

基于双波长像面数字全息显微的微通道检测

陶思勤, 孔明, 刘维*, 徐佳男, 程付霞, 刘凯璇, 杨泽秋

中国计量大学计量测试工程学院, 浙江 杭州 310018

摘要 针对微流控芯片通道三维形貌的可视化测量需求, 搭建了一套反射式离轴双波长像面数字全息显微测量系统。首先, 利用分辨率靶和标准样片对系统的横向、纵向分辨率和放大倍数进行标定实验, 结果表明双波长全息显微系统在横向宽度及纵向深度测量中具有较好的准确性和可行性。然后, 利用该系统分别对由 PDMS 材料制成的直通通道、圆形小室结构微流控芯片以及硅基底微流控芯片通道进行三维形貌检测, 并得到定量结果: 直通通道结构深度为 48.6 μm , 宽度为 75.8 μm ; 圆形小室微通道深度为 48.5 μm , 宽度为 76.6 μm ; 硅基底微流控芯片测量得到通道深度为 61.6 μm 。上述结果与白光干涉仪的测量结果具有良好的一致性, 说明双波长全息显微系统具有较高的可靠性和准确性, 可为微流控芯片微通道检测提供新的成像检测方法。

关键词 全息; 微流控芯片; 微通道; 像面全息; 双波长全息显微

中图分类号 O438.1

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS221540

1 引言

微流控芯片 (microfluidic chip) 作为微全分析系统发展的一种稳定、高集成性、低耗性分析平台, 近年来在化学、生物基因分析、医学检测等领域具有广泛的应用^[1-3]。微通道在微流控芯片中起着“容器”的作用, 通道的构型、长宽深等尺寸精度直接影响微流控系统中样品种类、通样量以及进样速率^[4-5], 因此对微流控芯片通道的三维形貌检测具有十分重要的意义。

微流控芯片光学检测方法主要有荧光检测法、吸收光度检测法等^[6], 它们能够实现微通道内部生化样品、试样分子的检测, 但考虑到微流控通道的尺寸和微流体的光学特性, 传统的成像检测方法无法满足通道内部无接触、动态检测等要求。数字全息显微技术作为一种新型三维成像技术, 其对于物光路中光程差较为敏感, 可以将物体的相位以及振幅信息通过 CCD 记录成全息图, 还原物体的三维形貌并进行测量分析, 具有无接触、噪声低、速度快等优势^[7], 近年来被广泛应用于微流控芯片的显微检测。Zhou 等^[8]采用在线数字全息显微技术研究微流控芯片内粉煤灰的粒度分布, 对记录到的大量全息照片进行相位重建和测量分析; di Leonardo 等^[9]将数

字全息显微术应用于微流控实验系统成像领域, 成功捕获微流控通道中探针粒子的全息图像。但目前的研究大多集中于对微流控芯片通道内部样品溶液、细微颗粒物和生物细胞等样品的相关特性研究, 对通道本身的研究还比较少^[10]。

为实现不同微流控芯片微通道的三维形貌测量, 本文将展开基于数字全息显微^[11-12]成像技术的微通道显微检测方法研究, 搭建了一套反射式离轴双波长像面数字全息显微实验系统, 并标定了系统的横向、纵向分辨率和实际放大倍数。最后, 基于该系统对 3 种不同结构微流控芯片的通道结构进行三维形貌检测, 利用两步相除法校正相位畸形, 计算得到通道的深度与宽度, 并开展了基于白光干涉测量法的比对研究, 结果表明, 利用两种方法测得的微通道轮廓参数吻合较好, 为微流控芯片的前期加工优化和后续的质量评估提供一定的参考。

2 双波长数字全息显微测量原理

双波长数字全息显微测量方法的基本原理即利用两束不同波长 λ_1, λ_2 的物光 μ_1, μ_2 和参考光 γ_1, γ_2 分别进行干涉, 在 CCD 面上形成干涉图, 记录的干涉图 $H_i(x, y)$ 可表示为

$$H_i(x, y) = \left| \mu_i(x, y) + \gamma_i(x, y) \right|^2 = \mu_i(x, y)\mu_i^*(x, y) + \gamma_i(x, y)\gamma_i^*(x, y) + \mu_i(x, y)\gamma_i^*(x, y) + \mu_i^*(x, y)\gamma_i(x, y), i = 1, 2, \quad (1)$$

收稿日期: 2022-07-27; 修回日期: 2022-09-12; 录用日期: 2022-10-08; 网络首发日期: 2022-10-18

基金项目: 国家自然科学基金 (52076200)

通信作者: *liuw@cjl.u.edu.cn

式中: (x, y) 为全息图的坐标; $\mu_i(x, y)$ 为 CCD 平面的物光波; $\gamma_i(x, y)$ 为 CCD 平面的参考光波; * 表示复共轭。第二个等号右边的前两项组成零级衍射项, 第三项为 +1 级项即物体的原始像, 最后一项为 -1 级项即物体的共轭项。在全息图的频谱上, 由于参考光与物光之间存在一定的夹角, 式(1)的上述 4 项在全息图的频谱中都是不重叠的, 因此可以采用频谱滤波的办法将物体的原始像提取出来^[10]。

采用离轴像面^[13]的方法记录全息图, 像面全息图的记录平面与物体的像平面处于同一平面, 再现距离为 0, 因此像面全息图的重建无需模拟参考光照射物体, 即无需进行衍射传播计算就能得到像面的信息。在得到分离的频谱后, 直接通过傅里叶逆变换, 结合两步相除法^[14]对物体相位进行畸变校正, 得到的原始物光场可表示为

$$O_i(x_o, y_o) = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}[h(x, y)]_{\text{filter}}\}, \quad (2)$$

