价值和发展前景。

1.1 光散射理论的发展简史

1869 年, Tyndall 发现悬浮于气体中的非常细小颗粒在白光照射下产生光散射现象。1871 年, Rayleigh 详细研究了 Tyndall 现象后提出了著名的 Rayleigh 散射。1890 年和 1908 年, Lorenz 和 Mie 分别利用麦克斯韦方程,通过求解各向同性的均匀球形粒子对平面电磁波的散射而提出了 L-M 理论^[3,4]。1909 年,德拜(Debye)用质点模型详细计算了电磁波的散射^[5],形成了经典的 Mie 散射理论,此理论适用于任何大小的球形粒子,并同时指出了 Rayleigh 散射的适用范围(Rayleigh 散射最初是针对处理一些独立的光学均匀的微粒,即相互距离较远的一些光学各向同性的比入射光波长要小的微粒)。1922 年和 1928 年,布里渊(Brillouin)和拉曼(Raman)把光散射理论从弹性光散射扩展到了非弹性光散射范围,使得人们对光与物质相互作用的认识得到了又一次突破^[6]。1944 年,Debye 将 Rayleigh 散射扩展到高分子溶液中去,从而使光散射技术得到了很快的发展^[7]。继后,范德胡斯特(Van de Hulst)^[8]给出了由吸收和非吸收物质构成的球状粒子的详细计算。1951 年,亚丁(Aden)和科克(Kerker)^[9]研究了涂层球粒子的散射,并进行了详细的讨论。1969 年, Kerker^[10]进一步研究了多层球电磁散射,获得了计算电磁散射系数的矩阵公式。1979 年,戴维斯(Davis)^[11]提出了高斯波束的平面波角谱

展开形式,为研究粒子波束散射提供了一条途径。1981年和1983年,图恩(Toon)^[12]和波登(Bohren)^[13]等分别建立了计算大尺寸球形粒子散射的一种数值方法。1988年,格斯百特(Gouesbet)、格瑞汉(Grehan)^[14,15]等根据Davis提出的高斯波束的一阶近似,利用勃朗姆威奇(Bromwich)公式深入研究了均匀球粒子对高斯波束的远区散射,提出了广义洛伦兹-米理论^[16](generalized Lorenz-Mie theory, GLMT),给出了一种计算轴向球形粒子对高斯波束散射的级数方法以及计算波束因子的三种计算方法。我国自1932年郑华织博士从事拉曼光谱研究开始,后有吴大燏、沈寿春等从事光散射方面的研究,并且取得了很多研究成果。如今,由于光散射研究的重要价值,我国有许多学者从事该理论和应用技术的开发研究。

1.2 光散射理论的主要分类

1.2.1 弹性光散射

在散射中,相对于入射光频率其散射频率没有变化的称为弹性光散射(elastic light scattering),也就是通常所说的Rayleigh散射。在均匀介质中掺入一些大小为波长数量级且杂乱分布的颗粒物质,它们的折射率与周围均匀介质的折射率不同,如胶体溶液、悬乳液、乳状物等,原来均匀介质的光学均匀性遭到破坏,次波干涉的均匀性也受到破坏。这种含有不均匀、无规则分布的颗粒物质的介质引起了光的散射,称为Tyndall散射^[17],属于弹性光散射。表述弹性光散射的主要理论有Mie散射理论(只有当球形粒子的半径 $a < 0.3\lambda/2\pi$ 时, Rayleigh的散射规律才是准确的; a 较大时,散射光强与波长的关系就不十分明显了, Mie理论讨论了均匀介质球的光散射),基于各种不同条件下有许多近似散射理论,如Rayleigh散射理论(特定方向上的散射光强度与波长 λ 的四次方成反比)、Van de Hulst散射理论、Debye散射理论和衍射散射理论等。本书将主要介绍弹性散射理论及其在生物细胞特征检测中的应用技术。

1.2.2 非弹性光散射

散射光中除了存在与入射光相同波长(或频率)的成分外,还存在其他波长(或频率)的散射,这种散射称为非弹性光散射。表述非弹性光散射的主要理论是拉曼散射理论。1928年,印度物理学家拉曼在气体和液体中观察到散射光频率发生改变的现象。拉曼散射遵守如下规律:散射光中在每条原始入射谱线(频率为 ν_0)两侧对称地伴有频率为 $\nu_0 + \nu_i$ ($i=1, 2, 3, \dots$)的谱线,长波一侧的谱线称为红伴线或斯托克斯线,短波一侧的谱线称为紫伴线或反斯托克斯线;频率差 ν_i 与入射光频率 ν_0 无关,由散射物质的性质决定,每种散射物质都有自己特定的频率差,其

