

聚焦函数性能评价指标设计及最优函数选取

翟永平¹ 周东翔¹ 刘云辉² 刘 顺³ 彭科举¹

(¹ 国防科学技术大学电子科学与工程学院, 湖南 长沙 410073; ² 香港中文大学机械与自动化工程系, 香港)
³ 国防科学技术科技大学常州超媒体与感知技术研究所, 江苏 常州 213016

摘要 显微镜自动聚焦其核心问题在于聚焦函数的设计及选取, 针对目前自动聚焦函数选取缺乏客观定量标准的问题, 在分析聚焦函数曲线特征的基础上, 设计了陡峭区宽度、清晰度比率、陡峭度、平缓区波动量、局部极值因子和灵敏度等 6 个定量评价指标, 这些指标不仅能用于最优函数的选取, 还可以为新的聚焦函数的设计提供理论依据。然后, 以这些指标为依据, 对目前已经提出的 12 种典型聚焦函数的性能进行了定量评估, 评估过程考虑了图像内容多寡对聚焦函数性能的影响。最后以两阶段聚焦过程为例给出了最优函数: 在粗聚焦阶段, 方差函数为最优函数, 在精细聚焦阶段, Brenner 函数为最优函数。

关键词 显微术; 自动聚焦; 聚焦函数; 评价指标; 图像内容密度; 最优函数

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201131.0418002

Design of Evaluation Index for Auto-Focusing Function and Optimal Function Selection

Zhai Yongping¹ Zhou Dongxiang¹ Liu Yunhui² Liu Shun³ Peng Keju¹

¹ College of Electronics Science and Engineering, National University of Defense Technology, Changsha, Hunan 410073, China

² Department of Mechanical and Automation Engineering, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China

³ Changzhou Institute of Supermedia and Sensing Technology, National University of Defense Technology, Changzhou, Jiangsu 2130161, China

Abstract Selection of the optimal focusing function from a given set of focusing functions is an important issue in image-based auto-focusing that is usually used in automatic image acquisition systems, such as automatic microscopes, vision-based micro-operating robots, etc. However, there is no quantitative index available for evaluating the performance of the focusing functions. Six quantitative evaluation index, including the width of steep part of focusing curve, the ratio of sharpness, the steepness, the variance of flat part of focusing curve, the factor of local extreme and the sensitivity are designed. These index can not only been used in the selection of optimal focusing function, but also provide theoretical basis for the design of new focusing function. Then, twelve typical focusing functions are evaluated based on the quantitative evaluation index. Results show that the variance function is the optimal focusing function in coarse auto-focusing, while the Brenner function is the optimal focusing function in fine auto-focusing.

Key words microscopy; auto-focusing; focusing function; evaluation index; image content density; optimal function

OCIS codes 180.5810; 100.2000; 110.1085

1 引 言

自动聚焦是全自动显微成像中的一项关键技

术, 由于显微镜景深一般比较小, 比如采用 100 倍物镜、数值孔径为 1.25 时, 其景深一般小于 $1 \mu\text{m}^{[1]}$,

收稿日期: 2010-11-01; 收到修改稿日期: 2010-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(60975023)资助课题。

作者简介: 翟永平(1982—), 男, 博士研究生, 主要从事医学图像处理及医疗机器人等方面的研究。

E-mail: talkshow88@yahoo.cn

导师简介: 刘云辉(1965—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事机器人学、机电系统和计算机视觉等方面的研究。

E-mail: yhliu@mae.cuhk.edu.hk

因此聚焦精度要求比较高,基于测距原理的主动式聚焦由于受机械系统运动误差的影响一般无法满足要求。因此在显微镜自动聚焦中一般采用基于图像处理的被动式聚焦方式,这种方式不依赖于任何测距设备,仅利用已获取的序列数字图像分析当前系统的聚焦状态,并按照一定的搜索策略控制电机反复调节镜头或载物台位置,直到获取最清晰的图像。这种聚焦方式最关键的是图像聚焦状态的判断,目前比较成熟的方法是基于清晰度测度(或称聚焦函数)的方法,由于聚焦图像一般表现为细节(边缘)清晰,因此其梯度幅值也相对比较大,在频域则表现为其高频分量丰富,而离焦图像则比较模糊,其梯度幅值比较小,在频域其高频分量也相对较少。基于此原理,很多学者提出了形式多样的聚焦函数,典型的有灰度差分函数^[2]、Tenengrad 函数^[3]和方差函数^[4]等。

由于聚焦函数种类繁多,因此在实际应用中如何选取合适的函数成为一个关键问题。到目前为止,有很多学者对聚焦函数的性能进行了研究与评估^[5~14],但也存在几个问题:首先,对聚集函数的评价只有定性指标而没有客观的定量评价指标,比如,一般认为聚焦函数应该满足单峰性、无偏性和具有较高的灵敏度和信噪比,实际上,只要图像不存在多个清晰层面,大多数函数是满足单峰性的,而对于灵敏度和信噪比则没有定量的评价指标,对聚焦函数的评估大多是通过简单观察聚焦曲线得出函数性能的好坏,至于好了多少是无法从数值上反映出来的;其次,部分评价指标具有一定的片面性,而有些对聚焦过程非常重要的指标则没有得到重视,比如聚焦函数的陡峭区宽度(参见第2节)是一个非常重要的指标,它直接决定了聚焦步长的选取范围,但这个指标在以往的研究中没有得到重视,甚至有部分学者从提高灵敏度的角度得出聚焦函数应该具有较小的半宽度(实际上可以理解为陡峭度宽度),但这种提法是不严谨的,聚焦函数陡峭区宽度越小,聚焦步长的可选范围越小,这对大范围动态聚焦是非常不利的。再比如,以往的研究中单纯要求聚焦函数的最大值跟最小值具有较大的比值(本文定义为清晰度比率,参见第2节),实际上当清晰度比率达到一定程度时,其值再增加对聚焦性能的改善是没有任何帮助的,尤其是在粗聚焦过程中,相反,那些清晰度比率达到一定程度而且在平缓区抗噪性能比较强的聚焦函数往往能得到更为鲁棒的聚焦结果,因此,评价指标的定义要考虑实际的聚焦过程及不同的聚焦

阶段;最后,以往对聚焦函数的评价大多基于特定的图像,而忽视了图像内容的多寡对聚焦函数性能的影响,实际上图像内容对聚焦函数曲线形态的影响非常大,对同一个聚焦函数,当图像中内容比较丰富时,聚焦函数曲线比较陡峭,最大值也非常显著,而当图像内容比较少时,其最大值往往是不显著的,甚至会淹没在噪声中而无法找到真实的焦平面,因此,在聚焦函数的评估过程中图像内容的多寡也必须考虑在内。