式中: $O_i(x_o, y_o)$ 表示畸变校正后的原始物光场; \mathcal{F} 表示傅里叶变换; \mathcal{F}^{-1} 表示傅里叶逆变换。由式(2)可得, 原始物光场的强度分布为 $|O_i(x_o, y_o)|^2$, 原始物光场的相位分布为

$$\phi_{\text{orig}} = \arctan\left\{\frac{\text{Im}[O_i(x_o, y_o)]}{\text{Re}[O_i(x_o, y_o)]}\right\}. \quad (3)$$

以反射型待测物体为例, 假设其折射率为 n , 波长为 λ , 物体表面某点处高度为 h , 那么物体相位 ψ 与高度 h 的关系式为

$$\psi = 4\pi nh/\lambda. \quad (4)$$

由于反正切函数自身周期的影响以及待测样品表面高度可能超过一个相位周期, 此时的相位 ψ 为包裹相位, 在 $[-\pi, \pi]$ 之间, 需对其进行解包裹得到物体真实相位 ϕ_i 。双波长解包裹^[15]是将两种波长 λ_1, λ_2 对应的包裹相位相减, 即

$$\Psi_i = \Psi_1 - \Psi_2 = 4\pi nh/\lambda_1 - 4\pi nh/\lambda_2 = 4\pi nh(1/\Delta), \quad (5)$$

式中: Δ 为等效波长,

$$\Delta = |\lambda_1 - \lambda_2|/(\lambda_1 \lambda_2). \quad (6)$$

那么被测物体某处的高度为

$$h = \Delta(\lambda_1 - \lambda_2)/(4\pi). \quad (7)$$

从式(5)可以看出, ϕ_i 可看作波长为 Δ 的照明光照射物体后物体的相位分布, 其中 ϕ 的范围为 $[-2\pi, 2\pi]$ 。在区间 $[-2\pi, 0]$ 的值加上 2π , 对物体相位进行 2π 补偿, 最终得到物体连续的相位分布。由上述分析可知, 双波长像面全息显微测量系统可以有效解决单波长深度测量范围小的问题, 有效避免了单波长解包裹算法带来的误差, 且可以突破单波长对于高度阶跃变化过大或者表面形貌极其复杂的物体测量的限制^[16-19]。

3 实验研究

3.1 实验装置

本实验采用反射式离轴双波长像面数字全息显微

实验系统, 系统主要由氦氖激光器、可调谐半导体激光器、CCD、显微物镜组成。其中: 两个激光器分别是波长为 632.8 nm 的氦氖激光器和波长范围为 634~643 nm 的可调谐半导体激光器; 选取波长 635.32 nm, 由式(6)计算可得等效波长为 131.93 μm 。CCD 的有效像素为 2608 pixel \times 1950 pixel, 像元尺寸为 2.775 $\mu\text{m} \times$ 2.775 μm ; 显微物镜放大倍率为 10 \times , 数值孔径为 0.25。实验装置如图 1 所示。

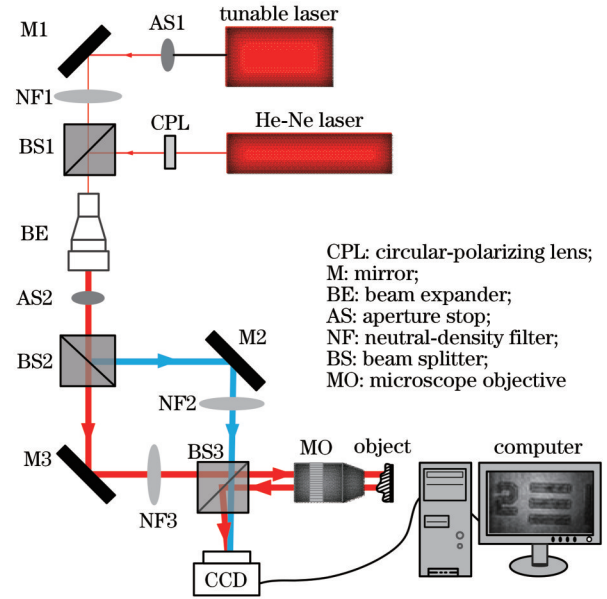


图 1 实验装置原理图

Fig. 1 Schematic of experimental apparatus

激光器发出的两路激光光束的路径要求完全重合, 以实现不同波长下激光共路; 再经过准直扩束器 BE, 确保两束激光照射在物体的同一位置上。共路激光分别通过衰减镜 NF1、偏振分光棱镜 CPL 后经过分光棱镜 BS1 到达准直扩束器 BE, 经 BS2 分光为两路, 其中一路成为参考光经反射镜 M2、衰减镜 NF2 到达 CCD 平面, 另一路作为物光经反射镜 M3 和衰减镜 NF3 以及显微物镜 MO 后到达物体表面, 之后携带物体相位以及振幅信息的物光波反射回 MO, 显微物镜将信息转换为球面波经分光棱镜 BS3 到达 CCD 表面, CCD 将物光通过显微物镜形成的聚焦像记录下来, 并与参考光波进行干涉, 形成像面全息图, 后经计算机处理。

利用两个不同波长合成更大等效波长的双波长数字全息显微技术具有快速、非接触、更大深度测量范围的特征。为了分析和验证测量系统的准确性和可行性, 采用 1951 USAF 分辨率靶、一维栅格标准样板和段差标准片分别对系统的实际放大倍数、横向分辨率和纵向深度进行标定。

