

光纖共焦顯微術之研製

范光照
台灣大學機械系
fan@ntu.edu.tw

陳柏伸
台灣大學機械系
r94522710@ntu.edu.tw

潘文珽
中科院二所
sp718982@tpts5.seed.net.tw

摘要

微小且為非接觸式量測，通常都是運用到顯微量測技術，且有鑒於近年來生醫工程的發展盛行，共焦顯微術由於空間中的光學切片能力高，無論是反射式或穿透式共焦量測技術運用相當盛行本研究利用聚焦形貌原理，搭配投影條紋與 CCD 達成虛擬共焦量測系統，系統特點如下:(1).系統內加入光纖，進行空間調節，節省下利用 DMD 投影所需要的縮束空間，順便藉由光纖斷面的蜂巢式結構，作為輔助投影條紋。(2).利用 LED 燈當作光源，減低因為 DMD 切換頻率所造成的燈光閃爍的問題。(3).使用投影條紋輔助投影量測配合聚焦形貌理論進行深度估計，用此方式作為理論基礎，藉此將待測物切片重建三維輪廓，也不會有以雷射作為光源造成待測物表面散射的問題。

關鍵詞：聚焦形貌、投影條紋法、光纖、共焦、三維輪廓重建

壹、前言

在時代的變遷中，人類不斷朝微小與精密化的加工過程邁進，泛如微機電技術與微細加工技術等等的運用之下，尺寸由毫米到微米甚至於到奈米等級，此時加工正確性的驗證也是不可或缺的一環，相形之下，微小量測技術就相當重要。由於接觸式量測方式量測彈性較差，如較軟或脆弱的待測物並不適合運用，所以非接觸式量測成為本論文選擇研發的重心。

而共焦顯微術由於空間中的光學切片能力高，無論是反射式或穿透式共焦量測技術運用相當盛行，故本論文挑選共焦顯微量測技術作為本論文的研究重心。所謂共焦，為物鏡焦點對稱於成像焦點兩者成共軛，由於光路上有針孔作為遮斷，所以當物鏡於待測物表面如果達到灰度值最亮時，即可以判定為物體表面輪廓的高度位置，反之失焦則呈現灰度值較低的情況。共焦顯微裝置中由於具有切片能力可重建三維輪廓，並且有好的空間解析能力，可以運用於：生物薄片檢驗、曲面量測等方面。

Ingo 等人[1]，除了討論多種共焦系統之外，也提出利用 DMD 與 CCD 做為虛擬針孔作為投影與接收訊號工具，取代硬體式的針孔遮斷，也可以算是仿共焦原理運用的系統，並將其系統加入光纖用於內視鏡運用。Nayar 等人[5]，提出深度估計方法聚焦重建形貌(shape from focus, SFF)，以高頻訊號決定物體表面輪廓，並利用高斯內插 (Gaussian interpolation)方式，由高斯模型的點與點間平滑曲線方式，趨近聚焦深度曲線最高點位置。Neil 等人[2]，廣視角顯微鏡中加入單一空間頻率格子陣列(grid pattern)的投影條紋，用來增加光學切片能力，與雷射共焦系統得到的圖像並無大的差異。Noguchi 與 Nayar 等人[3]，提出主動輔助投射光源運用於聚焦重建形貌上，加入的高頻訊號投射，可以適當的補償量測誤差增加量測正確性。

本論文根據上述參考文獻再加入構思，提出利用聚焦形貌量測方式(shape from focus)作為理論基礎，並配合自動聚焦函數(auto-focus function)演算理論與雜訊消除技術，進行物體三維輪廓重建(3D profile reconstruction)。搭配投影條紋法(fringe projection method)，增加光學切片能力與量測正確性，

另外加入影像光纖(image fiber)取代DMD作為空間調節裝置，更適時縮短光路系統，使用LED作為光源可以減低因為DMD切換頻率所造成的燈光閃爍的問題，由於投影與取像端的光纖與CCD皆可視為虛擬針孔，達到仿共焦(Confocal)系統裝置。

