

研發新穎線掃描高光譜顯微影像技術

鄭泊聲* 指導教授：張玉明[†]

March 12, 2022

摘要

以「線掃描」技術，大幅提升光譜掃描的速度。透過一個特殊的線光譜儀，搭配二維的影像感測器，能在一次影像的擷取時就對樣品的「一條線」進行光譜展開，有別於傳統光譜掃描一次對「一個點」進行展開，本系統只需要將樣品做單軸的移動，就可以掃描出樣品在二維空間的光譜分布。適合大尺寸樣品的光譜掃描，能大幅降低掃描所需的時間。目前本系統能夠對樣品在白光照射下的反射光譜，以及雷射所激發的螢光光譜進行掃描。

致謝

特別感謝張玉明老師將本系統的開發交付給我，並在過程中給予無私的支持與指導。本系統開發承蒙科技部 110 學年度大專學生參與專題研究計畫支持（計畫編號 110-2813-C-002-218-M），另感謝實驗室的陳維良博士、黎文鴻博士帶我了解光學系統的基礎知識，並承接本研究的後續開發，以及羅詔元博士在 LabVIEW 程式撰寫給予許多指導，和黃鈺淳在研發過程中鼎力協助。

目錄

| | | |
|----------|-------------------------|----------|
| 1 | 前言與研究目的 | 4 |
| 2 | 原理探討與文獻回顧 | 5 |
| 2.1 | 線掃描高光譜影像技術的原理 | 5 |
| 2.2 | 顯微高光譜影像的發展現況 | 5 |
| 2.3 | 實域與動量域的成像原理 | 6 |

*國立臺灣大學經濟系大學部

[†]國立臺灣大學凝態科學研究中心特聘研究員

| | |
|-----------------------------|----------|
| 3 研究方法 | 8 |
| 3.1 巨觀實域觀測 | 8 |
| 3.2 微觀實域觀測 | 8 |
| 3.3 動量域觀測 | 8 |
| 3.4 軟體開發 | 9 |
| 4 研究結果與討論 | 9 |
| 4.1 第一階段：技術驗證 | 9 |
| 4.1.1 巨觀用系統硬體 | 9 |
| 4.1.2 Order Blocking Filter | 11 |
| 4.2 後端軟體基礎 | 11 |
| 4.2.1 三維影像的建立 | 11 |
| 4.2.2 影像儲存 | 13 |
| 4.2.3 座標校正 | 14 |
| 4.3 第二階段：系統開發 | 14 |
| 4.3.1 Galvo | 15 |
| 4.4 照明 | 16 |
| 4.4.1 最高亮度、匯聚於背焦面 | 16 |
| 4.4.2 最高亮度、不匯聚於背焦面 | 17 |
| 4.4.3 較低亮度、匯聚於背焦面 | 18 |
| 4.5 使用者介面與功能 | 18 |
| 4.5.1 ROI 框取 | 21 |
| 4.5.2 背景/參考光譜 | 22 |
| 4.6 .init 檔 | 24 |
| 4.7 軟體結構調整 | 25 |
| 4.8 第三階段：功能優化 | 26 |
| 4.9 掃描速度 | 26 |
| 4.9.1 掃描迴圈 | 26 |
| 4.9.2 速度提升 | 27 |
| 4.9.3 電動載臺等待時間 | 27 |
| 4.9.4 iXon 擷取影像資料的等待時間 | 28 |
| 4.9.5 矩陣接合與旋轉 | 29 |
| 4.10 影像檔案讀取與進階存檔 | 29 |
| 4.10.1 檔案讀取 | 29 |
| 4.10.2 建立「讀取模式」 | 30 |
| 4.10.3 TIFF 格式之擴充 | 31 |
| 4.10.4 背景/參考光譜之儲存 | 31 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 4.11 光譜瀏覽功能 | 32 |
| 4.12 光譜量測實例 | 33 |
| 4.12.1 螢光光譜 | 33 |
| 4.12.2 反射光譜 | 34 |
| 4.12.3 OBF Revisited | 37 |
| 4.13 背焦面影像的探討 | 37 |
| 5 未來展望 | 38 |

