

# 反射式光纤共焦扫描成像的研究\*

杨莉松 王桂英 王建岗 步 扬 徐至展

(中国科学院上海光学精密机械研究所强光光学开放研究实验室, 上海 201800)

干效松

(Department of Physical Optics, University of Sydney, NSW 2006, Australia)

**摘 要** 建立了反射式光纤共焦扫描成像系统。分析了光纤-集光透镜参数  $A$  及物透镜有效数值孔径等对系统成像分辨率的影响, 并在此基础上选择了合适参数的透镜, 获得了优化的反射式光纤共焦扫描成像系统。测试结果表明, 该系统具有亚微米级横向成像能力, 微米级纵向层析能力, 成像稳定性好。它将应用于材料及生物组织三维成像检测中。

**关键词** 反射式光纤共焦扫描成像, 系统分辨率, 系统测试。

## 1 引 言

Minsky 早在 50 年代就率先提出共焦扫描成像的思想<sup>[1]</sup>。随后 Davidovits、Sheppard 和 Wilson 等<sup>[2-7]</sup>对共焦系统做了进一步的研究。研究表明: 共焦扫描显微系统不仅可以抑制成像中弱杂散光的影响, 而且在相同成像条件下, 其横向分辨率比普通显微系统高。更重要的是, 共焦系统具有三维成像能力, 可以进行材料表面形貌测量, 并对透明、半透明物体(如生物样品)具有一定的深度层析能力。目前, 共焦扫描显微术已成为材料、生物医学领域重要的检测技术<sup>[5-8]</sup>。

光纤器件用于共焦扫描成像系统, 使得系统结构紧凑, 小型化, 抗干扰能力强, 这是共焦显微术的发展方向之一。而了解系统成像特性, 进行系统优化设计是把光纤共焦扫描显微术推向实用化、商品化的关键。为此, 作者建立了一套反射式光纤共焦扫描显微系统(FOC-SM)。系统由单个光纤耦合器实现共焦系统的点照明和点接收, 因此结构比常规共焦扫描显微系统的简单, 且易调节。本文在共焦扫描成像理论基础进一步分析了影响光纤共焦扫描系统成像分辨率的因素, 并在此基础上进行了系统优化。在系统测试中, 获得了系统纵向响应曲线及系统的直边展宽量, 进行了光栅参数测量及鉴别率板的二维成像实验。结果表明, 该系统具有亚微米级横向成像能力、微米级纵向层析, 系统的成像稳定性也好。

## 2 系统分析及设计

反射式光纤共焦扫描成像系统实验装置如图 1 所示。激光束经透镜  $L_1$  耦合至单模光纤

\* 国家自然科学基金重点基金(批准号 69637030)及王宽诚基金资助项目。

收稿日期: 1998-03-23; 收到修改稿日期: 1998-05-21

耦合器(分光比: 50:50)的端头 1。通过调节  $L_1$ -光纤的耦合, 可以控制系统光源强度。端头 3 输出的光束分别经集光透镜  $L_2$  和物透镜  $L_3$  聚焦在样品上。从样品表面反射的光按原路返回至端头 3, 可见端头 3 同时起着照明点光源和接收小孔光阑的作用。探测器 CCD 接收从端头 4 输出的样品反射光。微机控制三维压电陶瓷平台(PZT)移动, 实现对样品的扫描, 并同步地对 CCD 采集到的每一点的灰度数据进行处理, 最后重构出样品的扫描图像。

