

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201703056



光学显微系统的图像质量优化方法

崔长彩¹, 张勇贞¹, 易定容², 孔令华³, 刘志群²

- (1. 华侨大学 制造工程研究院, 福建 厦门 361021;
2. 华侨大学 机电及自动化学院, 福建 厦门 361021;
3. 福建工程学院 机械与汽车工程学院, 福建 福州 350118)

摘要: 为了改善显微成像系统的照明均匀度和光照度,对透射式显微镜照明装置中的聚光镜进行优化设计. 首先,分析由双透镜组成的阿贝聚光镜光轴不对中、通光孔径小等问题对成像质量带来的负面影响. 然后,提出用单一非球面透镜替代双透镜聚光镜来改善成像质量的方法. 最后,实测聚光镜改进前后的照明装置对显微镜照明均匀度和光照度等关键性能指标的影响. 实验结果表明:在 20X、40X 物镜下,使用单个非球面透镜组成的聚光镜的照明装置的照明均匀度分别达到 0.50% 和 0.66%,比改进前的双透镜聚光镜的均匀度提高 5 倍;同时,优化聚光镜后的照明装置光照度比优化前分别提高了 15% 和 17%. 实际样本实验也表明,使用单个非球面透镜聚光镜的照明装置能有效提高照明均匀度和光照度,可以改善透射式光学显微镜的成像质量.

关键词: 照明均匀度; 光照度; 非球面透镜; 阿贝聚光镜; 光学显微成像方法

中图分类号: TP 394.1; TH 691.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2017)06-0768-06

Image Quality Optimization Method of Optical Microscopy System

CUI Changcai¹, ZHANG Yongzhen¹, YI Dingrong²,
KONG Linghua³, LIU Zhiqun²

- (1. Institute of Manufacturing Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. College of Mechanical Engineering and Automation, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
3. College of Mechanical and Automotive Engineering, Fujian University of Technology, Fuzhou 350118, China)

Abstract: The condenser of a transmissive optical microscope was optimized for improving its illumination uniformity and intensity. First, the adverse impact on the image quality resulting from potential misalignment of optical axes and small aperture of a multi-lens Abbe condenser was discussed. Then, an optimized design was proposed by using a single aspheric lens to replace the multi-lens Abbe condenser to improve the uniformity and intensity of illumination system. Finally, experiments were conducted to investigate the effects of the single aspheric lens condenser on image quality. The experimental results showed that the illumination uniformity of the microscope with the optimized condenser reached 0.50% and 0.66% under objectives with 20X and 40X magnifications respectively which were about 5 times better than those of the two-spherical lens condenser. Meanwhile, the intensity of the microscope with the new condenser increased over 15% and 17% under 20X and 40X objective lenses respectively as compared to those of the two-lensed system. Therefore, the optimized illumination system with a single aspheric lens can effectively improve the image uniformity and the intensity of

收稿日期: 2017-03-24

通信作者: 崔长彩(1972-),女,教授,博士,主要从事表面形貌评定技术、表面形貌测量技术及自动测量仪器的研究.
E-mail:cuichc@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51235004, 51475176)

the microscope, which results in an image of better quality.

Keywords: illumination uniformity; illumination intensity; aspheric lens; abbe condenser; optical microscope imaging method