1) 实际放大倍数标定

采用 1951 USAF 分辨率靶图案对全息显微系统进行标定, 如图 2(a) 所示, 首先利用 CCD 拍摄该组合测试靶第 6 组第 5 对元素 (线宽为 4.92 μm) 的全息图,

并进行数值再现,得到图 2(b)所示的分辨率靶再现强度图。然后将该元素右边线对作为观察区域,如图 2(c)所示,选取线对的第三条竖线作为实际放大倍数的

标定区域,经计算该条竖线的宽度为 24 pixel,因而其测量宽度为 $66.6 \mu\text{m}$,由此计算得到系统的实际放大倍数为 13.5 倍。

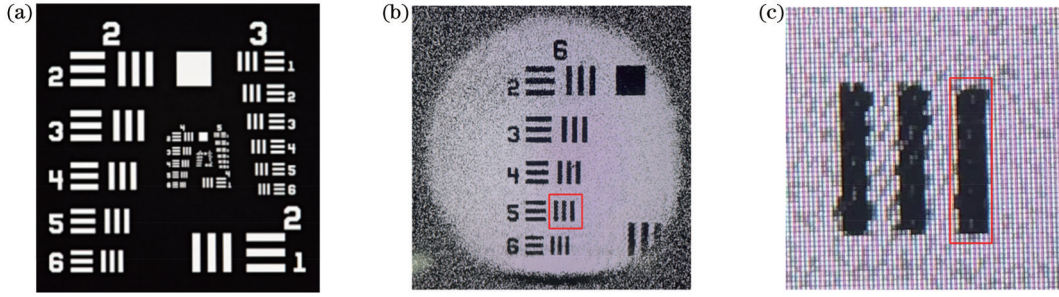


图 2 放大倍数标定实验结果。(a)测试靶 1951 USAF 图案;(b)第 6 组元素强度图;(c)第 5 对线对局部放大强度图
Fig. 2 Magnification calibration experimental results. (a) Test target 1951 USAF pattern; (b) element intensity image of group 6; (c) locally magnified intensity image of the 5th pair of lines

2) 横向分辨率标定

在数字全息显微的实际应用中,需先对系统的横向分辨率进行验证。为此,利用分辨率靶和微纳米一维栅格标准样板对其进行标定。栅格标准样板的拓扑结构如图 3 所示,其中:A 区域为循迹定位标识;B 区域由两个二维栅格组成,主要用来校准高精密仪器;C 区域有 4 种可以用来校准系统横向分辨率的一维栅格结构,尺寸规格分别 200 nm 、 500 nm 、 $1 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 。

利用 CCD 分别拍摄上述分辨率靶第 7 组元素以及标准样板 C 区域中线宽为 $1 \mu\text{m}$ 和 $5 \mu\text{m}$ 的区域,并对其进行数值再现,结果如图 4 所示。图 4(a)所示为分辨率靶第 7 组元素的再现相位,从图中可以清晰分辨出第 6 对元素(线宽为 $2.2 \mu\text{m}$)的横线、竖线相位分布情况;对于一维栅格样板结构,图 4(b)清晰再现了

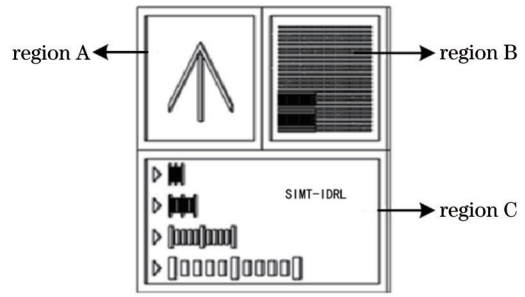


图 3 微纳米一维栅格结构示意图
Fig. 3 Schematic of micro-nano one-dimensional grid structure

线宽为 $5 \mu\text{m}$ 区域的相位,但线宽为 $1 \mu\text{m}$ 的栅格已无法清晰分辨,如图 4(c)所示。结合以上实验结果,该数字全息显微系统在 $10\times$ 显微物镜下的横向分辨率可达 $2.2 \mu\text{m}$ 。

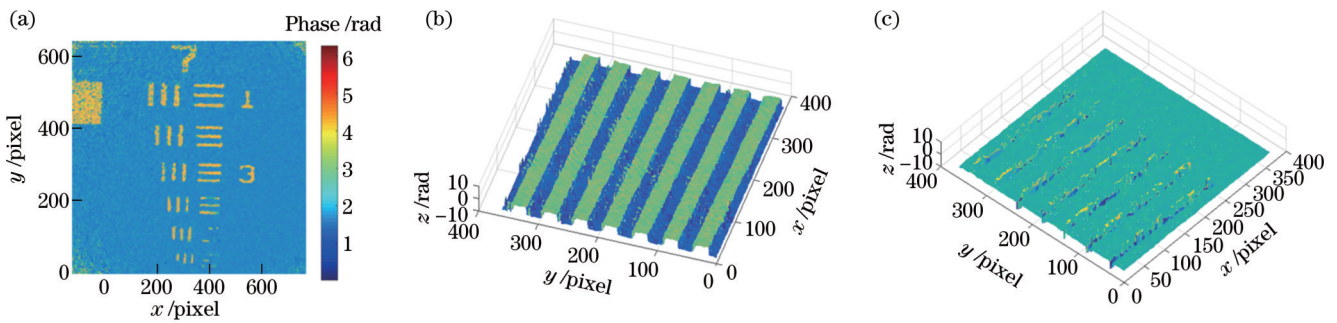


图 4 横向分辨率标定实验结果。(a)分辨率靶第 7 组元素再现相位;(b) $5 \mu\text{m}$ 线宽栅格再现相位;(c) $1 \mu\text{m}$ 线宽栅格再现相位
Fig. 4 Experimental results of transverse resolution calibration. (a) Reproduction phase of group 7 element in the resolution target; (b) phase reproduction of grid with $5 \mu\text{m}$ line width; (c) phase image reproduction of grid with $1 \mu\text{m}$ line width

