

DOI: 10.19650/j.cnki.cjsi.J2107561

无限共轭距物镜的数值孔径全自动测量方法与系统*

张粹玲, 张 蓓

(北京航空航天大学自动化科学与电气工程学院 北京 100191)

摘 要:提出了一种针对无限共轭距显微物镜的数值孔径测量方法,采用载玻片与空气界面处的全反射效应以及其在物镜的后焦面产生的全反射圆作为数值孔径参考基准,根据阿贝正弦定理推导出物镜的数值孔径。完成了基于该原理的实验测试系统的研发,包括光学系统、控制系统和完整的后焦面算法流程。其中的图像处理算法采用了二维傅立叶相关分析和灰度统计。对若干实际的油浸物镜的数值孔径进行了测量,结果表明本方法相对误差低于1%,远低于本文对比的其它方法。本方法对应的实验测量装置简单,可快速、全自动化地对实际的油浸物镜的数值孔径进行测量,且测量结果具有高精度和高重复性的优势,能直接用于无限共轭距油浸物镜的数值孔径测量,解决当前制约我国高端镜头检测方面的困难,具有很好的应用前景。

关键词:油浸显微物镜;数值孔径测量;阿贝正弦定理;傅立叶平面;傅立叶相关分析

中图分类号: TH741 文献标识码: A 国家标准学科分类代码: 510.20

Approach and system for automatic numerical aperture measurement of infinite conjugate objective

Zhang Cuiling, Zhang Bei

(School of Automation Science and Electrical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract: Proposes an approach to measure the numerical aperture (NA) of the infinite conjugate objective. It utilizes the total internal reflection (TIR) phenomenon occurring on the air-coverslip interface to generate a reference on the back focal plane (BFP), and the NA is measured based on Abbe sine condition. According to the principle, a home-designed measurement system is developed, containing the optical system, the control system and the whole image-processing software to extract the NA value from experimentally acquired BFP images. The algorithm of the image-processing software utilizes the two-dimensional Fourier correlation analysis and grayscale statistics. The NA values of several objective lenses are measured experimentally. The results indicate that the relative error of the proposed method is no more than 1%, much lower than that of the other method compared in this work. The proposed method features on the simple measurement configuration and fast and automatic measurement of the NA of practical oil-immersion objective lenses. The results show high precision and good repeatability. The approach works for the NA measurement of the infinite conjugate oil-immersion objective lenses.

Keywords: oil-immersion objective lens; numerical aperture measurement; Abbe sine condition; Fourier plane; Fourier Correlation Analysis

0 引 言

高数值孔径(numerical aperture, NA)物镜分辨率高、收光能力强,被广泛应用于光学显微镜^[1]、表面等离子体技术^[2]、光学存储^[3]以及激光处理^[4]等多个领域。

数值孔径NA是表征物镜聚焦特性的重要参数,定义为透镜与被检物体之间的折射率(n)和孔径角半数的正弦之乘积。在实际使用中,为了对实验装置进行合理规划^[5-6]以及对测量结果进行正确的评估^[7],需要对物镜数值孔径进行精确测量。目前国内外使用的高NA物镜,尤其是20世纪90年代推出的无限共轭距物镜,主要来

收稿日期:2021-03-06 Received Date: 2021-03-06

* 基金项目:北航青年拔尖人才计划(YWF-21-BJ-J-715)项目资助



自于诸如莱卡、蔡司、尼康、奥林巴斯等镜头巨头。这些商用的无限共轭距的商用油浸物镜在出厂时通常对其 NA 值进行了标定(位于镜头筒中部位置),用户可直接根据该标定值进行设计和操控。对于 NA 可变的油浸物镜,厂商则仅给出 NA 的可变范围。用户在具体使用时,如果需要知晓具体的 NA 值,则需要用户自标定。

我国的显微物镜制造厂商多年来为国外镜头厂商进行代工。在代工的过程中,积累了一定的加工和镜头组装经验,促进了国产镜头的问世。但是由于缺乏相关的检测技术和装备,国产镜头的参数标定问题未能有效地解决,目前主要采取两种方案:第一,直接将理论值作为标定值。由于油浸物镜(或固浸物镜)是经过物镜与匹配油(或固体小球)装配得到,根据几何关系可得到理论数值孔径值^[8-9],但是将理论值作为实际值,仅适用于一些对数值孔径要求不严格的场合。第二种方案是代工时通过积累参数和经验,将国外对标镜头的参数直接作为“逆向研发-自主加工/组装”国产镜头的参数。很显然,两种情况下的实际数值孔径值并未经过准确测量。因此,有必要提出一套简单可行的数值孔径测量方案对数值孔径进行测量。

