

文章编号: 0253-2239(2005)07-923-7

椭偏光学显微成像系统聚焦评价函数的研究*

陈 涉 孟永宏 靳 刚

(中国科学院力学研究所, 北京 100080)

摘要: 自动聚焦技术在椭偏光学显微成像系统中是一项关键的技术。利用几种常用聚焦评价函数作为研究手段研究了这一过程。实验中采用硅基底表面人血纤维蛋白膜层和多元蛋白质芯片样品作为研究对象, 研究了儿种函数在自动聚焦过程中函数值的变化, 以及噪音、样品区域选择对聚焦效果的影响。实验验证拉普拉斯评价函数和 Sobel 评价函数可以满足系统的要求; 采用多幅图像平均的方法可以有效降低噪音, 当平均次数达到 9 次以上, 系统噪音的影响就可以被降至有效评价的程度; 沿同一锐边, 选择不同的调焦区域, 对聚焦过程基本没有影响; 利用评价函数在实验中确定了倾斜平面成像的最佳聚焦平面, 并与理论像平面吻合。实验证明利用聚焦评价函数可以实现自动聚焦技术在椭偏光学显微成像系统中的应用。

关键词: 光学测量; 显微; 自动聚焦; 椭偏光成像系统; 聚焦评价函数; 噪音

中图分类号: O439; TG115.21 文献标识码: A

Study on the Autofocus Evaluation Function in Ellipsometric Imaging System

Chen She Meng Yonghong Jin Gang

(Institute of Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Auto focusing is key technique in ellipsometric imaging system. The process is studied by use of several autofocus' evaluation functions. FIB on Si wafer and multi-channel proteinchip has been used in experiment. The change of functions value has been studied. The effect of noise and selected area used for auto focusing are evaluated. The experiment shows that Laplacian function and Sobel function are suitable for this system. By using several frames to get average result, the effect of noise has reduced to good level when the number of frame more than 9. Along the same sharp edge, selecting different areas for autofocus, it has no influence on result. Using autofocus evaluation function to get the focus image of tilting plane, and the result agrees with the theoretical plane of image. It has been confirmed that autofocus evaluation function can be used in ellipsometric imaging system.

Key words: optical measurement; microscopy; autofocus; ellipsometric imaging system; autofocus evaluation function; noise

1 引 言

椭偏光学显微成像是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型超薄膜及表面测量技术^[1]。该技术在传统光学椭偏测量术的基础上结合 CCD 摄像技术、计算机图像采集、图像处理技术而产生的一种新兴测量技术。具有极高垂直分辨力(0.1 nm 量级的厚度分辨力)和很高水平分辨力(微米量级的横向分辨

力), 同时成像面积大(达到厘米量级), 结果直观(以图像显示)以及非接触测量等突出优点^[1,2]。该技术为薄膜材料研究和功能生物膜研究提供了一种全新的测量手段, 在生物分子药物筛选和临床医学诊断等方面有希望获得广泛的应用^[3~8]。

对于通常的光学系统, 正确聚焦是系统正常使用所必须满足的一个前提条件。椭偏光学成像系统

* 国家自然科学基金(60178033, 90206029)资助课题。

作者简介: 陈 涉(1971~), 男, 浙江人, 助理研究员, 主要从事自适应光学和椭偏光学显微成像系统的研究。

E-mail: schen@imech. ac. cn

收稿日期: 2004-06-28; 收到修改稿日期: 2004-10-31

和通常的光学系统有很大的不同,它的物平面与成像透镜有一定夹角 θ , CCD 成像平面和成像透镜平行,这样 CCD 成像面上所成像就非常复杂,有些区域正好达到最佳成像区域,而有些区域则在焦点的前后分布。本文采用多种聚焦评价函数,在图像中选取不同的成像区域,研究了在聚焦过程中区域内评价函数值的变化,得到一批相关结果。对于文献 [9] 强调的以局部极大值的数量作为衡量评价函数优劣的标准提出疑义。从某种意义上来说,那些极大值恰恰反映了局部的情况。简单否认大量峰值的出现,会忽略某些感兴趣的局部变化。

2 自动调焦系统及自动调焦评价函数

由于微电子技术、计算机技术、显示测量技术的发展,促进了自动调焦技术的发展。从 20 世纪 60 年代开始,自动调焦技术已广泛应用于照相机、显微镜、投影仪、摄像机、光刻设备和检测仪器等光学系统中^[10,11]。