针对以上问题,本文在分析聚焦函数曲线形态的基础上,定义了陡峭区宽度、清晰度比率、陡峭度、平缓区波动量、局部极值因子和灵敏度等6个定量评价指标,这些指标从不同的角度反映了聚焦函数某一方面的性能,为选取最优函数提供了评价依据。然后归纳总结了目前已提出的12种典型的聚焦函数,并以上述评价指标为依据,对这些函数进行了定量评估,评估过程考虑了不同图像内容对聚焦函数性能的影响。最后,以目前常用的两阶段聚焦过程为例,给出了在不同聚焦阶段选取最优函数的标准及相应的最优函数。

2 聚焦函数评价指标设计

在显微镜成像过程中,在焦平面处获取的图像最为清晰而在焦平面两侧获取的图像则逐步模糊。相应地,理想的聚焦函数应该在焦平面处取得最大值,而在焦平面附近随着图像模糊程度的加剧,聚焦函数值单调下降。在实际应用中,有部分函数的最大值并不在焦平面处取得,而是偏离了焦平面,这时如果以该函数为依据进行焦平面的搜索,那么系统将无法找到真正的焦平面。因此一个好的聚焦函数首先要满足其函数最大值跟实际焦平面重合这个特性,我们将聚焦函数的这种特性称为无偏性。如果聚焦函数满足了无偏性,那么不同聚焦函数的区别就体现在其函数曲线的具体形态存在较大差异,这些差异直接影响了自动聚焦的速度、精度及抗噪性能。定量评价指标设计就是为了客观定量地评估这些差异,依据这些指标,研究者可以根据具体要求选取合适的聚焦函数,另一方面,这些指标还可以为新的聚焦函数的设计提供参考。

1) 陡峭区宽度

在显微镜成像过程中,随着目标(或载物台)沿着光轴(z 轴)远离焦平面,图像越来越模糊,聚焦函数值也快速下降,当目标(或载物台)离开焦平面一定距离后,图像中几乎看不到任何内容,这时如果继

续远离焦平面,图像的清晰程度不会产生显著变化,相应地聚焦函数值的变化也非常缓慢,此时其值的波动主要是受随机噪声的影响。为了描述聚焦函数曲线的这种特性,我们将曲线划分为陡峭区和平缓区[图 1(a)],在陡峭区,目标(或载物台)位置的任何轻微改变都将引起聚焦函数值的剧烈变化,而在平缓区,目标(或载物台)位置的变化不会引起聚焦函数值的剧烈变化。陡峭区宽度主要受图像内容和聚焦函数的影响,当图像内容和聚焦函数确定时,其宽度近似为确定值,用 W_s 表示。平缓区分布在陡峭区两侧,分别称为左平缓区和右平缓区,左右平缓区跟陡峭区的分界点分别称为左临界点和右临界点,其坐标分别为 (z_{lcp}, f_{lcp}) , (z_{rcp}, f_{rcp}) , 其中横坐标代表载物台 z 轴的位置,纵坐标代表图像清晰度值。设 (z_i, f_i) (其中 $i = 1, 2, 3, \dots$) 为聚焦曲线上的离散点列,这些点列在聚焦曲线上的位置从左到右

排列,反映了图像由模糊到清晰再到模糊的过程,为了准确定位临界点,将满足以下条件的第一个点 (z_n, f_n) (从左到右的顺序)作为左临界点

$$\frac{f_n}{\bar{f}_{n-1}} > \gamma, \quad (1)$$

式中 γ 为比例系数,其取值大于 1, \bar{f}_{n-1} 为前 $n-1$ 个点的清晰度的平均值,即

$$\bar{f}_{n-1} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} f_i, \quad (2)$$

此时左临界点坐标 $z_{lcp} = z_n, f_{lcp} = f_n$ 。采用同样的方式按照从右至左的顺序可以获取右临界点的坐标。临界点确定后,陡峭区宽度 W_s 可由左右临界点横坐标的差值决定,即

$$W_s = |z_{lcp} - z_{rcp}|, \quad (3)$$

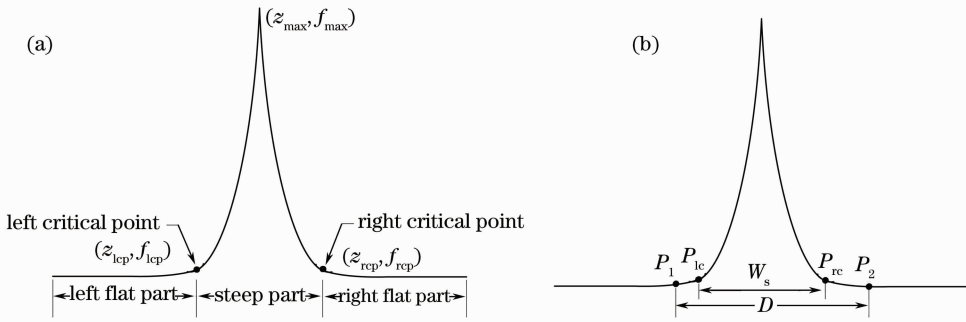


图 1 (a) 典型聚焦曲线形态及曲线中不同区域的划分, (b) 陡峭区宽度跟聚焦步长间的关系

Fig. 1 (a) Typical focusing curve and different parts in the curve, (b) relation between the width of the steep part and the the focusing step

陡峭区宽度 W_s 是一个非常重要的参量,它决定了聚焦过程最大步长 D_{max} 的选择,在以往的研究中,聚焦步长的选择非常随意,在两阶段或三阶段聚焦算法中(指将聚焦过程划分为两个或三个阶段,在第一个阶段,聚焦步长非常大,这是为了快速靠近焦平面,这个阶段也称为粗聚焦,在第二和第三个阶段,选用小步长,目的是获得精确的聚焦结果,这些阶段也称为精细聚焦),粗聚焦的步长往往选的非常大,但当聚焦步长大于一定值的时候,则会出现无法找到焦平面的情况,如图 1(b)所示,若粗聚焦步长 D 大于陡峭区宽度 W_s ,则聚焦过程会从 P_1 点直接“跨越”陡峭区到达 P_2 点,由于这两个点的函数值没有显著差异,因此聚焦过程会认为还没有达到陡峭区,从而一直向右搜索,使得搜索过程陷入“死循环”而无法找到焦平面。因此,为了保证在任何情况下聚焦过程都能到达陡峭区从而找到焦平面,聚焦

的最大步长必须小于陡峭区宽度,也即

$$D_{max} < W_s, \quad (4)$$

2) 清晰度比率

第二个参量为清晰度比率 R ,定义为聚焦函数最大值跟最小值的比率:

$$R = \frac{f_{max}}{f_{min}}, \quad (5)$$

式中 f_{max} 为聚焦函数的最大值, f_{min} 为聚焦函数的最小值,该最小值在平缓区取得,在实际应用中,平缓区采样点是有限的,因此 f_{min} 可以取这些有限点中函数的最小值。清晰度比率 R 表征了聚焦函数对不同离焦程度图像的分辨能力,清晰度比率 R 越大,清晰图像跟模糊图像清晰度值的差异越大,也就越容易分辨。