随着全自动数字扫描显微成像技术的发展,光学显微成像技术在病理诊断上的应用越来越广泛. 病理诊断和生物检测的成像过程中对图像质量要求越来越高^[1-2], 图像的好坏直接影响光学显微系统的评定、自动对焦精度等问题^[3]. 照明装置是光学显微成像系统的重要组成部分,其照明均匀度和光照度是影响显微成像系统图像质量的两个重要因素. 光学显微系统的性能直接受照明均匀度和光照度的影响,文献提出分别采用软件和硬件的方法来提升照明均匀度和光照度的性能. 李庆忠等^[4]运用小波变换算法增强图像照度;梁琳等^[5]阐述了图像增强算法对不同领域的图像均匀性提升;朱珂汉等^[6]采用掩膜法对透射显微镜的照明均匀度进行了有效校正. 软件算法虽在一定程度上提高图像质量,但往往容易受背景与样本的对比度影响,改善效果并不明显. 硬件优化则是在成像前对照明光路做了改进. 朱晓萌等^[7]在基于卤素灯光源的基础上研制了一套 FF-OCT 成像系统,使用改进型科勒照明装置在提升图像质量方面取得了不错的效果;Deng 等^[8]早期将近百个复眼透镜阵列植入聚光装置内,显著地改善了成像均匀性;王沛沛等^[9]利用双排复眼透镜实现大面积均匀照明. 由于复眼透镜太小加工难度大、成本高且工作环境要求严格,较少在普通生物显微镜上应用. 本文采用只包含单个非球面透镜的聚光镜来同时提升照明均匀度和光照度,实验结果证明该方法可行.

1 显微镜照明装置的原理与优化分析

1.1 显微镜的照明装置

常用显微镜的照明装置有临界照明和科勒照明. 临界照明实际上就是把光源(比如灯丝)直接成像到被照物体上的一种照明方法. 这种照明方法容易实现且光能利用率高,相当于在物平面上放置光源,但容易受光源表面亮度不均匀或细小的结构影响. 观测生物标本一般采用比临界照明装置具有更高均匀度的科勒照明. 常规科勒照明的原理,如图 1 所示. 由图 1 可知:灯丝产生的卤素光源经集光镜在光阑 2 成像,再由聚光镜将光阑 2 得到的光在物镜的入口成像(一般为无穷远处);同时,聚光镜还将光阑 1 进入的光成像于标本面上;光阑 1,2 可以分别调整光源的入光孔径和视场成像光阑,分别称为孔径光阑和视场光阑. 因此,科勒照明能够获得均匀的照明效果.

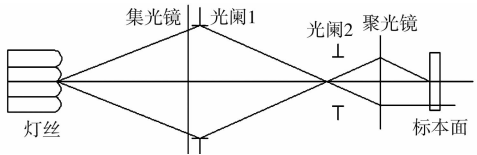


图 1 科勒照明原理

Fig. 1 Principle of Kohler illumination system

在科勒照明中,聚光镜在孔径光阑和视场光阑的成像时都扮演重要的作用,可以保证系统的照明均匀度. 因此,对聚光镜具有非常高的要求. 聚光镜通常是由多个透镜组成,多透镜轴向是否对中对是影响聚光镜性能的主要因素. 透射光照明成像系统结构简图,如图 2 所示. 通过改进多透镜组是提高照明装置的光照度和均匀性的方法之一.

1.2 显微成像系统的照明均匀度和光照度

采用均匀度和光照度指标分析显微成像质量. 由光照度的定义^[10-11]可知,光照度(E)、光强值(I)、光源与受照面积之间的距离(R)、光源通过照明装置的孔径角(γ)之间的关系为

$$E = (I \times \cos \gamma) / R^2. \tag{1}$$

由此可知:光照度和点光源的光强成正比,与光照距离平方成反比,与孔径角 γ 的余弦值成正比. 当 $\gamma=0$ (即垂直照明)时,光照度达到最大.

由光照度可得照明均匀度的定义^[12]为

$$U(x,y) = [E(x,y) - \bar{E}] / \bar{E}. \tag{2}$$

式(2)中: $U(x,y)$ 为照明均匀度; \bar{E} 为被照明物体表面照度的平均值; $E(x,y)$ 为被照明物面上某点的照度值,通常照度值可以是灰度值大小. 式(2)可以直观地理解为各点照度与平均值的差异,但仅仅是一种

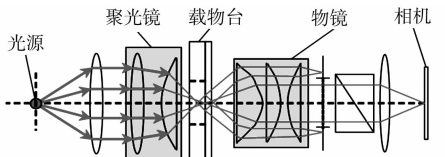


图 2 透射光照明成像系统结构简图

Fig. 2 Framework of illumination imaging system

统计学的平均结果. 为了定量的评价优化方案,采用光照度和均匀度进行度量.