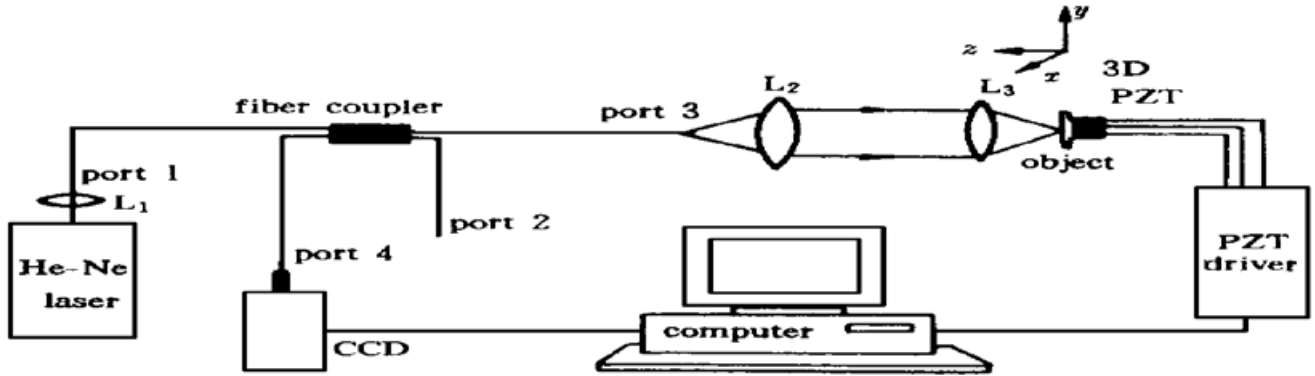


Fig. 1 Experimental setup of a confocal reflection-mode scanning microscope using single-mode fiber coupler

系统中, 透镜和光纤参数的选择以及扫描步长的控制, 是系统设计及优化的关键。通过分析系统成像特性可以分别说明这些问题。

## 2.1 影响系统成像的主要因素

从光纤共焦成像系统的理论分析中可知: 光纤-集光透镜参数  $A$  和物透镜有效数值孔径是研究系统成像特性的主要参数。对于实际反射式光纤共焦扫描系统, 一般有  $A > 1$ 。此时系统的直边像展宽量, 即系统最小横向分辨率  $\Delta x_{\min}$  可表示为<sup>[9, 10]</sup>

$$\Delta x_{\min} = \frac{\lambda \sqrt{A\pi}}{2\pi n \sin \alpha} \quad (1)$$

$$A = (2\pi a_0 r_0 / \lambda f_1)^2, \quad \sin \alpha = a_0 / f_2 \quad (2)$$

式中  $r_0$  为光纤模场半径,  $a_0$  为物、像空间光阑半径,  $n$  为物空间折射率,  $n \sin \alpha$  为物空间有效数值孔径,  $f_1$ 、 $f_2$  分别为集光透镜和物透镜的焦距。由(1)式看出, 物空间有效数值孔径一定时,  $A$  值越小, 即光纤模场半径  $r_0$  和像空间有效数值孔径越小, 则直边像展宽量越小, 系统横向分辨率越高。 $A$  值一定时, 物空间有效数值孔径越大, 则系统横向分辨率越高。

另一方面, 反射式共焦扫描成像系统具有纵向深度层析能力, 其最小分辨率可以用焦点在纵向上强度分布的半高宽  $\Delta z_{\text{FWHM}}$  表示<sup>[9, 10]</sup>

$$\Delta z_{\text{FWHM}} = \frac{2n\lambda u_{1/2}}{8\pi[n \sin(\alpha/2)]^2} \quad (3)$$

式中  $u$  为归一化离焦量。 $u_{1/2}$  为系统纵向响应强度  $I-u$  曲线<sup>[9]</sup> 的半高半宽值, 与  $A$  有单值对应关系:  $A < 4$  时,  $u_{1/2} \approx 3$ ;  $A \geq 4$  时,  $u_{1/2} \approx A$ 。 $\Delta z_{\text{FWHM}}$  越小, 系统的纵向分辨能力越强, 即层析能力就越强。由上式可以看出,  $A$  越小、物透镜数值孔径越大, 则系统纵向分辨率越高。

由以上分析可知, 光纤-集光透镜参数  $A$  和物透镜数值孔径是影响系统分辨率的重要参数。在成像系统设计中, 如果要保证集光透镜-光纤的耦合效率(如在生物组织层析成像中), 则选择模场半径及数值孔径较小的光纤, 并选择数值孔径较大的物透镜将有利于系统分辨率的提高; 如果不考虑集光透镜-光纤耦合中的能量损失(如在高反射率的材料表面检测中), 则选择数值孔径比光纤数值孔径小的集光透镜, 将使系统成像分辨率进一步提高。系统测试