3) 陡峭度

图 2 给出了两个不同的聚焦函数曲线示意图,显然函数 F_2 的清晰度比率跟函数 F_1 的清晰度比

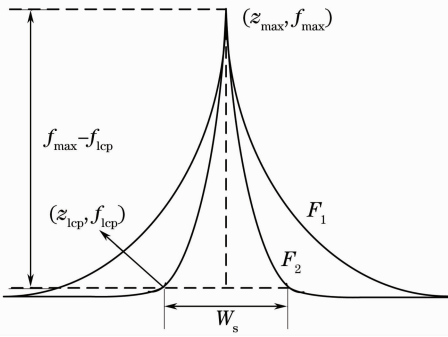


图 2 聚焦曲线陡峭度定义示意图

Fig. 2 Definition of steepness of focusing curve

率相同,但这两个函数曲线仍有显著差异,曲线 F_2 显得更为“陡峭”一些,而曲线 F_1 则相对平缓一些。同时注意到显微镜的前后景深存在差异,因此聚焦曲线的左右陡峭程度也是不同的,因此分别定义左陡峭度和右陡峭度来表征这种特性。左陡峭度定义为

$$S_L = \frac{2(f_{\max} - f_{lcp})}{W_s}, \quad (6)$$

式中 f_{\max} 为聚焦函数的最大值, f_{lcp} 为左临界点的聚焦函数值, W_s 为陡峭区宽度。同样,右陡峭度定义为

$$S_R = \frac{2(f_{\max} - f_{rcp})}{W_s}, \quad (7)$$

式中 f_{rcp} 为右临界点的聚焦函数值。那么,函数总的陡峭程度可以定义为左陡峭度和右陡峭度的均值

$$S_R = \frac{1}{2}(S_L + S_R) = \frac{2f_{\max} - f_{lcp} - f_{rcp}}{W_s}. \quad (8)$$

陡峭度参量也可以表征聚焦函数对不同离焦程度图像的分辨能力,但该参量考虑了陡峭区宽度对曲线形态的影响,因此在表征函数曲线形态方面更加贴切。

4) 平缓区波动量

由于受噪声及其它因素的影响,在平缓区聚焦函数值并不是单调增加或单调减小的,而是呈现一种波动状态(图 3),波动越剧烈说明该函数的抗噪

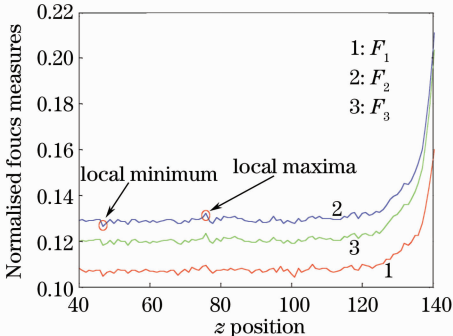


图 3 聚焦曲线平缓区局部极值

Fig. 3 Local extreme in flat part of focusing curve

性能越差,反之则说明该函数抗噪性能比较好。为了表征聚焦函数在平缓区波动的剧烈程度,定义平缓区波动量 V_f ,若平缓区采样点有 N 个,则 V_f 定义为这些点列函数值的标准差(式中 \bar{f}_f 为平缓区聚焦函数的均值),即

$$V_f = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (f_i - \bar{f}_f)^2}. \quad (9)$$

5) 局部极值因子

在实际聚焦过程中,平缓区往往存在非常多的局部极值,这会导致聚焦过程陷入局部极值而无法找到真实的焦平面,为了防止这种情况的发生,需要设置一个门限值,只有那些聚焦函数值发生显著改变的极值点才能作为全局极值,由于不同的聚焦函数其平缓区波动量是不同的,由此可知它们所需要的门限值也是不同的,将此门限值称为局部极值因子(LEF),并定义如下:

$$f_{LEF} = \frac{f_{L\max} - f_{L\min}}{f_{L\min}}, \quad (10)$$

式中 $f_{L\max}$, $f_{L\min}$ 分别代表平缓区的极大值和极小值。局部极值因子 LEF 也可表征聚焦函数在平缓区波动的剧烈程度,LEF 越小,函数抗噪性能越好。虽然平缓区波动量跟局部极值因子都可表征平缓区的波动程度,但后者还可以作为自动聚焦过程中的一个参量来防止聚焦过程陷入局部极值。

6) 灵敏度

在聚焦函数的最大值附近,若横坐标改变 ϵ ,则函数值会发生剧烈变化,不同的聚焦函数其变化的剧烈程度不同,如图 4 所示,当图中曲线 F_1, F_2 的横坐标同时改变 ϵ 时,曲线 F_2 函数值的变化 δ_2 远大于曲线 F_1 函数值的变化量 δ_1 。在精细聚焦过程中,最大值附近函数值变化越剧烈,越容易找到真实的焦平面,相反,如果最大值附近函数值变化较为缓和,则聚焦过程有可能停止在焦平面附近的虚假的焦平面上,当噪声影响较大时这种情况更为严重。这里

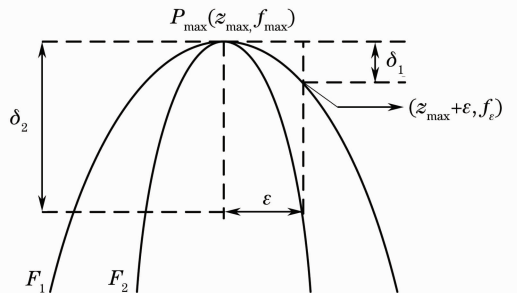


图 4 聚焦曲线灵敏度定义示意图

Fig. 4 Definition of sensitivity of focusing curve

用灵敏度来表征聚焦函数最大值附近的变化剧烈程度,灵敏度越高说明该函数的变化越剧烈,反之函数变化越缓和,灵敏度定义如下:

$$f_{\text{sen}} = \frac{f_{\text{max}} - f(z_{\text{max}} + \epsilon)}{f(z_{\text{max}} + \epsilon)}, \quad (11)$$

式中 f_{max} 为聚焦函数的最大值, $f(z_{\text{max}} + \epsilon)$ 为横坐标变化 ϵ 时的函数值,可以简记为 f_{ϵ} 。

