

文章编号: 1005-5630(2024)01-0082-13

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.202303020033

## 共焦显微镜技术及其应用

毛肖肖, 赵斌, 董祥美, 高秀敏

(上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海 200093)

**摘要:** 共焦显微测量是一种很有前景的技术, 具有非接触测量和高精度位移识别能力, 广泛应用于芯片加工、高精密仪器制造、生物医学、材料化学、工业检测等领域。其沿轴向位置高精度扫描的二维图像可用于三维重建, 然而, 扫描的速度限制了图像的采集速率, 为了克服这一局限性, 研究人员提出了许多方法对传统的共聚焦显微镜系统进行了改进。例如, 基于扫描振镜光束扫描型共焦显微镜、基于数字微镜装置的共焦显微镜、差分式扫描共焦显微镜等。本文主要讨论了各种共聚焦显微镜的工作原理、物镜类型、扫描方法、优缺点及应用。随着光学核心部件的升级和各种准确、高效算法的出现, 未来共焦显微镜的扫描速度会更快、应用范围更广、分辨率更高。

**关键词:** 共焦显微; 三维成像; 位移识别; 扫描速度

**中图分类号:** TH 742 **文献标志码:** A

## Confocal microscope technology and application

MAO Xiaoxiao, ZHAO Bin, DONG Xiangmei, GAO Xiumin

(School of Optical-electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for  
Science and Technology, Shanghai 200093, China)

**Abstract:** Confocal micro-measurement is a promising technology with non-contact measurement and high-precision displacement recognition capabilities, which is widely used in chip processing, high-precision instrument manufacturing, biomedicine, material chemistry, industrial testing and other fields. The two-dimensional images scanned with high accuracy along the axial position can be used for three-dimensional reconstruction. However, the scanning speed limits the rate of image acquisition. In order to overcome this limitation, researchers have proposed many methods to improve the conventional confocal microscope system. For example, it mainly includes scanning confocal microscope based on scanning galvanometer beam, confocal microscope based on digital micro-mirror device, differential scanning confocal microscope, etc. Here, this paper mainly discusses the working principle, types of objective lens, scanning methods, advantages and

收稿日期: 2023-03-02

基金项目: 国家重点研究发展计划项目(2018YFC1313803); 深圳市基础研究项目(JCYJ20200109105411133)

第一作者: 毛肖肖(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为光谱共聚焦、光学成像。

E-mail: [xx\\_lucky0921@126.com](mailto:xx_lucky0921@126.com)

通信作者: 高秀敏(1978—), 男, 研究员, 研究方向为矢量光场, 医疗光学, 光学成像, 光电检测, 量子传感器等。E-mail: [gxm@usst.edu.cn](mailto:gxm@usst.edu.cn)

disadvantages, and applications of various confocal microscopes. We believe that with the upgrading of the core components of the optical system and the emergence of various accurate and efficient peak algorithms, the scanning speed of the confocal microscope will be faster; the range will be wider and the resolution will be higher in the future.

**Keywords:** confocal microscopy; 3D imaging; displacement identification; scanning speed

## 引 言

随着科学技术、半导体加工、精密制造技术的快速发展, 物体表面形貌测量变得越来越重要, 表面三维细节的可视化有助于研究人员对物体表面质量进行准确评估, 发现新的功能材料, 提高器件性能<sup>[1]</sup>。由于显微镜具有较高的分辨率, 且能实现与物体非接触测量, 避免测量时因接触带来的损伤和误差, 它被广泛应用于各种精密的 3D 测量领域。比如, 近场扫描光学显微镜<sup>[2]</sup>、扫描隧道显微镜<sup>[3]</sup>、原子力显微镜<sup>[4]</sup>以及普通光学显微镜都可以进行 3D 表面的高精度测量。但是这些方法之间仍存在许多的问题, 它们对环境要求高, 实现过程复杂, 分辨率以及测量精度较低, 在表面轮廓测量领域的应用受到极大的限制。

近年来, 由于其独特的轴向响应能力, 特别是在各种高精度的显微成像应用中, 共焦显微镜被广泛用于表征非常小的 3D 结构并测量表面轮廓<sup>[5-7]</sup>, 采用共轭技术对物体进行扫描成像, 已经成为一种热门的检测方法。共焦显微镜主要分为激光共聚焦和彩色共聚焦等, 激光共聚焦显微镜(laser confocal microscope, LCM)测量三维表面形貌时, 需要对每个点进行精确的深度扫描, 这严重降低了测量效率。然而, 彩色共聚焦显微镜(chromatic confocal microscope, CCM)具有独特的高分辨率和轴向响应能力, 不需要轴向逐点扫描, 且对环境要求低、检测精度能够达到微米级, 克服了 LCM 的缺陷, 被广泛应用在物体表面的形貌测量和检测上。

1955 年, Marvin<sup>[8]</sup>制造出了第一台共聚焦显微镜。1984 年, Molesini 等<sup>[9]</sup>基于波长位移编码原理, 使用一组专门设计的色差透镜构建了表面轮廓仪, 这是基于激光共聚焦的另一种新的形貌测量方法<sup>[10]</sup>。之后, 彩色共聚焦技术不断地被研

究人员更新及扩展应用。Chun 等<sup>[11]</sup>提出了一种基于光束横向扫描的彩色共焦显微镜, 无需纵向机械移动就可以测量三维表面; Reyes 等<sup>[12]</sup>提出了一种彩色共焦方法来测量膜的折射率和厚度; Chen 等<sup>[13]</sup>提出了一种利用新型双缝彩色共焦显微镜的宽带差分共焦法进行单次显微 3D 表面测量。共焦显微镜与传统光学显微镜的区别在于共焦显微镜能够克服轴向杂散光的影响, 提高了图像分辨率。此外, 彩色共焦显微镜具有层析能力, 可以进行三维层析成像, 成功摆脱了电子显微镜仅在活体样本中观察的局限性, 已经成为细胞、组织检查等生物领域的必备仪器<sup>[14]</sup>。

本文重点介绍了用于三维表面计量的共焦显微镜。阐述了其基本工作原理、优缺点、色散物镜、光源、共焦针孔、成像方法和重建算法。此外, 总结了共聚焦显微镜在透明材料、工业集成、生物医学等方面的应用<sup>[15]</sup>。

## 1 共焦显微镜

### 1.1 激光共焦显微镜

激光共焦显微镜是一种高精度非接触的测量方法, 广泛地应用于显微成像中。激光共焦显微镜是在普通显微镜的基础上引入了“共焦技术”和“激光扫描技术”<sup>[16]</sup>。如图 1 所示, 以激光束为光源, 由激光束发射的激光通过照明针孔和准直透镜形成平行光, 然后从分光镜反射到物镜并聚焦在样品上, 并在焦平面对样品进行逐点 X-Y 轴扫描, 在探测器处获得二维图像<sup>[17-18]</sup>。由于光路中探测针孔和照明针孔存在共轭关系, 只有聚焦在焦平面上的点才可以在探测针孔处成像, 因此焦平面外的点不会对成像造成干扰。通过调整聚焦平面在 Z 轴上的位置, 可以在不同位置连续扫描多个二维图像来获得一系列光学切片图像。