通过对国内外的 NA 检测方案和仪器进行调研,我们发现对于早期的干物镜(待测样品和镜头之间为空气),通常采用技术成熟的商用数值孔径仪进行测量,如阿贝孔径仪(<http://www.microscope-antiques.com/abbeapert.html>)和针对阿贝孔径仪的改进,如 Stolle 孔径仪(<https://www.inspec-international.com/INSPECUK/images/pdf/Equipment/Respiratory/Apertometer.pdf>)和 Cheshire 孔径仪(www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artapr13/dg-aperture.html)等,这些仪器需要测量人员对游标进行手动调节,使十字线交点与观察到的圆斑相切来读取数值孔径数值,是目前使用仍较为广泛的一类方法。但是对于油/固浸物镜,这类商用数值孔径仪并不适用。虽然可对这类商用仪器进行改进使其勉强可用,但是需要额外的辅助物镜,且测量者要在出瞳面进行观察,测量过程较复杂,对测量人员要求也较高,目前并没有可商用化的仪器。对于产业界的镜头巨头厂商如何对其高端油浸物镜进行测量,基于商用技术保密的需求,目前并没有文献报道。通过调研文献,我们发现学术界目前有 3 种方案:

第 1 种方案为间接测量方案,通过焦面场的自相关运算得到的点扩散自相关函数(point-spread autocorrelation function, PSAF)来测量数值孔径^[10],可用于实时测量高数值孔径物镜的数值孔径,但这一方法计算较复杂。第 2 种方法即“rear-angle”法^[11],也是间接测量方案,通过测量物镜焦距、放大率以及物镜在像平面侧聚焦角来确定数值孔径。该方法充分利用了物镜的成像特性,但是由于待测量较多,更容易引入测量误差。同

时,无论是改进型的孔径仪,还是两类改进方法,都面临着测量速度慢、依赖于人工等问题,且在用于高数值孔径物镜时操作复杂,实用性不强。

近些年来,另一种便捷的方案(第 3 种方案)即傅立叶平面(对应于实验系统中的后焦面/BFP)法问世。国内外已有部分实验室采用了该方案,例如 Dai 等^[12]提出利用荧光物质的反射特性将聚焦角度分布转化为后焦面(back focal plane, BFP)孔径分布的方法来测量数值孔径,为数值孔径的测量提供了一种新的思路;Wan 等^[13]也成功将该荧光后焦面法用于固浸物镜的 NA 测量中。考虑到实际使用中荧光法的系列问题诸如荧光分子的光漂白及不稳定性、荧光物质与载玻片之间的空气间隙对测量精确的影响、部分用户对荧光技术的不熟悉等,提出了一种原理和操作都非常简单和便捷的测量方案,并开发了实验样机对其进行验证。具体地,本文充分利用物镜后焦面中孔径分布与聚焦角直接对应这一特点,提出一种简单的测量无限共轭距物镜数值孔径的方法,该方法利用全内反射(total internal reflection, TIR)效应在物镜后焦面上产生一个全反射圆环作为参考基准来确定数值孔径。依据此测量原理搭建了一套完整的实验平台以获取后焦面图像,并相应提出一套测量识别算法,能够通过自动识别 BFP 图像特征实现数值孔径的快速、精确测量,极大地减少了人眼观测带来的随机误差,降低对人工操作的依赖性。

1 测量原理

该测量方法的原理如图 1 所示,利用光束在载玻片/空气界面发生的全反射效应实现数值孔径的测量。测量时使载玻片远离显微镜物镜的表面置于物镜的焦平面,由激光器发射的光束经扩束镜后成为横截面直径等于或大于被测物镜通光孔径的光束,光束通过待测显微物镜聚焦到标准载玻片远离物镜的表面,即载玻片与空气的交界面(如图 1 中纯色光束所示)。光线由光密介质进入光疏介质,会发生全反射现象,根据 Snell 定律可知全反射临界角 θ_{TIR} 满足: $\sin\theta_{TIR} = n_{air}/n_1$, 其中 n_1 表示载玻片和载玻片与显微镜之间填充介质的折射率, n_{air} 表示空气的折射率,取空气折射率为 1,则上式变为: $\sin\theta_{TIR} = 1/n_1$ 。当激光入射角较小时,光线透过载玻片表面进入空气中,反射光振幅较小;而当激光入射角大于全反射临界角时,发生全反射,反射光振幅较大(如图 1 阴影部分光线所示)。光线在临界角和最大孔径角附近的反射强度发生突变,此时,对反射光在物镜后焦面的成像进行捕捉,可得到半径分别对应物镜通光孔径(clear aperture, CA)半径 R_{CA} 和全反射吸收圆半径 R_{TIR} 的圆环形图案(如图 1 所示)。目前所使用的物镜大多为消像差物镜,满足阿贝正弦定理,则光线聚焦角(反射角)的正弦与对应光

线在后焦面的径向位置成线性关系,由此可以得到全反射临界角 θ_{TIR} 和最大聚焦角 θ_{CA} 与反射光线在后焦面投影的径向位置 R_{TIR} 、 R_{CA} 之间满足如下关系^[12,14]:

$$\begin{cases} R_{TIR} = f \sin \theta_{TIR} \\ R_{CA} = f \sin \theta_{CA} \end{cases} \quad (1)$$