在椭圆偏光显微成像系统(如图 1)中,以 CCD 摄像机作为系统的信号探测器,摄像机所获取的图像通过图像采集卡进入计算机^[2,12,13]。系统的自动调焦,可以利用已有的器件和计算机的运算能力,不需要使用额外的器件。本文采用了基于系统图像分析的三步法自动调焦获得了良好的成像质量^[13]。

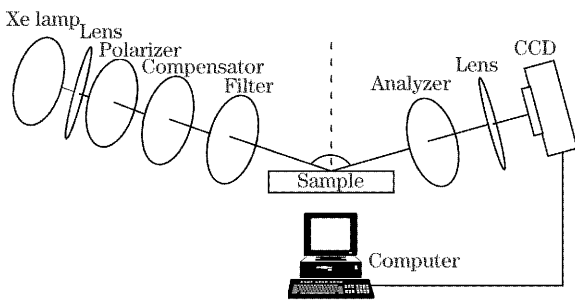


图 1 椭圆偏光成像系统框图

Fig. 1 Diagram of ellipsometric imaging system

一幅正确聚焦的图像所包含的信息远比离焦图像丰富。人眼判断正确聚焦与否的一个重要指标是图像的清晰程度(即图像的锐度),正确聚焦图像较离焦图像锐度大。考虑点物通过光学系统的情况,以几何光学的观点看,点物通过透镜系统成像,如果像接收面偏离理想像面,则像点为一扩展斑点,无清晰边界,斑点形状与透镜系统的出瞳相同。当像接收面与理想像面重合时,光斑最小。如果成像透镜都是圆形,即可测定光斑直径 R 的大小,得到离焦程度。但实际上,直接测量 R 是不可能的。以傅里

叶光学的观点来看,透镜可以看成是一个低通线性滤波器,正确聚焦时,具有最大截止频率,截止频率随离焦量增加而降低。光学系统的光学传递函数常以高斯模型表示^[14]:

$$G_{\text{Gauss}}(\rho) = \exp\left(-\frac{1}{4}R^2 \cdot \rho^2\right), \quad (1)$$

式中 R 为光斑半径, ρ 为圆空间频率, $\rho^2 = u^2 + v^2$, u , v 为空间坐标 x 和 y 的傅里叶变换对。因此,可以通过测量调焦图像的光强分布来间接测量 R 的大小,从而判断图像的聚焦结果。由于高频分量决定了像的锐度,所以通常利用图像光强分布的梯度作为调焦的评价,即

$$F_{\text{grad}} = \sum \sum \{\nabla g(x, y)\}^2, \quad (2)$$

式中 $g(x, y)$ 为成像平面上 (x, y) 点的光强。基于此原理的常用调焦评价函数有 Robert 评价函数、Sobel 评价函数^[13]。另外拉普拉斯函数也常用作自动调焦的评价函数:

$$F_{\text{lap}} = \sum_{i=1}^{M-1} \sum_{j=1}^{N-1} [\nabla^2(x, y)]^2, \quad (3)$$

其中

$$\begin{aligned} \nabla^2 g(x, y) = & 4g(x, y) - g(x, y+1) - \\ & g(x, y-1) - g(x+1, y) - \\ & g(x-1, y). \end{aligned} \quad (4)$$

还存在很多用于自动聚焦的评价函数,文中选取了其中最具代表性的 Vollath's $F5$ ^[9,15]。

3 实验结果及相关讨论

在完成三步法自动调焦^[13](把 CCD 摄像机的位置调整到焦点附近)的基础上,让 CCD 摄像机沿轨道前后运行,连续记录选择区域中聚焦评价函数的变化情况,依据函数值的变化研究聚焦情况。首先对 Robert, Sobel 和拉普拉斯, Vollath's $F5$ 四种评价函数进行比较,初步确定在椭圆偏光成像系统中哪种函数较为恰当;然后讨论系统中噪音的影响,采用多幅平均法抑制噪音;第三部分对用于计算评价函数的区域不同而产生的聚焦效果变化进行探讨;第四部分针对一个细节相对丰富的样品,选择不同区域,对如何获得真正所需的聚焦位置,进行细致地研究。在本节的最后针对上述实验结果进行讨论。