1) 光照度的度量. 光照度的度量采用平均灰度值的比率(η)度量,计算式为

$$\eta = \bar{I}_B / \bar{I}_F.$$

(3)

式(3)中: \bar{I}_F, \bar{I}_B 分别为优化前后的图像平均灰度值. 当 $\eta > 1$ 时,表示新聚光镜的光照度更好;当 $\eta = 1$ 时,表示聚光镜无优化效果;而当 $\eta < 1$ 时,表示新聚光镜的光照度更差.

2) 均匀度的度量. 均匀度表示图像每个像素点与整体均值的偏离程度,可用变异系数 c_V 表示,即

$$c_V = \delta / \bar{I}.$$

(4)

式(4)中: $\delta = \sqrt{\frac{1}{(M \times N - 1)} \cdot \sum_{x \leq M, y \leq N} \{I(x, y) - \bar{I}\}^2}$; $\bar{I} = \frac{1}{M \times N} \cdot \sum_{x \leq M, y \leq N} I(x, y)$; $I(x, y)$ 为 (x, y) 点处的灰度值; M, N 分别代表图像的行、列数.

表 1 聚光镜的类型

Tab. 1 Type of condensers

聚光镜的类型	有无畸变修正	
	球差	色差
阿贝聚光镜	无	无
消球差聚光镜	有	无
消色差聚光镜	无	有
消球差-消色差聚光镜	有	有

2 聚光镜的原理与优化分析

2.1 阿贝聚光镜的工作原理

聚光镜的分类根据畸变修正程度和使用的领域如明场、暗场、相位相反等不同而有所不同. 按畸变修正程度分类是一种较为常用的分类方法,如表 1 所示.

文中的生物显微镜采用的是没有对球差和色差进行畸变修正的双透镜阿贝聚光镜. 它由若干个光学透镜组按轴线方向的位置关系排列组成,如图 3 所示. 其工作原理:从点光源发出的发散光聚集成平行光束进入聚光镜的孔径光阑,根据对应物镜的数值孔径值调整孔径光阑保证入射的平行光以一定半径的光通量进入聚光镜的透镜组中;然后,经过多次折射以光锥的形式汇聚到样本面上;最后,由样本面上的光以最佳的孔径角 α 入射到物镜,最终在相机成像的过程.

光线经过孔径光阑进入阿贝聚光镜的双透镜组,经过多次折射进入到物镜的入瞳孔内. 在多次折射过程中,对双透镜组的轴线对中要求是非常严格的. 然而,实际工厂的组装环境不具备光轴对中检验设备,难以保证透镜组光轴的一致性. 另外,光源也是影响照明均匀性的因素之一. 理想点光源不具有方向性,是实现理想均匀照明的条件之一,但实际光源并非理想点光源,均匀照明时难免会受到具有方向性光源的影响.

为了尽可能地减少影响,可以通过选择数值孔径大的物镜来利用系统的光通量,但光通量的增大会加剧亮度的方向选择性. 因此,由修正的不同视场 β (光线范围与光轴中心的夹角)处的照度公式可知

$$E_i = \frac{B_i}{B_0} E_0 \cos^4 \beta_i.$$

(5)

式(5)中: B_i 为某一角度 β_i 对应亮度值; B_0 为沿光轴方向的亮度值, B_0 值大于等于 B_i ; E_0 为沿光轴方向的照度值; E_i 为某一角度 β_i 对应的照度值,同样地, E_0 值大于等于 E_i . 不同的 β_i 会引起不同的光照度值变化,由此可知,光源亮度的方向性会造成视场的不均匀照明.

另外,阿贝聚光镜的通光孔径不能太大,否则,球差变大会导致照明均匀度变差,从而限制了光通量,影响了光照度的大小. 因此,通过调整孔径大小无法同时提高均匀度和光照度. 在物镜数值孔径值高于 0.60 时,阿贝聚光镜色差、球差容易显现出来. 因此,阿贝聚光镜多用于普通显微镜上,不满足具有高倍数且高数值孔径的高端光学显微成像系统的要求.