中有些与介质的红外吸收频率相一致。拉曼散射的强度比 Rayleigh 散射(可见光的散射)要弱得多。拉曼散射的完善解释需用量子力学理论,不仅可解释散射光的频率差,还可解决强度和偏振等一类问题。布里渊散射也属于拉曼散射,即光在介质中受到各种元激发的非弹性散射,其频率变化表征了元激发的能量。与拉曼散射不同的是,在布里渊散射中是研究能量较小的元激发,如声学声子和磁振子等。此外,还有描述 α 粒子与介质作用的汤姆孙(Thompson)散射理论及描述 X 射线与石墨作用的康普顿(Compton)散射理论。这些理论都属于非弹性散射研究的范畴^[6]。

1.2.3 关于光散射的几个主要概念

1. 分子散射

有些介质表面看来均匀纯净,但在介质内部由于密度的起伏,介质中存在着局部密度和平均密度之间统计性的偏离,从而破坏了其光学均匀性,也会引起光的散射,如大气散射,这种散射称为分子散射。当物质处在气、液二相的临界点时,密度涨落很大,光波照射其上就会产生强烈的分子散射,这种散射光称为临界乳光。

2. 不相关散射

不相关散射是指分散在均匀介质中的微小颗粒(或称散射体)所产生的散射。当颗粒之间的距离足够大,以至于一个颗粒的散射不会因为其他颗粒的存在而受到影响。在这种情况下,可以不管其他颗粒的存在而研究一个颗粒的散射行为,称为不相关散射。严格说来,同一入射光中,由不同颗粒散射在同一方向上的散射光具有一定的位相关系,是相干的。但由于小颗粒的极其微小的位移或散射角度极微小的变化会改变其位相差,因此大量无规则杂乱分布的小颗粒散射的净效应可以认为是各个颗粒散射光强的相加而不管其位相关系,犹如不同颗粒的散射光是不相干的;反之,当散射体相距很近时,就必须考虑散射体之间的相互影响。这种散射称为相关散射。相关散射的数学处理比不相关散射复杂得多。

Kerker 指出,颗粒间距离大于颗粒直径的 3 倍是保证不相关散射的条件^[10]。为了保证不相关散射,介质中的颗粒浓度应不大于表 1.1 给出的数值。由表 1.1 可以看出,工程中所遇到的大多数实际问题都可作为不相关散射来处理。例如,即使是非常浓的雾,它由直径约为 1mm 的水滴组成,在 1cm^3 中大约存在一个水滴,这时颗粒之间的距离大约是直径的 10 倍,满足不相关散射的条件。许多溶胶液体都有类似情况。

表 1.1 满足不相关散射的颗粒粒径和浓度对应表

颗粒直径/ μm	0.1	1.0	10.0	100.0	1000.0
颗粒数浓度/ cm^{-3}	10^{13}	10^{10}	10^7	10^4	10
颗粒体积浓度 C_V	—	—	$<0.524\%$	—	—

3. 单散射

单散射指每一个散射颗粒都暴露于原始入射光线中,仅对原始的入射光进行的散射。反之,有部分颗粒并不暴露于原始光线中,它们对其他颗粒的散射光再次进行散射,即原始入射光线通过介质时产生多次散射,如果这种作用比较强,则称这种散射为复散射。

对于不相关的单散射,由 N 个相同颗粒作为散射中心的集合体的散射强度是单个颗粒散射强度的 N 倍,数学处理十分简单。但对于复散射,散射光强与散射颗粒数的简单正比关系不复存在,目前数学上处理这类问题仍然很困难。可以利用介质的光学厚度 T 作为判别是否满足单散射的依据^[18]。实验指出,当光学厚度 $T < 0.1$ 时,单散射占绝对优势,复散射的影响可略去不计;当光学厚度 $T > 0.3$ 时,复散射起主导作用;当 $0.1 < T < 0.3$ 时,可以按单散射处理,但需作适当修正。因此,为了保证试验或测量在不相关的单散射条件下进行,应对介质中散射体的浓度和光线通过介质的光学厚度加以控制。

1.3 光散射理论的主要应用

光的散射现象在各个科学技术领域中都有广泛应用。通过散射光的测量可以了解到散射颗粒的浓度、大小、形状及取向等,在物理、化学、气象等许多方面的研究中得到应用。散射光谱又可用于确定物质分子与原子的特性。