3.1 四种聚焦评价函数的比较

这里选取一条快速变化的锐边作为研究的区域(如图 2),图中样品亮区域为硅基底表面上人血纤维蛋白膜层,暗区域是硅基底,白色线框勾画出的区

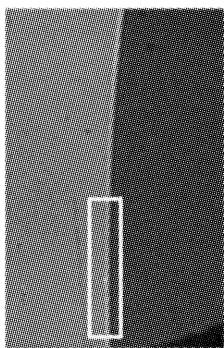


图 2 聚焦区域选择图

Fig. 2 Selected area for autofocus

域用于计算聚焦评价函数值。在垂直方向上样品、透镜及 CCD 成像面保持平行,水平方向上三者有一定的夹角。为减小噪音的影响,工作中采取 100 幅连续图像平均。图 3(a)是前三种聚焦评价函数,结果有很好的的一致性。Vollath's F_5 的自动聚焦曲线[如图 3(b)]出现异常,类似结果在自动聚焦过程中将无法获得准确的结果,下文将不对该函数进行讨论。图中横坐标是 CCD 相机的成像面所在位置,单位是 $5 \mu\text{m}$ 。

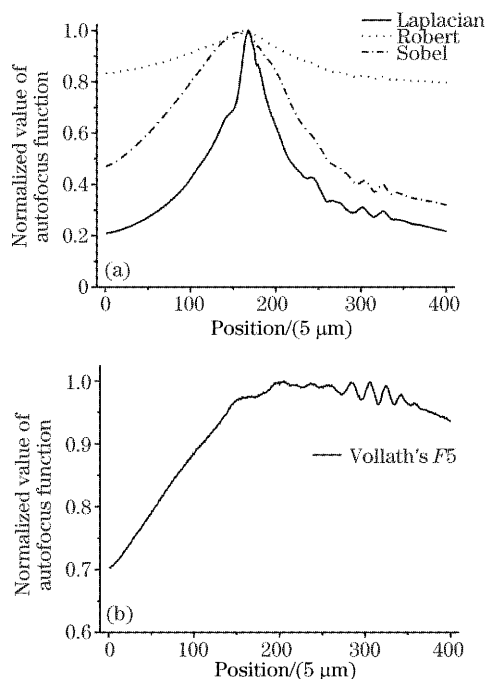


图 3 归一化的自动调焦评价函数值

Fig. 3 Normalized value of autofocus evaluation function

3.2 噪音对于聚焦评价函数比较

为获得噪音影响的结果,利用 3.1 节相同场景,用均方根作为评价参量 σ (以 100 次的结果作为参考值),图 4 是实验结果,图中横坐标为平均次数。

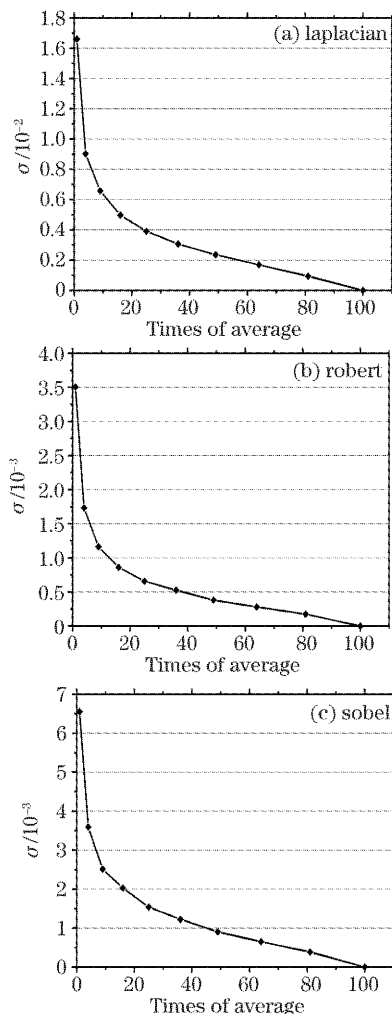


图 4 评价函数的均方根

Fig. 4 Root-mean-square of autofocus evaluation function

为了进一步验证实验结果,选取了完全不同的场景(如图 5),图中样品是多元蛋白质芯片样品,区域 1 包括 6 条垂直锐边,区域 2,3,4 包括两条垂直锐边,区域 5,6,7,8 分别包含唯一的垂直锐边,区域 9,10,11,12 分别包含唯一的垂直锐边,面积减小。图 6 是实验结果。