2.2 非球面单透镜聚光镜的设计

阿贝聚光镜透镜组的光轴不对中和光源等因素会影响照明装置的均匀度和光照度,且标本照明难以同时获得高的均匀度和光通量. 采用单透镜聚光镜解决光轴不对中问题,而为同时提高光通量和均匀度,采用非球面设计,即采用由单个非球面透镜组成的聚光镜设计方案. 虽然非球面透镜的加工复杂,但现代精准微纳加工技术可以实现非球面光学透镜加工. 图 4 为非球面单透镜聚光镜设计,通过仿真设

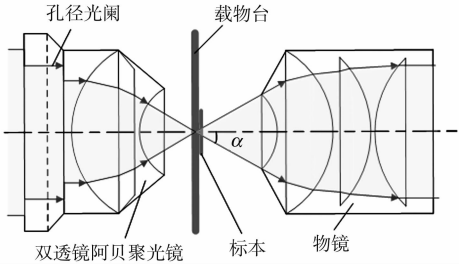


图 3 阿贝聚光镜光路图

Fig. 3 Abbe condenser optical pathway

计得到最佳面型尺寸. 图 4 中: W 为聚光镜的通光孔径, 取值为 49 mm; h 为透镜的最大厚度, 取值为 21 mm; 非球面透镜的 1, 2 面半径大小分别为 30, 60 mm 的球面, 球心均在 X 坐标轴上.

3 实验结果与分析

3.1 聚光镜轴向高度的选取

考虑到聚光镜的轴向位置对成像质量的影响, 通过移动聚光镜的轴向位置, 即在分别不同的 16 个位置获取 16 张图像, 按各张图像的单列像素作为一列求平均灰度值(\bar{I}), 如图 5 所示.

由图 5 可知: 位置 1 到位置 16 的曲线反映随着聚光镜逐渐靠近样本, 图像的灰度值越大. 由此可知, 聚光镜的轴向高度对成像质量的影响是不可忽视的. 因此, 在对比实验和测试样过程中, 可将聚光镜调整为统一的轴向高度.

3.2 透明样本的对比实验

分别选取 20X 和 40X 物镜对样品的照明均匀度和光照度进行测试, 实验条件, 如表 2 所示. 为了减少相机的曝光时间对成像亮度值的影响, 以及保证对比实验条件一致, 满足成像要求, 在 20X/NA=0.65 物镜下, 选取曝光时间为 5 ms, 而在 40X/NA=0.75 物镜下, 选取曝光时间为 4 ms. 无样本载玻片更有利于评价照明均匀度和光照度, 因此, 选用透明载玻片作为观测样本. 为了达到聚光的最佳效果, 调整聚光镜 NA 值和相应放大倍数物镜的 NA 值相同.

由表 2 可知: 在 20X/NA=0.65 的物镜下, 测试得到采用由单个非球面透镜组成的新聚光镜的比率 η 为 1.15, 相比于使用双球面透镜的旧聚光镜提高了 15% 的照度值; 而在 40X/NA=0.75 的物镜下, 测试得到新聚光镜的比率 η 为 1.17, 相比于旧聚光镜提高了 17% 的照度值.

为了比较新旧聚光镜的光照度, 令旧聚光镜的光照度比率(η)为 1.00, 新旧聚光镜的性能对比, 如表 3 所示. 显微镜相机采集到的透明样本图片按分块方式处理, 即求取每一列像素的平均灰度值, 绘制曲线如图 6 所示. 由图 6 可知: 旧聚光镜评价曲线中心区域的灰度值大于两侧, 即照明

光场分布呈现余弦分布, 图像边缘的光强约为中心光强的 97%. 优化后, 由于光通量的增加, 有效地减少了余弦分布的趋势, 即新聚光镜的评价曲线趋势基本趋于水平.