3 典型聚焦函数

目前提出的聚焦函数非常多,这些函数可以分为三类:1)基于梯度的聚焦函数,这些函数通过计算图像在某种意义下的梯度幅值的统计量(比如梯度的算术平均值等),然后比较不同离焦深度图像的梯度幅值统计量的大小关系从而获取图像是否离焦的初步判断;2)基于频域的函数,这类函数一般通过傅里叶变换(或其它变换,如小波变换等)将图像转换到频域,通过分析图像高频分量从而获取图像清晰度的某种评价。由于清晰图像其频域表现为高频分量的增加,而随着图像离焦深度的增加,图像越来越模糊,其高频分量也随之减少,因此图像的离焦过程可以看成是一个低通滤波过程;3)基于图像统计信息及自相关的聚焦函数,这类函数最典型有方差函数、自相关函数等。由于基于频域的评价函数计算较为复杂,在实际中应用并不多。因此本文重点评估第一类和第三类聚焦函数。

3.1 基于梯度的聚焦函数

基于梯度的聚焦函数目前应用最为广泛,不同的函数之间的区别主要体现在梯度计算方式的不同,最简单的有灰度差分法和 Robert 梯度等,较复杂的有 Sobel 算子计算梯度,还有采用拉普拉斯算子计算梯度,实际上只要是能反映图像邻域灰度变化的任何算子都可以用来计算梯度,这也是为什么目

前聚焦评价函数种类繁多的原因所在。下面给出目前最常用的几种基于梯度的聚焦函数。

1) 灰度差分绝对值和(SMD)

$$F_{\text{SMD}} = \sum_{i,j} [|g(i,j) - g(i,j-1)| + |g(i,j) - g(i-1,j)|], \quad (12)$$

式中 $g(i,j)$ 代表图像在 (i,j) 点处的灰度值(以下同)。该函数由 Jarvis 等^[2]于 1976 年提出,是目前最简单的一种聚焦函数。

2) 图像的梯度能量(EOG)

$$F_{\text{EOG}} = \sum_{i,j} [|g(i,j) - g(i,j-1)|^2 + |g(i,j) - g(i-1,j)|^2], \quad (13)$$

该函数在 SMD 函数的基础上计算灰度差分的平方和,可以进一步增大函数的清晰度比率。

3) 基于 Robert 算子的差分绝对值和(简称 Robert 函数)

$$F_{\text{Robert}} = \sum_{i,j} [|g(i,j) - g(i+1,j+1)| + |g(i+1,j) - g(i,j+1)|]. \quad (14)$$

该函数跟 SMD 函数相似,不同的地方在于 SMD 仅仅考虑了水平和垂直差分,而 Robert 算子仅仅考虑正负 45° 方向的灰度差分。

4) 基于 Robert 算子的梯度能量(简称 RbtEnergy 函数)

$$F_{\text{RbtEnergy}} = \sum_{i,j} [|g(i,j) - g(i+1,j+1)|^2 + |g(i+1,j) - g(i,j+1)|^2]. \quad (15)$$

5) 基于 Sobel 算子的函数(简称 Sobel 函数)

$$F_{\text{Sobel}} = \sum_{i,j} [|G_x(i,j)| + |G_y(i,j)|], \quad (16)$$

式中 $G_x(i,j)$ 和 $G_y(i,j)$ 分别为图像 x, y 方向的一阶 sobel 算子差分,计算如下:

$$G_x(i,j) = [g(i+1,j-1) + 2g(i+1,j) + g(i+1,j+1)] - [g(i-1,j-1) + 2g(i-1,j) + g(i-1,j+1)], \quad (17)$$

$$G_y(i,j) = [g(i-1,j+1) + 2g(i,j+1) + g(i+1,j+1)] - [g(i-1,j-1) + 2g(i,j-1) + g(i+1,j-1)]. \quad (18)$$

由于 Sobel 算子结合了高斯平滑和微分,所以其结果对噪声有很强的稳健性。

6) Tenengrad 函数

$$F_{\text{Tenengrad}} = \sum_{i,j} [G_x^2(i,j) + G_y^2(i,j)]. \quad (19)$$

该函数也是基于 Sobel 算子,由 Tenenbaum^[3]于 1974 年提出,由于对水平及垂直差分进行了平方

运算,因此其清晰度比率也大为增强,该函数在很多自动聚焦系统中都得到应用。

7) 图像的拉普拉斯能量(EOL)

$$F_{\text{EOL}} = \sum_{i,j} [g(i-1,j) + g(i+1,j) + g(i,j-1) + g(i,j+1) - 4g(i,j)]^2. \quad (20)$$

该函数首先利用拉普拉斯算子计算图像的二阶梯度,然后对梯度幅值进行平方运算。

8) SML 函数

该函数由 Nayar^[15]于 1994 年提出,它是在拉普拉斯算子的基础上进行了部分改进,计算 x, y 方向二阶差分绝对值之和的平方。该函数抗噪性能也比较好,在很多自动聚焦系统中得到应用:

$$F_{\text{SML}} = \sum_{i,j} [|2g(i,j) - g(i-1,j) - g(i+1,j)| + |2g(i,j) - g(i,j-1) - g(i,j+1)|]^2. \quad (21)$$

9) Brenner 函数^[16]

$$F_{\text{Brenner}} = \sum_{i,j} |g(i,j) - g(i+2,j)|^2. \quad (22)$$

该函数计算梯度的方式跟其他函数有所不同,它利用与当前像素间隔 1 pixel 的点计算图像梯度,实际上也可以理解为计算二阶梯度。

3.2 基于统计信息及自相关的聚焦函数

基于图像统计信息的聚焦函数目前数量较少,比较典型的有自相关函数及方差函数,另外,也有部分学者提出了基于图像信息熵的函数,但该函数抗噪性能非常差,不具有实际应用价值。下面重点介绍三个函数。

1) Vollaths 函数

$$F_{\text{Vol}} = \sum_{i,j} g(i,j) |g(i+1,j) - g(i+2,j)|. \quad (23)$$

该函数由 Vollaths^[17]于 1988 年提出,是典型的基于自相关的函数。在众多基于相关的函数中,该函数性能较为优异。

2) 方差函数(Var)^[4]

$$F_{\text{Var}} = \sum_{i,j} [g(i,j) - \bar{g}]^2, \quad (24)$$

式中 \bar{g} 为图像灰度的均值,由于清晰图像一般比模糊图像具有更大的灰度级差异,因此图像灰度方差的大小可以用来反映图像的清晰程度。

3) 归一化方差函数(NorVar)

$$F_{\text{NorVar}} = \frac{1}{\bar{g}} \sum_{i,j} [g(i,j) - \bar{g}]^2. \quad (25)$$

该函数在方差函数的基础上利用灰度均值进行了归一化。

4 性能评估

4.1 图像数据获取

本文采用自行研发的高精度自动调焦实验平台(如图 5 所示)采集图像数据。调焦平台的主要性能

参数如下:1)传动机构采用 LinEng 公司高精度步进电机和 THK 公司滚珠丝杠,调焦机构理论最小步长可达 $0.02 \mu\text{m}$;2)图像采集系统采用高清 CCD 相机,相机传感器尺寸 $2/3 \text{ inch}$ ($1 \text{ inch} = 2.54 \text{ cm}$),分辨率 $1.41 \times 10^6 \text{ pixel}$;3)光路系统采用奥林巴斯光学显微镜,采用柯拉照明,物镜放大倍率为 100 倍(油镜),数值孔径 1.25,理论景深为 $0.5 \mu\text{m}$ 。测试条件如下, CPU: Intel Core(TM)2 E7400@2.80 GHz, 内存: 2 GB;软件采用 VC6.0 编程实现。