时,在其它条件不变情况下选择了两种不同数值孔径的集光透镜,进行了系统纵向响应曲线的对比实验,证实了这一分析,并由此获得了优化的共焦扫描成像系统。

此外,波长  $\lambda$  也是影响系统成像分辨率的重要参数。它与最小分辨量存在线性关系,即所用光的波长越短,成像系统分辨率越高。

理想情况时,  $A = 3$ ,  $n \sin \alpha = 1.4$ , 设光源波长为  $632.8 \text{ nm}$ , 根据(1)式和(4)式可以得到系统横向最小分辨量  $\Delta x_{\min} = 0.22 \mu\text{m}$ , 纵向最小分辨量  $\Delta z_{\text{FWHM}} = 0.32 \mu\text{m}$ 。可见光纤共焦扫描成像系统的横向、纵向极限分辨量为亚微米量级。

## 2.2 影响成像的其它因素

对于扫描成像系统,取样步长的选取不仅影响扫描成像速度,而且还影响成像质量。若欠取样,在频域物体的周期频谱将重叠,高频分量被淹没,反映在像空间就是不能获得较理想的物体信息。若过取样,则会加大系统信息冗余度,无谓延长扫描成像时间。扫描成像中的取样步长应与系统频谱带宽满足 Whittaker-Shannon 抽样定理<sup>[11]</sup>。即设在  $x$  方向抽样,则最大允许间隔  $\Delta x \leq 1/2B_x$ , 其中:  $2B_x$  为  $x$  方向系统频谱带宽。根据衍射理论<sup>[11, 12]</sup>,截止频率  $B_x$  与系统分辨率  $\Delta$  有近似关系:  $B_x = 1/\Delta$ 。若对弱散射、弱吸收物体进行成像测量,系统的实际成像分辨率接近于系统分辨率,此时,横(纵)向采样步长可以取系统横(轴)向最小分辨量的一半。

考虑到要充分利用  $L_3$  的数值孔径,  $L_3$  光阑孔径  $a_0$  应满足:

$$a_0 \approx \begin{cases} \text{NA}_{\text{optical fibre}} f_1 & \text{NA}_{\text{optical fibre}} \leq \text{NA}_{\text{collecting lens}} \\ \text{NA}_{\text{collecting lens}} f_1 & \text{NA}_{\text{collecting lens}} \leq \text{NA}_{\text{optical fibre}} \end{cases} \quad (4)$$

另外,对高散射介质(如厚的生物样品)成像,由于散射使信号光激烈衰减,系统设计中必须保证光路中能量损失最小。即应保证透镜-光纤耦合效率尽可能高,并注意从  $L_2$  输出的平行光不能过覆盖  $L_3$ 。

根据上述分析,在实际扫描成像中应视具体成像要求确定光纤、透镜的参数,选择合适的扫描步长。对于建立的共焦扫描成像系统,首先进行了系统最小分辨量的测试,光栅参数测量及鉴别率板的二维成像实验。

## 3 系统测试及成像

系统使用的光源为  $632.8 \text{ nm}$  He-Ne 激光,激光功率  $> 7 \text{ mW}$ , 光束直径  $0.7 \text{ mm}$ 。激光输出功率起伏  $\leq \pm 2.5\% / \text{h}$ 。压电陶瓷平台程长  $20.00 \mu\text{m}$ , 最小移动步长  $5 \text{ nm}$  (定位精度  $< 5 \text{ nm}$ )。  $L_3$  选用  $40\times$  的普通消像差物镜,数值孔径为  $0.65$ , 工作距离为  $0.63 \text{ mm}$ 。实验中使用的光纤:数值孔径为  $0.13$ , 场模半径  $2.1 \mu\text{m}$ 。  $L_2$  分别选用  $4\times$ ,  $10\times$  物镜,数值孔径分别为  $0.1$  和  $0.25$ , 即系统  $A$  值约分别为  $4.3$  和  $7.3$ 。CCD 信噪比  $> 48 \text{ dB}$ , 最小照度  $0.02 \text{ lx}$ , 适用于微光探测。

### 3.1 系统纵向响应曲线

共焦扫描成像系统的纵向响应曲线的半高宽  $\Delta z_{\text{FWHM}}$  是反映系统纵向层析能力大小的重要指标。将反射镜面( $632.8 \text{ nm}$  99%)垂直于光轴,置于共焦系统焦点附近,并沿纵向( $z$  方向)平移,获得了如图 2 所示的系统纵向强度响应曲线。实验中扫描步长为  $0.2 \mu\text{m}$ 。很明显,使用数值孔径为  $0.1$  的集光透镜以损失光路中的能量为代价获得了比数值孔径为  $0.25$  的集光透镜高的纵向分辨率。测得响应曲线的半高宽,即系统纵向最小分辨量  $\Delta z_{\text{FWHM}}$  分别约