表 3 新旧聚光镜的性能对比

Tab. 3 Comparison of performance between old and new condenser

物镜放大倍数	类型	c_v	\bar{I}	η
20X	单个非球面透镜聚光镜	0.005 0	217.9	1.15
20X	双球面透镜聚光镜	0.022 2	189.4	1.00
40X	单个非球面透镜聚光镜	0.006 6	181.1	1.17
40X	双球面透镜聚光镜	0.028 6	154.2	1.00

测试数据表明: 文中所设计的非球面单透镜聚光镜在 20X, 40X 物镜的条件下均实现了光照度的提升; 不同放大倍数的数据偏差主要是在不同条件下相机曝光时间参数设置不同引起的.

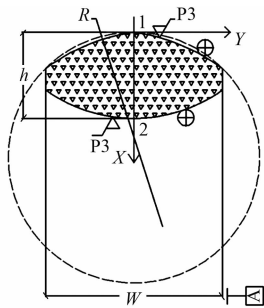


图 4 非球面单透镜聚光镜仿真设计

Fig. 4 Single lens of aspherical condenser

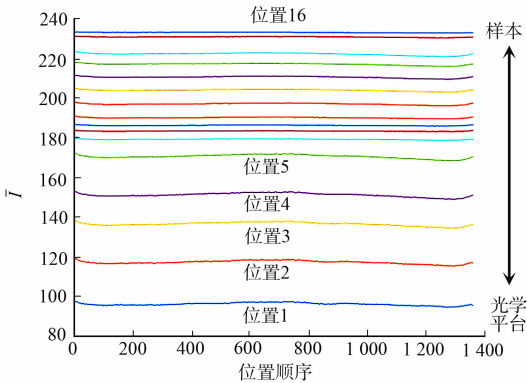


图 5 聚光镜的不同轴向高度成像实验

Fig. 5 Experiments of condenser imaging under different axial height

表 2 透明样本对比实验条件

Tab. 2 Transient sample comparison experimental conditions

物镜放大倍数	类型	曝光时间/ms	NA
20X	新聚光镜	5	0.65
20X	旧聚光镜	5	0.65
40X	新聚光镜	4	0.75
40X	旧聚光镜	4	0.75

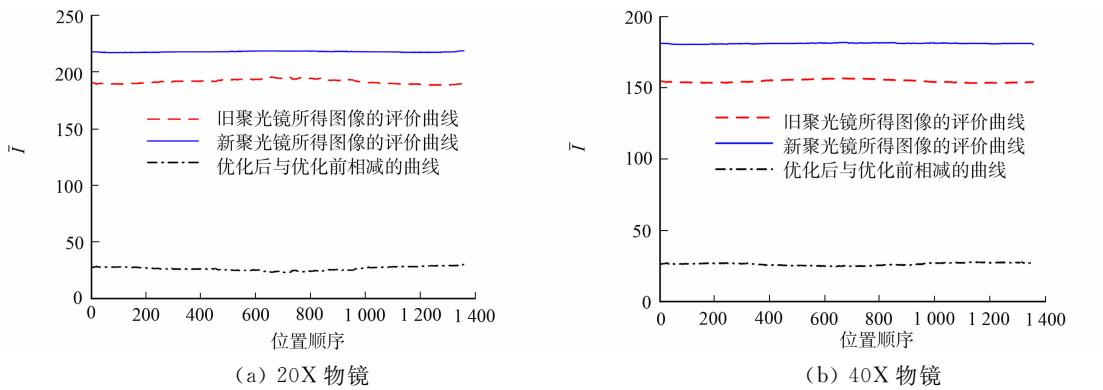


图 6 不同倍数物镜下透明样本图像处理结果

Fig. 6 Image processing results of transparent samples under different multiplier

3.3 照明均匀度的对比实验

分别在 20X,40X 物镜条件下对透明载玻片样本采集图像,并计算不同条件下新旧聚光镜获得的图像的 c_v 值. 在 20X/NA=0.65 的物镜下,测试得到旧聚光镜的 c_v 值为 2.22%,而采用由一个非球面单透镜组成的聚光镜获取的图像 c_v 值可达到 0.50%. 在 40X/NA=0.75 的物镜下,测试得到旧聚光镜的 c_v 值为 2.86%,而采用非球面单透镜的新聚光镜获取的图像 c_v 值可达到 0.66%. c_v 值越小表示图像均匀度越好,表明系统的照明均匀度越高. 综上,与传统的双透镜聚光镜相比,非球面单透镜聚光镜对照明装置的均匀度有较明显的改善.