式中: f 是待检物镜的焦距。通过式(1)可将光线的角度分布转化为后焦面上孔径大小的分布,即:

$$\frac{\sin \theta_{TIR}}{\sin \theta_{CA}} = \frac{R_{TIR}}{R_{CA}} \quad (2)$$

其中,最大聚焦角 θ_{CA} 对应的是物镜的数值孔径。结合全反射临界角定义以及数值孔径定义 $NA = n_1 \sin \theta_{CA}$,又可以得到:

$$\frac{\sin \theta_{TIR}}{\sin \theta_{CA}} = \frac{n_1 \sin \theta_{TIR}}{n_1 \sin \theta_{CA}} = \frac{n_{air}}{NA} = \frac{1}{NA} \quad (3)$$

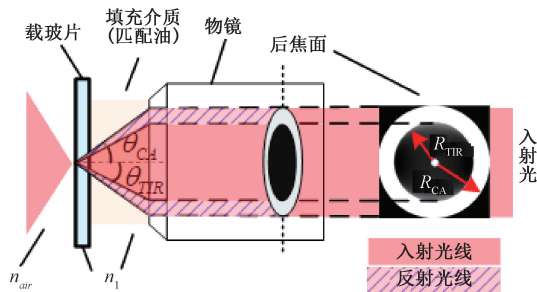


图1 测量原理

Fig. 1 The principle of the measurement

故物镜的数值孔径可由下式计算得到:

$$NA = \frac{R_{CA}}{R_{TIR}} \quad (4)$$

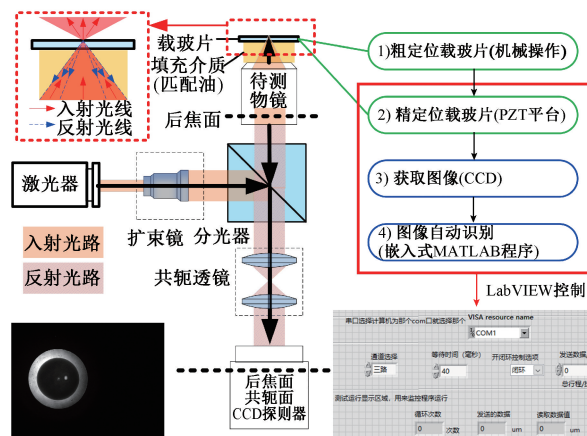
由式(4)可看出,物镜的数值孔径可通过显微物镜后焦面成像的最大光圈的半径及全反射吸收圆的半径的比值计算得到,利用阿贝正弦定理,将数值孔径的角度测量转化为后焦面孔径大小的测量,极大地简化了测量步骤。值得注意的是,此方法中数值孔径是通过全反射圆环半径与通光孔径圆环之间的相对关系测量的。为保证能在后焦面观测到全反射圆环,待测物镜的通光孔径圆环需大于全反射环,即所测物镜需要满足: $R_{CA} > R_{TIR}$,因此该方法适用于数值孔径大于1的物镜。

2 实验系统与图像处理

依据上述测量数值孔径原理,搭建了测量系统,并提出一套后焦面图像特征识别算法。为了验证这一套测量方案的可行性和有效性,进行了多次实验,分别测量了多个物镜的数值孔径。下文以奥林巴斯公司制造的数值孔径的标定 NA 为1.40的油浸物镜为例,对实验装置与图像处理步骤进行详细的阐述。

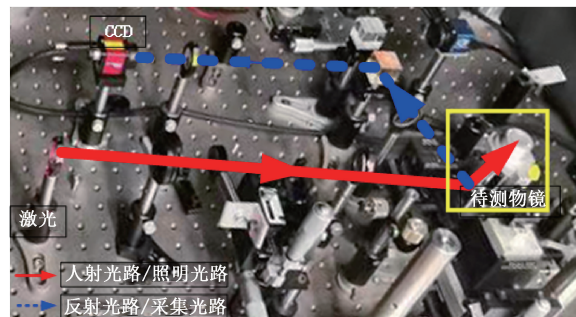
2.1 实验系统

依据原理设计的测量系统如图2所示,包括激光光源、待测显微油浸物镜、载玻片、用于捕获后焦面图像的CCD探测器,以及配套使用的激光扩束镜、分光器和一对共轭透镜。其中物镜、探测器以及一对共轭透镜共轴,激光照明光路与分光器所在平面成 45° 。照明光源采用波长为632.8 nm的氦氖激光,通过扩束装置成为宽度等于或大于物镜通光孔径的光束,经分光器后光线充满显微物镜的通光孔径(如图2(a)所示)。所使用的油浸物镜的数值孔径标定值为1.40,载玻片远离显微物镜的一侧位于系统的焦平面,且载玻片的折射率与油浸物镜所用匹配油的折射率相同,均为1.518,通过物镜的光线聚焦于载玻片远离物镜的一侧。图2(a)中虚框内展示了光线通过载玻片时的光路,纯色光线为入射光,其中小于临界角的光线透过载玻片,而大于临界角的光线则被反射回物镜。反射后的光线通过物镜和一对共轭透镜成像于位于物镜后焦面共轭面的探测器。实验所使用的CCD探测器型号为Guppy Pro F-125B,分辨率 1292×964 ,像素尺寸为 $3.75 \mu\text{m} \times 3.75 \mu\text{m}$,得到后焦面图形如图2所示。



