

文章编号: 1672-9897(2008)01-0084-05

SPT 方法在纳米粒子布朗运动观测中的应用

王绪伟, 李战华

(中国科学院力学研究所非线性力学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要: 纳米粒子布朗运动特性对 Micro-/Nano-PIV 的使用和与粒子相关的物理现象的研究有重要意义。观测了 200nm 荧光粒子的布朗运动, 利用单粒子追踪 (SPT) 算法和自编程序处理图像, 获得粒子的均方位移, 计算了实验扩散系数 D_{exp} 为 $2.09 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 。与 Stokes-Einstein 公式估计的理论扩散系数 D_{th} 相比, 二者量阶一致, 但实验扩散系数的数值偏小约 5%。对相关的实验误差进行了分析。

关键词: 布朗运动; 单粒子追踪法; 纳米粒子; 扩散系数

中图分类号: TP39.1; O353.5 **文献标识码:** A

Brownian motion measurement of nano particles with the SPT method

WANG Xu-wei, LI Zhan-hua

(LNM, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The Brownian motion of nano tracer has important effects on the measurement accuracy of Micro-/Nano-PIV and evaluating many other parameters of the liquids. In this paper, the author tracked the trajectories of 200nm particles. Using the single particle tracking (SPT) algorithm, an in-house image processing program was compiled, with which the image series were processed. The experiment got a diffusion coefficient D_{exp} of about $2.09 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Compared with the theoretical value D_{th} estimated with the Stokes-Einstein equation, D_{exp} is of the same order of magnitude as D_{th} , the deviation is about 5%. Related error analysis on several possible causes was given in this paper.

Key words: Brownian motion; single particle tracking; nano particle; diffusion coefficient

0 引言

通过对粒子(或分子)布朗运动的观测可以确定某些物理参量或揭示界面现象^[1-3], 因此粒子布朗运动的测量一直引人关注。粒子布朗运动的测量方法很多^[4]。常见的方法可以归纳为两类: 单粒子追踪法 (SPT)^[5-6] 和固定聚焦体积法(如光子相关光谱)^[7]。前者使用不同波长的激光和显微技术记录粒子运动序列, 然后利用粒子运动轨迹计算扩散系数; 后者检测聚焦体积内粒子光强的脉动, 通过信号相关运算得到脉动信号的二阶自相关函数获得粒子扩散信息。因此后者适用于聚焦光斑体积很小或溶液浓度极稀, 检测区内只有 1~2 个粒子的情况。由于单粒子追踪法测量原理简单、测量浓度范围比较广、能够提取布朗运动在不同维度的信息, 所以得到广泛应用。笔者拟采用此方法。

SPT 方法的理论基础是粒子扩散系数和粒子均方位移之间的关系^[8]:

$$\overline{x^2} = 2D\Delta t \quad (1)$$

其中 D 为粒子扩散系数, Δt 为观测时间间隔, $\overline{x^2}$ 为粒子在 Δt 时间内的位移量。对于二维或三维的情况, 则(1)式右端要分别乘以 2 或 3。进一步爱因斯坦根据球形粒子的 Stokes 阻力公式推导了计算扩散系数的 Stokes-Einstein 公式^[8]:

$$D = \frac{kT}{3\pi\mu\phi} \quad (2)$$

其中 k 为波尔兹曼常数, T 为绝对温度, μ 为流体(含粒子)的动力粘度, ϕ 为粒子直径。当粒子浓度小于 5% 时, 粒子浓度引起的粘性变化可以忽略, μ 可以直接使用纯流体的粘度系数。

近几年, 利用 SPT 方法的研究很多。Nakroshis (2003) 等人通过观测 1.02 μm 聚苯乙烯粒子布朗运动

收稿日期: 2007-07-11; 修订日期: 2007-11-05

基金项目: 国家自然科学基金(10672172); 国家 863 项目(2007AA04Z302)