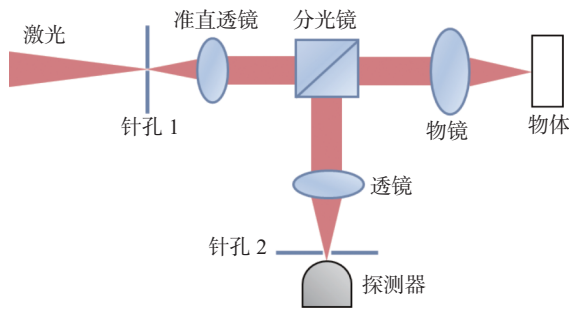


图 1 激光共焦显微镜示意图

Fig. 1 Schematic diagram of laser confocal microscope

## 1.2 彩色共焦显微镜

彩色共焦系统采用复色光源，探测器通过接收不同波长的光信号还原出被测表面的三维形貌。如图 2 所示，由于色散物镜的色散作用，进入系统的复色光通过色散物镜后会聚焦在不同的轴向位置，当光从物体表面原路反射回去时，只有聚焦在焦平面上的光才可以进入探测器，其余的杂散光则被针孔遮挡。探测器输出的信息即为焦平面处的样品表面信息，通过不断改变焦平面位置，可以获取样品不同深度的表面信息，即样品的高度信息。通常，将共焦反射显微镜放置在焦平面处，通过驱动三维位移控制器改变物体位置，利用 CCD 采集一系列不同深度二维图像，最后将所扫描物体获得的图像进行三维重建，恢复样本的 3D 形貌。

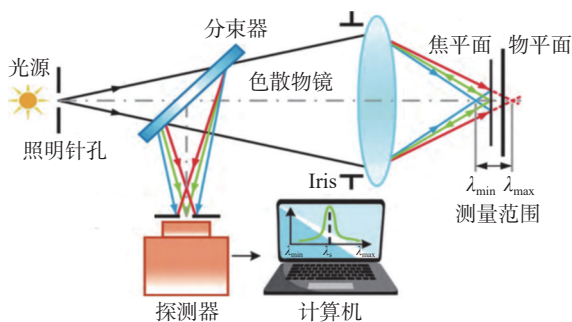


图 2 简化的彩色共焦显微镜模型

Fig. 2 Simplified model of confocal microscope

## 2 共焦显微系统组成

### 2.1 色散物镜

色散物镜是共焦系统中的核心部件，其设计方式主要包括折射式和衍射式。折射式色散物镜

因其光学系统的设计比较成熟，加工简单，价格经济合理，便于色散等特点，在早期被广泛应用<sup>[19]</sup>。Olsovsky 等<sup>[20]</sup>基于色散传递原理，利用非球面透镜设计的物镜在 590~775 nm 的波长范围内实现了 157  $\mu\text{m}$  的色散和 3  $\mu\text{m}$  的轴向分辨率；王安苏等<sup>[21]</sup>在可见光波段 450~700 nm 范围内设计的色散物镜的轴向色差为 120  $\mu\text{m}$ ；刘乾等<sup>[22]</sup>、王津楠等<sup>[23]</sup>采用双分离的消色差场镜和非球面透镜组合的设计使整个系统的测量范围达到了 1.7 mm，平均测量精度可达 1.8  $\mu\text{m}$ 。梁青等<sup>[24]</sup>基于透镜分离结构组合的方式，设计的色散物镜的系统轴向测量范围为 1 mm，理论分辨率为 5 nm。马敬等<sup>[25]</sup>使用单透镜结合双胶合透镜的设计实现了系统测量精度的提高。如图 3(a)、(b)所示为折射式色散物镜类型。

衍射光学元件带来的色散特性和传统折射光学器件的色散特性相反，色散效果也更加明显<sup>[26]</sup>，因此，为了提高系统的灵敏度、分辨率和线性度，改善成像质量，许多研究者将折射和衍射透镜组合的方式引入到色散物镜的设计中如图 3(c)所示。Dobson 等<sup>[27]</sup>通过 40 倍显微物镜和 60 倍衍射光学元件的组合，使系统的轴向色散范围高达 55  $\mu\text{m}$ ，半峰全宽 (full width at half maxima, FWHM) 为 2.5  $\mu\text{m}$ 。

此外，菲涅尔透镜能够获得更优秀的线性度，有利于提高衍射效率和横向空间分辨率<sup>[28]</sup>。Liu 等<sup>[29]</sup>加工了直径为 11.27 mm、焦距为 50 mm 的菲涅尔波带片 (Fresnel zone plate, FZP)，轴向测量范围超过 16 mm，轴向分辨率达到 0.8  $\mu\text{m}$ 。波带片相比于透镜更加轻便，具有可折叠的优势，在共焦显微镜的小型化上深受人们的关注，如图 3(d)所示，由于 FZP 存在衍射级次，色差很难克服，在宽波段范围内成像方面仍需要进一步的探索。

折射型色散物镜因其优势被广泛应用在共焦系统中。但是，其色散性能不稳定、非线性色散等缺点容易对系统造成很大的影响，因此，设计折射式物镜时需要选用多种玻璃组合来改善其线性度。在利用衍射元件设计色散物镜时，许多研究人员将传统多片折射式镜头系统简化为单片衍射镜头，可以克服数值孔径小，加工困难等方面的难题<sup>[30]</sup>。

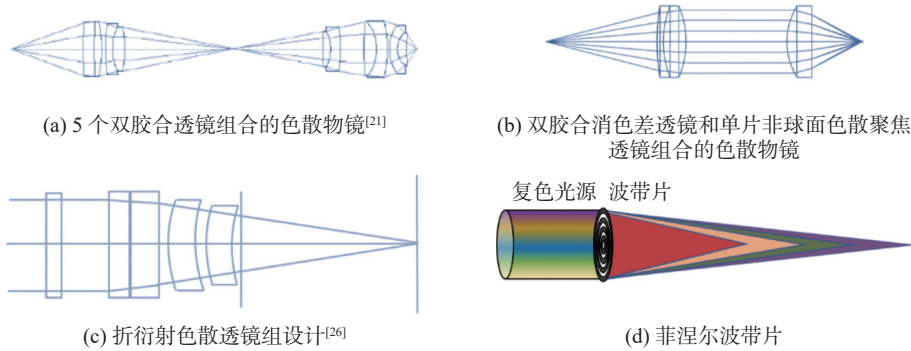


图 3 色散物镜

Fig. 3 Objective lens

## 2.2 光源

色散是宽带光学系统中非常普遍的现象, 彩色共焦技术是通过反射光谱的聚焦波长来解码样品表面的轴向位移, 当白光光源(LED)通过光阑后会有一部分能量损失, 这将会影响光谱信号的信噪比, 通过增大孔径的方式会影响到系统的分辨力<sup>[31]</sup>。Gharbi 等<sup>[32]</sup>和 Minoni 等<sup>[33]</sup>采用超连续光谱光源, 实现了量程的扩展, 但超连续光谱光源价格昂贵, 成本较高。Matsukuma 等<sup>[34]</sup>提出了一种采用锁模飞秒激光光源的双探测器差分色散共焦探针生成了超连续谱光源, 它的测量范围达到了  $200\ \mu\text{m}$ , 对高度为  $1.8\ \mu\text{m}$  的台阶样品进行三维表面轮廓测量, 存在约 8% 的偏差。

由于光源和样品表面的色散特性对反射光谱有很大的影响, 导致在许多位移测量中焦点波长发生偏移, 利用稳定光源可有效提高彩色共焦测量系统的精度, 还利于扩展量程, 提高轴向分辨和采样速度。

## 2.3 共焦针孔

共焦显微镜的照明针孔和探测针孔具有共轭关系, 共焦点即为被探测点。来自物镜焦点的信号只能通过共轭针孔检测, 该针孔在聚焦光通过的同时还抑制了杂散光的干扰, 实现了三维空间滤波的目的。因此, 可以实现高空间分辨率的光学切片<sup>[35]</sup>。共焦针孔的直径严重影响成像的亮度和分辨率, 如果针孔尺寸增加过大, 系统横向分辨率将与传统光学显微镜相同, 系统的轴向精度降低; 针孔尺寸过小会影响光的通过, 导致光强度损失, 使光探测器接收不到足够多的能量信号, 从而降低测量精度。因此, 共焦针孔的大小