(a) 测量系统简图及操作步骤

(a) Schematic diagram of measurement system and operation procedure



(b) 实验系统

(a) Experiment system

图2 实验装置及操作步骤、控制系统

Fig. 2 Experiment configuration, operation procedures, and control system

图 2 同时给出了实验测量中的操作步骤以及控制系统。其中样品的放置、图像的获取需要通过控制系统实时进行控制,由机械控制台与 LabVIEW 控制平台组成。在将样品(载玻片)放置在系统中后,要使样品精确地位于焦平面上,首先需要通过机械操作对样品进行粗定位,这一步骤通过实验平台上的机械旋钮可实现。此后依次完成样品的精定位(利用基于压电驱动器的纳米定位工作台,即 PZT 平台)、图像捕捉和图像处理过程,这一过程是通过 LabVIEW 平台进行控制的,其中图像处理过程可离线通过 MATLAB 进行处理,也可直接通过嵌入式 MATLAB 程序实现。本文采用后者以实现全自动化的测量。

2.2 图像处理

根据上文所述,数值孔径的计算可以表示为 $NA = R_{CA}/R_{TR}$, 在获得后焦面图形后需要分别对最大光圈的半径及全反射吸收圆的半径进行识别后计算数值孔径。本文提出一套完整的算法实现数值孔径的计算,算法流程依次包括:1)通过傅立叶相关分析(Fourier correlation analysis, FCA)实现圆心的识别;2)灰度统计与插值;3)半径的识别以及数值孔径的计算。每一步具体图像处理过程如图 3 所示。

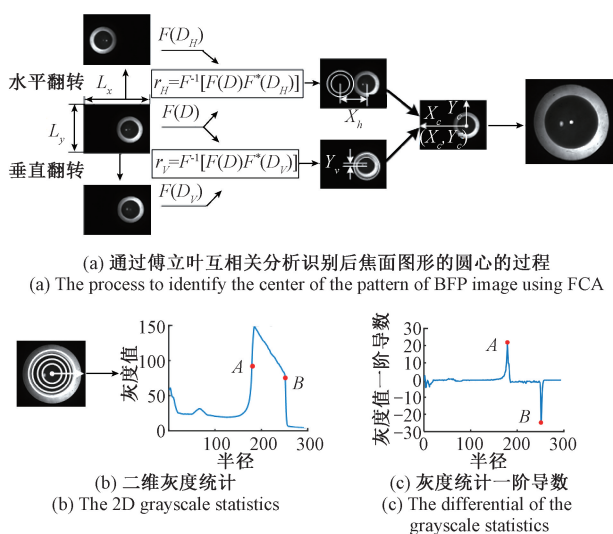


图 3 图像处理

Fig. 3 Image processing

1)通过傅立叶相关分析实现圆心的识别。要获取半径值,首先需要对所得环形图案的圆心进行识别。考虑到图形的对称性,可以通过傅立叶相关分析对同心圆的圆心进行识别^[15-16]。如图 3(a)所示,首先将捕获的后焦面图像进行水平和垂直翻转,之后分别计算原后焦面图像与水平翻转、垂直翻转后的图像的相关系数 r_H, r_V , 得到两个相关系数矩阵:

$$\begin{cases} r_H = \mathcal{F}^{-1}[\mathcal{F}(D)\mathcal{F}^*(D_H)] \\ r_V = \mathcal{F}^{-1}[\mathcal{F}(D)\mathcal{F}^*(D_V)] \end{cases} \quad (5)$$

式中: $\mathcal{F}(D)$ 、 $\mathcal{F}(D_H)$ 和 $\mathcal{F}(D_V)$ 分别表示翻转前与水平、垂直翻转后图像的傅里叶变换。找到两个相关矩阵中最大模值所在位置,可得到水平翻转后的图像与翻转前图像中圆心的水平相对位置 x_h 、垂直翻转后的图像与翻转前图像中圆心的垂直相对位置 y_v 。进一步,根据得到的圆心偏移距离以及翻转前图像的长度和宽度,圆心的位置 (x, y) 可由下式计算得到:

$$x = (L_x - x_h)/2, y = (L_y - y_v)/2 \quad (6)$$

其中, L_x 和 L_y 分别表示原图像的长度和宽度。傅立叶相关分析利用了图像对称性,极大地减少了激光相干噪声的影响^[15-16]。

2)灰度统计与插值。半径的识别需要通过对后焦面图像强度的分析得到,因此,在对圆心进行识别后,进一步获取图形沿半径的灰度强度。一种简单的做法是根据识别的圆心直接画出一条半径,对沿此半径的灰度进行统计(一维统计法),但此方法易受到激光相干噪声的影响。为减小像素分布不均匀以及噪声带来的影响,以圆心为中心,分别统计不同半径值处一圈的灰度总值,将其平均值作为这一半径下的灰度值(二维统计法)。这一统计数据是以探测器的单元像素为单位的,对于单位像素间不连续的强度数据,可进一步通过线性插值函数获得更精确的亚像素单位的灰度统计分布,结果如图 3(b)所示。