作者简介: 王绪伟(1984-), 男, 甘肃会宁人, 博士生。研究方向: 微尺度流动。E-mail: wangxw @ lum.imech.ac.cn

计算了 Boltzmann 常数^[9],通过对 107 个粒子的跟踪统计,测量得到的 Boltzmann 常数为 $1.415(\pm 0.04) \times 10^{-23} \text{J/K}$; Loudet(2004)借助对 $1\mu\text{m}$ 粒子布朗运动的测量得到了非各向同性介质中的球形粒子的 Stokes 阻力^[10]; Park(2005)等人实验测量了 500nm 粒子布朗运动与温度之间的关系^[2],实验中 2D 布朗运动测量的精度为 4.26%。但以上研究主要集中在粒子直径在 500nm 以上的范围,随着微米尺度流场观测的开展,直径更小的纳米荧光粒子被广泛地使用^[11]。粒径的减小,粒子的光强变弱,对成像提高了要求,而且小粒径粒子的布朗运动更剧烈,加上实验观测时景深的限制,对实验测量纳米粒子的布朗运动增加了难度。笔者观测了粒径为 200nm 荧光粒子的布朗运动,然后利用 SPT 方法编制图像处理软件,计算实验扩散系数并与理论扩散系数进行比较,最后分析了实验误差。

1 实验装置与方法

实验在力学所 LNM 室进行,观测采用 Olympus IX71 倒置荧光显微镜,配有数值孔径 $\text{NA} = 1.35$ 的 100 倍物镜。图像采集使用 Andor 885 EMCCD,像素为 501×502 。实验用荧光粒子为直径 200nm 的 Polystyrene 微球(Duke Scientific),粒径的误差小于 $\pm 5\%$,粒径分布的标准偏差 $< 10\%$ 。在超纯水中稀释至体积分数约为 10^{-5} 。实验环境相对湿度为 80% ,环境温度在 $20 \sim 24^\circ\text{C}$,相应水的动力粘性系数为 $0.9 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-3} \text{Pa}\cdot\text{s}$ 。

实验时,将约 $5\mu\text{L}$ 含纳米荧光粒子的溶液滴到盖玻片上,使用波长 $520 \sim 550\text{nm}$ 的入射光激发荧光粒子发光(发射波长为 615nm),然后通过 CCD 直接记录液滴中荧光粒子的布朗运动。连续两帧的时间间隔 Δt 取 $30 \sim 100\text{ms}$ 的 8 组不同值,其中包括图像曝光时间(约 5ms)和将图像向计算机传输的时间。每一时间间隔 Δt 下连续拍摄 $50 \sim 100$ 帧图片,重复进行 3 组实验。追踪图像中粒子的运动轨迹并统计粒子的方均位移,采用公式(1)可以曲线拟合得到实验扩散系数。

2 图像处理方法

采用 SPT 方法对布朗运动粒子的追踪和测量,需要 4 个环节:图像滤波、粒子识别、粒子匹配、扩散系数计算。

(1) 图像滤波

此步骤是对图像进行预处理,主要目的是滤除灰度图像中的背景噪声信号并增强光斑信号。采用的办法是对图像的灰度矩阵 A 作一个卷积运算 $A'(n, m) = \sum_{i=-\omega}^{\omega} \sum_{j=-\omega}^{\omega} A(i, j) K(i-n, j-m)$ 。卷积核 K 是一个大小为 $(2\omega + 1) \times (2\omega + 1)$ 的矩阵,第 i 行 j 列的元素大小为^[6]

$$K(i, j) = \frac{1}{K_0} \left[\frac{1}{B} \exp\left(-\frac{i^2 + j^2}{4\lambda_n^2}\right) - \frac{1}{(2\omega + 1)^2} \right] \quad (3)$$

其中归一化常数 $K_0 = \frac{1}{B} \left[\sum_{i=-\omega}^{\omega} \exp\left(-\frac{i^2}{2\lambda_n^2}\right) \right]^2 - \frac{B}{(2\omega + 1)^2}$ 和 $B = \left[\sum_{i=-\omega}^{\omega} \exp\left(-\frac{i^2}{4\lambda_n^2}\right) \right]^2$ 。 λ_n 是信号的相关因子,对于随机噪声, $\lambda_n \approx 1$ 。式(3)大括号中第一项用来增强具有高斯强度分布特性的光斑信号,第二项用于滤除背景中的随机噪声。参数 ω 的值一般取大于粒子光斑直径的像素值,小于两个粒子间距离(像素值)的一半。本实验中,粒子直径为 $6 \sim 8$ 像素, $\omega = 10 \sim 12$ 像素即可实现图像有效滤波。