貳、研究方法

一、聚焦量測原理

依照參考文獻[5]與圖 1 上所示，假定物面(objective plane)與成像面(image plane)，在透鏡(lens)兩側呈現相對應位置關係，如果感應面(sensor plane)位置在焦距外距離成像面(image plane) δ 的位置， r 則為在感應面成像的範圍，根據比例關係可以得到下式：

$$\frac{1}{o} + \frac{1}{i} = \frac{1}{f} \quad (1)$$

$$i : \delta = R : r \quad (2)$$

而根據傅立葉光學理論，失焦影像 $I_d(x, y)$ 可以用模糊函數 $h(x, y)$ 與聚焦影像 $I_f(x, y)$ 的摺積表示，擴散參數(σ_h)被假定等比於失焦面成像半徑 r ，以下式子為其正反轉換：

$$I_d(x, y) = h(x, y) * I_f(x, y) \quad (3)$$

$$I_D(u, v) = H(u, v) \cdot I_F(u, v) \quad (4)$$

$$h(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma_h^2} e^{-\frac{x^2+y^2}{2\sigma_h^2}} \quad (5)$$

$$H(u, v) = e^{-\frac{u^2+v^2}{2}\sigma_h^2} \quad (6)$$

故感測位置的距離 δ 增加，失焦面成像半徑 r 增加，擴散參數 σ_h 也會增加。

以圖 2 而言，如果感測平面(sensor plane)位置相對於透鏡的距離《像距》不變的話，物體的聚焦面(focused plane)則會在透鏡另一端的某一聚焦深度放置《像距》，會有最佳的成像。反之將像距固定，相對的物距也會固定，如果將物體作垂直向掃描的話，就可以將物體順利切片，以此方法搭配具焦函數重建物體輪廓。

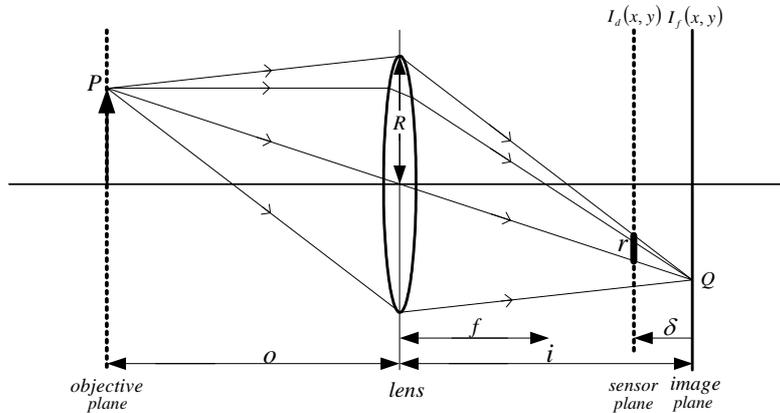


圖 1：單透鏡成像原理

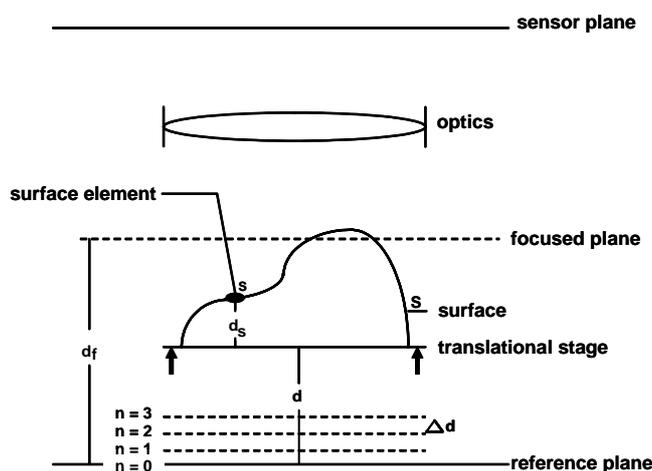


圖 2：聚焦形貌示意圖

二、聚焦反應曲線

在量測過程中，當鏡頭進行垂直掃描的同時，針對 CCD 上的畫素值做聚焦函數評估計算，在理想情況之下，此曲線經由失焦到切入焦距位置再到失焦，相對於聚焦函數則會反映出一明顯峰值的曲線，而峰值的取得在本文將為重點，因為峰值位置代表的是聚焦最清晰位置，理論上聚焦最清晰位置則可以代表相對應所量測的待測物輪廓高度。而由於本身 CCD 雜訊、光源閃爍與投影條紋清晰度等影響，會造成深度反應曲線有雜訊突點而不平滑，導致沒辦法正確判斷峰值位置，以下對於此一問題提出解決的一些方式，如傅立葉轉濾波、曲線擬合演算法等做介紹。