3)半径的识别以及数值孔径的计算。从灰度统计图可看出,在临界角和最大聚焦角处反射强度发生较为明显的变化,则全反射圆和透光孔径圆半径可分别由两个变化边缘决定。但是观察灰度统计曲线可看出临界角处灰度统计变化较为缓慢,带宽约为 10 pixel。而其变化也决定着不同全反射圆半径的取值,对应于不同的数值孔径值。对此,通过灰度统计的梯度变化来进行边缘检测和确定半径是一种有效的方式,我们求得灰度统计值的一阶导数后,分别将一阶微分的最大值和最小值作为全反射圆和透光孔径圆的半径。实验中我们使用的 CCD 分辨率为 1 pixel,但经过插值算法后我们可将分辨率提高到 0.1 pixel,即相机最小分度值为 0.1 pixel,估读时多读一位,半径分别为 180.94 和 252.55(pixel),即图 3(b)和(c)中点 A、B 所表示的位置。因此,计算得到的物镜数值孔径为 1.40,可以看出此测量值与标定值 1.40 达到了很好的吻合。此外,该算法在 MATLAB 环境中开发与运行,实验中使用 Intel(R) Core(TM) i5-6600 处理器在 3.30 GHz 下运行,只需要约 870 ms。

本图像处理流程与算法在实现数值孔径全自动提取的同时,充分考虑了噪声的影响,主要体现在以下几个方



面:1)在进行 FCA 识别圆心前,对图像进行了中值滤波以滤除与有效信息无关的离散点噪声^[15-16];2)对实验图像进行互相关操作(FCA)以降低随机噪声的影响;3)通过二维旋转灰度统计以减小相干噪声以及像素分布不均匀的影响。更多关于图像处理以及降噪的细节可见文献[15-16]。

2.3 结果分析

1) 测量结果

为了验证检测方案的可行性和精度,首先对两款具有直接 NA 标定的商用镜头(@ 奥林巴斯)的数值孔径进行了测量,计算所得数值孔径的结果如表 1 所示,分别为 1.40 和 1.25。对两款物镜的测量与识别过程均重复 10 次,根据多次测量结果的标准差计算其对应的不确定度,均为 0.02,具体的不确定度分量及计算方式见 2) 节。考虑到奥林巴斯公司具有多年研发经验,给定的标定值是目前最为可靠的结果,而对两款商业化且有直接 NA 标定的镜头(@ 奥林巴斯)的测试结果与其实际标定值较为接近,在我国目前没有可行的检测方案的现状下,本文的方案可以方便、快捷地完成测量,且与国外镜头厂家的标定值较为接近,验证了方案及样机的可行性,表明我们的方案可达到跨国巨头公司的商用测量水平,也可用于我国国产镜头的测试。其次,表 1 和 2 分别列出本文所提方法和文献[12]方法对几款透镜的测量结果和相对误差,与文献[12]所提方法相比,可看出本文的方法整体表现出较小的相对误差,即较高的精度。在此基础上,在该系统样机上对国产 NA 标定值为 1.45 的油浸物镜进行了测试,测试结果为 1.44 ± 0.04 。一方面看出我国具备了高 NA 物镜的加工制造能力,但是另一方面也能看出实际物镜的真实值与理论值(或未经检测而直接标定)的 NA 值的差距以及测量其实际 NA 值的必要性。

表 1 本文方法测量结果

Table 1 Measurement results of the proposed method

物镜类型	标定值	本文方法 测量值	相对 误差/%
奥林巴斯消色差油浸物镜 1 (PlanApo 60x)	1.40	1.40 ± 0.02	0
奥林巴斯消色差油浸物镜 2 (PlanApo 100x)	1.25	1.24 ± 0.02	-0.80
国产油浸透镜	1.45	1.44 ± 0.04	-0.69

2) 不确定度计算

首先我们分析 NA 不确定度的构成及计算方式。NA 测量结果的表达式如式(4)所示($NA = R_{CA}/R_{TIR}$),分别对两端取对数并微分,得到 NA 的不确定度计算式为:

表 2 文献[12]方法测量结果

Table 2 Measurement results of reference [12]