近年来,随着新器件的快速发展(如激光器、光敏传感器等),光散射的理论与技术得到了快速的发展,出现了许多重要的光散射技术(如弹性光散射技术、动态光散射技术、拉曼散射技术以及 X 射线和中子的小角散射技术等),被广泛应用于物理化学、高分子化学、胶体科学和生命科学的研究,并在研究生物分子性质及自聚集行为、表征聚合体微粒的形成与粒径分布、探究表面/界面结构等方面发挥了十分重要的作用。在此主要介绍弹性光散射的应用。

1.3.1 散射技术在细胞分类计数中的应用

现代生命科学正一日千里地向前发展,其中细胞生物学是发展最为迅速的一门分支学科,也是当前生命科学中的四大前沿学科之一。作为生命基本结构单位和功能单位的细胞,其形态是千姿百态的,大小也极不一致,但这些不同都是与其

功能相适应的。对细胞大小分布和形体特征的认识几乎受到生命科学每个领域的关注,特别是在临床医学应用方面,许多疾病的辅助诊断、疗效观察、预后判断都依赖于对细胞形态特征的识别;而比较传统的利用细胞计数板在显微镜下用人工的方法进行细胞的计数、分类、染色和辨形等,工作量巨大,易使操作者疲劳而影响测量结果的精度。随着先进的激光技术、半导体技术、光电技术、微电子技术、光纤技术和计算机技术的迅速发展和应用,综合光、机、电、计算机于一体的激光散射测量技术,以其快速、简便、无破坏性、精确、重复性好等优点,在医学细胞自动检验领域中取得了巨大的发展和广泛的应用。其中最为典型的应用就是流式细胞仪技术。

由于任何一个单散射物体(它的再次散射可以忽略不计)被光照射后产生的散射光形式代表了这个物体独特的物理描述,因此流式系统中细胞的散射光可用来分辨非均匀细胞群中的不同细胞。被细胞散射的全部散射光以及散射光的角度分布不仅跟细胞的大小有关,而且跟细胞的折射率有关。同时,细胞的非对称性和生存性也影响散射光。研究表明^[19]:在散射角(散射方向与入射方向的夹角)小于 90° 范围内,散射光强分布(相对于散射角)的极大值和极小值主要和细胞的大小有关;而在更大散射角范围内,其对应值主要与细胞内部的介电结构有关。因此,不仅可以用激光散射技术来确定细胞的大小,还可以按细胞形态、内部成分对细胞进行分类计数,并可识别细胞的非对称性以及它在流式系统中的取向情况,从而将活细胞从死细胞中区分出来。细胞的散射形式在 $0^\circ\sim 180^\circ$ 有许多极大值和极小值,故许多技术采用了多种不同方法从散射光信号中获得丰富的信息^[20-23]。

流式细胞仪的发展经历了70多年。1930年,卡斯珀森(Casperrsson)和托雷尔(Thorell)开始了细胞的计数研究;1934年,摩登文(Moldaven)用光电仪记录流过一根毛细管的细胞数量,成为世界上最早设想使细胞检测自动化的人;1936年,Casperrsson等将显微光度术引入细胞检测技术中;1940年,昆氏(Coons)提出用结合荧光素的抗体去标记细胞内特定蛋白的方法;1947年,顾克尔(Guclcer)运用层流和湍流原理研制成功了微粒计数器;1949年,库尔特(Coulter)提出悬液计数粒子的方法;1950年,Casperrsson利用显微分光光度计采用紫外(UV)和可见光检测细胞;1953年,克如斯兰德(Crosland)与泰勒(Taylor)提出了分层鞘流自动计数红细胞的技术;1953年,派克(Parker)和赫其恩(Hutcheon)设计了一种全血细胞计数装置,形成了流式细胞仪的雏形;1954年,伯尼(Beirne)和Hutcheon发明光电粒子计数器;1959年,Coulter计数器设计成功;1965年,卡门斯凯(Kamemtsky)等提出了用分光光度计对细胞进行分类的技术;1967年,Kamemtsky和Melamed在Moldaven的方法基础上提出细胞分选的方法;1969年,蒂拉(Van Dilla)、福劳乐(Fulwyler)等发明第一台荧光检测细胞计;1972年,赫增伯格(Herzenberg)对细胞分选器改进成功。如今,随着光电技术的进一步发展,流式细胞仪已开始向模块化、生物芯片微型化方向发展,流式细胞技术日臻完善,成为分