快速傅立葉(fast Fourier transform, FFT)，此方式的特性是將離散傅氏轉換(discrete Fourier transform, DFT)重複的項次重新編組，利用對稱性與周期性來減少運算，好比一種網狀的流程圖來運算，缺點在於計算數量必須為二的次方數式(7)(8)為基本轉換式。

$$F(u) = \frac{1}{M} \sum_{x=0}^{M-1} f(x) e^{-j2\pi ux/M} \quad (7)$$

$$f(x) = \sum_{u=0}^{M-1} f(u) e^{j2\pi ux/M} \quad (8)$$

利用 Euler 公式可以得到式(9)，而 $F(u)$ 又可以分為實部 $R(u)$ 以及虛部 $I(u)$ ，藉此可以得到傅立葉頻譜，如式(10)所示，也是濾波工作中判斷頻率的評估依據。另外也可得到相角或稱為相位頻譜，如式(11)所示。最後如果要考量頻譜性質則需知道功率頻譜，如式(12)所示，如圖 3 所示可以看到原始資料與轉換至頻域後的結果。

$$F(u) = \frac{1}{M} \sum_{x=0}^{M-1} f(x) \left[\frac{\cos 2\pi ux}{M} - \frac{\sin 2\pi ux}{M} \right] \quad (9)$$

傅立葉頻譜(spectrum)：

$$|F(u)| = \left[R^2(u) + I^2(u) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

相角(phase angle)：

$$\phi(u) = \tan^{-1} \left(\frac{I(u)}{R(u)} \right) \quad (11)$$

功率頻譜：

$$P(u) = |F(u)|^2 = R^2(u) + I^2(u) \quad (12)$$

最小平方法擬合(least square fitting)，對曲線進行擬合是一種近似的方法，曲線擬合點並沒有通過資料點，次方數的增加和曲線彎折的次數有相對的關係，此一方式是取量測點到曲線點之間的平方合為最小做為擬合曲線，如圖 4 所示。而如果當高頻訊號分佈於低頻訊號上呈現的週期具有一致性，則利用曲線擬合可以很有效的求取峰值，為了確保取得正確性，也可以先經由濾波除雜點，再進行判斷。曲線數學模型：

$$y_i = f(x_i; a_2, a_1, a_0) = a_2 x_i^2 + a_1 x_i + a_0 \quad (13)$$

平方誤差：

$$E_i = \sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i)]^2 \quad (14)$$

總平方誤差：

$$E = \sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i)]^2 = \sum_{i=1}^n [y_i - (a_2 x_i^2 + a_1 x_i + a_0)]^2 \quad (15)$$