圖片目錄

| | |
|--|----|
| 1 背焦面成像原理 [10] | 6 |
| 2 動量域影像的成像光路參考 [11] | 7 |
| 3 巨觀系統光路圖 | 9 |
| 4 Image size when combined | 10 |
| 5 Stage, spectrograph, ccd | 11 |
| 6 The order blocking filter. | 12 |
| 7 線掃描的原理 | 13 |
| 8 網格的線掃描影像 | 13 |
| 9 微觀系統光路圖 | 14 |
| 10 Micro system. | 15 |
| 11 HL-2000 | 16 |
| 12 Energetic | 17 |
| 13 Coupled at brightest, collimated on BFP. | 17 |
| 14 OM: Coupled at brightest, collimated on BFP. | 18 |
| 15 Coupled at brightest, collimated off BFP. | 19 |
| 16 OM: Coupled at brightest, collimated off BFP. | 19 |
| 17 Coupled at evenest, collimated off BFP. | 20 |
| 18 OM: Coupled at evenest, collimated off BFP. | 20 |
| 19 在影像模式下的軟體介面。 | 21 |
| 20 掃描時的軟體介面。 | 22 |
| 21 ROI 框取功能。 | 23 |
| 22 檢視反射率影像時的軟體介面。 | 24 |
| 23 軟體會自行偵測硬體系統是否存在。 | 30 |
| 24 雷射螢光光譜的觀測 | 34 |

| | | |
|----|---|----|
| 25 | 平均過後的螢光高光譜影像，以 405nm 雷射激發。本照片的比例經過調整，以符合樣品實物。實際大小約為 $1.2 \times 3.5\text{mm}$ ，由 350 張單線光譜影像所接合而成 | 35 |
| 26 | 螢光的高光譜影像，僅擷取約在 628nm 下的樣品影像。 | 35 |
| 27 | 螢光的高光譜影像，僅擷取約在 526nm 下的樣品影像，已經幾乎不可見。 | 35 |
| 28 | 反射光譜的觀測 | 36 |
| 29 | 白光的高光譜影像，僅擷取約在 628nm 下的樣品影像。 | 36 |
| 30 | 白光的高光譜影像，僅擷取約在 526nm 下的樣品影像，仍然相當清楚。 | 37 |
| 31 | 背焦面影像系統光路圖 | 37 |
| 32 | BFP of 300 grating | 39 |
| 33 | Real space image of 300 grating | 40 |
| 34 | BFP of 500 grating | 41 |

表格目錄

| | | |
|---|-------------------------|----|
| 1 | 影像設定對掃描時間的影響。 | 27 |
| 2 | 新增的影像資料標籤。 | 31 |

1 前言與研究目的

傳統的光譜量測技術，是將樣品螢光送入光譜儀中展開，透過樣品的激發光譜或反射光譜了解其光學特性。在光譜儀中，被展開的樣品光譜多半以線性光譜 (spectrum) 呈現，記錄其在各個波長的訊號強度。對於由單一物質組成的均勻樣品，這樣的觀測方式相當有效率，但觀測者若想了解樣品在不同位置上的光譜性質差異，則必須對樣品的每個位置分別進行光譜展開，才能建立出一張含有位置訊息的光譜影像 (spectrum image)。以最常見的二維掃描來說，必須沿著樣品座標軸上所設定的二維區域進行掃描，再透過後處理將每個位置的光譜資訊重新建立成一張二維平面的光譜影像。

簡而言之，傳統的光譜量測是對不具空間維度的光譜資訊進行展開，若要建立帶有位置訊息的光譜影像，就必須對每個要觀測的空間維度進行掃描；而高光譜影像技術，則是將帶有一維空間位置訊息的光譜資訊進行展開，能夠大幅減少光譜影像所需的掃描時間。舉例來說，在一個二維卡式座標中，傳統的雷射掃描共軛焦顯微鏡一次只能對「一個點」進行展開，若要建立帶有二維空間資訊的光譜影像，就必須進行二維的「面掃描」；而高光譜影像技術，則是對樣品上的「一條