3) 段差标准片 $20.79 \mu\text{m}$ 校准面的测量

双波长数字全息显微系统具有更大深度测量范围的特征,利用标定值为 $20.79 \mu\text{m}$ 的段差标准样片对该系统的纵向深度开展标定实验。图 5(a)为该标准样片的三维深度图,图 5(b)所示为段差标准片的平均高度曲线,测量得到样片整体直边段差高度为 $19.9 \mu\text{m}$,

相对误差为 4.2% 。

利用分辨率靶和标准样片完成系统的标定实验,其测量结果说明了双波长数字全息显微系统在横向精度及纵向深度测量中具有较高的准确性,从而提升了数字全息显微测量系统的测量性能,拓宽了其测量范围。

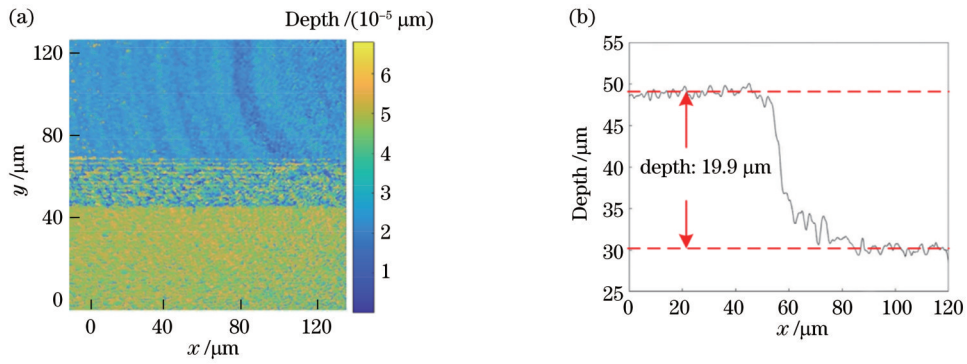


图 5 段差标准片测量结果。(a)深度图;(b)高度曲线

Fig. 5 Measurement results of segment difference standard film. (a) Depth image; (b) height graph

3.2 微流控芯片微通道的测量

利用双波长像面数字全息显微系统对不同材料和形状的微流控芯片微通道进行测量,包括由 PDMS 材料制成的直通道、圆形液相小室微流控芯片以及硅基

底微流控芯片,如图 6(b)(c)中 region 1、region 2、region 3 所示。分别对这 3 种不同结构的微通道进行拍摄测量,为了便于对比,并与白光干涉显微测量结果进行对比分析。

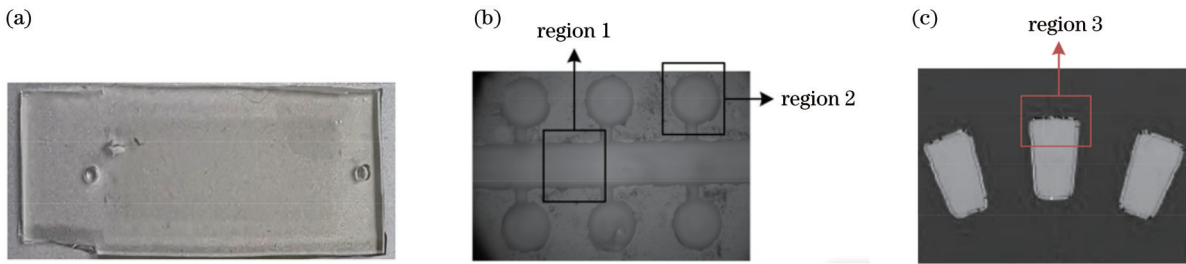


图 6 芯片实物图与结构图。(a) PDMS 芯片实物图;(b) 50×放大下的 PDMS 芯片通道;(c) 硅基底芯片通道放大结构图

Fig. 6 Chip physical diagram and structure diagram. (a) PDMS chip physical diagram; (b) PDMS chip channel at 50× magnification; (c) enlargement structure diagram of silicon substrate chip channel

对于直通道结构的微流控芯片,分别拍摄不同波长下的物体全息图和参考全息图,如图 7 所示,同时利用两步相除法^[14]对各波长下的再现像相位进行畸变校正,得到图 8 所示的包裹相位图,其中图 8(a)、(b)分别对应 632.8 nm 和 635.32 nm 两种波长的结果,将两个单波长下的包裹相位相减得到等效波长下包裹相位分

布,如图 8(c)所示。其中依然有间断相位,这是因为相减过程中出现小于 0 的相位。利用 2π 补偿法对其进行补偿,得到直通道的三维形貌如图 9(b)所示,可看出相位均展开已无包裹。将通道深度图[图 9(a)]上沿 x 轴方向所有列的深度数据相加并求出平均值、画出截面曲线,从而计算得到被测样品的平均深度。