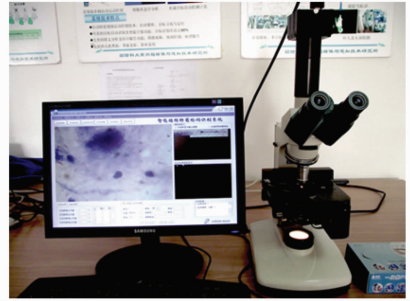


图 5 自行研发的显微镜自动调焦系统

Fig. 5 Our auto-focusing system of microscope

以显微镜焦平面为原点采集 1 副图像,然后在焦平面左右两侧各采集 98 副图像,相邻图像间的步长为 $0.4 \mu\text{m}$,略小于显微镜景深,这样可以获得非常精细的分析结果。所用标本为肺结核病人的痰涂片样本,为了更具一般性,在大量标本中选取了两组典型样本,样本按照所观察图像中内容的多寡分别以 A, B 标记,其中 A 样本图像内容非常丰富, B 样本图像内容较少。这样,我们获取了两组图像数据,每组有 197 副图像,图 6 给出了每组图像中三副典型图像,分别为深度离焦图像、离焦图像和清晰图像。

4.2 数据归一化

对以上采集的两组图像,计算每副图像的聚焦函数值,那么该图像采集时对应的 z 轴位置(或索引号)和其聚焦函数值所组成的二维坐标构成了聚焦函数曲线上的一个个离散点。为了便于比较不同聚焦函数的性能,一般需要对函数值进行归一化,需要指出的是这里的归一化方式跟很多文献中的归一化方式不同,目前常用的归一化方式有单个函数归一化,也即将每个函数的最大值设置为 1,函数的其它值相应的进行缩放即可,这是目前用的最多的归一化方式,但这种方式存在的明显缺陷:无法看出不同函数清晰度比率的相对关系,函数性能的优劣不易观察;还有一种是多个函数统一归一化绘制,也即将所有函数整体考虑,选取函数的最大值并设置为 1,

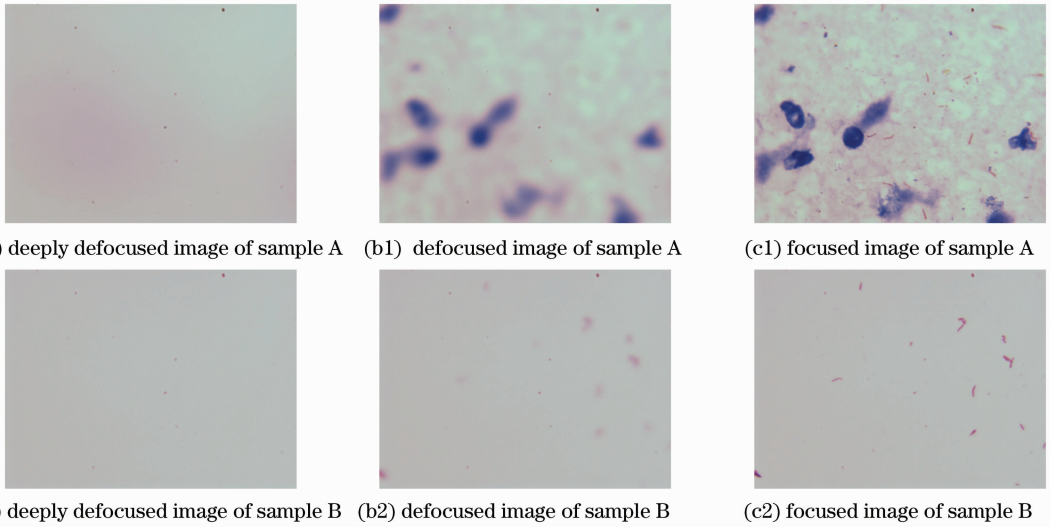


图 6 图像内容丰富程度不同的两组图像及其在不同离焦深度情况下的图像样本

Fig. 6 Images captured under different defocusing level from two different samples with high image content density and low image content density respectively

然后将其他函数的函数值进行相应的缩放,这种方式可以突出函数值较大的点跟函数,但对于函数值较小的点跟函数则无法观察它们的清晰度比率关系。这里的归一化的原则为:函数曲线必须能反应函数的清晰度比率关系,也即归一化后函数的最大值之比应该和清晰度比率之比相一致。设归一化的函数共有 n 个,第 i 个函数用 $f_i (0 \leq i \leq n-1)$ 表示,其清晰度比率为 R_i ,其最大值记为 f_i^{\max} 。依据以上原则,函数 f_i 跟 f_j 的最大值跟清晰度比率应该满足如下关系:

$$\frac{f_i^{\max}}{f_j^{\max}} = \frac{R_i}{R_j}. \quad (26)$$

假设第 j 个函数的清晰度比率 R_j 是所有函数中清晰度比率最大的一个,则将第 j 个函数的最大值设置为 1,也即 $f_j^{\max} = 1$,那么第 i 个函数的最大值

$$f_i^{\max} = \frac{R_i}{R_j} \cdot f_j^{\max} = \frac{R_i}{R_j}. \quad (27)$$

获取函数最大值后,该函数的其他值则进行相

应的缩放即可,设 f_i^m 为第 i 个函数归一化后的第 m 个函数值,假设其原始值为 F_i^m ,则

$$f_i^m = F_i^m \cdot \frac{f_i^{\max}}{F_i^{\max}}, \quad (28)$$

式中 F_i^{\max} 为第 i 个函数归一化前的最大值。经过归一化后,不同函数的最小值相等,而最大值则反应了它们清晰度比率间的相对关系。需要指出的是,这里的数据归一化是为了聚焦曲线的显示方便,而对于函数具体性能指标的数值分析没有任何影响。图 7 给出了以上 12 种聚焦函数对 A 组样本的归一化聚焦曲线,曲线横坐标为图像采集时所对应的 z 轴位置索引,焦平面处索引号为零,每隔 $0.4 \mu\text{m}$ (也即图像采集间隔)索引号增 1 或减 1,曲线纵坐标为归一化的聚焦函数值。其中图 7(a) 给出一 $98 \sim 98$ 共 197 副图像的聚焦曲线全貌,为了方便观察,图 7(b) 选取陡峭区局部进行放大显示。图 8 为 12 种聚焦函数对 B 组样本的归一化聚焦曲线。