需要综合考虑信噪比和光通量。

此外, 在不同样本的共焦成像光路系统中, 使用可调节的光圈是不够的, 不仅需要克服不同孔径针孔尺寸的大小, 同时还需保持探测光路的对准。为了实现针孔的快速、准确以及可重复定位, 开发了众多改变针孔尺寸的系统, 例如圆形针孔电动线性阵列, 通过机动方形或六边形光圈来改变针孔尺寸<sup>[36]</sup>。

## 3 共焦成像扫描方法

一般来说, 要在共焦显微镜中重建 3D 图像, 需要快速扫描样品获取一系列连续 2D 图像<sup>[37-38]</sup>。有多种扫描的方法可以提高共焦显微镜的扫描速率, 包括基于扫描振镜光束扫描型共焦显微镜、旋转 Nipkow 圆盘扫描共焦显微镜、基于微透镜阵列的共焦显微镜、基于数字微镜装置的共焦显微镜、差分式扫描共焦显微镜、基于扫描源的彩色共焦显微镜。此节介绍了各种扫描方法的工作原理和优缺点。

### 3.1 基于扫描振镜光束扫描型共焦显微镜

基于扫描振镜光束扫描型共焦系统使用激光作为点光源, 同时在光路中安装两个可控制其转动角度的转向振镜, 分别用于控制光束对样品进行  $X$  和  $Y$  方向的逐点扫描来获取不同深度的二维图像, 最终实现三维重建, 如图 4(a)所示。系统中避免了机械移动, 提高了扫描速率, 且横向分辨率是普通显微镜的 2 倍。

但是基于扫描振镜光束扫描型共焦显微镜采用的逐点扫描方式, 仍然严重降低了测量效率。

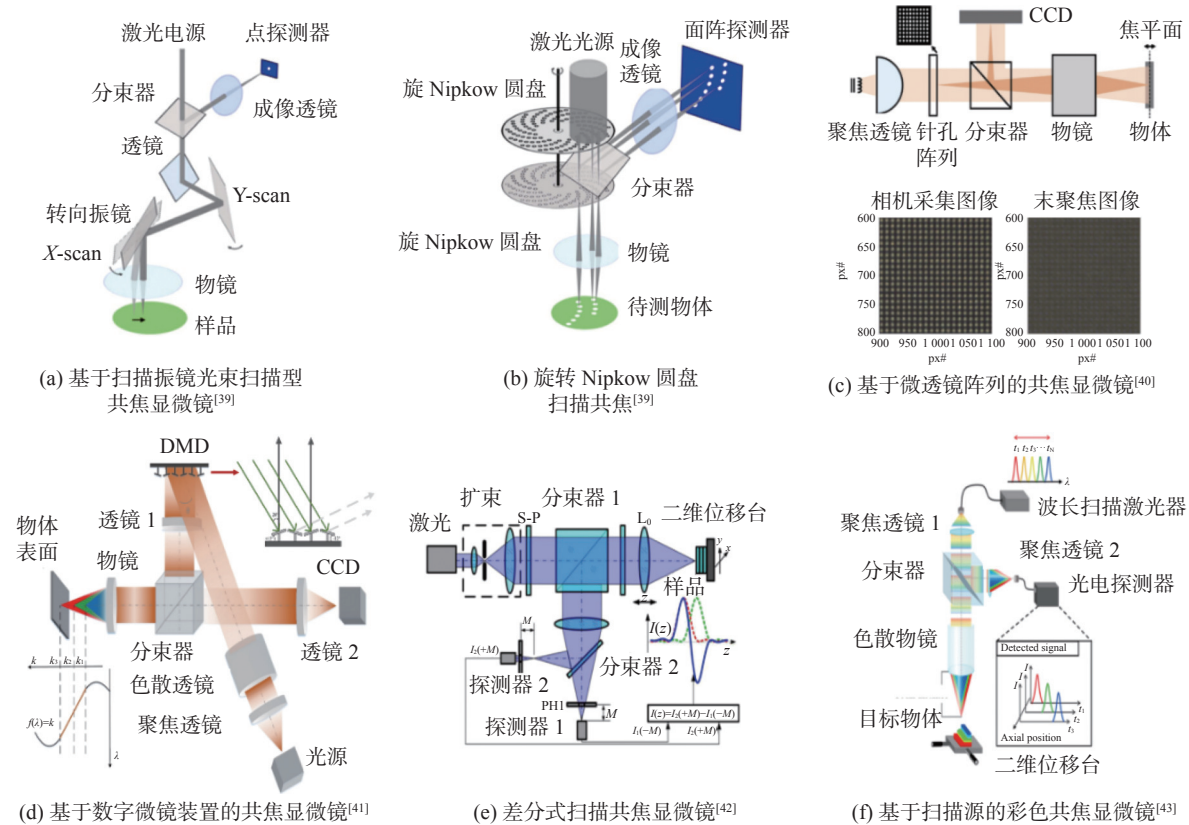


图 4 共焦成像显微镜中的各种扫描方法

Fig. 4 Various scanning methods of confocal imaging microscope

除此之外，基于扫描振镜光束扫描型共焦显微镜的轴向层析的能力和针孔掩模都减少了散射，较大程度地提高了成像深度，同时，大部分杂散光被抑制。探测器接收到的反射信号非常微弱，因此需要使用灵敏度高的光电倍增管。

### 3.2 旋转 Nipkow 圆盘扫描共焦

彩色共焦技术在表面形貌测量领域备受关注，然而，现有的彩色共焦技术多为单点测量，一定程度上限制了测量效率，为了提高彩色共焦的检测速度，国外很多学者对共焦系统进行了改良。1884 年，德国科学家 Nipkow 等提出了 Nipkow 转盘法。1960 年，Hadravsky 和 Petran 等<sup>[44]</sup>学者将 Nipkow 盘取代单个针孔的方式将其应用在了共焦显微镜中，提高了检测速度。

利用旋转 Nipkow 圆盘的扫描共焦是基于多光束扫描的方法，可以实时成像，具体原理如图 4(b) 所示。光源发出的光穿过被测物体聚焦的共轭平面上的针孔，形成许多点光源照射在

样品表面。最后，反射光在通过分束器之后在 CCD 上成像，这样就实现了多点同时成像。同时，配合 Nipkow 圆盘的高速旋转以实现快速的二维成像。

旋转圆盘共焦显微镜由区域检测器获取 2D 图像，能够形成真实的共焦图像，进行实时观察光学切片图像，数据处理更容易。然而，转盘旋转圆盘对针孔的尺寸和位置要求十分严格，不能改变系统的分辨率，并且系统比较复杂、昂贵。

### 3.3 基于微透镜阵列的共焦显微镜

基于微透镜阵列的显微成像能够降低光路中杂散光的影响，提高了三维图像重构的分辨率，与 Nipkow 盘相比，基于微透镜阵列的共焦显微镜提高了系统的光能利用率、扩大了视场。2015 年，Hillenbrand 等<sup>[45]</sup>提出了基于针孔阵列的彩色共焦传感器，通过照明针孔阵列将复色光源换成点光源阵列，用于快速获取被测物表面高

度信息。Tiziani 等<sup>[46]</sup>利用微透镜阵列实现多点测量, 进一步提高了测量的效率。基于微透镜阵列的共焦系统如图 4(c), 将针孔阵列放置在分束镜前, 当光源穿过针孔时, 形成的光源阵列就可以照明在物体表面, 通过使用区域相机 CCD 来捕捉物体表面反射的针孔图案。因此, 确定相应针孔位置的高度, 根据获得的二维针孔阵列信息可以重建 3D 表面。