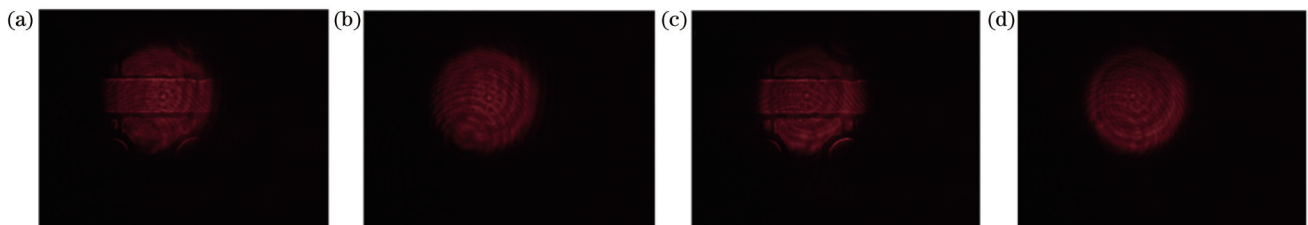


图 7 不同波长下的直通道全息图。(a) 632.8 nm 通道全息图;(b) 632.8 nm 参考全息图;(c) 635.32 nm 通道全息图;(d) 635.32 nm 参考全息图

Fig. 7 Straight channel holograms under different wavelengths. (a) 632.8 nm channel hologram; (b) 632.8 nm reference hologram; (c) 635.32 nm channel hologram; (d) 635.32 nm reference hologram

为了便于分析,将系统测量值与白光干涉仪对直通道平均深度进行对比测试,通道轮廓参数测试结果如图 9(c)实线所示,比较结果如表 1 所示。可以看到,两种方法的宽度平均相对误差为 3.7%,深度平均相

对误差为 2.8%,测量结果具有良好的一致性,说明双波长数字显微系统能够得到精确的相位分布,具有良好的微通道检测能力。

利用上述系统对圆形液相小室结构的微通道进行

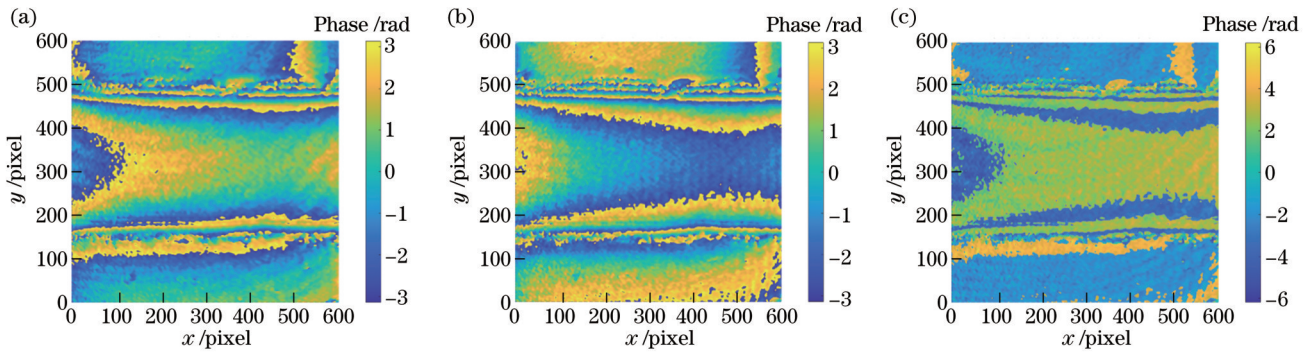


图 8 直通通道包裹相位图。(a) 632.8 nm 包裹相位；(b) 635.32 nm 包裹相位；(c) 等效波长相位分布

Fig. 8 Wrapped phase images of straight channel. (a) Wrapped phase for 632.8 nm; (b) wrapped phase for 635.32 nm; (c) equivalent wavelength phase distribution

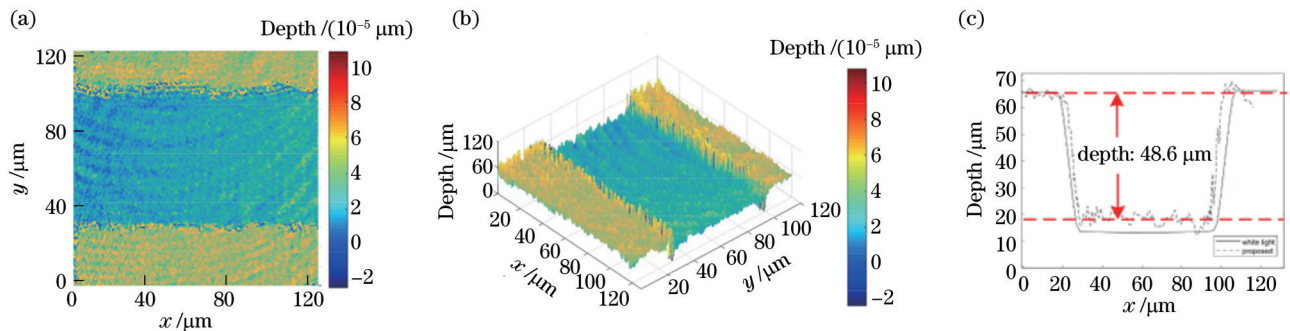


图 9 直通通道测量结果图。(a) 深度图；(b) 三维形貌图；(c) 对比实验结果

Fig. 9 Straight channel measurement results. (a) Depth image; (b) three-dimensional topography image; (c) compare experimental result

表 1 微流控芯片直通通道三维形貌测量结果对比

Table 1 Comparison of three-dimensional topography measurement results of microfluidic chip straight channel

Measurement method	Width / μm	Depth / μm
Dual-wavelength digital holography	75.8	48.6
White light interferometry	78.7	50.0

测量时,由于制作过程中样品阶跃高度较大部分稍有平整,这部分在表面形貌重构时,强度和相位图边缘出现强烈的高低起伏现象,因此经相位畸变校正后通过中值滤波^[19]算法得到圆形小室微通道的三维深度图、三维形貌图以及深度截面曲线图,分别如图 10(a)~(c)