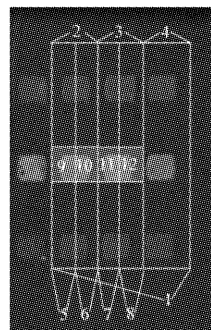


图 5 聚焦区域选择图

Fig. 5 Selected area for autofocus

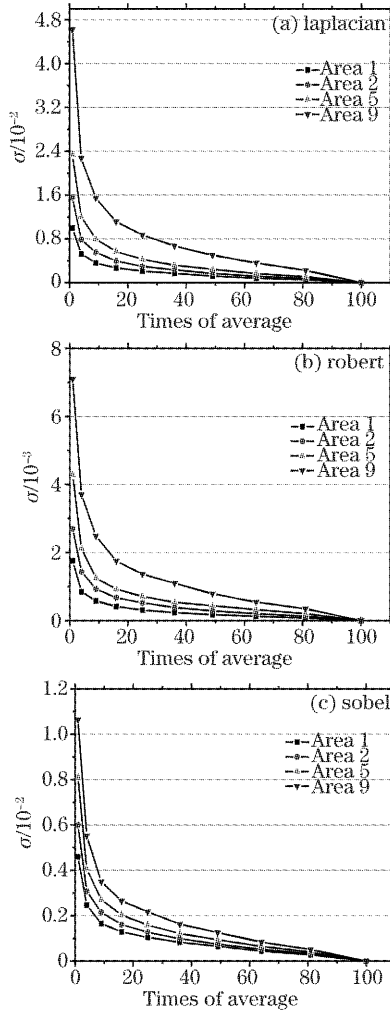


图 6 评价函数的均方根

Fig. 6 Root-mean-square of autofocus evaluation function

3.3 不同样品区域选取对于聚焦效果的影响

选取 3.1 节相同的简单样品,沿锐边对称选取不同区域(如图 7)进行比较,聚焦效果基本一致,但彼此之间存在微小的差别。图 8 是相应的实验结果。

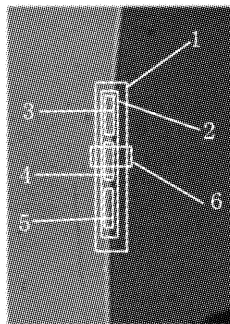


图 7 聚焦区域选择图

Fig. 7 Selected area for autofocus

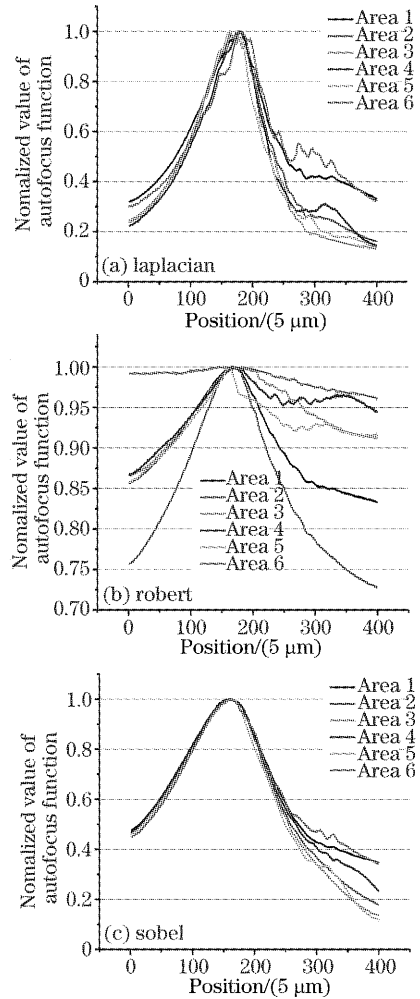


图 8 区域选择对聚焦效果的影响

Fig. 8 Influence of selected area on the position of focus

3.4 复杂样品成像研究

为研究整个平面的成像,进一步的实验中采用 3.2 节已采用过的多元蛋白质芯片样品(如图 9),图 10 是实验结果。

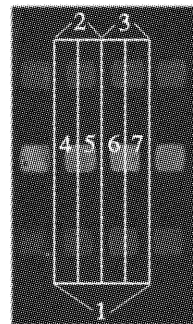


图 9 聚焦区域选择图