由于存在相邻针孔的串扰, 随着针孔间距的减小, 信噪比和深度分辨率降低, 针孔阵列的间距还限制了 3D 成像的横向分辨率, 降低了系统的信噪比。

### 3.4 基于数字微镜装置的共焦显微镜

数字微镜装置(digital micromirror device, DMD)是由一定尺寸的微反射镜组成的阵列, 可以覆盖具有数百万个单独控制像素的 2D 区域, 改善传统单点彩色共焦技术的低扫描效率问题。其中 DMD 上由各镜像原件组成以控制反射角度, 将 DMD 用作光束调制器件, 可以获得可编程针孔阵列, 替代反射式共焦系统中的分束镜, 经过光束整形后的平行光通过 DMD 反射到色散透镜, 最后利用 CCD 采集图像信息, 原理如图 4(d)所示。Chen 等<sup>[47]</sup>将 DMD 技术集成到 CCM 系统中, 以消除垂直和横向机械扫描结构的必要性。与微透镜阵列所形成的点光源阵列相比, 基于 DMD 的点阵列光源具有良好的可调制性, 能适应不同要求的测量对象。

DMD 可以调整采样点, 控制扫描速率。但是, DMD 不会对分束后的光产生聚焦作用, 进行共焦测量时的纵、横向分辨率都会比使用微透镜阵列时下降。

### 3.5 差分式扫描共焦显微镜

20 世纪 90 年代, 国外的共焦激光扫描显微镜就已经做得相当成熟<sup>[48]</sup>, 韩国的 Ishihara 等<sup>[49]</sup>提出了一种平行共焦光路, 它可以根据实际需要改变微透镜阵列在光路中的位置, 并利用微透镜的位置生成二维点光源阵列。如图 4(e)所示, 从物体表面反射的光束被一分为二, 分别聚焦到放置在焦前和焦后的两个探测器上, 对接收的轴向强度响应曲线进行差分计算来获取变化信息。

在差分共聚焦显微镜(differential scanning confocal microscope, DSCM)中通过检测光学焦点来改进共聚焦显微镜的信噪比和轴向分辨率, 抑制了常见的噪声, 轴向分辨率得到双倍提高<sup>[50]</sup>, 并且不需要横向扫描, 能够实现样品表面轮廓的高速测量。

### 3.6 基于扫描源的彩色共焦显微镜

为了提高三维表面轮廓的成像速度, Jeong 等<sup>[43]</sup>提出了基于扫描源的彩色共聚焦显微镜(swept-source-based chromatic confocal microscopy, SS-CCM)的新概念, 并研究了相应成像系统的有效性, 如图 4(f)所示。SS-CCM 采用波长扫描激光器连续、重复地产生与宽带光源等效波长的光, 所产生的光经过色散物镜, 聚焦在被测物体上, 由光电探测器来接收物体表面的发射光。由此可见, 系统不再使用光谱仪来接收反射光, 因为基本过程与波长无关, 而是与时间相关, 光电探测器可以根据时间尺度反复获得反射光的光谱信息, 最终通过解码光谱信息来获得物体表面信息。

与常规 CCM 相比, SS-CCM 可以提高三维轮廓的检测速率。系统中使用单个光电探测器从色散透镜阵列中获得光谱编码深度, 能够显示出更灵敏的响应<sup>[43]</sup>。

## 4 三维重建及应用

### 4.1 三维重建

在传统共焦显微镜中, 可以计算轴向响应的峰值强度来确定物体的轴向位置<sup>[51]</sup>, 通过建立波长与被测物体表面的轴向位移之间的关系, 可以从接收到的波长信息获得被测物体表面的高度信息, 即三维成像。因此, 准确和高效的峰值提取算法在共焦成像中至关重要。常用的标准峰值波长提取包括最大值搜索、质心算法和高斯拟合算法。但是, 传统的算法会导致较大的系统峰值提取误差。因此, 为提高计算的效率和准确性, 研究人员提出了多种改进方法。

在 CCM 中, 将彩色相机替代光电探测器作为系统接收端, 可以得到整个物体表面的图像,

彩色共焦扫描成像系统的特性是光学层析，首先通过记录一系列不同深度的截面图像，再利用这些截面图像来重构厚物体的完整图像。根据光波编码原理，通过聚焦点的颜色来校准轴向高度。聚焦点的颜色在不同的高度是不同的，因此可以使用不同的颜色 RGB 值来研究表面高度和波长之间的关系。然而，图像 RGB 与波长之间存在非线性关系，因此需要将 RGB 颜色模型转换为其他合适的颜色模型，并通过算法实现与波长的对应关系<sup>[52]</sup>。

未来，在共焦显微镜的三维重建方面仍需付出巨大努力来降低数据处理的复杂性，提高成像效果，光学信号的调制领域也有很多的方法可能能够进一步加快共聚焦显微镜领域的信号传输和分析<sup>[53]</sup>。

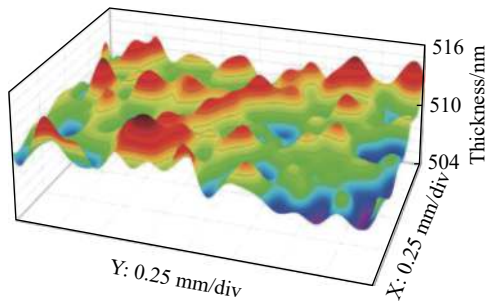
#### 4.2 透明材料检测

CCM 不仅可以用于三维成像，其具有的层析能力还可以对光学透明、半透明或弱散射材料进行断层深度剖面、多层成像和缺陷检查<sup>[54-55]</sup>及厚度测量，检测层间界面处反射光后能够提供

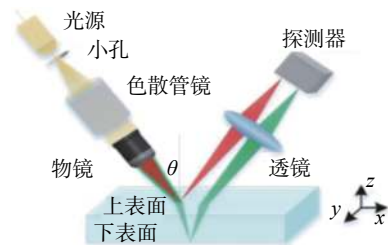
准确的薄膜厚度信息，而且不会造成任何样品的损坏。测量系统能够有效地克服漫反射表面的局限，广泛应用于微尺寸测量包括玻璃、陶瓷等材质在内的高精度表面深度位移测量中。

随着第四次工业革命的到来，半导体和显示行业对厚度测量的需求稳步增加，为了确认衬底和薄膜的各种层的物理厚度<sup>[56]</sup>，应准确且快速地测量厚度，以保持高生产率，如图 5(a)所示为薄膜形貌测量。此外，在触摸界面电子设备等应用中，需要在薄膜上涂一层硬涂层以提高表面硬度，涂层的精确测量为未来的电子皮肤提供了前景<sup>[57]</sup>。Cox 等<sup>[58]</sup>提出了共焦厚度测量法来测量光盘上的薄透明涂层；Wang 等<sup>[59]</sup>使用新型差分共焦系统测量透镜厚度，提高了测量精度；Kuo 等<sup>[60]</sup>开发了双光束共焦显微镜，测量了透明材料的折射率和厚度。

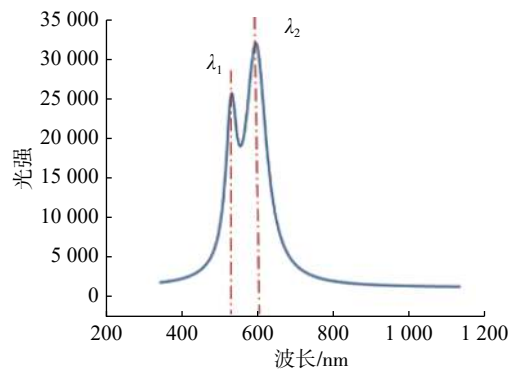
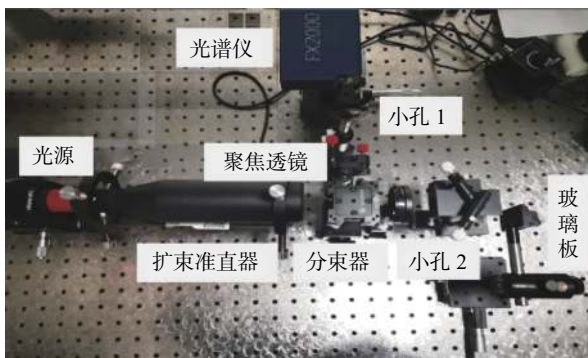
在透明材料检测过程中，CCM 测量系统会由于被测物体的透明介质(如玻璃、塑料)的分散在检测过程中出现信号混叠，串扰等情况，降低测量系统的信噪比，导致无法准确获得不同层表面的光谱信息，使实验结果产生误差。Yu