2.5 μm 和 5.5 μm。理论计算分别为 1.9 μm 和 5.1 μm。实测与理论分析基本一致。在直边展宽量测量、光栅参数测定和鉴别率板二维扫描成像中, 由于光功率足够强, 不考虑光路中的能量损失, 集光透镜均选用数值孔径为 0.1 的物镜。

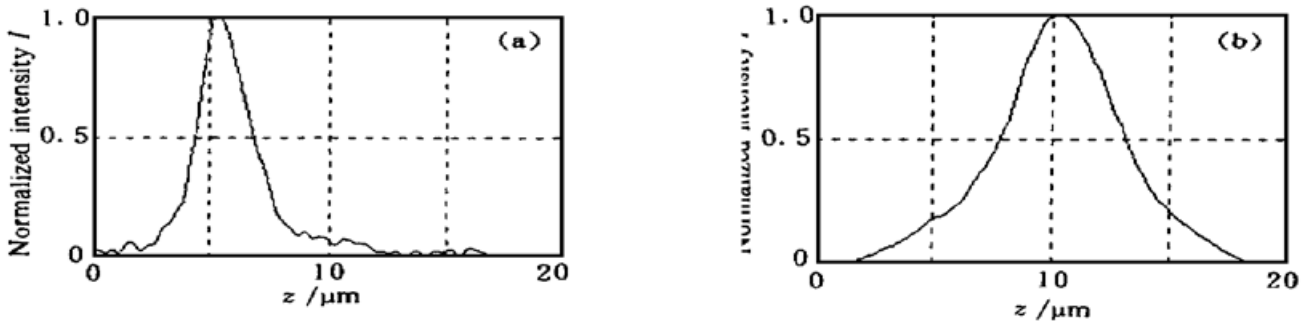


Fig. 2 Experimental result of intensity of the axial response to a perfect reflector in FOCSM. (a) Collecting lens 4×, NA 0.10, (b) Collecting lens 10×, NA 0.25

### 3.2 亚微米透光线条一维扫描像

亚微米透光线条一维共焦扫描像如图 3 所示。测试中扫描步长为 0.3 μm。明场下的光纤共焦扫描成像系统为纯相干系统, 若不考虑系统像差等因素的影响, 扫描像边缘处的像强度不依赖于系统的光学参数, 恒为远离边缘且像强度强的位置的 1/4<sup>[7, 13]</sup>。根据这一判据, 可确定系统直边展宽量, 即系统横向最小分辨量为 0.6 μm, 与理论计算的 0.55 μm 基本一致。

### 3.3 光栅一维共焦扫描像

1200 l/mm 光栅的刻线距离为 0.833 μm, 是在系统可分辨的范围。将光栅垂直光轴放置, 并进行一维扫描, 结果如图 4 所示。其中, 扫描步长为 0.1 μm。

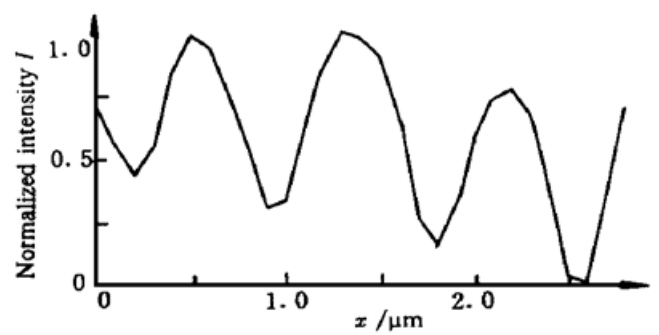
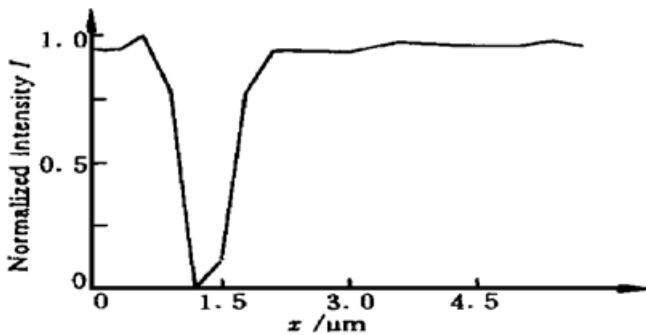