(2) 粒子识别

滤波后图像具有较好的对比度,选择一个合适的灰度阈值将较亮的光斑信号和较暗的背景噪声分离,光斑图像灰度最大值的位置即为该粒子的空间位置。寻找粒子灰度最大值的办法很多,这里对二值化图像使用连通性检查识别粒子。为了保证识别的粒子为物理粒子,对粒子光斑形状(长和宽)进行筛选,滤除聚合粒子团和粒子衍射光晕等假粒子。这一方法比其它算法更易于理解,却能同样有效地检测光斑位置。得到光斑位置之后可以通过重定位,将光斑位置的精度提高到亚像素水平,通常使用的是光斑的质心^[6]

$$\begin{cases} x_p = \frac{1}{m_0} \sum_{i^2 + j^2 \leq \omega^2} [i \times A(x + i, y + j)] \\ y_p = \frac{1}{m_0} \sum_{i^2 + j^2 \leq \omega^2} [j \times A(x + i, y + j)] \end{cases} \quad (4)$$

其中 $m_0 = \sum_{i^2 + j^2 \leq \omega^2} A(x + i, y + j)$, $A(x, y)$ 为光斑图像灰度。我们采用更精确的办法,假定光斑符合高斯分布特性,

$$A = A_0 \exp\left[-\frac{(x - x_p)^2 + (y - y_p)^2}{4\sigma^2}\right] \quad (5)$$

拟合得到光斑位置 (x_p, y_p) 。这里 ω 可以取与滤波模板相同或更小的值。

(3) 粒子匹配与轨迹

对 t 时刻图像中的每个光斑,寻找它们在 $t + \Delta t$ 时刻图像中相应的光斑位置(匹配),对所有帧图像重复这一过程获得该粒子的轨迹。这是单粒子追踪方法最关键的环节。最简单的匹配方法是最小位移法,即认为 $t + \Delta t$ 时刻图像中与待匹配光斑最近邻的光斑为最佳匹配。这一方法适用于粒子浓度较稀,而且时间间隔 Δt 较短的场合。第二种方法假定单个粒子在一定时间 Δt 内的位移量 δ 服从概率^[6]

$$P(\delta | \Delta t) = \frac{1}{4\pi D\Delta t} \exp\left(-\frac{\delta^2}{4D\Delta t}\right) \quad (6)$$

那么,最佳的粒子匹配使得在 Δt 内 N 个粒子的位移 $\{\delta_i\}, i=1, \dots, N$ 的概率

$$P(\{\delta_i\} | \Delta t) = \left(\frac{1}{4\pi D\Delta t}\right)^N \exp\left(-\sum_{i=1}^N \frac{\delta_i^2}{4D\Delta t}\right) \quad (7)$$

为最大。这种方法适用于粒子浓度较大的情况。实验使用的浓度很低,使用最小位移方法,即可满足要求。参考区域大小与两帧之间的时间间隔 Δt 有关,为粒子最大可能位移的两倍,实验中最大参考区域取到 30 个像素。

I. F. Sbalzarini (2005)^[5]提出了另一种算法,不仅考虑了待匹配粒子之间的距离关系,而且参考了粒子光斑的强度和形状,综合利用这 3 个因素建立一个代价函数可以得到更合理的结果。如果代价函数中不考虑光强和光斑形状等因素,该方法即退化为上述方法一:最近邻方法。

(4) 均方位移的计算

根据式(1),为了获得扩散系数,首先要计算粒子均方位移。粒子均方位移 $\overline{x^2}$ 计算公式,

$$\overline{x^2(\Delta t)} = \frac{\sum_k x_{ik}^2(\Delta t)}{\sum_k n_k} \quad (8)$$

x_{ik} 为在 k 时刻,第 i 个粒子在时间间隔 Δt 内的位移, n_k 为 k 时刻参与统计的粒子数。这样对不同时间间隔的图像序列执行上述操作,就可以得到 $\overline{x^2}$ 随 Δt 变化的数据,进而拟合出扩散系数 D_{exp} 。NanoSight 公司使用这一方法时,只对同一粒子统计均方位移,即式(8)中不对下标 i 进行求和。这样得到每个粒子对应的扩散系数,进而可以获得粒径分散性。考虑到所追踪的粒子轨迹长短不同,在实验数据处理时只统计每个粒子轨迹的前 6 个位移量 $x_{ik} (k=1 \sim 6)$,剩余的轨迹被忽略。对每个时间间隔 Δt ,参与统计的粒子总数为 100 ~ 1000 个。