析细胞学领域中无可替代的重要工具。目前,关于流式细胞仪已出版的期刊文章超过 40 000 篇。

1.3.2 光散射技术在尿沉渣检测中的应用

近年来,由于新技术的不断应用,尿沉渣检测技术又步入了日新月异的自动化新时代。1988 年,美国国际遥控成像系统有限公司研制成功了世界第一台高速摄像式的尿沉渣分析仪。1990 年,日本东亚医疗电子有限公司与美国国际遥控成像系统有限公司合作,将原系统改进为图像流式细胞术的尿沉渣分析仪。在此基础上,日本东亚医疗电子有限公司于 1995 年研制出了新一代的 UF-100 型全自动尿沉渣分析仪。1996 年,德国宝灵曼公司推出图像式尿沉渣自动分析仪。1997 年,美国戴西斯公司推出流动池式尿沉渣定量分析工作站,并于 1999 年引入中国。

2001 年,美国太平洋公司推出 MUD1000 自动染色尿沉渣分析工作站,采用国际先进的自动显微平台技术,使尿沉渣镜检的标准化、自动化达到了一个新的水平。2003 年,美国国际遥控成像系统有限公司又推出了一款名为 IQ200 的尿沉渣分析仪,采用了基于神经网络的自动粒子识别软件,能够自动识别尿沉渣各种有形成分,并可进行定位和分析,提高了临床诊断质量和准确度。

基于流式细胞和电阻抗分析的原理,尿液中细胞经菲啶与羰化氰染料染色后,在鞘液的作用下,形成单个、纵列细胞流,快速通过氩激光检测区;仪器检测荧光、散射光和电阻抗的变化,当仪器在捕获了荧光强度(fluorescent light intensity)、前向荧光脉冲宽度(FLW)、前向散射光强度(FSC)、前向散射光脉冲强度(FSCW)和电阻抗信号后,经综合识别和计算得到相应细胞的大小、长度、体积和染色质长度等资料,并作出红细胞、白细胞、细菌和管型等的散射图及定量报告。相关参数作用如下所示。①荧光强度(FL):指从染色尿液细胞发出的荧光,主要反映细胞染色质的强度。②前向荧光脉冲宽度(FLW):主要反映细胞染色质的长度。③前向散射光强度(FSC):主要反映细胞大小。④前向散射光脉冲宽度(FSCW):主要反映细胞长度。⑤电阻抗大小:主要反映细胞体积。该方法优点:是近年来发展的不需离心的新方法,使用简单、快速,重复性好;识别细菌、真菌能力强;除计算红细胞、白细胞数量外,还能给出红细胞均一性和非均一性的百分比^[18]等实用的参数,对泌尿系统疾病的诊断、鉴别诊断和疗效观察具有重要临床应用价值;对鉴别血尿来源(肾小球、肾小管及下泌尿道)有参考价值;避免尿沉渣镜检的主观影响^[24]。

1.3.3 光散射技术在粒子计数中的应用

随着全球经济和科学技术的迅速发展,在众多生产加工和科学研究领域中都会遇到对颗粒物特征分布进行检测的需求。这些颗粒物质的粒度和粒度分布参数在这些领域中具有重要意义。例如,大气监测、环境检测、冶金工业、医学制药

业、燃料喷射与燃烧效率的评定、集成电路加工和涂料、染料、黏合剂等材料加工业以及国防和空间科学等,无不要求对粒子的粒度和粒度分布参数进行准确的测量和研究。

传统的测量方法主要是接触法,有筛分法、电阻法、称重法和显微法等。这些方法测量速度慢,使用环境要求高,不能用于实时在线的测量,且测量动态范围小。非接触的方法主要有照相法、干涉法和光散射法。其中,照相法存在与接触法相同的弱点;干涉法和光散射法因具有测量动态范围大、速度快、能进行实时在线测量等优点,而受到越来越广泛地应用,并且作为近代测量新技术的起点拉开了高新技术竞争战争。其中,光学尘埃粒子计数器就是光散射理论的一个典型的应用。

光学尘埃粒子计数器是洁净技术环境检测的必备仪器,也是粒子检测应用中一个最为重要的高科技产品,其检测原理主要依据照明光束中尘埃粒子的散射光强来判断粒径的大小。关于光被悬浮微粒散射的科学理论的研究,始于19世纪后期,并由 Rayleigh 和 Tyndall 完成理论与实验研究工作。20世纪初, Mie 提出被测粒径与入射光波长相同数量级范围的散射理论。因此,光散射理论为尘埃粒子计数技术提供了理论基础。早期光学尘埃粒子计数器是以白光作为光源,存在明显的缺点。20世纪60年代以来,激光的出现,为光学尘埃粒子计数器提供了大功率、高亮度和稳定性好的照明光源。由于激光光束强度高,在光敏区中产生的照度远大于白光,且其谱线单一,光束规则,易获得较高的信噪比,从而大大提高了尘埃粒子计数器的灵敏度。激光的出现对光学尘埃粒子计数技术起到极大的推动作用,使得目前单分散尘埃粒子计数检测技术的灵敏度从 $0.3\mu\text{m}$ 提高到 $0.001\mu\text{m}$,同时其光电传感器信噪比也提高了4~5个数量级^[25]。