表 4 实物样本成像条件

Tab. 4 Physical sample imaging

experiment conditions

物镜放大倍数	类型	曝光时间/ms	NA 值
20X	新聚光镜	5	0.65
20X	旧聚光镜	5	0.65
40X	新聚光镜	4	0.75
40X	旧聚光镜	4	0.75

3.4 实物样本图像质量对比实验

在同样条件下对实物样本做成像实验,采用 Moti-ic BA410E 显微镜和 Motiic Pro285A 相机,以染色细胞样本 1 和标准线对板样本 2 (ready optics extreme group 11)作为观察对象,实验条件如表 4 所示.

采集的样本优化前后聚光镜在 Motiic 20X 和 40X 物镜下的对比结果,分别如图 7,8 所示. 由图 7,8 可知: 由于照明均匀度受样本干扰严重,无法对测试实验均匀度做评价.

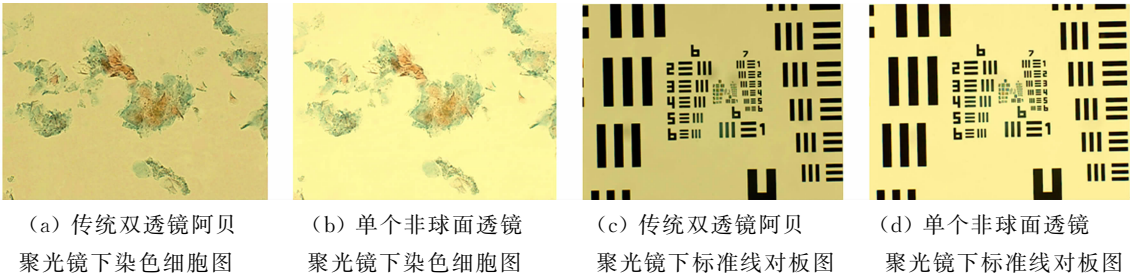


图 7 20X 物镜下新旧聚光镜对比实验

Fig. 7 Comparison between two condensers under 20X objective

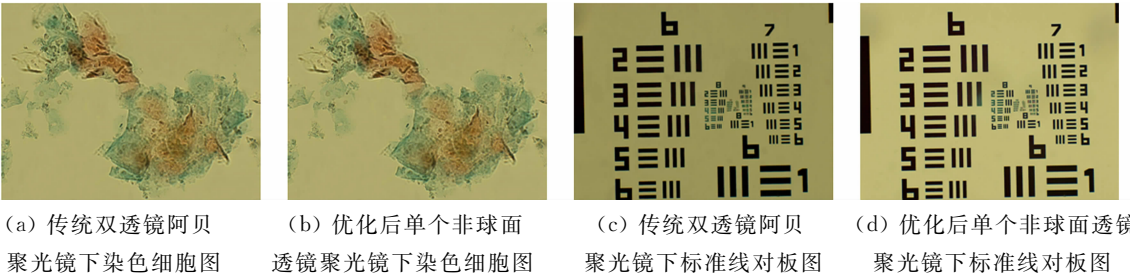


图 8 40X 物镜下聚光镜优化前后对比测试实验

Fig. 8 Comparison between two condensers under 40X objective

实物测试的光照度计算方法和对比实验的方法一致,处理数据结果如表 5 所示. 由表 5 可知: 同一

样本在不同放大倍数下成像对照明光照度的影响略有不同, 相比于 40X 物镜的视场, 20X 物镜的视场范围更大, 反映更多样本信息, 优化前后的灰度值相差较大. 从透明样本对比结果(表 3)显示, 在 20X 和 40X 物镜的成像系统及相同的摄像条件下, 优化后平均灰度值分别提升了 28.5 和 26.9, 而染色细胞测试的灰度差值均小于透明样本对比的实验结果. 这是由于染色细胞的透光性较差, 优化前后的差值在一定程度上有所减少, 均小于对比实验的结果差值. 由表 5 还可知: 20X 物镜下单个非球面透镜聚光镜的染色细胞和分辨率板的比率分别为 1.15, 1.15; 40X 物镜下单个非球面透镜聚光镜的染色细胞和分辨率板的比率分别为 1.18, 1.17. 综合不同生物样本的测试情况, 20X 和 40X 物镜下新聚光装置对光照度分别提升了 15% 和 17%.