(a) 薄膜的三维厚度地形图<sup>[57]</sup>



(b) 玻璃反射率测量的实验装置<sup>[63]</sup>



(c) CCM 测量系统装置图及玻璃板光谱峰值

图 5 半(透明)材料检测

Fig. 5 Detection of semi(transparent) material

等<sup>[61]</sup>通过倾斜照明彩色共焦显微镜测量透明试样厚度, 如图 5(b)所示, 提高了系统的信噪比, 但是样品厚度在不同的轴向位置测量结果不一致。因此, 在使用 CCM 对透明样品厚度进行测量时, 需要对材料色散的误差进行理论分析, 建立误差评估的关系以及如何对产生的误差进行补偿, 这些对提高 CCM 对透明材料的测量精度都是十分必要的。如图 5(c)所示, 使用 CCM 对厚度为 0.17 mm 的玻璃板进行检测, 当玻璃板上下两个表面位于测量的范围内时, 只有聚焦在被测物体上下两个表面上波长为  $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$  的光会原路返回, 光谱仪显示两个光谱峰值。最后, 根据波长信息与位移的关系, 分别得到两个光谱峰值对应的位移, 位移之间的差值即玻璃板厚度信息。实验所测得的厚度信息包含由于待测透明物对不同波长的光有不同的折射率, 聚焦距离与对应的波峰关系发生偏差, 因此, 需要建立玻璃板的厚度补偿模型对测量结果进行补偿, 提高实验的准确度, 最终, 玻璃板的测量误差在 2  $\mu\text{m}$ 。

玻璃基板的厚度均匀性、翘曲度及表面波纹度等参数可以衡量其平整度<sup>[62]</sup>, 采用彩色共焦显微镜, 能够在透明试样的制作过程中对其表面信息进行实时监测, 提高生产的效率和质量。

### 4.3 工业集成检测

在机械加工、薄膜制备、光学加工等精密领域中, 表面粗糙度是描述表面微观轮廓的基本特点, 是评价产品表面质量最常用的参数之一<sup>[63]</sup>。工业上最常用的光学无损测量, 需要采用位移传感器对变化信息进行精密测量和标定。相比于传统的共焦显微方法, 彩色共焦法对被测物体表面的纹理、倾斜、颜色等外界因素不敏感, 具有良好的抗干扰性, 精度高, 易于集成的优势也在非接触式在机测量研究中得到了广泛关注, 适用于要求高检测效率和在线测量的工业现场, 如图 6 所示。微加工后的工件表面在线测量成为满足日益增长的质量要求的关键。基于 CCM 开发的集成在微加工机床上的扫描系统, 可以扫描工

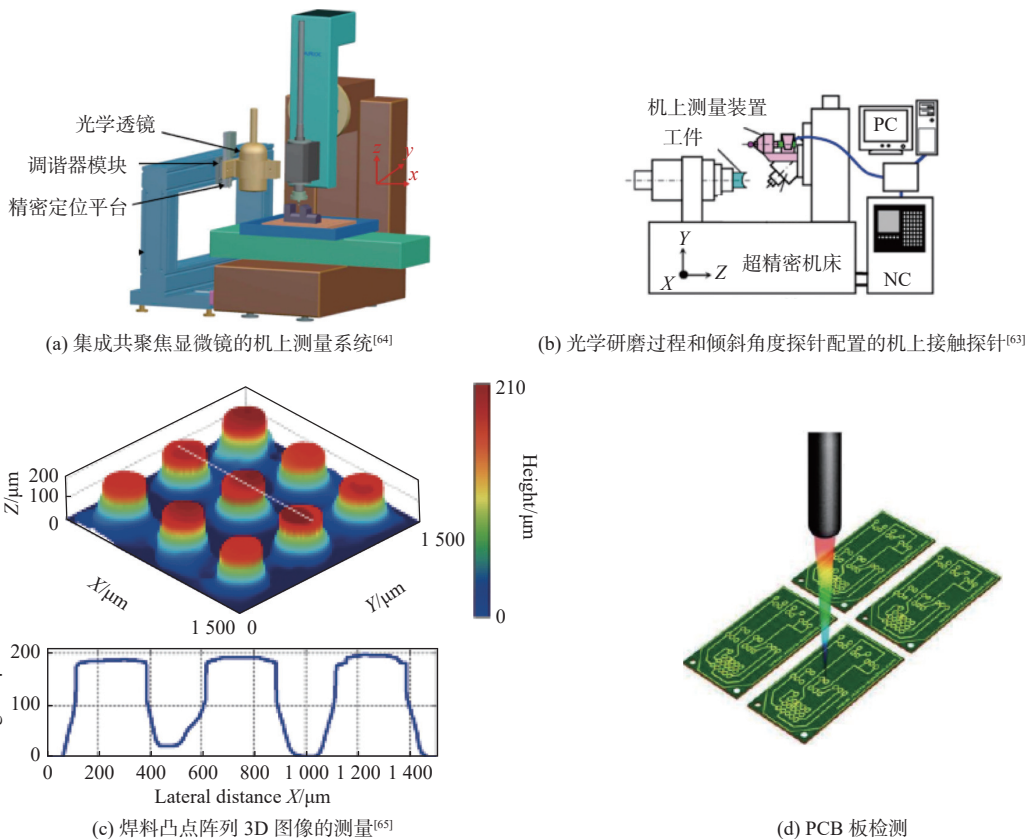


图 6 工业集成检测应用

Fig. 6 Industrial integrated detection application



业级在线集成的基板上满载的粘结模具的托盘，并且在一个有强烈振动影响的环境中实现了大约  $2\sim 3\ \mu\text{m}$  的精度，减少了 64% 的检测时间<sup>[64]</sup>。在超精密车床上集成了彩色共焦位移传感器后，可以实现加工—测量一体化的功能，实现了自动测量与数字化加工的协调。

彩色共焦显微镜是在机测量中非常重要的组成，可以实现高效率、高精度的在线检测。

#### 4.4 生物医学成像

共焦显微镜在组织和细胞水平上对癌症成像具有很大的前景，为皮肤科的诊断和治疗提供了有效的方法。荧光反射共焦显微镜 (fluorescence reflection confocal microscope, FRCM) 是一种无创光学成像方法，可以准确分辨组织并检查皮肤细节。通过大量的临床研究，荧光反射共焦显微镜已被证明能够以高灵敏度和特异性诊断绝大多数皮肤癌<sup>[66]</sup>，这大大超过了临床评估。例如使用半导体激光器作为发射器和接收器来检测皮肤癌，实验结果与数值模拟一致，并且结构变化明显，能够可视化癌症类型的识别<sup>[67]</sup>。

荧光反射共焦显微镜在组织细胞水平上可做多种功能的测量与分析，能够实现单色、多色荧光通道实时成像，可用于拍摄高放大率的荧光图像、利用拼接功能对大组织进行全景扫描、动态观察生理状态下细胞内离子 PH 对细胞代谢等各