物镜类型	标定值	文献[12] 方法测量值	相对 误差/%
奥林巴斯消色差油浸物镜 1 (PlanApo 60x)	1.40	1.392 ± 0.006	-0.57
奥林巴斯消色差油浸物镜 3 (UPlanFLN 100x)	1.30	1.242 ± 0.004	-4.46
奥林巴斯消色差油浸物镜 4 (UPlanApo/IR 60x)	1.20	1.127 ± 0.003	-6.08

$$u_{NA} = \overline{NA} \cdot \sqrt{\left(\frac{\partial \ln NA}{\partial R_{CA}} \cdot u_{CA}\right)^2 + \left(\frac{\partial \ln NA}{\partial R_{TIR}} \cdot u_{TIR}\right)^2} = \overline{NA} \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{CA}}{R_{CA}}\right)^2 + \left(\frac{u_{TIR}}{R_{TIR}}\right)^2} \quad (7)$$

式中: u_{NA} 、 u_{CA} 和 u_{TIR} 分别表示最终合成的 NA 和两圆环半径(R_{TIR} 和 R_{CA})的不确定度, \overline{NA} 、 $\overline{R_{CA}}$ 和 $\overline{R_{TIR}}$ 为计算得到的平均值。其中,圆环半径的不确定度来源主要有两个方面,其一为重复测量性的不确定度,采用 A 类不确定度评定方法进行评定。其二为相机分辨率大小不同引起的不确定度,采用 B 类不确定度评定方法进行评定。下面具体分析不确定度分量并给出计算方法,不确定度分量及计算如表 3 所示。

(1) 重复测量性的不确定度

假设测量过程重复 n 次,测得半径及 NA 的结果分别为: R_{CAi} 、 R_{CAi} 、 NA_i ($i = 1, 2, \dots, n$), 平均值为 $\overline{R_{CA}}$ 、 $\overline{R_{TIR}}$ 和 \overline{NA} 。根据贝塞尔公式,重复测量性的圆环半径的不确定度 u_{CA}^1 、 u_{TIR}^1 分别为:

$$u_{CA}^1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_{CAi} - \overline{R_{CA}})^2}{n(n-1)}} \quad (8)$$

$$u_{TIR}^1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (R_{TIRi} - \overline{R_{TIR}})^2}{n(n-1)}} \quad (9)$$

(2) 相机(CCD)分辨率大小不同引起的不确定度

实验中选用的相机分辨率大小不同会影响识别半径的精度。本实验中,通过插值算法可以将半径识别精度精确到 0.1 pixel(像素尺寸为 $3.95 \mu\text{m}/\text{pixel}$)。根据不确定度定义,由 CCD 分辨率引起的不确定度大小为:

$$u_{CA}^2 = u_{TIR}^2 = \Delta_{\text{CCD}} / \sqrt{3} = 0.06 \quad (10)$$

(3) 合成不确定度

将 A 类与 B 类不确定度进行合成,可得到圆环半径的合成不确定度为:

$$\begin{cases} u_{CA} = \sqrt{(u_{CA}^1)^2 + (u_{CA}^2)^2} \\ u_{TIR} = \sqrt{(u_{TIR}^1)^2 + (u_{TIR}^2)^2} \end{cases} \quad (11)$$

根据式(7)可计算得到最终 NA 测量结果的不确定度。对扩展不确定度为：
进一步计算扩展不确定度时，一般取包含因子 $k=2$ ，则相

$$U_{NA} = k \cdot u_{NA} \quad (12)$$

表3 不确定度分量及计算(以标定 $NA=1.40$ 透镜为例)Table 3 Uncertainty components and calculation (Taking an example of lens with labeled $NA=1.40$)

类别	符号	不确定度来源	不确定度类型	计算公式	结果示例 (以标定 $NA=1.40$ 透镜为例)
R_{CA} 的不确定度分量	u_{CA}^1	重复测量	A类	式(8)	0.58
	u_{CA}^2	CCD分辨率	B类	式(10)	0.06
R_{CA} 的合成不确定度	u_{CA}	式(11): $u_{CA} = \sqrt{(u_{CA}^1)^2 + (u_{CA}^2)^2}$			0.58
R_{TIR} 的不确定度分量	u_{TIR}^1	重复测量	A类	式(9)	0.56
	u_{TIR}^2	CCD分辨率	B类	式(10)	0.06
R_{TIR} 的合成不确定度	u_{TIR}	式(11): $u_{TIR} = \sqrt{(u_{TIR}^1)^2 + (u_{TIR}^2)^2}$			0.56
NA 的合成不确定度	u_{NA}	式(7): $u_{NA} = \overline{NA} \cdot \sqrt{\left(\frac{u_{CA}}{\overline{R}_{CA}}\right)^2 + \left(\frac{u_{TIR}}{\overline{R}_{TIR}}\right)^2}$			0.01
NA 的扩展不确定度	U_{NA}	式(12): $U_{NA} = k \cdot u_{NA}$ (k 为包含因子)			0.02 ($k=2$)