3 实验结果与误差分析

3.1 实验结果

使用第 2 节给出的方法进行实验,然后根据第 3 节给出的图像处理方法得到 200nm 粒子的扩散系数。图 1 显示了重合在一起的相邻两帧图像,其中圆圈标出了第一张图像中的粒子,三角形为第二张图像上的粒子,未标出的粒子表示没有找到相应的匹配或者没有被识别的粒子。图 2 中的数据点给出了不同时间间隔 Δt (横坐标)条件下,200nm 粒子实验测量的均方位移 $\overline{x^2}$ 。实线为根据实验点进行线性拟合得到的直线。由式(1)可知,该拟合直线的斜率与扩散系数成正比,从而实验扩散系数为: $D_{\text{exp}} = 2.09 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ 。将实验条件 $\phi = 200\text{nm}$, $T \approx 294\text{K}$, $\mu = 0.98 \times 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ 带入式(2),得到理论扩散系数 $D_{\text{th}} = 2.20 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$,可见实验值与理论值量级一致,但数值偏小约 5%。由于该实验使用的荧光粒子粒径误差为 $\pm 5\%$,所以这一偏差应在合理的范围内。为了更全面地解释实验结果,下一节对实验误差进行了分析。



图 1 200nm 粒子图像
Fig.1 Photo of 200nm particles

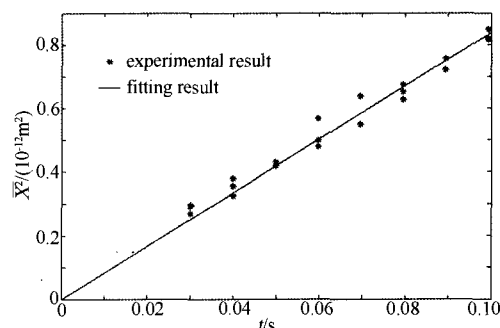


图 2 均方位移与时间间隔 Δt
Fig.2 The relationship between the mean square displacement and interval time Δt

3.2 误差分析

3.2.1 曝光时间

假设时间间隔 Δt_{exp} 由:曝光时间 Δt_p 和传输(含

等待)时间 Δt_i 两部分组成,即 $\Delta t_{exp} = \Delta t_i + \Delta t_p$ 。笔者认为图像中光斑位置对应于粒子在曝光时间 Δt_p 内某一时刻的粒子位置。通常 $\Delta t_p \ll \Delta t_i$,由 Δt_p 内粒子位置的不确定性带来的误差可以忽略。由于纳米粒子的亮度比较低且布朗运动剧烈,实验中 Δt_p 要足够长以方便使用 CCD 捕捉粒子,而 Δt_{exp} 却不能太长以避免大量粒子跑出焦平面,所以粒子在 Δt_p 内的位置不确定性也就成了一个影响实验测量的因素。这一误差表现为,在相邻两帧图像上光斑所经历的时间 $\Delta t'_{exp}$ 不严格对应于时间间隔 Δt_{exp} ,而是有一个偏差 δt ,且 $-\Delta t_p/2 < \delta t < \Delta t_p/2$,即

$$\Delta t'_{exp} \approx \Delta t_{exp} + \delta t$$

定义 $\epsilon = \frac{\delta t}{\Delta t_{exp}}$,修正的扩散系数实验测量值为

$$D'_{exp} = \frac{1}{2} \frac{\overline{x^2}}{\Delta t'_{exp}} = \frac{1}{2} \frac{\overline{x^2}}{\Delta t_{exp} + \delta t} = \frac{1}{2} \frac{\overline{x^2}}{\Delta t_{exp}} \times \frac{1}{1 + \epsilon} \approx D_{exp} \times (1 - \epsilon + \epsilon^2 + \dots) \quad (9)$$

根据 δt 的统计分析,式(9)右端括号内奇次幂的项为零, D'_{exp} 对 D_{exp} 作用了 ϵ^2 项的修正。由于 δt 与曝光时间 Δt_p 有关,当曝光时间 $\Delta t_p \ll \Delta t_{exp}$ 即 $\delta t \ll \Delta t_{exp}$ 时 $\epsilon \rightarrow 0$, $D'_{exp} \approx D_{exp}$;当 Δt_p 较大时, ϵ 不趋于 0,上式右端要对 D_{exp} 进行修正。假设 δt 在定义域内服从均匀分布,对于 200nm 粒子的实验测量,按照 $\Delta t_p = 5\text{ms}$, $\Delta t_{exp} = 30\text{ms}$,积分式(9)发现, D_{exp} 要比实际值 D'_{exp} 偏小约 0.23%。