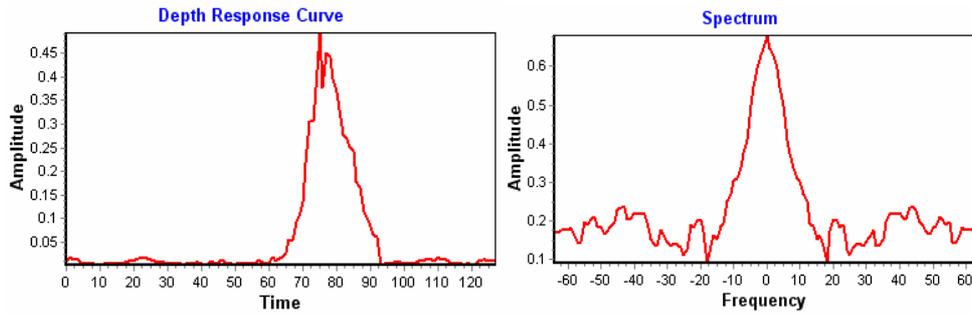


圖 3：聚焦反應曲線與頻譜圖

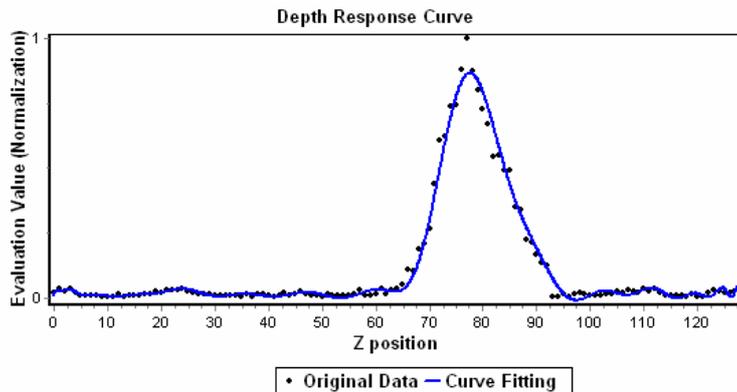


圖 4：聚焦反應曲線擬合

三、光學系統設計

本系統中利用光纖傳像束做空間調節元件，藉由光纖束本身的光纖陣列作為投影條紋，呈現蜂巢

狀的光投影面，此方式並不用考慮到繞射極限的問題，並且較 DMD 做投影儀器更便於對位組裝，而且光源使用 LED 光源，比起 DMD 閃爍程度較地低較為穩定，缺點則是在於光源經過光纖時，光強衰減率較大，而且光纖不平整也會投影反應在量測面上。本文提出解決方法有二，一為磨平光纖斷面，另一方式則是可以先量測一平整平面做校正，再將待測物量測結果相減掉校正平面，就可把待測物面上因光纖造成的缺陷去除。光纖傳像主要有三個重要的參數，數值空徑、透射率與解析度，數值孔徑牽涉到影像進入光纖的入口角度有多大，即所謂的即收光能力，而根據光纖的特性，如圖 5 所示，可見數值孔徑(NA)、入射角度(θ_{\max})、光纖束折射率(n_f)與光纖包覆層的折射率(n_c)相關，以及公式如下所示。

$$NA = n_i \sin \theta_{\max} = (n_f^2 - n_c^2)^{1/2} \quad (16)$$

可以根據圖 6 所示，光路可以區分做投影端、取像端與投影條紋大小設計三部份做分析，前兩個部份，利用成像位置區分光路分析透鏡進行分析，由於需要設計的參數繁多，如遠心鏡(telecentric lens)與準直透鏡(collimated lens)的焦距、位置擺放與成像大小等等，都須經過分析設計，本研究將成像方程式進行程式化，以利做參數最佳化的工作，最後再利用光學軟體做驗證。

另外投影條紋大小選定，根據參考文獻[5]，投影條紋愈密其實會有更好的空間切片能力，但是有鑒於投影條紋的均勻度與對比，以及 CCD 本身的橫向解析有限，所以預先進行 DMD 先估計最佳條紋大小，因為此方法調變容易，改變條紋大小方便，藉此得到最佳參數。