Fig. 9 Selected area for autofocus

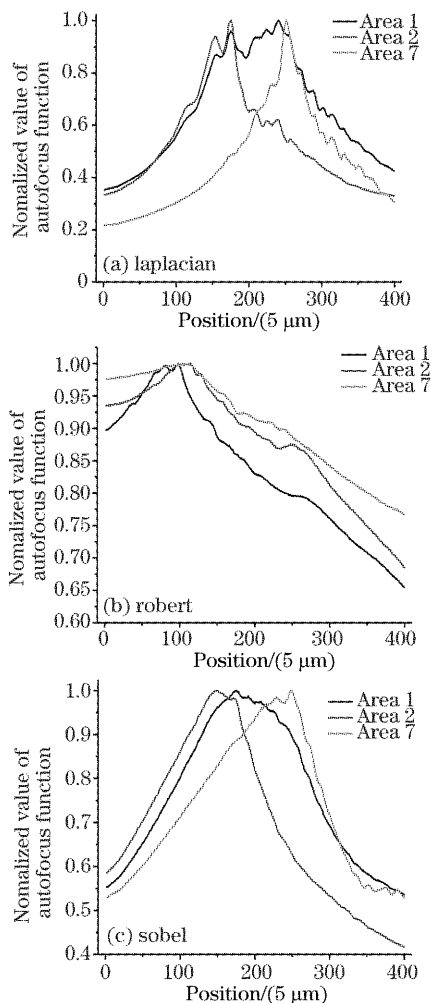


图 10 归一化的自动调焦评价函数值

Fig. 10 Normalized value of autofocus evaluation function

在研究上述问题中,注意到一个现象:随着选取的锐边位置(这里用选择框起始点位置表示)的变化,焦点位置呈现线性变化的过程。这种现象反应了一个基本事实:倾斜样品的聚焦面仍旧是平面,在理论上这很容易证明。为进一步验证上述结论,选取了更多的区域(图 11 中区域 1 到区域 7),获得了

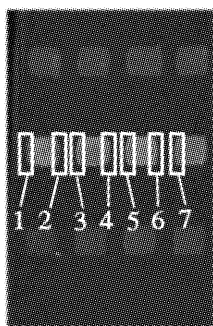


图 11 聚焦区域选择图

Fig. 11 Selected area for autofocus

类似的结果(如图 12)。

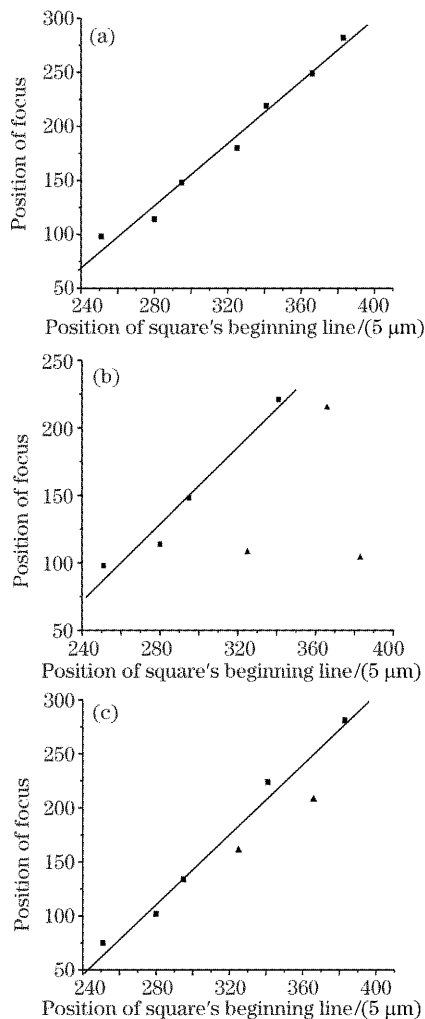


图 12 评价函数选择框起点和焦点位置的曲线

Fig. 12 Relationship of the position of focus and the position of square's beginning line

3.5 实验结果及讨论

通常的样品都是由若干快速变化的边和缓慢变化的面组成的,对聚焦评价函数而言,缓慢变化的面达不到聚焦的目的^[10],而快速变化的边才会形成聚焦函数的变化,这个原则在自动聚焦区域选择中具有普遍意义。