所示。取其沿中间对称线的高度分布得到该结构的深度约为 48.5 μm ,同时计算得到该对称线的宽度即圆形最大直径(76.6 μm)。将双波长像面数字全息显微系统与白光干涉仪的测量结果进行对比,结果如表 2 所示,两种方法对宽度和深度测量结果基本吻合,平均相对误差均为 3.0%,证明了本文方法的有效性。

对硅基底微流控芯片的微通道进行拍摄,即图 6 (c)中 region 3 区域,测得该区域三维深度图、三维形貌图以及深度截面曲线(取所有列高度的平均值)如图 11 所示。利用所提系统测得该部分微通道的深度为 61.6 μm ,利用白光干涉仪测得的高度为 60 μm ,相对

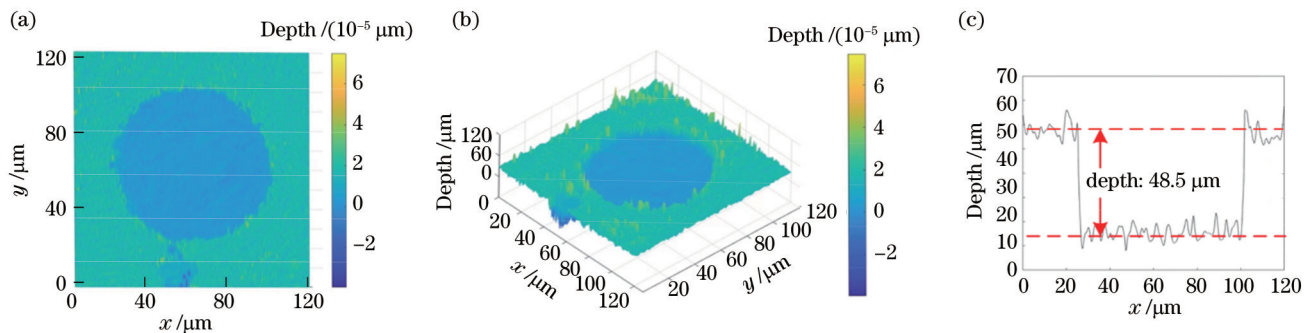


图 10 圆形小室测量结果。(a) 深度图；(b) 三维形貌图；(c) 截面曲线图

Fig. 10 Circular chamber measurement results. (a) Depth image; (b) three-dimensional topography image; (c) sectional graph

表 2 微流控芯片圆形小室通道三维形貌测量结果对比

Table 2 Comparison of three-dimensional topography measurement results of circular chamber channels in microfluidic chips

Measurement method	Width / μm	Depth / μm
Dual-wavelength digital holography	76.6	48.5
White light interferometry	78.9	50

误差为 2.7%。

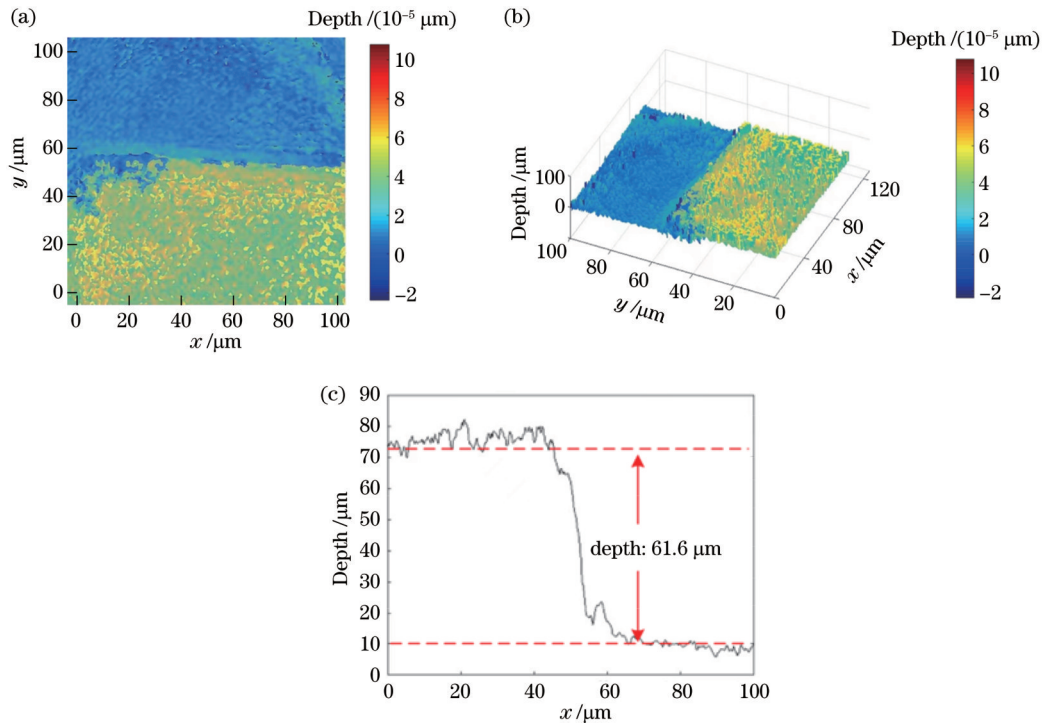


图 11 硅基底芯片测量结果。(a)深度图;(b)三维形貌图;(c)截面曲线图

Fig. 11 Silicon substrate chip measurement results. (a) Depth image; (b) three-dimensional topography image; (c) sectional graph