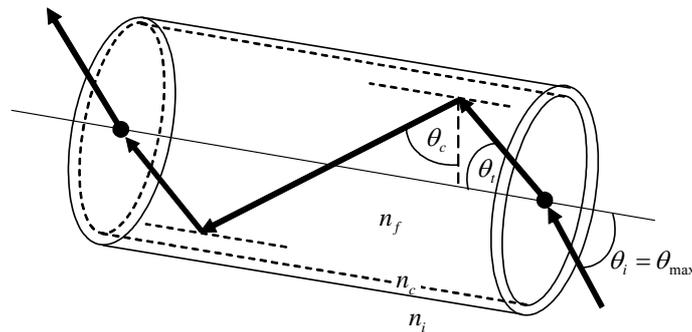


圖 5：經由光纖傳像的示意圖

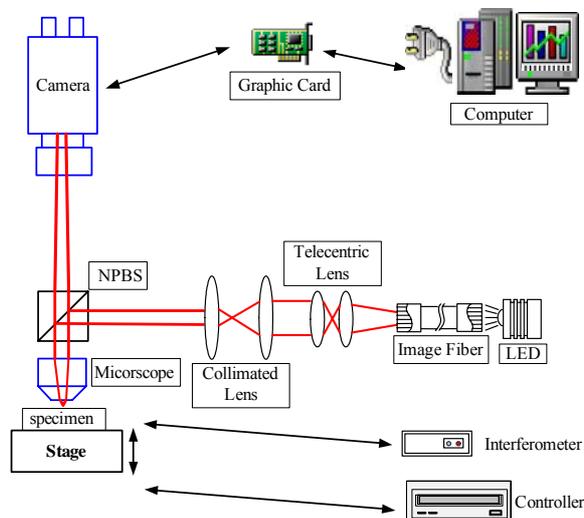


圖 6：量測系統示意圖

四、系統架構

起先利用桌上實驗驗證量測可行性，詳細系統示意圖如圖 6 所示，利用 LED 燈作為光源，利用光纖作為空間調節器，並利用光纖斷面作為投影條紋面，光纖前端接遠心鏡組減少擴束量，接下來運用透鏡做準直投影入顯微物鏡中，投影到待測物上方作為投影光源外也作為高頻訊號投射，取像部分由影像擷取卡驅動 CCD 進行，垂直掃描部分則是由平台進行實現，位移的校證則是利用雷射干涉儀作位移回饋。

另外模組化的系統則是經由機構設計方式進行，將所有元件模組成為一量測機台。模組後的機構最主要和桌上實驗最大差異是在於，進行垂直掃描移動的平台與雷射干涉儀由 PZT 取代，如圖 7 所示，PZT 驅動部分則改由 DA 裝置透過電壓放大器放大電壓推動 PZT，間接推動物鏡造成位移，由於此一移動機構為開迴路系統，缺點在於整體機構的位移需要先經過位移校正才能做準確位移量測，且整體機構位移受限於 PZT 移動距離，圖 8 是整體組合後的架構圖。

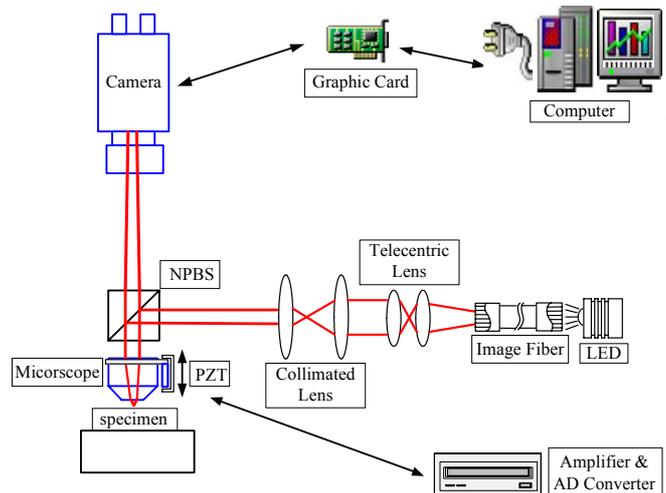


圖 7：模組化後的系統流程圖

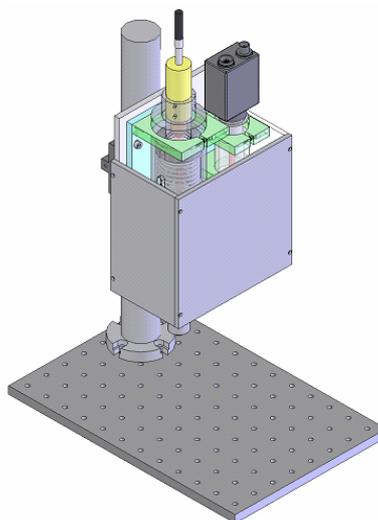
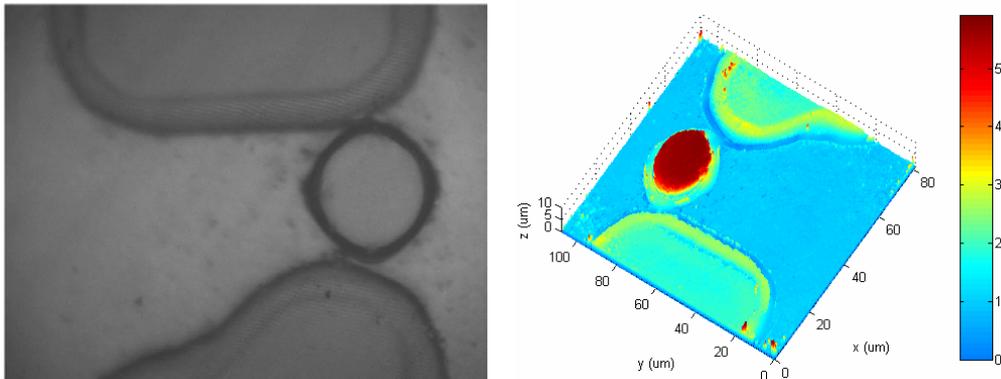