光学尘埃粒子计数器(OPC)的产生始于20世纪50年代末,至今仅有50多年的历史。其技术可追溯到第二次世界大战末期,当时德国为了提高“V-2”飞弹的命中率,在加工安装导航陀螺仪时,首先采用了密封洁净环境,而洁净环境的检测,必须进行尘埃粒子计数检测。目前,国际先进水平的光学尘埃粒子计数领域的公司有美国 Met One 公司、Royco 公司和 Pms 公司等。它们的尘埃粒子计数器具有采样流量高(已达 $28.3\text{L}/\text{min}$)、计数效率高($0.1\mu\text{m}$ 粒子的计数效率可达100%)、检测灵敏度高(可达纳米量级)、整个过程的测试时间已缩短为1min(如 BI-90 快亚微米粒子粒度仪^[26])等优点。同时,检测的对象不仅是空气成分,也用于液体的检测,且已实现对单分散散射光场的二维分布的测定以及对亚微米粒子的几何结构的直接测定^[26]。经过近百年的理论研究发展,伴随数学理论的发展和激光器件、计算机、功能材料、光电传感器等各种新器件、新产品的进步,相应的新模型、新算法、新原理、新技术和新方法层出不穷,粒子计数科学技术已经深深地影响着产业、技术和科学的发展。

1.3.4 细胞分类识别的其他光散射应用技术

1. 多角度散射法

在光散射检测法中,为了从散射光中得出更多有关细胞的信息,许多学者采用了多角度散射法。萨尔兹曼(Salzman)等在两个角度探测散射光^[27,28];后又采用一个多环同心圆环光电探测器探测与激光光轴成 $0^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 范围内32个散射角处的光强来得到每个细胞的散射形式,然后将每个细胞的散射形式都放在同一坐标系中,得到散射图。使用一个数学集聚算法(mathematical clustering algorithm)来确定细胞可分为几类,同时采用一个线性分离算法(linear separation algorithm)来决定散射图上每类细胞之间的分界线,从而把细胞分为几类^[29]。这种方法的缺点是算法比较复杂。

2. 散射强度曲线法

一定波长的激光光束照射悬浮液中的颗粒或细胞,在全部散射角(或一定散射角)范围内测量散射光强的角度分布,将 Mie 理论的散射图形与之进行比较来确定颗粒或细胞的大小和折射率。在比较中,一些极大和极小值角度的位置尤其有助于颗粒(或细胞)大小和折射率的确定。凯伊(Kaye)等^[30]让单个细胞流过激光照射区,记录 $0^{\circ}\sim 180^{\circ}$ 内多个散射角度上(角度分辨率为 1.5°)的散射光强分布,通过寻找极小光强角度位置并与计算机中存储的理论值相比较而得到该细胞的大小和折射率,进而根据多个细胞的大小和折射率对此细胞群分类和计数。

3. 两角度强度比值法

用激光照射散射体,同时测出两个不同散射角 θ_1 和 θ_2 处的光强分别为 $I_1(\theta_1, \alpha, m)$ 和 $I_2(\theta_2, \alpha, m)$ 。定义一比率函数

$$R(\theta_1, \theta_2, \alpha, m) = k \cdot I_1(\theta_1, \alpha, m) / I_2(\theta_2, \alpha, m)$$

其中, α 是尺寸参数(粒子周长/光在介质中的波长), m 是粒子的相对折射率, k 是一个规一化常数。通过与理论计算的 $R(\theta_1, \theta_2, \alpha, m) \sim d$ (d 是粒子的直径)关系曲线相比而得出粒子的直径和折射率,或直接对 $R(\theta_1, \theta_2, \alpha, m)$ 进行频谱分析得出颗粒群的分布。

4. 多向散射法

通过同时测量前向散射(forward scatter, FS)、后向散射(backscatter, BS)或侧向散射(sidescatter, SS)的方法对细胞进行分类计数。Salzman等^[27]在1975年,通过同时测量FS和SS成功地分辨出人体周围血液中的淋巴细胞、单核细胞