种指标的影响等<sup>[68]</sup>。因此，共焦显微镜结合其他相关生物技术，如图 7 所示为共焦显微镜在生物学中的应用。

#### 4.5 其他

共焦显微镜的三维成像还应用于许多其他的领域，在日常安全运输中准确监测变形极其重要。例如，Ma 等<sup>[70]</sup>使用彩色共焦检测方法评估金属厚度，检测不确定度为 0.12，用共焦技术测量了  $150\ \text{°C}$  高温范围内动态压力下薄膜的弹性膨胀变形。

共焦显微镜广泛应用于生物医学和工业领域，在化学和材料方面的应用就比较有限。在这些领域，很多学者使用共焦显微镜做温度相关的研究，例如，冷冻乳剂、晶体生长、扩散等，通过使用共焦显微镜精确控制温度平台，能够对 200 mm 冰晶成型化合物错的溶液醋酸盐固化期间倾斜冰晶生长进行原位 3D 成像获得的完整信息，而不会产生观测伪影<sup>[72]</sup>，如图 8(b) 所示。此外，它还可以结合拉曼成像用于检测聚合物混合物，例如评估纤维、复合材料(存在纳米颗粒的地方)、混合物和乳液等。能够快速、无损的全面应用于分析银纹形成、表面界面动力学和不稳定性、相容性、液滴破碎、聚合物混合物混合效率、组分扩散流变学和滑移检测<sup>[73]</sup>，如图 8(c) 所示检测杂交聚合物酶体，能够帮助研究人员更好地理解聚合物混合物。

共焦显微镜可用于研究物体表面粗糙度、透明和半透明物体厚度、生物医学、工业集成、温度检测等领域，表 1 总结了此处描述的几种三维共焦显微镜测量任务的特点。

## 5 总 结

在过去几十年里，传统的共焦测量法仍局限于视野和实时测量上，单一的扫描点降低了共焦镜头的扫描速率，大大阻碍了测量速度和精度。但随着计算机和激光技术的快速发展，相比于其他类型的共焦显微测量，许多研究人员针对共焦系统中光源选型和提升色散透镜的分辨能力上进行深入地研究，出现了多点并行的扫描方式，能够更快地采集物体的二维信息，明显地提高了三

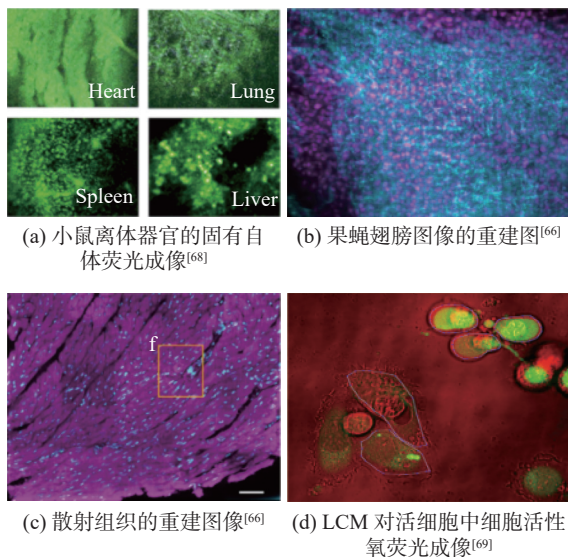


图 7 共焦显微在细胞生物学的应用

Fig. 7 Application of confocal microscopy in cell biology

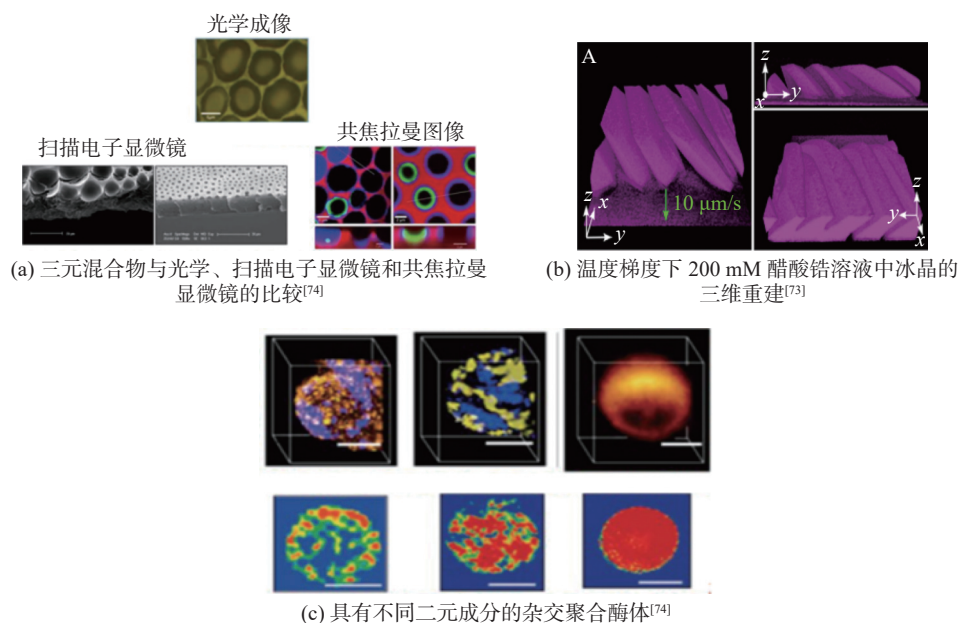


图 8 共焦显微在其他领域的应用

Fig. 8 Application of confocal microscopy in other fields

表 1 三维共焦显微镜测量任务的特点

Tab. 1 The characteristics of the measurement task of the three-dimensional confocal microscope

应用	共焦显微镜的主要特征	应用案例	参考文献
三维表面测量	无需任何机械扫描, 高速高分辨率	工业检查, 牙科扫描, 在线质量检测。	[43, 64, 74-76]
厚度测量	实用, 准确校正折射率和材料曲率引起的误差	评估硬涂层样品的均匀性;(半)透明材料厚度测量。	[62, 70, 77, 67, 78]
生物医学	实时显示活标本断层扫描	皮肤科, 胃肠科, 眼科的临床诊断和肿瘤边缘评估。	[79-81]
聚合物检测	高分辨率的无损光学观察	研究表面界面动力学和不稳定性、相容性, 液膜动力学特性测量。	[73]
形变检测	在线动态变形测量, 高精度	管道形变检测, 物体膨胀检测。	[71, 56]
表面粗糙度测量	高空间分辨率无损测量	质量评估, 微/纳米波导及组件。	[81, 82]

维成像速度。由于彩色共焦法省略了轴向步骤, 能够适应更多复杂环境, 快速实现三维表面的测量, 同时, 改进了峰值提取算法来提高成像的范围和图像的分辨率, 加快了三维测量的速度和精度, 逐渐成为工业检测、生物医疗、超精密几何量计量测试等相关领域的不可缺少的角色, 相信在未来继续优化提升共焦显微镜系统性能具有重要的工程价值和产业价值。

#### 参考文献:

- [1] SHIMIZU Y, MATSUKUMA H, GAO W. Optical sensors for multi-axis angle and displacement measurement using grating reflectors[J]. *Sensors*, 2019, 19(23): 5289.
- [2] 朱星. 扫描近场光学显微镜 [J]. *现代科学仪器*, 1996(4): 7-9.
- [3] 杨学恒, 陈安, 何光宏, 等. 扫描隧道显微镜系统 [J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2001, 24(3): 137-141.
- [4] 赵春花. 原子力显微镜的基本原理及应用 [J]. *化学教育(中英文)*, 2019, 40(4): 10-15.
- [5] LIU D L, WANG Y, QIU L R, et al. Confocal pore size measurement based on super-resolution image restoration[J]. *Applied Optics*, 2014, 53(25): 5694-5700.
- [6] TIZIANI H J, UHDE H M. Three-dimensional image sensing by chromatic confocal microscopy[J]. *Applied Optics*, 1994, 33(10): 1838-1843.
- [7] MURRAY J M. Methods for imaging thick specimens: confocal microscopy, deconvolution, and structured