圖 8：本系統設計架構

參、研究成果

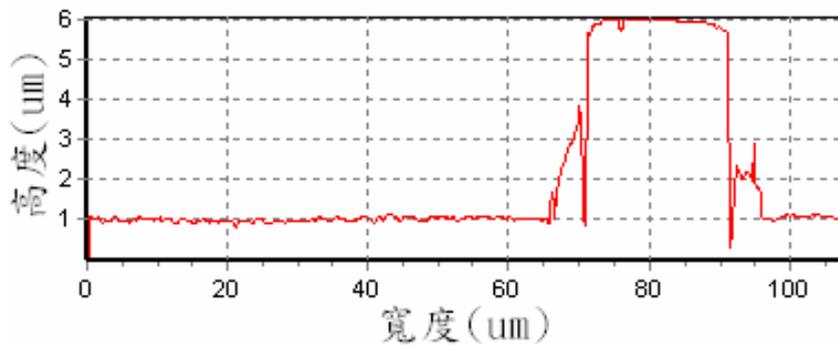
系統上在最佳狀況下進行 $4.21\mu\text{m}$ 的量測階高共二十次，平均量測誤差約為 $0.048\mu\text{m}$ ，最大全區量測誤差約為 $0.106\mu\text{m}$ ，量測不確定度於 $\pm 3\sigma$ 的量測誤差範圍約為 $\pm 0.113\mu\text{m}$ ，量測誤差量約在 1.14%。在系統模組化後，進行 $4.21\mu\text{m}$ 的量測階高，平均量測誤差約為 $0.104\mu\text{m}$ ，最大全區量測誤差約為 $0.166\mu\text{m}$ ，量測不確定度於 $\pm 3\sigma$ 的量測誤差範圍約為 $\pm 0.142\mu\text{m}$ ，量測誤差量約在 2.47%。

量測實例應用中，第一個例子的量測應用，是針對 LCD 板上方的間隙球，如圖 9 所示，分別為間隙球量測圖像、三維形貌重建與間隙球量測剖面圖，量得間隙球高度值約為 $5.02\mu\text{m}$ 。第二個量測例為微機電元件，如圖 10 所示，分別為聚焦在頂部與底部圖、三維形貌重建與量測剖面圖，量得高度值約為 $80.8\mu\text{m}$ 。