4 结 论

针对微流控芯片内部结构微通道的检测,在数字全息显微技术理论的基础上,构建反射式离轴双波长像面数字全息显微测量装置,展开微流控芯片通道三维形貌测量的研究。该装置通过分辨率靶和标准样片标定实验,表明系统在横向宽度及纵向深度的测量中具有较好的准确性。在上述理论分析和实验验证的基础上将实验装置用于微流控芯片通道的三维形貌检测,通过记录两种波长下的物体全息图,结合两步相除法和 2π 补偿法定量恢复了测量表面的相位分布,得到不同结构微通道的宽度和深度信息,并展开与白光干涉显微测量的对比研究,对比测量结果具有较好的一致性,从而进一步验证了双波长数字全息术用于物体形貌测量的有效性,为数字全息显微技术用于微流控芯片的前期加工优化和后续的质量评估提供一定的参考。在对芯片通道结构本身的研究基础上,所提系统可以推广到利用数字全息显微术对微流控芯片通道内

由以上实验结果可知,所提系统的横向分辨率可达 $2.2\ \mu\text{m}$,使用相应相位畸变校正算法以及中值滤波算法减少干扰,可提高系统相位测量精度。对于不同通道宽度、深度的测量误差范围均在4%以下,准确再现了微通道的相位分布以及面型分布。该系统结合了光的干涉来提升成像性能,极大拓展了测量应用领域,特别对于微米级尺度细胞结构得以可视化研究有着重要的意义。

部反应液、生物细胞、生物切片样品等进行特性研究,从而扩大数字全息显微术的应用范围。此外,为提高数字全息显微测量精度,近年来人们采用不同形式的结构光照明^[3]进行了大量研究。在对硬件光路结构不断改进和完善的同时,也可以对相位畸变校正以及相位补偿算法进行优化,突破传统算法局限,达到更高的显微测量精度水平。谨望本文的工作能为微通道的检测提供新的思路,对生物医学成像领域提供有益的参考。

参 考 文 献

- [1] 魏巍, 武瑞君, 桑晓冬, 等. 微流控技术研究的可视化分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2022, 39(3): 551-560.
Wei W, Wu R J, Sang X D, et al. Visualization analysis of microfluidics research status[J]. Journal of Biomedical Engineering, 2022, 39(3): 551-560.
- [2] Yourassowsky C, Dubois F. High throughput holographic imaging-in-flow for the analysis of a wide plankton size range[J]. Optics Express, 2014, 22(6): 6661-6673.
- [3] 王阳, 张美玲, 王宇, 等. 部分相干照明的数字全息显微技术及应用[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(18): 1811005.

- Wang Y, Zhang M L, Wang Y, et al. Partially coherent illumination-based digital holographic microscopy and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 48(18): 1811005.
- [4] 李俊昌, 桂进斌, 宋庆和, 等. 像面数字全息物体像的完整探测及重建[J]. *光学学报*, 2022, 42(13): 1309001.
Li J C, Gui J B, Song Q H, et al. Complete detection and reconstruction of object image in image plane digital holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(13): 1309001.
- [5] 林炳承, 秦建华. 微流控芯片分析化学实验室[J]. *高等学校化学学报*, 2009, 30(3): 433-445.
Lin B C, Qin J H. Analysis laboratory based on a microfluidic chip[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2009, 30(3): 433-445.
- [6] 孙薇, 陆敏, 李立, 等. 微流控芯片技术应用进展[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2019, 42(3): 221-224.
Sun W, Lu M, Li L, et al. Application progress on microfluidic chip technology[J]. *Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine*, 2019, 42(3): 221-224.
- [7] 黄柳. 基于数字全息的微结构形貌测量关键技术研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2021.
Huang L. Research on key techniques of microstructure topography measurement based on digital holography[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2021.
- [8] Zhou H, Yang Z, Yao Z G, et al. Application of digital holographic microscopy and microfluidic chips to the measurement of particle size distribution of fly ash after a wet electrostatic precipitator[J]. *Flow Measurement and Instrumentation*, 2018, 60: 24-29.
- [9] di Leonardo R, Leach J, Mushfique H, et al. Multipoint holographic optical velocimetry in microfluidic systems[J]. *Physical Review Letters*, 2006, 96(13): 134502.
- [10] 王喆. 微流控芯片定量检测的数字全息显微成像技术研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2018.
Wang Z. Quantitative microscopy and tomography in microfluidics by digital holography[D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2018.
- [11] 邓丽军, 黄星艳, 曾吕明, 等. 基于双色 LED 芯片的双波长像面数字全息显微术[J]. *光学学报*, 2018, 38(1): 0111004.
Deng L J, Huang X Y, Zeng L M, et al. Dual-wavelength image-plane digital holographic microscopy based on Bi-color LED chips[J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(1): 0111004.
- [12] 曾雅楠, 汪飞, 雷海, 等. 双波长数字显微像面全息术测量微结构表面形貌[J]. *光学学报*, 2013, 33(10): 1009001.
Zeng Y N, Wang F, Lei H, et al. Surface profile measurement of microstructures based on dual-wavelength digital microscopic image-plane holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2013, 33(10): 1009001.
- [13] 吴海钰. 基于像面数字全息的物体动态形变测量研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2020.
Wu H Y. Research on object dynamic deformation measurement based on image-plane digital holography[D]. Chongqing: Chongqing University of Technology, 2020.
- [14] 邹惠莹. 数字全息测量微结构表面形貌算法研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
Zou H Y. Study on algorithm of digital holography with application to microstructure topography measurement[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2014.
- [15] 王羽佳, 江竹青, 高志瑞, 等. 双波长数字全息相位解包裹方法研究[J]. *光学学报*, 2012, 32(10): 1009001.
Wang Y J, Jiang Z Q, Gao Z R, et al. Investigation on phase unwrapping in dual-wavelength digital holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(10): 1009001.
- [16] 陈波, 白倬宁, 赵亚迪, 等. 双波长数字全息法测量物体三维形貌[J]. *华北理工大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(4): 120-124.
Chen B, Bai Z N, Zhao Y D, et al. Measurement of three-dimensional morphology of objects by dual wavelength digital holography[J]. *Journal of North China University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2018, 40(4): 120-124.
- [17] 葛磊, 文永富, 程灏波. 双波长离轴数字全息成像技术研究[J]. *影像科学与光化学*, 2021, 39(6): 790-797.
Ge L, Wen Y F, Cheng H B. Study on off-axis dual-wavelength holographic imaging[J]. *Imaging Science and Photochemistry*, 2021, 39(6): 790-797.
- [18] 赵亚迪. 双波长数字全息成像方法及应用[D]. 唐山: 华北理工大学, 2019.
Zhao Y D. Dual-wavelength digital holographic imaging method and application[D]. Tangshan: North China University of Science and Technology, 2019.
- [19] 薛蓉. 粗糙表面微观形貌的数字全息测量实验研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2015.
Xue R. Experimental study on digital holographic measurement of rough surface micro-topography[D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2015.