Fig. 3 1-D scanning curve of submicron line in FOCSM

Fig. 4 1-D scanning curve of 1200 g/mm grating

根据系统直边展宽量及边缘判据, 并注意到测量中主要误差来源于读数误差(设为扫描步长的一半 0.05 μm), 确定出光栅常数为 1250 ± 80 g/mm。

测试中, 光栅是人为垂直光轴放置的, 平面与扫描面可能不完全平行。此时由于共焦扫描显微系统具有三维成像特性, 光学性质相同的点将表现出不同的光强度, 如图 4 所示。但当面间的夹角不大且扫描范围不大时, 对于成像面上各点引入的离焦量将变化不明显。例如, 夹角 10°, 扫描范围 5.0 μm 时, 则离焦量变化为 0.9 μm, 小于系统纵向最小分辨量, 很难从一维或二维扫描像中辨认扫描面与成像面是否平行。由此引入的测量误差为 1.5%, 在小测量范围(~ 1 μm) 比较起读数误差可以忽略。

### 3.4 鉴别率板二维共焦扫描像

图 5 所示为归一化后的鉴别率板二维共焦扫描像。图中白色部分为反射膜层, 黑色部分为透光玻璃。从图中可以较清晰地分辨出反射膜层上的微米瑕疵。本文对该位置进行过重复

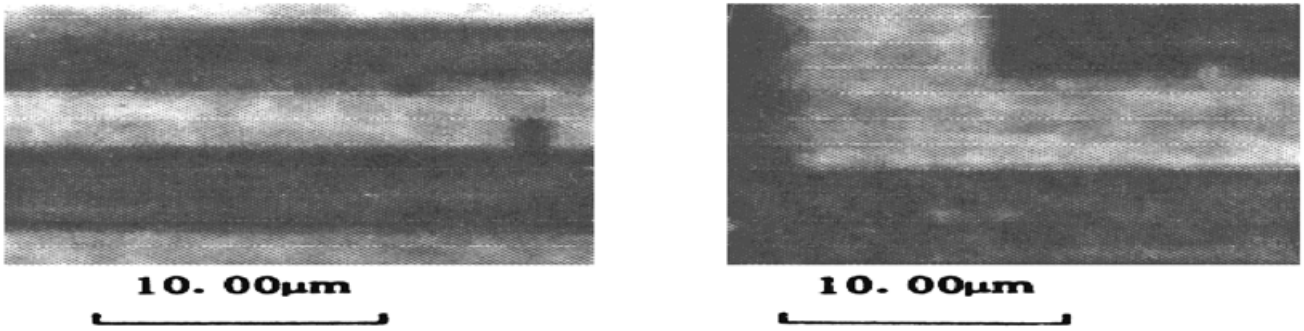


Fig. 5 The 2-D normalized image ( $19\ \mu\text{m} \times 19\ \mu\text{m}$ ) of standard bars

测量, 成像稳定性较好。但同时也注意到, 相同介质不同区域的像也存在灰度变化。图 5 中可以较明显地看到膜层表面有“纹理”, 这将在另一文中进行分析。

实际上, 二维共焦扫描像一般都包含物体光学信息(反射率等)和形貌信息(三维结构)。只有通过三维扫描, 即多层面的二维扫描, 并在分析成像面之间相互影响的基础上进行三维图像重构才能将叠加信息在一定程度上分离, 从而获得物体的真实像。

**结 论** 实验结果表明建立的反射式光纤共焦扫描成像系统最小可以分辨亚微米量级物体, 具有层析成像能力。为提高系统成像分辨率, 还可以选择数值孔径和场模半径更小的光纤, 及数值孔径更大的物镜。但必须注意到: 使用普通的大数值孔径( $\text{NA} 1.0$  以上)物镜, 系统工作距离将会很短( $< 100\ \mu\text{m}$ ), 限制了系统的成像范围。因此, 在系统设计中除了要考虑成像分辨率因素之外, 还应视具体成像要求选择合适数值孔径的物镜。