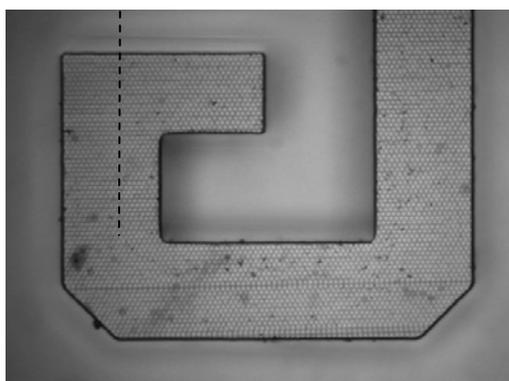
(a) 間隙球量測圖像

(b) 三維形貌重建

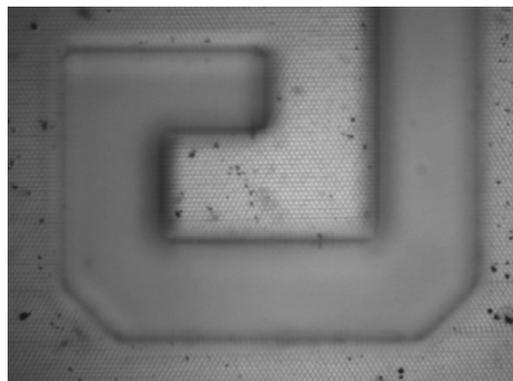


(c) 剖面圖

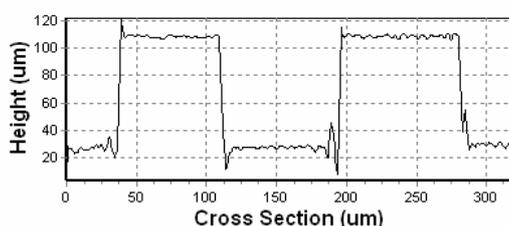
圖9：間隙球量測結果



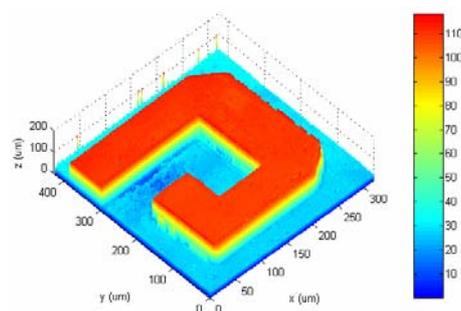
(a) 聚焦在頂部圖



(b) 聚焦在底部圖



(c) 剖面圖



(d) 三維形貌重建

圖10：微機電元件量測結果

肆、結論與建議

結論：

1. 搭配光纖投影條紋與 CCD 達成仿共焦量測系統。
2. 系統軟體皆由自行研發。
3. 光纖運用適當縮短光路系統，利用光纖斷面上光纖絲作為增加量測面上高頻訊號的投影條紋。且 LED 燈源使用更減低光源閃爍現象，減少因光強變化造成的誤差。
4. 光源量測，相較於雷射做光源，不像使用單波長雷射做光源有斷高不連續面的邊緣散射問題。
5. 機械結構設計方式，模組化整體系統，實現微小三維量測系統。

建議：

1. 結構光的投影遷就於光纖面的投影條紋，雖然光纖適當縮小了光路長度，但是並無法彈性的改變條紋型態，改變大小也必須經由更換鏡組才可變換條紋大小。
2. 光纖面不平整會造成量測誤差，即使利用反向補差的方式做補償，還是會有量測不確定因素存在，可以設法研磨光纖平面增加量測準確度。
3. 由於同軸取像方式，會有因為待測物體傾斜角度過大，反射回的光強不足造成取得影像過暗，或是物鏡的數值孔徑大而在斷差的邊緣有遮蔽性，而造成影像過暗，而造成無法量測的問題。如果具有斜角取像量測方式輔助可以補償無法量測的問題，並用疊合方法完整得到全部輪廓。
4. 愈多的掃描區間會有愈多的資料點要處理，而且做愈精確的處理需要愈多的時間，如果可以有更好的演算方式來替代，或者更加的縮短程式執行的演算法，則能更有效率的進行量測。

實際模組化的成品，由於是利用開迴路控制 PZT，在精度上只能利用校正預知位移，如果可以有閉迴路回授裝置，則可以有更精確的量測精度。

五、參考文獻

- 【1】 Krohne Ingo and Pfeifer Tilo (2003). New method for confocal microscopy and its endoscopic application. *Proc. of SPIE*, Vol. 5143, pp. 281-288.
- 【2】 M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson (1997). Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics Letters*, Vol. 22, No. 24, pp. 1905-1907, Dec 15.
- 【3】 Minori Noguchi and Shree K. Nayar (1994). Microscopic Shape from Focus Using Active Illumination. *IEEE*, Vol. 1, pp. 147-152.
- 【4】 Q. S. Hanley and P. J. Verveer. (1999). An optical sectioning programmable array microscope implemented with a digital micromirror device. *Journal of Microscopy*, Vol. 196, pp. 317-331, December.
- 【5】 Shree K. Nayar and Yasuo Nakagawa (1994). Shape from Focus. *IEEE*, Vol. 16, No. 8, August.

六、致謝

特別感謝由中山科學研究院提供經費支援(BB96006P)，使本研究能順利進行，並於此發表研究成果。