3) 测量误差分析

本方法测量误差主要来源于系统装配误差和不同灰度统计方法产生的误差。

(1) 装配误差分析

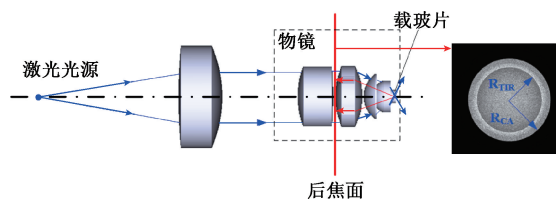
如图1和2所示,本方法在系统装配过程中需要使载玻片远离物镜一侧位于物镜的焦面,然而实际使用中,正离焦和负离焦情况下都会对后焦面圆环形状及测量结果造成影响,本节通过 ZEMAX 仿真模型分析离焦误差。

图4所示为建立的测量系统光路模型(图4(a))及离焦影响情况(图4(b))。图4(a)显示了光线经扩束装置后平行进入油浸物镜的示意图,其中激光光源设置未 632.8 nm ,所用物镜为 $98\times/1.28NA$ 的油浸物镜,透镜模型及数据来源于参考文献[17]。入射光线由在载玻片表面产生全反射现象,反射光线进入物镜后由位于后焦面处的 CCD 成像。当载玻片远离物镜的一面精确位于焦面时,得到的后焦面图像如图4(a)所示。

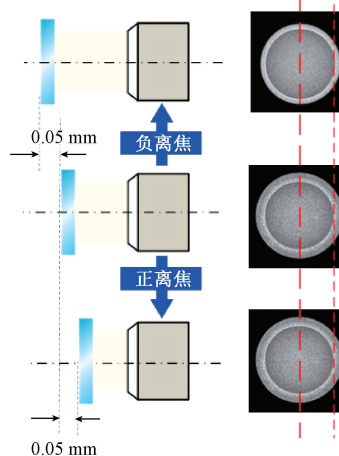
为了研究离焦造成的误差,分别将载玻片前后移动 0.05 mm (定义远离焦面为负离焦,靠近焦面为正离焦),得到的后焦面图像如图4(b)所示。可见,在负离焦情况下,得到的 NA 将小于标准值,而正离焦情况下,由于物镜通光孔径的限制,多余的光束无法进入物镜,因此得到的 NA 将仍等于标准值。

(2) 不同灰度统计方法产生的误差分析

2.2节“图像处理”步骤2“灰度统计与插值”提到,获得灰度曲线的方式有一维统计法(one-dimensional, 1D)和二维统计法(two-dimensional, 2D),采取不同的方



(a) ZEMAX光学模型及后焦面图像
(a) Optical model in ZEMAX and BFP image



(b) 离焦示意图及后焦面图像
(b) Defocus and BFP images

图4 离焦误差

Fig. 4 Error of defocus

法对噪声敏感度不同,结果误差也不同。采用蒙特卡洛模拟分析噪声对两种灰度统计算法的影响及产生的误

差。对计算的预设 NA 值为 1.40 的后焦面图像加不同强度的高斯噪声(均值 $\mu_{noise} = 0$, 方差 $\sigma_{noise}^2 = 0.1 \sim 1$), 如图 5 所示, 并分别通过一维和二维统计获得灰度曲线, 并通过图像处理步骤 3) 计算出 NA 值。在每一噪声下, 这一步骤均重复 10^4 次, 并对获取的 NA 取均值和方差, 最终得到如图 5 所示的不同噪声等级下的 NA 误差棒。由图可得, 二维方法产生的误差(均值和方差)总体小于一维方法, 这是由于二维方法的平均过程减小了噪声的影响。当噪声水平 σ_{noise}^2 小于 0.7 时, 两种统计方法结果均较接近预设值, 但二维方法的方差明显小于一维方法; 而当噪声水平 σ_{noise}^2 大于 0.7 时, 二维统计方法(2D)抗噪性较强, 误差较小。

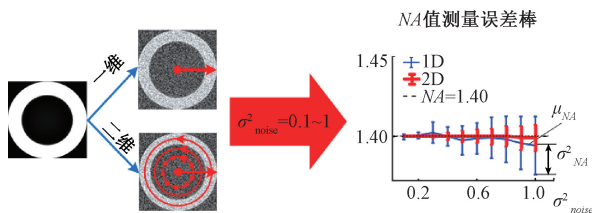


图 5 噪声对灰度统计及测量结果的误差

Fig. 5 Error of noises on grayscale statistics and results

3 结 论

本文提出一种测量无限共轭距物镜的数值孔径的方法与系统, 该方法利用载玻片/空气界面的全反射效应在物镜后焦面产生的参考基准来测量数值孔径, 适用于数值孔径大于 1 的无限共轭距物镜。根据测量原理设计的一套完整的实验系统与图像处理算法实现了从获取后焦面图像到计算数值孔径的自动处理过程, 测量速度快、重复性好、精度高, 极大地减少了人员操作带来的不必要的误差。本方法在实际应用中便于推行, 为物镜数值孔径的测量提供了一种可行性方案, 重点在于解决了我国当前高端油浸物镜的检测受制于国外的困境。

参考文献

[1] 高思田, 李琪, 施玉书, 等. 我国微纳几何量计量技术的研究进展 [J]. 仪器仪表学报, 2017, 38 (8): 1822-1829.
GAO S T, LI Q, SHI Y SH, et al. Research progress of China's micro/nanometer geometric quantity metrology technology [J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2017, 38 (8): 1822-1829.
[2] ZHANG B, ZHANG C Q, SOMEKH M G, et al. Modeling and analysis of a common-path surface plasmon interferometer with confocal configuration [J]. Optics Letter, 2018, 1 (3): 822-831.