- illumination[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, 2011(12): 1399 – 1437.
- [ 8 ] MARVIN M. Microscopy apparatus: US, 3013467[P]. 1961 – 12–19.
- [ 9 ] MOLESINI G, PEDRINI G, POGGI P, et al. Focus-wavelength encoded optical profilometer[J]. *Optics Communications*, 1984, 49(4): 229 – 233.
- [10] DUSSLER G, BROECHER B, PFEIFER T. Inspection of microsystems with a laser scanning microscope[C]//Proceedings of SPIE 3825, *Microsystems Metrology and Inspection*. Munich: SPIE, 1999: 144 – 150.
- [11] CHUN B S, KIM K, GWEON D. Three-dimensional surface profile measurement using a beam scanning chromatic confocal microscope[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2009, 80(7): 073706.
- [12] REYES J G, MENESES J, PLATA A, et al. Chromatic confocal method for determination of the refractive index and thickness[C]//Proceedings of SPIE 5622, 5th Iberoamerican Meeting on Optics and 8th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Their Applications. Porlamar: SPIE, 2004: 805 – 810.
- [13] CHEN L C, NGUYEN D T, CHANG Y W. Precise optical surface profilometry using innovative chromatic differential confocal microscopy[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(24): 5660 – 5663.
- [14] POOLA P K, AFZAL M I, YOO Y, et al. Light sheet microscopy for histopathology applications[J]. *Biomedical Engineering Letters*, 2019, 9(3): 279 – 291.
- [15] SENIOR J M, MURTAZA G, STIRLING A I, et al. Referenced intensity-modulated optical fiber sensor system for measuring linear displacement[C]//Proceedings of SPIE 1795, *Fiber Optic and Laser Sensors X*. Boston, MA, USA: SPIE, 1993: 353 – 361.
- [16] LYDA W, GRONLE M, FLEISCHLE D, et al. Advantages of chromatic-confocal spectral interferometry in comparison to chromatic confocal microscopy[J]. *Measurement Science and Technology*, 2012, 23(5): 054009.
- [17] HILLENBRAND M, MITSCHUNAS B, BRILL F, et al. Spectral characteristics of chromatic confocal imaging systems[J]. *Applied Optics*, 2014, 53(32): 7634 – 7642.
- [18] PRUSS C, RUPRECHT A, KÖRNER K, et al. Diffractive elements for chromatic confocal sensors[J]. *DGaO Proceedings*, 2005, 43: 106 – 107
- [19] RAYER M, MANSFIELD D. Chromatic confocal microscopy using staircase diffractive surface[J]. *Applied Optics*, 2014, 53(23): 5123 – 5130.
- [20] OLISOVSKY C, SHELTON R, CARRASCO-ZEVALLOS O, et al. Chromatic confocal microscopy for multi-depth imaging of epithelial tissue[J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(5): 732 – 740.
- [21] 王安苏. 基于光谱共焦原理的三维表面形貌测量的光学系统研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [22] 刘乾, 杨维川, 袁道成, 等. 光谱共焦显微镜的线性色散物镜设计 [J]. *光学精密工程*, 2013, 21(10): 2473 – 2479.
- [23] 王津楠, 陈凤东, 刘炳国, 等. 基于白光 LED 的光谱共焦位移传感器 [J]. *中国测试*, 2017, 43(1): 69 – 73.
- [24] 梁青, 薛丹, 伍星昱. 光谱共焦位移传感器镜头设计 [J]. *光学技术*, 2019, 45(6): 653 – 659.
- [25] 马敬, 齐月静, 卢增雄, 等. 光谱共焦位移传感器线性色散物镜设计 [J]. *中国激光*, 2019, 46(7): 0704009.
- [26] 王佳怡, 刘涛, 唐晓锋, 等. 光纤式色散共焦三维测量系统及算法比较研究 [J]. *光子学报*, 2021, 50(11): 1112001.
- [27] DOBSON S L, SUN P C, FAINMAN Y. Diffractive lenses for chromatic confocal imaging[J]. *Applied Optics*, 1997, 36(20): 4744 – 4748.
- [28] MALY M, BOYDE A. Real-time stereoscopic confocal reflection microscopy using objective lenses with linear longitudinal chromatic dispersion[J]. *Scanning*, 1994, 16(3): 187 – 192.
- [29] LIU T, WANG J Y, LIU Q, et al. Chromatic confocal measurement method using a phase Fresnel zone plate[J]. *Optics Express*, 2022, 30(2): 2390 – 2401.
- [30] 宁悦文, 胡摇, 陶鑫, 等. 基于偏振衍射色散共焦的光学元件轴向间距测量 [J]. *应用光学*, 2021, 42(4): 698 – 702.
- [31] RUPRECHT A K, WIESENDANGER T F, TIZIANI H J. Chromatic confocal microscopy with a finite pinhole size[J]. *Optics Letters*, 2004, 29(18): 2130 – 2132.
- [32] GHARBI J R, MENESES J, TRIBILLON G, et al. Chromatic confocal microscopy by means of continuum light generated through a standard single-mode fibre[J]. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 2004, 6(6): 544 – 548.
- [33] MINONI U, MANILI G, BETTONI S, et al. Chromatic confocal setup for displacement measurement using a supercontinuum light source[J]. *Optics & Laser Technology*, 2013, 49: 91 – 94.
- [34] MATSUKUMA H, SATO R, SHIMIZU Y, et al. Measurement range expansion of chromatic confocal probe with supercontinuum light source[J]. *International Journal of Automation Technology*, 2021, 15(4): 529 – 536.
- [35] LEEGHIM H, AHN M K, KIM K. Novel approach to optical profiler with gradient focal point methods[J].