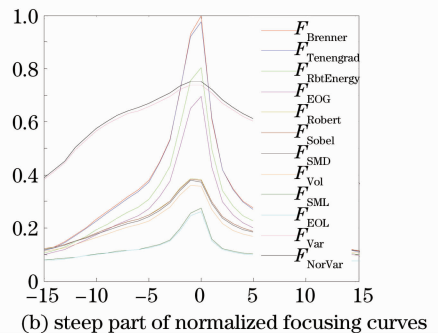
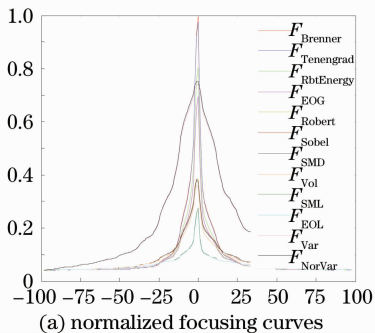


图 7 12 个典型聚焦函数对 A 组样本对的聚焦曲线

Fig. 7 Focusing curves of 12 typical focusing functions for images of sample A

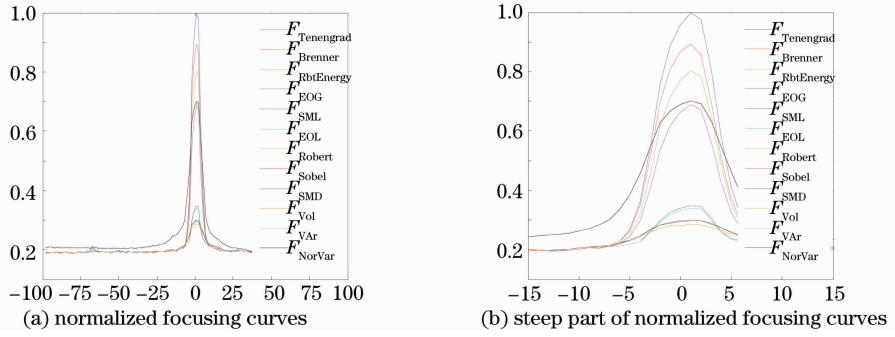


图 8 12 个典型聚焦函数对 B 组样本对的聚焦曲线

Fig. 8 Focusing curves of 12 typical focusing functions for images of sample B

4.3 性能定量评估

分别计算 A, B 两组样本聚焦函数曲线的陡峭区宽度、清晰度比率、陡峭度、平缓区波动量、局部极值因子及灵敏度等 6 个评价指标值, 结果分别如

表 1, 2 所示。为了评估函数的计算复杂度, 在表中还给出了聚焦函数值的计算时间 T (单位为 ms)。分析表中数据, 可以得出如下结论:

表 1 A 组样本聚焦函数曲线的 6 个评价指标值

Table 1 Values of evaluation index for curve of focusing function of sample A

	R	W_s	S	V_f	f_{LEF}	f_{Sen}	T
$F_{Brenner}$	23.865	66	5.705	0.001	0.070	1.391	47.533
$F_{Tenengrad}$	23.306	60	6.269	0.001	0.056	1.331	64.350
$F_{RbtEnergy}$	19.181	62	6.002	0.002	0.070	1.360	51.569
F_{NorVar}	17.942	178	2.423	0.001	0.032	0.102	52.173
F_{Var}	17.628	178	2.421	0.001	0.032	0.101	51.802
F_{EOG}	16.570	66	5.585	0.002	0.077	1.337	50.350
F_{Robert}	9.249	80	4.344	0.005	0.080	0.295	50.624
F_{Sobel}	9.161	84	4.136	0.004	0.078	0.289	51.006
F_{SMD}	9.019	80	4.330	0.005	0.080	0.295	50.264
F_{Vol}	8.620	84	4.095	0.005	0.090	0.337	49.157
F_{SML}	6.595	74	4.445	0.006	0.101	1.258	55.416
F_{EOL}	6.278	74	4.399	0.006	0.103	1.189	52.599

表 2 B 组样本聚焦函数曲线的 6 个评价指标值

Table 2 Values of evaluation index for curve of focusing function of sample B

	R	W_s	S	V_f	f_{LEF}	f_{Sen}	T
$F_{Tenengrad}$	5.341	14	22.720	0.003	0.112	0.247	65.319
$F_{Brenner}$	4.779	14	20.091	0.003	0.098	0.287	48.061
$F_{RbtEnergy}$	4.291	12	24.951	0.003	0.095	0.239	52.457
F_{Var}	3.762	36	7.698	0.002	0.035	0.108	51.914
F_{NorVar}	3.747	36	7.707	0.002	0.034	0.108	52.075
F_{EOG}	3.679	12	23.631	0.003	0.084	0.226	51.610
F_{SML}	1.863	10	17.469	0.007	0.058	0.146	51.173
F_{EOL}	1.813	10	16.858	0.007	0.058	0.142	53.315
F_{Robert}	1.600	14	10.003	0.007	0.054	0.038	51.299
F_{Sobel}	1.599	14	10.016	0.007	0.054	0.037	51.362
F_{SMD}	1.589	14	9.908	0.007	0.053	0.037	51.020
F_{Vol}	1.521	14	9.134	0.007	0.048	0.037	49.178

1)按照清晰度比率大小对函数进行分类,那么以上 12 个函数可以分为两类,第一类有 F_{Brenner} , $F_{\text{Tenengrad}}$, $F_{\text{RbtEnergy}}$, F_{Var} , F_{NorVar} 和 F_{EOG} ,这类函数的清晰度比率普遍比较大,而其他 6 个函数的清晰度比率远小于第一类的函数,称为第二类函数。比如对 A 组样本,第一类的 F_{Brenner} 其清晰度比率为 23.865,而第二类的 F_{EOL} 其清晰度比率为 6.278。另外,当图像内容的多寡改变时,清晰度比率的大小排序会发生局部变化,比如对 A 组样本(图像内容丰富), F_{Brenner} 的清晰度比率略大于 $F_{\text{Tenengrad}}$,而对 B 组样本(图像内容较少), $F_{\text{Tenengrad}}$ 的清晰度比率则大于 F_{Brenner} ,但该类中其他函数的排序则未发生变化。这种由图像内容变化导致类内排序发生的变化在第二类函数中表现得非常明显,比如对 A 组样本, F_{SML} 在第二类函数中排在第 5 位,而对 B 组样本,该函数则排在第二类函数中的第 1 位。

2)方差函数 F_{Var} 和归一化方差函数 F_{NorVar} 的陡峭区宽度明显大于其他 10 个函数,比如对 A 组样本, F_{Var} 和 F_{NorVar} 陡峭区宽度均为 178,该宽度值约为其他函数陡峭区宽度的 2.5~3 倍。从图 7(a)也可观察出,当其他函数还处于平坦区时,方差函数和归一化方差函数早进入了陡峭区,这种特性对于大范围聚焦是非常有利的。分析 B 组样本数据也可得出同样的结论。