[3] KIM J, KIM M, HONG S, et al. Characteristics of the depth of focus in a high-NA optical system with a SIAX for data storage [J]. Proc. SPIE, 2010, 7730.
[4] MALINAUSKAS M, REKŠTYTĖ S, JONAVI ČIUS T, et al. Femtosecond pulsed light polarization induced effects in direct laser writing 3D nanolithography [J]. Proc. SPIE, 2016, 9736.
[5] 刘文文, 余晓芬, 王永红, 等. 并行像散共焦微结构探测光学系统分析与设计 [J]. 仪器仪表学报, 2012, 33 (5): 1154-1160.
LIU W W, YU X F, WANG Y H, et al. Analysis and design of the parallel astigmatic confocal optics system for detecting 3D micro-structure [J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2012, 33 (5): 1154-1160.
[6] 卜乙禄, 李琦, 李彦宏, 等. 激光差动共焦反射式超大曲率半径测量系统研制 [J]. 电子测量与仪器学报, 2020, 34 (5): 1-8.
BU Y L, LI Q, LI Y H, et al. Development of laser reflection differential confocal ultra-large radius measurement system [J]. Journal of Electronic Measurement and Instrumentation, 2020, 34 (5): 1-8.
[7] BÖHMER M, ENDERLEIN J. Orientation imaging of single molecules by wide-field epi-fluorescence microscopy [J]. Journal of the Optical Society of America B, 2003, 20 (3): 554-559.
[8] HWANG S, LEE Y. Simulation of an oil immersion objective lens; A simplified ray-optics model considering Abbe's sine condition [J]. Optics Express, 2008, 16 (26): 21170-21183.
[9] ZHANG J, SEE C W, AND SOMEKH M G. Imaging performance of widefield solid immersion lens microscopy [J]. Applied Optics, 2007, 46 (20): 4202-4208.
[10] MÜLLER M, BRAKENHOFF G J. Characterization of high-numerical aperture lenses by spatial autocorrelation of the focal field [J]. Optics Letter, 1995, 20 (21): 2159.
[11] LEHMANN W, WACHTEL A. Numerical apertures of light microscope objectives [J]. Journal of Microscopy, 1993, 169: 273-274.
[12] DAI L, GREGOR I, HOCHT I, et al. Measuring large numerical apertures by imaging the angular distribution of radiation of fluorescing molecules [J]. Optics Express, 2005, 13 (23): 9409-9414.
[13] WANG L, PITTER M C, SOMEKH M G. Wide-field



high-resolution solid immersion fluorescence microscopy applying an aplanatic solid immersion lens [J]. *Applied Optics*, 2010, 49(31): 6160-6169.

- [14] GU M. *Advanced optical imaging theory* [M]. Springer Verlag, 2000.
- [15] ZHANG B, ZHANG C Q, WANG Q, et al. Identification of waveguide mode and surface plasmon resonance mode using Fourier cross-correlation analysis [J]. *IEEE Photon*, 2018, 58(25):6920-6925.
- [16] ZHANG B, WANG Q, LI A, et al. Direct and practical identification for back focal plane based surface plasmon microscopy [J]. *IEEE Photonics Journal*, 2020, 12(1): 6900208.
- [17] LAIKIN M. *Lens Design* [M]. New York & London: CRC Press, 2007.

作者简介



张粹玲, 2019 年于华北电力大学获得学士学位, 现为北京航空航天大学在读硕士, 主要研究方向为图像处理、模式识别。
E-mail: zhangcuiqing1997@163.com

Zhang Cuiling received the bachelor's degree from North China Electric Power University, in 2019. She is currently pursuing the master's degree in the Beihang University. Her current research interests are pattern recognition and image processing.



张蓓(通信作者), 2006 年和 2009 年分别于西安交通大学获得学士和硕士学位, 2012 年于诺丁汉大学获得博士学位, 现为北京航空航天大学副教授, 主要研究方向为微纳光子学, 模式识别及人工智能。

E-mail: bei.zhang@buaa.edu.cn

Zhang Bei (Corresponding author) received the bachelor's and master's degrees from Xi'an Jiaotong University, and the Ph. D. degree from the University of Nottingham in 2006, 2009, and 2012 respectively. She is currently an associate professor in Beihang University. Her current research interests include nanophotonics, pattern recognition, and artificial intelligence.