从图 3 可以看出,前三种聚焦评价函数[如图 3(a)]都有唯一的全局极大值,且位置基本重合,任意选取这三种函数中的一个都可以获得正确的聚焦效果,其中拉普拉斯评价函数的实验曲线尖锐程度最大。Vollath's F5 评价函数出现了异常,无法正确聚焦。

多幅平均的方法可以有效地抑制系统噪音,这在 3.2 节的实验(图 4)中得到了验证,当平均的次数达到 9 次时,σ 值降低到 1 次的一半以下。各聚

焦评价函数 σ 的具体数值有所区别,其中 Robert 评价函数的 σ 值最小,拉普拉斯评价函数的 σ 值最大。但是否可以定义一个 σ 值作为判别误差水平的指标,也比较牵强。随着平均次数的增加 σ 值也随之减小,但自动调焦的时间也会大幅增加,在实际工作中,取 9 次作为实际的平均次数,这样在高速度和低误差水平间可以获得一个折中。在完全不同的场景中我们也看到了类似结果(图 6)。同时在新的场景中发现一个现象: σ 随选取区域增加而变小。

不同样品区域选取对于聚焦效果的影响这个问题上,Robert 函数[图 8(b)]的结果最复杂,其中区域 6 没有正确聚焦;Sobel 函数[图 8(c)]的结果一致性相对较好,区域选取的影响很小;拉普拉斯评价函数[图 8(a)]在不同区域的选择中出现了两个不同的最大值,后续实验中了解到这是由于聚焦锐边有一定宽度,两个位置对应阶梯两侧的焦点位置。为了达到良好的一致性,Sobel 函数是最佳选择,选用拉普拉斯评价函数则必须非常清楚所获得焦点位置对应哪个细节。为了获得所需聚焦效果,针对实际样品,评价函数的选择尤为重要,区域的选择也应该仅围绕关心的细节。

对复杂样品研究中可以看到,从区域 1 到 7 (图 9)的拉普拉斯评价函数在整个聚焦过程中的变化[图 1(a)]可以发现,区域 1 拥有很多锐边,结果也有很多极大值,且极大值之间差别很小,这样的结果将导致自动聚焦失败。如果选取区域变化一致,如区域 7,结果就只有一个明显的极大值,这样就很容易找到焦点位置。在聚焦区域的选取上应本着尽量减少细节的原则。Sobel 评价函数都拥有唯一的极大值[图 10(c)],但是由于现在的样品是倾斜的,为了达到所需要的聚焦效果,区域的选择仍需综合考虑。Robert 评价函数的结果也拥有唯一的极大值[图 10(b)],但实验曲线的锐利程度显然不如另外两个函数。

倾斜样品的聚焦平面仍旧是平面,这一点在拉普拉斯函数的结果[图 12(a)]中得到了很好的验证,Sobel 函数[图 12(c)]中有两个点(图中用▲表示)出现了异常,观察实验曲线(区域 4~6),发现最大点附近有一个很宽的平台,此时噪音影响严重,很小的扰动就会使结果严重偏离。Robert 函数的结果[图 12(b)]有更多点出现异常。

4 结 论

通过以上一系列的实验和分析,看到拉普拉斯评价函数可以准确反映聚焦过程的实际情况,其他诸如 Robert 和 Sobel 评价函数也有类似效果。这三种函数中,拉普拉斯评价函数显得更为适用一些。这种现象的出现是由于该函数更能反应细节的变化,其他函数的平均效应比较强,对椭圆偏光学显微成像系统拉普拉斯评价函数拥有特殊的优势。采用多幅平均的方法可以降低噪音的影响,在当前的噪音水平下,只要平均次数达到 9 次以上,就可以达到非常满意的结果。利用自动调焦评价函数,实验中获得聚焦平面恰好落在成像平面上,反应了对于实验系统,自动聚焦评价函数是有效的。另外对于类似于椭圆偏光学显微倾斜成像系统的光学体系,尽量选取关心区域附近的细节,采用拉普拉斯评价函数就可以获得满意的聚焦效果。在今后的工作中将对自动调焦过程中的算法以及倾斜样品的像消除畸变进行深入研究,以进一步改善系统的工作状态。