3)在所有函数中,方差函数 F_{Var} 和归一化方差函数 F_{NorVar} 的陡峭度是最小的,这种特性也可从图 7(a),(b)和图 8(a),(b)中观察出来,在显微镜经历从离焦到聚焦的过程中,这两个函数值的增大过程表现得较为缓和,而其他函数则首先经历“漫长”的平缓波动过程,到了陡峭区则函数值“突然”增加。另外,从表 1 和表 2 数据对比可发现,当图像内容较丰富时(表 1),除了方差函数和归一化方差函数外,其他函数的陡峭度差距不大,但当图像内容较少时(表 2),函数的陡峭度分化较为严重。

4)清晰度比率较大的函数其平缓区波动量则相应地较小,从表 1 和表 2 可见,在结论 1)中划分为第一类的函数其平缓区波动量明显小于第二类函数,尤其注意到方差函数和归一化方差函数的平缓区波动量是所有函数中最小的,这种特性对于大范围聚焦是非常有利的。

5)局部极值因子的大小没有呈现出一定的规律性,这是由于该指标受随机噪声影响非常大,在该

指标的定义中明确表明,该指标的主要用途是作为自动聚焦过程中的一个参量来防止聚焦过程陷入局部极值,一般情况下,为了得到更为鲁棒的结果,可以在该值的基础上进行适当的放大,以抵抗聚焦过程中局部极值的影响。

6)灵敏度最高的几个函数为 F_{Brenner} , $F_{\text{Tenengrad}}$, $F_{\text{RbtEnergy}}$, F_{EOG} , F_{SML} 和 F_{EOL} ,其中前 4 个函数灵敏度差距不大,而后 2 个灵敏度则稍低于前 4 个。其它剩余的 6 个函数灵敏度则远低于前 6 个函数,表明这几个函数不适合应用在精细聚焦中。

7)表中最后一列给出了函数的计算时间,计算条件为:CPU: Intel Core(TM)2 E7400@2.80 GHz;内存:2 GB;计算环境为 VC6.0;图像大小为 800 pixel×600 pixel。从计算结果可以看出: $F_{\text{Tenengrad}}$ 函数的计算时间明显大于其他函数, F_{Brenner} 和 F_{Vol} 函数的计算时间略小于其他函数。由于该结果是在特定计算机上测试获得的,当测试条件改变时,计算结果会发生变化。更一般的函数复杂度分析需要从函数本身出发进行分析,比如要分析函数需要多少个加法、多少乘法等。文献[18]给出了部分聚焦函数的计算复杂度分析,读者可以参考。

4.4 图像内容对聚焦函数的影响

从以上数据分析结果来看,图像内容的多寡对聚焦函数性能的影响非常大,表现在以下几个方面:

1)图像内容越丰富,函数的陡峭区宽度越大,清晰度比率越高,相应地灵敏度也会越高,这种情况下,自动聚焦的难度较小。而当图像内容减少时,相应的指标会降低,这给自动聚焦造成非常大的困难。

2)当图像内容比较少时,函数的陡峭度明显增大,这是由于函数陡峭度宽度急剧降低所致。

3)内容较少的图像其平缓区波动量明显大于内容丰富的图像,这是由于内容较少时随机噪声的影响将增加,这种情况下,为了保证大范围聚焦的成功,必须选取平缓区波动量相对小的函数,并选取合适的局部极值因子以防止自动聚焦陷入局部极值。

图 9 给出了内容丰富程度不同的图像,其中图 9(a),(b)的图像是以上定量评估过程中的样本 A 和样本 B 中的清晰图像,而图 9(c)中的图像也来自肺结核病人标本,但该图像中图像内容非常少。图 10 给出了这 3 组样本对同一个聚焦函数的聚焦曲线,显然,当图像内容发生变化时,聚焦函数的性能及相应的指标也发生了很大变化。

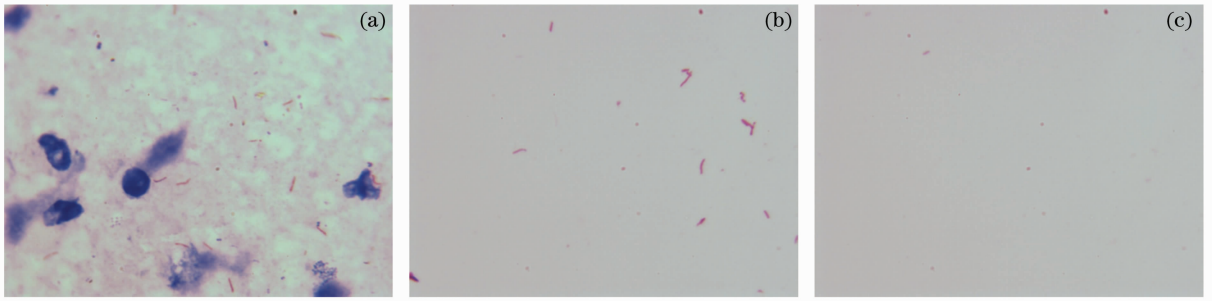


图9 图像内容丰富程度不同的图像。(a)图像内容丰富,(b)图像内容较少,(c)图像内容极少

Fig.9 Images with (a) high contents (b) median contents and (c) low contents

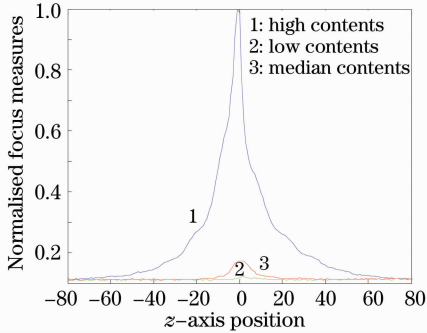


图10 内容丰富程度不同的图像序列其聚焦函数曲线形态比较

Fig.10 Images sequence and curve of their focusing functions with high contents, median contents and low contents respectively

4.5 最优函数选取

通过以上指标的定量分析发现,当一个聚焦函数其单项指标优于其它函数时,该函数的其他指标未必也优于其它函数。虽然在以往的研究中,有学者对聚焦函数进行综合评分得出最优函数^[11],但我们认为这种方式并不可取,打分的标准和对应的权重不好设置,当权重设置不好时往往会得出不符合实际的结论,综合得分高的函数未必能取得好的聚焦效果,实际情况是往往那些综合得分不高但单项性能指标好的函数能反而能取得较好的效果。