3.2.2 温度测量

由于实验使用的温度探头不可能埋入到 5 μL 的实验液体中,所以测量温度和实验液体的温度并不完全相同。液体粘度随温度的变化可以导致布朗运动的测量误差。粘度与温度的关系可以表示为: $\mu = A \times 10^{\frac{B}{T-C}}$,其中 A 、 B 、 C 是物性常数^[2]。对于水介质, A 、 B 、 C 分别为: 2.414×10^{-5} 、247.8、140,代入式(2)

$$D = \frac{kT}{3\pi A\phi} \times 10^{-\frac{B}{T-C}} \quad (10)$$

假设室温为 20 $^{\circ}\text{C}$,当测量温度比实验液体的实际温度偏低 1 $^{\circ}\text{C}$ 就会引起实验扩散系数比理论扩散系数偏小 0.5%。因此待测样品局部的温度测量与控制显得非常重要。

3.2.3 焦平面厚度

显微镜的焦平面厚度是 2 维跟踪产生误差的另

一个重要的影响因素。物理粒子在 3 维空间内运动,而 CCD 在垂直焦平面的 Z 向的观测范围由景深决定。当使用 100X 物镜时,景深 $\Delta Z \approx 2\mu\text{m}$,而在焦平面内的观测范围是 $80\mu\text{m} \times 80\mu\text{m}$ 。这一不对称性导致那些在 Z 方向有较大位移的粒子不能参与统计。如图 3 所示,某粒子在 t_0 时刻的位置为 p ,则在 $t_0 + \Delta t$ 时刻,它的位置可能是 3 维空间的任意位置,如 p' 或者 p'' 。而焦平面之外的 p' 位置的粒子因灰度值较小,在统计过程中易被忽略。因此由于观测空间的不对称性可以引起位移均方值 $\overline{x^2}$ 偏大,使得测量扩散系数偏大。

由上述分析可以看出,实验曝光时间与间隔时间的比引起扩散系数实验测量值的误差与 ϵ 的 2 次方成正比,所以对于更小粒径粒子的布朗运动测量,曝光时间与间隔时间的比是一个重要影响因素。其次,曝光时间和温度都有可能引起实验扩散系数小于理论值,这可能是本实验的部分误差来源。而景深的影响会导致实验扩散系数比理论扩散系数偏大,由此,实验扩散系数小于理论扩散系数的可能原因是曝光时间或温度测量的不准确性。

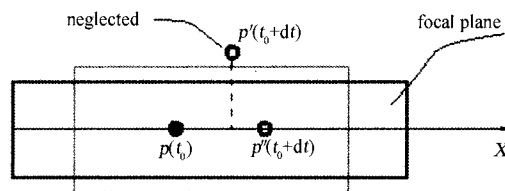


图 3 景深影响示意图
Fig.3 Sketch for the effects of the depth of field on measurement results

4 结论

详细描述了用于粒子布朗运动观测的单粒子追踪法(SPT)的数据处理技术,并使用该方法观测了 200nm 荧光纳米粒子布朗运动,使用粒子的粒径远小于现有同类研究使用的 500nm 粒子。实验得到的扩散系数为 $2.09 \times 10^{-12} \text{m}^2/\text{s}$,而相应的实验条件下的理论扩散系数为 $2.2 \times 10^{-12} \text{m}^2/\text{s}$ 。可见实验测量的扩散系数与理论值量级一致,但数值偏小约 5%。分析了曝光时间、景深、温度测量等因素对实验测量的影响,其中曝光时间与间隔时间之比太大、以及温度测量偏低都会引起实验扩散系数小于理论值。这一误差分析也为进一步开展相关的测量工作和研究与粒子布朗运动相关的其他物理问题积累了经验。

种主、被动边界层控制装置转换起始位置的移动;油流技术用来获取模型表面流线信息;边界层控制装置及模型产生的详细激波系分析用纹影技术来完成。边界层被动调控结果已用于选择 Hyper-X 马赫数 7 飞行器最终采用的边界层调控构型及其高度,并已成功进行了飞行试验。