共焦系统这种点照明-点接收成像系统能在一定程度上抑制散射对成像的影响, 这使得共焦系统在散射介质内物体成像研究中比常规光学显微系统有更大的发展潜力。在散射介质成像中, 系统的实际分辨率主要与成像物层面透过率有关, 层面透过率越高, 实际成像分辨率将越接近系统分辨率。细胞、神经元、植物种子、肺及肌肉等生物组织为散射介质, 对红光或近红外光吸收少, 对该波段的光为透明、半透明成像物, 适合用共焦扫描显微术进行三维成像研究。当今光学层析成像界及医学界关注于利用各种光学方法进行癌肿组织的早期诊断, 共焦扫描成像术作为有效滤除散射光的“空间门”技术已经得到了广泛的研究及应用。目前仍在探索的问题主要是定性分析实际成像中散射及物体层面之间的作用会对共焦系统成像产生多大影响, 以及针对具体生物样品选择什么波长(此时的实际成像分辨率与所用波长一般不是简单的线性关系)、功率(对生物活体无伤害)的可见激光在光路中和图像重构时最大限度地抑制这些影响并获得高分辨的三维像。

中科院上海光机所黄惠杰老师提供了实验中用的鉴别率板, 特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] Minsky M. Microscopy Apparatus, U. S. Patent No. 3013467, 1961-12-19
- [2] Davidovits, Egger M D. Scanning laser microscope for biological investigations. *Appl. Opt.*, 1971, **10** (7): 1615~ 1619
- [3] Sheppard C J R, Choudhury A. Image formation in the scanning microscope. *Optica Acta*, 1977, **24** (10): 1051~ 1073

- [4] Sheppard C J R, Wilson T. Depth of field in the scanning microscope. *Opt. Lett.*, 1978, **3**(3) : 115~117
- [5] Sheppard C J R. Scanning optical microscopy, In: *Advances in Optical and Electron Microscopy*, Barer R, Cosslett V E eds. London: Academic Press, 1987. **10** : 1~ 98
- [6] Wilson T. *Confocal Microscopy*, London: Academic Press, 1990.
- [7] Wilson T, Sheppard C J R. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*, London: Academic Press, 1984. 1~ 9
- [8] Pawley J B. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Plenum Press, 1994. 1~ 15
- [9] Min Gu. *Principles of Three-Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*, London: World Scientific Press, 1996. 175~ 210
- [10] Carlsson K, Aslund N. Confocal image for 3-D digital microscopy. *Appl. Opt.*, 1987, **26**(16) : 3232 ~ 3238
- [11] Goodman J W. *Introduction to Fourier Optics*, New York: McGraw Hill Press, 1968. 17~ 25
- [12] Born M, Wolf E. *Principles of Optics*, New York: Pergamon Press, 1980. 370~ 420
- [13] Hewlett S J, Barnett S M, Wilson T. Image intensity at the edge of a straight edge object. *J. Modern Optics*, 1990, **37**(12) : 2017~ 2024
- [14] Snyder A, Love J. *Optical Wave-guide Theory*, London: Chapman and Hill Press, 1983.

## Research On Reflection-Mode Fiber-Optical Confocal Scanning Imaging System

Yang Lisong      Wang Guiying      Wang Jiangang      Bu Yang      Xu Zhizhan  
(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Gan Xiaosong

(Department of Physical Optics, University of Sydney, NSW 2006, Australia)

(Received 23 March 1998; revised 21 May 1998)

**Abstract** An alternative implementation of confocal scanning microscopy has been developed to construct a compact and anti-jamming confocal microscope by using fiber optical components. A fiber optical confocal scanning microscope (FOCSM) in reflected mode was built for this purpose. The influence of fiber-collective lens parameter  $A$  and numerical aperture of objective lens on the system imaging resolution is analyzed. Consequently, an optimum collective lens was chosen to improve the system resolution with certain fiber and objective lens. In system testing, submicron transverse resolution and micron axial section resolution with good imaging stability has been obtained. The instrument will be used for three-dimensional imaging of the microstructure in the fields of material sciences, biology and medicine.

**Key words** fiber optical confocal scanning imaging in reflection mode, system resolution, system testing.