4 结论

根据高端生物显微镜成像质量要求高的特点, 提出使用单个非球面透镜的聚光镜代替传统双透镜阿贝聚光镜的方法, 用于改善数字显微成像系统的照明均匀度和光照度. 实验结果证明, 在生物显微镜常用的 20X 和 40X 物镜观察下, 新聚光镜在照明均匀度方面的提升将近 5 倍(即 c_v 值降低大约 5 倍). 优化后的聚光装置在 20X 物镜下光照度的提升约为 15%, 40X 物镜下光照度的提升约为 17%.

在不同实际观察样本下, 相比传统双透镜阿贝聚光镜下观察效果, 单个非球面透镜的聚光装置能有效地改善显微成像系统数字照明均匀度和光照度, 为成像系统提供高质量图像. 与已有双排复眼透镜均匀照明装置相比, 两者都能提高照明均匀度. 但是, 文中方法的优势在于造价相对较低, 不存在双排复眼透镜对准问题, 因而具有更高的性价比, 更适合先进生物医学光学显微镜.

参考文献:

[1] 蔡霞, 方晓艾, 田兰婷, 等. 显微镜技术在植物细胞自噬研究中的应用[J]. 电子显微学报, 2016, 35(2): 180-185. DOI:10.3969/j.issn.1000-6281.2016.02.013.

[2] 吴太虎, 毛佳文, 陈锋, 等. 痕量微生物快速检测系统[J]. 光学精密工程, 2015, 23(11): 3061-3068. DOI:10.3788/OPE.20152311.3061.

[3] 韩昌元. 光电成像系统的性能优化[J]. 光学精密工程, 2015, 23(1): 1-9. DOI:10.3788/OPE.20152301.0001.

[4] 李庆忠, 刘清. 基于小波变换的低照度图像自适应增强算法[J]. 中国激光, 2015, 42(2): 272-278. DOI:10.3788/cjl201542.0209001.

[5] 梁琳, 何卫平, 雷蕾, 等. 光照不均图像增强方法综述[J]. 计算机应用研究, 2010, 27(5): 1625-1628. DOI:10.3969/j.issn.1001-3695.2010.05.006.

[6] 朱珂汉, 杨鸣, 蒋金涛. 显微镜透射光照不均匀图像校正方法[J]. 计算机应用, 2013, 33(增刊 1): 190-192.

[7] 朱晓萌, 高万荣, 朱越. 使用改进型科勒照明系统的全场光学相干层析成像系统[J]. 光学学报, 2014, 34(5): 57-61. DOI:10.3788/aos201434.0511002.

[8] DENG Ximing, LIANG Xiangchun, CHEN Zezun, *et al.* Uniform illumination of large targets using a lens array [J]. Applied Optics, 1986, 25(3): 377-381. DOI:10.1364/AO.25.000377.

[9] 王沛沛, 杨西斌, 朱剑锋, 等. 基于复眼透镜的大面积均匀照明方案研究[J]. 应用光学, 2014, 35(5): 771-778. DOI: 10.5768/JAO201435.0501007.

[10] 屈恩世, 张恒金, 曹剑中, 等. 对光学设计中照度计算公式的讨论[J]. 光学学报, 2008, 28(7): 1364-1368. DOI:10.3321/j.issn:0253-2239.2008.07.028.

[11] 杜温铎, 李福田, 周秀良. 均匀照明和照度分布计算[J]. 光学精密工程, 1978(4): 1-6.

[12] 周淑文, 林金波. 复眼透镜照明系统的均匀性[J]. 浙江大学学报(工学版), 1986, 20(5): 135-141.