- Optics Express*, 2012, 20(21): 23061 – 23073.
- [36] VAGH H, CHHANIWAL V K, CHAKRABARTY B S, et al. Vibration analysis with pinhole confocal technique[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2006, 77(11): 116113.
- [37] YE P, PAREDES J L, WU Y, et al. Compressive confocal microscopy: 3D reconstruction algorithms[C]//Proceedings of SPIE 7210, Emerging Digital Micromirror Device Based Systems and Applications. San Jose: SPIE, 2009: 72100G.
- [38] YOO H K, LEE S W, KANG D K, et al. Confocal scanning microscopy: a high-resolution nondestructive surface profiler[J]. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 2006, 7(4): 3 – 7.
- [39] KIM C S, YOO H. Three-dimensional confocal reflectance microscopy for surface metrology[J]. *Measurement Science and Technology*, 2021, 32(10): 102002.
- [40] KIM C S, KIM W, LEE K, et al. High-speed color three-dimensional measurement based on parallel confocal detection with a focus tunable lens[J]. *Optics Express*, 2019, 27(20): 28466 – 28479.
- [41] YU Q, ZHANG Y L, ZHANG Y, et al. A novel chromatic confocal one-shot 3D measurement system based on DMD[J]. *Measurement*, 2021, 186: 110140.
- [42] WANG Y, QIU L R, ZHAO W Q. High precision radially-polarized-light pupil-filtering differential confocal measurement[J]. *Optics & Laser Technology*, 2016, 82: 87 – 93.
- [43] JEONG D, PARK S J, JANG H, et al. Swept-source-based chromatic confocal microscopy[J]. *Sensors*, 2020, 20(24): 7347.
- [44] XIAO G Q, CORLE T R, KINO G S. Real-time confocal scanning optical microscope[J]. *Applied Physics Letters*, 1988, 53(8): 716 – 718.
- [45] HILLENBRAND M, WEISS R, ENDRÖDY C, et al. Chromatic confocal matrix sensor with actuated pinhole arrays[J]. *Applied Optics*, 2015, 54(15): 4927 – 4936.
- [46] TIZIANI H J, ACHI R, KRÄMER R N, et al. Microlens arrays for confocal microscopy[J]. *Optics & Laser Technology*, 1997, 29(2): 85 – 91.
- [47] CHEN C, YANG W J, WANG J, et al. Accurate and efficient height extraction in chromatic confocal microscopy using corrected fitting of the differential signal[J]. *Precision Engineering*, 2019, 56: 447 – 454.
- [48] LIN P C, SUN P C, ZHU L J, et al. Single-shot depth-section imaging through chromatic slit-scan confocal microscopy[J]. *Applied Optics*, 1998, 37(28): 6764 – 6770.
- [49] ISHIHARA M, SASAKI H. High-speed surface measurement using a non-scanning multiple-beam confocal microscope[J]. *Optical Engineering*, 1999, 38(6): 1035 – 1040.
- [50] TAN J B, WANG F S. Theoretical analysis and property study of optical focus detection based on differential confocal microscopy[J]. *Measurement Science and Technology*, 2002, 13(8): 1289 – 1293.
- [51] RAHLVES M, ROTH B, REITHMEIER E. Confocal signal evaluation algorithms for surface metrology: uncertainty and numerical efficiency[J]. *Applied Optics*, 2017, 56(21): 5920 – 5926.
- [52] 石国强. 玻璃基板表面高度信息获取方法的研究 [D]. 西安: 西安理工大学, 2021.
- [53] KHONINA S N, KAZANSKIY N L, BUTT M A, et al. Optical multiplexing techniques and their marriage for on-chip and optical fiber communication: a review[J]. *Opto-Electronic Advances*, 2022, 5(8): 210127.
- [54] 李春艳, 李庚鹏, 刘继红, 等. 基于 GRNN 的光谱共焦位移测量方法分析与研究 [J]. *光子学报*, 2022, 51(3): 0330001.
- [55] LEE D R, GWEON D G, YOO H. Annular-beam dual-detection confocal reflectance microscopy for high-speed three-dimensional surface profiling with an extended volume[J]. *Measurement Science and Technology*, 2020, 31(4): 045403.
- [56] BAI J, LI J W, WANG X H, et al. A new method to measure spectral reflectance and film thickness using a modified chromatic confocal sensor[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2022, 154: 107019.
- [57] ZHONG F, HU W, ZHU P N, et al. Piezoresistive design for electronic skin: from fundamental to emerging applications[J]. *Opto-Electronic Advances*, 2022, 5(8): 210029.
- [58] COX G, SHEPPARD C J R. Measurement of thin coatings in the confocal microscope[J]. *Micron*, 2001, 32(7): 701 – 705.
- [59] WANG H F, SHI L P, LUKYANCHUK B, et al. Creation of a needle of longitudinally polarized light in vacuum using binary optics[J]. *Nature Photonics*, 2008, 2(8): 501 – 505.
- [60] KUO W C, BOU Y K, LAI C M. Simultaneous measurement of refractive index and thickness of transparent material by dual-beam confocal microscopy[J]. *Measurement Science and Technology*, 2013, 24(7): 075003.
- [61] 张雅丽, 余卿, 尚文键, 等. 斜照明式彩色共聚焦测量系统设计及其实验研究 [J]. *中国光学*, 2022, 15(3): 514 – 524.
- [62] YU Q, ZHANG Y, SHANG W, et al. Thickness measurement for glass slides based on chromatic

- confocal microscopy with inclined illumination[J]. *Photonics*, 2021, 8(5): 170.
- [63] ZHOU R J, SHEN D R, HUANG P, et al. Chromatic confocal sensor-based sub-aperture scanning and stitching for the measurement of microstructured optical surfaces[J]. *Optics Express*, 2021, 29(21): 33512 – 33526.
- [64] YE L, QIAN J, HAITJEMA H, et al. On-machine chromatic confocal measurement for micro-EDM drilling and milling[J]. *Precision Engineering*, 2022, 76: 110 – 123.
- [65] LEE D, GWEON D G, YOO H. Multipoint scanning dual-detection confocal microscopy for fast 3D volumetric measurement[J]. *Journal of Microscopy*, 2018, 270(2): 200 – 209.
- [66] WU Y C, HAN X F, SU Y J, et al. Multiview confocal super-resolution microscopy[J]. *Nature*, 2021, 600(7888): 279 – 284.
- [67] MOWLA A, DU B W, TAIMRE T, et al. Confocal laser feedback tomography for skin cancer detection[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(9): 4037 – 4048.
- [68] CARVER G E, LOCKNAR S A, MORRISON W A, et al. High-speed multispectral confocal biomedical imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(3): 036016.
- [69] AMALDOSS M J N, PANDZIC E, KOSHY P, et al. Detection and quantification of nanoparticle-induced intracellular ROS in live cells by laser scanning confocal microscopy[J]. *Methods*, 2022, 207: 11 – 19.
- [70] MA X J, GAO D Z, YANG M S, et al. Measurement of thickness of metal thin film by using chromatic confocal spectral technology[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2011, 19(1): 17 – 22.
- [71] ZSCHENDERLEIN U, ZHANG H, ECKE R, et al. Dynamical characterisation of a miniaturised bulge tester for use at elevated temperatures[C]//2021 22nd International Conference on Thermal, Mechanical and Multi-Physics Simulation and Experiments in Microelectronics and Microsystems (EuroSimE). St. Julian: IEEE, 2021: 1 – 6.
- [72] MOUD A A. Polymer blends analyzed with confocal laser scanning microscopy[J]. *Polymer Bulletin*, 2023, 80(6): 5929 – 5964.
- [73] DEDOVETS D, MONTEUX C, DEVILLE S. A temperature-controlled stage for laser scanning confocal microscopy and case studies in materials science[J]. *Ultramicroscopy*, 2018, 195: 1 – 11.
- [74] XI M M, WANG Y Q, LIU H B, et al. Calibration of beam vector deviation for four-axis precision on-machine measurement using chromatic confocal probe[J]. *Measurement*, 2022, 194: 111011.
- [75] CHEN Z Z, WANG Z D, REN M J, et al. Development of an on-machine measurement system for ultra-precision machine tools using a chromatic confocal sensor[J]. *Precision Engineering*, 2022, 74: 232 – 241.
- [76] LI S B, SONG B F, PETERSON T, et al. MicroLED chromatic confocal microscope[J]. *Optics Letters*, 2021, 46(11): 2722 – 2725.
- [77] CHOI Y M, YOO H, KANG D. Large-area thickness measurement of transparent multi-layer films based on laser confocal reflection sensor[J]. *Measurement*, 2020, 153: 107390.
- [78] SCHLAFER S, MEYER R L. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 138: 50 – 59.
- [79] VILLARD A, BREUSKIN I, CASIRAGHI O, et al. Confocal laser endomicroscopy and confocal microscopy for head and neck cancer imaging: Recent updates and future perspectives[J]. *Oral Oncology*, 2022, 127: 105826.
- [80] XAVIER J B, WHITE D C, ALMEIDA J S. Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging[J]. *Water Science and Technology*, 2003, 47(5): 31 – 37.
- [81] BEZAK T, ELIAS M, SPENDLA L, et al. Complex roughness determination process of surfaces obtained by laser confocal microscope[C]//2016 IEEE 20th Jubilee International Conference on Intelligent Engineering Systems. Budapest: IEEE, 2016: 157 – 160.
- [82] SUN D G, SHANG H P, JIANG H L. Effective metrology and standard of the surface roughness of micro/nanoscale waveguides with confocal laser scanning microscopy[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(4): 747 – 750.

(编辑: 张 磊)