Microchannel Detection Based on Dual-Wavelength Image-Plane Digital Holographic Microscopy

Tao Siqin, Kong Ming, Liu Wei*, Xu Jianan, Cheng Fuxia, Liu Kaixuan, Yang Zeqiu

College of Metrology and Measurement Engineering, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

Abstract

Objective The microfluidic chip is composed of a micro-nano-scale channel network. The microfluidic effect of biological, chemical, medical, and other samples is generated by the microchannel which carries the function of the "container" in the reaction. The dimensional accuracy such as the structure, shape, and size of the microchannel will directly impact the sample type, sample throughput, and sample injection rate in the microfluidic system. Therefore, it is of great significance to detect the three-dimensional topography of microfluidic chip channels. In recent years, scholars have continuously introduced new imaging detection methods for microfluidic chips, but most of the research focuses on the surface morphology of the reaction solution in the microchannel of the microfluidic chip or samples to be tested. There

is little literature introduction on the measurement of microchannels. In this paper, digital holographic microscopic detection technology is combined with microfluidic technology. It provides a new imaging detection method for the microfluidic channel and has important application value for improving the quality of the chip.

Methods This paper proposes a method for measuring the microchannels of microfluidic chips based on dual-wavelength image-plane digital holographic microscopy to meet the requirements of three-dimensional topography visualization of microfluidic chip channels. A reflective off-axis dual-wavelength image-plane digital holographic microscopic measurement system is built. Firstly, the lateral and vertical resolution and the magnification of the system are calibrated by the resolution target and standard sample. The results show that the dual-wavelength holographic microscope system has good accuracy and feasibility in the measurement of lateral and vertical depth. Then the straight channel of the polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic chip, the circular liquid phase chamber with vertical height transition, and the microchannel of the silicon-based microfluidic chip are measured. The phase distribution of the measurement surface is quantitatively recovered by combining the two-step phase division method and the 2π compensation method.

Results and Discussions Firstly, a reflective off-axis dual-wavelength image-plane digital holographic microscopy experimental system is built (Fig. 1). To analyze and verify the accuracy and feasibility of the measurement system, this study adopts the 1951USAF resolution target, one-dimensional grid standard template, and segment difference standard film to calibrate the system respectively. The lateral resolution of this digital holographic microscope system can reach $2.2\ \mu\text{m}$ (Fig. 4), and the actual magnification of the system is 13.5 times (Fig. 2). At the same time, the $20.79\ \mu\text{m}$ segment difference standard film is measured, and the longitudinal depth is $19.9\ \mu\text{m}$ with a relative error of 4.2% (Fig. 5). In addition, the three-dimensional morphology of the straight channel of the PDMS microfluidic chip, the circular liquid phase chamber with vertical height transition, and the microchannel of the silicon-based microfluidic chip are reproduced. Microchannels with different structures are obtained. The depth and the width of the straight channel and the circular chamber microchannel are $48.6\ \mu\text{m}$ & $75.8\ \mu\text{m}$ (Fig. 9) and $48.5\ \mu\text{m}$ & $76.6\ \mu\text{m}$ (Fig. 10), respectively; the channel depth of silicon-based microfluidic chip is $61.6\ \mu\text{m}$ (Fig. 11). Finally, the experimental results are well consistent with the white-light interferometry results (Table 1 & Table 2), which illustrates the reliability and accuracy of the dual-wavelength holographic microscope system, providing a new imaging detection method for the microchannel detection of microfluidic chips.

Conclusions In this paper, a reflective off-axis dual-wavelength image-plane digital holographic microscopy measuring device is constructed based on digital holographic microscopy. The research on the three-dimensional topography measurement of microfluidic chip channels is carried out. The experimental results show that the lateral resolution of the system can reach $2.2\ \mu\text{m}$. The error range of the channel width and depth measurement is less than 4%, and the phase and plane distributions of the microchannel are accurately reproduced, indicating that the system has certain accuracy and feasibility. This research greatly expands the application field of digital holographic microscopic measurement, especially for closed microfluidic channels, meeting the needs of non-contact and label-free detection. In addition to the research on the structure of the chip channel itself, digital holographic microscopy can be extended to study the characteristics of the reaction solution, biological cells, and biological slice samples in the channel of the microfluidic chip. This study broadens the application scope of digital holographic microscopy and lays a foundation for the research on microfluidic-related technologies.

Key words holography; microfluidic chip; microchannels; image-plane holography; dual-wavelength holographic microscopy