边界层主动控制研究筛选了 14 种吹气构型,结果显示所有构型对产生转换起始位置移动都是有效的。吹气压力比为 5 时,刚好能确保喷口声速射流条件;为了将转换起始位置移动到边界层控制装置附近,从而提供有效的调控,需要 40 或更高的压力比;锯齿槽构型产生有效的转换移动需要的吹气压力比最小;单排较大孔排列的 H4 构型是圆孔概念中最好的。试验研究结果表明用于高超声速吸气式飞行器的主动边界层控制方法是可行的。

参考文献:

- [1] BERRY S A. Forced boundary layer transition on X-43 (Hyper-X) in NASA LaRC 31-inch Mach 10 air tunnel [R]. NASA/TM-2000-210315.

- [2] BERRY S A. Forced boundary layer transition on X-43 (Hyper-X) in NASA LaRC 20-inch Mach 6 air tunnel [R]. NASA/TM-2000-210316.
- [3] CALLEJA J F. Boundary layer transition experiments on a one-third scale Hyper-X forebody model at Mach 7 and 10 [R]. GASL Technical Report No. 382, 2000.
- [4] RAUSCH V L. Hyper-X: flight validation of hypersonic air-breathing technology [R]. ISABE 97-7024, 1997.
- [5] RAUSCH V L. NASA scramjet flights to breath new life into hypersonics [R]. Aerospace America, 1997, 35(7):40-46.
- [6] McCLINTON C R. Hyper-X wind tunnel program [R]. AIAA 98-0553.
- [7] SCOTT A B. X-33 Hypersonic boundary layer transition [R]. AIAA 99-3560.
- [8] HORVATH T J. X-38 Experimental aerothermodynamics [R]. AIAA 2000-2685.
- [9] BERRY S A. Results of aerothermodynamic and boundary-layer transition testing of 0.0362-scale X-38 vehicle in NASA Langley 20-inch Mach 6 tunnel [R]. AIAA 2000-2685.
- [10] HOLLIS B R. X-33 computational aeroheating predictions and comparisons with experimental data [R]. AIAA 2000-2685.

(上接第 87 页)

参考文献:

- [1] SCHROEDER C M, TEIXEIRA R E, SHAQFEH E S G, et al. Dynamics of DNA in the flow-gradient plane of steady shear flow: Observations and simulations [J]. *Macromolecules*, 2005, 38 (5):1967-1978.
- [2] PARK J S, CHOI C K, KIHM K D. Temperature measurement for a nanoparticle suspension by detecting the Brownian motion using optical serial sectioning microscopy [J]. *Meas. Sci. Technol.*, 2005, 16:1418-1429.
- [3] GITTINGS M R, SAVILLE D A. The determination of hydrodynamic size and zeta potential from electrophoretic mobility and light scattering measurements [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1998, 141:111-117.
- [4] CHRISTIAN HELLRIEGEL, KIRSTEIN J, BRÄUCHLE C. Tracking of single molecules as a powerful method to characterize diffusivity of organic species in mesoporous materials [J]. *New Journal of Physics*, 2005, 23 (7).
- [5] SBALZARINI I F, KOUMOUTSAKOS P. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology

- [J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, 151(2):182-195.
- [6] CROCKER J C, GRIER D G. Methods of digital video microscopy for colloidal studies [J]. *Journal of Colloid and Interface Science* 1996, 179(1):298-310.
- [7] DERTINGER T, PACHECO V, VON DER HOCHT I, et al. Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: A new tool for accurate and absolute diffusion measurements [J]. *Chemphyschem*, 2007, 8(3):433-443.
- [8] EINSTEIN A. *Investigations on the theory of the Brownian Movement* [M]. Dover Publishing INC, 1956.
- [9] PAUL NAKROSHIS, MATTEW AMOROSO, JASON LEGERE, et al. Measuring Boltzmann's constant using video microscopy of Brownian motion [J]. *Am. J. Phys.*, 2003, 71 (6):568-573.
- [10] LOUDET J C. Stokes drag on a sphere in a nematic liquid crystal [J]. *Science*, 2004, 306:1525.
- [11] SATO Y, INABA S, HISHIDA K, et al. Spatially averaged time-resolved particle-tracking velocimetry in microspace considering Brownian motion of submicron fluorescent particles [J]. *Experiments in Fluids*, 2003, 35(2):167-177.