参 考 文 献

- 1 H. Arwin. Spectroscopic ellipsometry and biology: recent developments and challenges[J]. *Thin Solid Films*, 1998, **313**~**314**: 764~774
- 2 G. Jin, Y. H. Meng, J. H. Xing *et al.*. Visualization of adsorbed biomolecular layers-one of ellipsometric micro-imaging applications[J]. *J. Test and Measurement Technique*, 1998, **12** (3): 166~171 (in Chinese)
靳 刚,孟永宏,邢建华等. 生物分子吸附膜层的图像显示——光学椭圆偏显微成像技术应用之一[J]. 测试技术学报, 1998, **12**(3): 166~171
- 3 L. M. Abrantes, G. Jin, M. Kalaji *et al.*. Self-assembled monolayers of ferrocenylthiols on gold: An electrochemical and optical characterization [J]. *Portugalia Electrochimica Acta*, 1999, **17**: 191~199
- 4 Gang Jin, Zhan-hui Wang, Yong-hong Meng *et al.*. Imaging ellipsometry for the visualization of biomolecular layers[J]. *Proc. 20th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 1998, **20**(2/6): 581~584
- 5 Wang Yang, Gan Fuxi. Optical constants of a new soluble subphthalocyanine spin-coated thin film[J]. *Chin. J. Lasers*, 2002, **A29**(3): 239~242 (in Chinese)
王 阳,干福熹. 新型可溶性亚酞菁旋涂薄膜的光学常数[J]. 中国激光, 2002, **A29**(3): 239~242
- 6 Geng Yongyou, Gu Donghong, Gan Fuxi. Study on the refractive index and absorption of azo nickel chelate thin film[J]. *Chin. J. Lasers*, 2004, **31**(9): 1091~1094 (in Chinese)
耿永友,顾冬红,干福熹. 偶氮金属镍薄膜的折射率和吸收特性研究[J]. 中国激光, 2004, **31**(9): 1091~1094
- 7 Wang Yong, Gu Donghong, Gan Fuxi. Refractive index and absorption of a new subphthalocyanine thin film[J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(5): 434~638 (in Chinese)

- 王 阳, 顾冬红, 于福熹. 亚酞菁薄膜的折射率和吸收特性[J]. 光学学报, 2001, **21**(5): 634~638
- 8 Xie Honglan, Chen Jianwen, Gao Hongyi *et al.*. Influence of incident energy on reconstructed atomic images in X-ray fluorescence holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(7): 1004~1008 (in Chinese)
谢红兰, 陈建文, 高鸿奕 等. X 射线荧光全息术中入射能量对原子像的影响[J]. 光学学报, 2004, **24**(7): 1004~1008
- 9 A. Santos, C. Ortiz de Solorzano, J. J. Vaquero *et al.*. Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis [J]. *J. Microscopy*, 1997, **188**: 264~272
- 10 Cao Fusheng, Qiou Yinggang. Automatic focusing photoelectric device [J]. *Optical Instruments*, 1986, **8** (1): 25 ~ 29 (in Chinese)
曹福生, 裘颖刚. 轮廓光电自动调焦系统[J]. 光学仪器, 1986, **8** (1): 25~29
- 11 Ren Sigang, Li Jianwei, Xie Lili. Automatic focusing technique based on gray scale difference method [J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2003, **30**(2): 53~55 (in Chinese)
- 任四刚, 李见为, 谢利利. 基于灰度差分法的自动调焦技术[J]. 光电工程, 2003, **30**(2): 53~55
- 12 Chen Yajun. Study of automatic focusing with Haar transform [J]. *Chin. J. Infrared Research*, 1987, **6**(3): 189~196 (in Chinese)
陈亚骏. 用 Haar 变换实现自动调焦的研究[J]. 红外研究, 1987, **6**(3): 189~196
- 13 Meng Yonghong, Jin Gang. The study for the auto-focusing of imaging ellipsometry system [J]. *J. Test and Measurement Technology of NCIT*, 2000, **14**: 220~225 (in Chinese)
孟永宏, 靳 刚. 椭偏光学显微成像系统自动调焦的研究[J]. 华北工学院测试技术学报(专刊), 2000, **14**: 220~225
- 14 Je-Ho Lee *et al.*. Implementation of a passive automatic focusing algorithm for digital still camera [J]. *IEEE Transactions on Consumer Electronics*, 1995, **41**(3): 449~454
- 15 N. Kehtarnavaza, H.-J. Oh. Development and real-time implementation of a rule-based auto-focus algorithm [J]. *Real-Time Imaging*, 2003, **9**: 197~203