根据实际自动聚焦过程选取最优函数,在显微镜大范围自动聚焦过程中,至少要经历两个阶段,第一个阶段为粗聚焦阶段,由于显微镜载物台(或物镜)的初始位置跟焦平面之间的位置关系往往是不知道的,在很多情下载物台甚至离焦平面非常远,因此在粗聚焦阶段的关键问题就是快速靠近焦平面附近,这个过程的聚焦步长往往比较大,因此就要求聚焦函数有较大的陡峭区宽度以适应大步长聚焦,同时聚焦函数的平缓区波动量不能太大以防止聚焦陷入局部极值,结合以上指标定量分析发现,方差函数和归一化方差函数均满足要求,这两个函数的各

项性能基本一致,唯一的区别就是归一化方差函数的计算复杂度略高于方差函数,因此可将方差函数作为粗聚焦阶段的最优函数。当载物台靠近焦平面后,聚焦进入第二个阶段,这个阶段的关键问题是聚焦的精度,这就要求聚焦函数必须有足够高的灵敏度以找到真实的焦平面。结合指标定量分析发现, Tenengrad 函数和 Brenner 函数均满足要求,这两个函数的各项性能指标也基本一致,但 Tenengrad 函数的计算复杂度略高于 Brenner 函数,因此可将 Brenner 函数作为精细聚焦阶段的最优函数。最后,需要指出的时,虽然图像内容对聚焦函数性能有很大影响,但图像内容的多寡对最优函数的选取没有任何影响,也即无论图像内容多还是少,最优聚焦函数是不变的。

5 结 论

自动聚焦是全自动显微成像中的一项关键技术,其核心问题在于聚焦函数的设计及选取,针对目前自动聚焦函数选取缺乏客观定量标准的问题,本文以显微镜自动聚焦为背景,在分析聚焦函数曲线的基础上,设计了陡峭区宽度、清晰度比率、陡峭度、平缓区波动量、局部极值因子和灵敏度等6个评价指标,这些指标从不同的角度反映了聚焦函数某一方面的性能,为最优函数的选取提供了评价依据。然后归纳总结了目前已经提出的12种典型的聚焦函数,并以所设计的评价指标为依据,对这些函数的性能进行了定量评估,评估过程考虑了不同图像内容对聚焦函数性能的影响。最后,以目前常用的两阶段聚焦过程为例,给出了不同聚焦阶段的最优函数:在粗聚焦阶段,方差函数为最优函数,在精细聚焦阶段, Brenner 函数为最优函数。需要指出的是,本文虽然以两阶段自动聚焦过程为例给出了最优函数,但是实际情况可能存在很多变化,这依赖于具体的聚焦策略,因此在实际应用中研究者可以根据自

身需求选取合适的聚焦函数,而选取的标准仍然是本文提出的6个评价指标,只不过不同的应用对这些指标的侧重程度不同而已。因此,本文所提的6个评价指标为聚焦函数性能的评估及最优函数的选取提供了基本的理论依据。

参 考 文 献

- 1 K. R. Spring, M. W. Davidson. Depth of Field and Depth of Focus [DL]. <http://www.microscopyu.com/> 2010
- 2 R. A. Jarvis. Focus optimization criteria for computer image processing [J]. *Microscope*, 1976, **24**(2): 163~180
- 3 J. M. Tenenbaum. Accommodation in Computer Vision [D]. USA: Stanford University, 1970
- 4 G. J. Chen, M. F. Zhu, Y. K. Wang *et al.*. Study on definition evaluation function based on image contrast variation [C]. In: Proc the 2007 Annual Conference on International Conference on Computer Engineering and Applications, Australia, 2007, 254~258
- 5 FC. A. Groen, Young I, G. Lightart. A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms [J]. *Cytometry*, 1985, **6**(2): 81~91
- 6 Chen Lu, Xu Wendong, Zhu Qing. A novel focus servo module in hybrid magneto-optical recording testing system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(5): 1341~1346
陈 璐, 徐文东, 朱 青. 光磁混合存储动态测试系统中的聚焦伺服模块研究[J]. *光学学报*, 2009, **29**(5): 1341~1346
- 7 Fan Fuming, Cheng Lianglun, Wang Xiaofen *et al.*. A new type of high-speed automatic focusing system [J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2010, **37**(5): 127~132
范富明, 程良伦, 王晓芬 等. 一种新型光学快速自动聚焦系统 [J]. *光电工程*, 2010, **37**(5): 127~132
- 8 Qu Yufu, Pu Zhaobang, Zhao Huijie *et al.*. Influence factor analysis of sensitivity of focus criteria function [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(7): 902~906
屈玉福, 浦昭邦, 赵慧洁 等. 调焦评价函数灵敏度的影响因素分
- 析[J]. *光学学报*, 2005, **25**(7): 902~906
- 9 Gao Chao, Zhu Hongjun, Guo Yongcai *et al.*. A focusing criterion function based on edge point counting [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(s2): 163~167
高 潮, 朱红军, 郭永彩 等. 一种基于边缘点计数的聚焦评价函数 [J]. *中国激光*, 2009, **36**(s2): 163~167
- 10 Hu Fengping, Chang Yilin, Ma Yanzhuo *et al.*. Development of the video automatic focus method [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(10): 1901~1906
胡凤萍, 常义林, 马彦卓 等. 视频自动聚焦的实现研究 [J]. *光子学报*, 2010, **39**(10): 1901~1906
- 11 A. Santos, C. O. Solorzano, J. J. Vaquero *et al.*. Evaluation of autofocus functions in molecular cytogenetic analysis [J]. *J. Microscopy*, 1997, **188**(3): 264~272
- 12 Y. Sun, S. Duthaler, B. J. Nelson. Autofocusing algorithm selection in computer microscopy [C]. In: Proc Intelligent Robots and Systems, 2005 (IROS 2005) Aug 2-6, 2005: 70~76
- 13 J. M. Russell, T. S. Douglas. Evaluation of autofocus algorithms for tuberculosis microscopy [C]. In: Proc 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS Cité Internationale Lyon, France, August 23-26, 2007: 3489~3492
- 14 B. S. Luthi, N. Thomas, S. F. Hwiid *et al.*. An efficient autofocus algorithm for a visible microscope on a Mars lander [J]. *Planetary and Space Science*, 2010, **58**(10): 1258~1264
- 15 S. K. Nayar, Y. Nakagawa. Shape from focus [J]. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1994, **16**(8): 824~831
- 16 J. F. Brenner, B. S. Dew, J. B. Horton *et al.*. An automated microscope for cytological research: a preliminary evaluation [J]. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 1976, **24**(1): 100~111
- 17 D. Vollath. Automatic focusing by correlative methods [J]. *J. Microscopy*, 1987, **147**(3): 279~288
- 18 J. Sun, Y. H. Yuan, C. Y. Wang. Comparison and analysis of algorithms for digital image processing in autofocusing criterion [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(1): 35~39
孙 杰, 袁跃辉, 王传永. 数字图像处理自动图像聚焦算法的分析和比较 [J]. *光学学报*, 2007, **27**(1): 35~39