線」，將線上每個點之光譜一次性展開。因此，透過高光譜影像技術，只要沿著與線光源垂直之方向進行一維掃描，就能快速地完成一張二維區域的光譜影像，如此可大幅提升顯微光譜影像的量測速率。

2 原理探討與文獻回顧

2.1 線掃描高光譜影像技術的原理

本系統所採用的線掃描 (Line scan or Push-broom) 影像原理，可以圖一來說明。首先，系統中包含一個簡單的光學顯微鏡，能搭配不同倍率的顯微物鏡使用，該光學顯微鏡會將樣品的像成在一部線光譜儀的入射狹縫上 (圖中的 input slit)，樣品位置不同時，狹縫上的像也會不同。狹縫上的影像即對應到樣品的「掃描線」，而這部線光譜儀會同時對線上的每個位置進行光譜量測 (圖中的 dispersion 示意)，共計 512 條光譜線會在影像感測器上形成一個二維影像，其 Y 軸就是與狹縫同向的空間座標，其 X 軸則是光譜的波長座標 (即是圖中的 on sensor image)。圖一中的樣品圖樣，實際在系統上觀測後，圖樣中央掃描線的線掃描影像，如圖二所示。由於圖二的拍攝環境是以頻寬較窄的 LED 做為反射光譜的光源，因此在波長方向受到 LED 光源較窄的頻寬所限制。

透過這樣的影像系統，我們從影像感測器上擷取一張二維影像 (on sensor image)，就能得到樣品單線上 512 個不同位置的光譜，接著只要再對樣品進行單方向的移動掃描，就能將各處單線的光譜影像組合成一張完整的高光譜影像 (Hyperspectral image)。在本系統的設定下，將樣品沿著空間的 X 軸移動，擷取每個 X 座標上的線掃描影像後，透過軟體接合，即可得到整個樣品平面的光譜資訊。這樣的影像除了記錄樣品在二維空間的空間特徵外，也包含了每個空間位置的光譜特徵，因此實是一張三維的影像 (Data cube)。

2.2 顯微高光譜影像的發展現況

顯微高光譜影像技術在研究領域的發展，涵蓋相當廣的層面。觀測的範圍從最常見的樣品螢光、雷曼散射，到相干反斯托克斯拉曼光譜 (CARS) 都有 [1, 2, 3]。研究應用的領域，也相當廣泛，尤其以生物相關的研究最為豐碩 [4, 5]，而奈米材料相關的研究當然也不再話下 [1]。

近期的相關研究更在高光譜影像資料處理有不少突破，過去以影像處裡演算法的開發為主 [6, 7]，並以影像偵測的相關研究成果較為豐盛 [8]，到近年更有將深度學習應用於高光譜影像處裡的成果 [9]。

2.3 實域與動量域的成像原理

動量域成像的理論基礎是傅立葉光學，而傅立葉光學的數學核心即是傅立葉轉換。在光學領域，透過傅立葉轉換，能將實域位置的光線訊息，轉換為動量域散射角度的光線訊息。以數學語言來說，原本以 $f(x)$ 定義的光學訊息，代表的是每個 x 位置上的光線，透過傅立葉轉換

$$E(k_x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{ik_x x} dx$$

後，將呈現出在每個角動量 k_x 方向上的光線資訊。

傅立葉光學最簡單的實例就是干涉現像，在光圈或狹縫背後的干涉圖樣，即傅立葉光學的所呈現出的動量域影像。除此之外，傅立葉光學的概念也早已廣泛應用，例如全像攝影將光線的二維空間資訊加上角度資訊，建立出會隨著觀看角度而變化的影像。傅立葉光學也被應用於空間濾波器的設計，透過在動量域對光線進行濾波，再到實域成像，能將影像中不同頻率的雜訊移除。

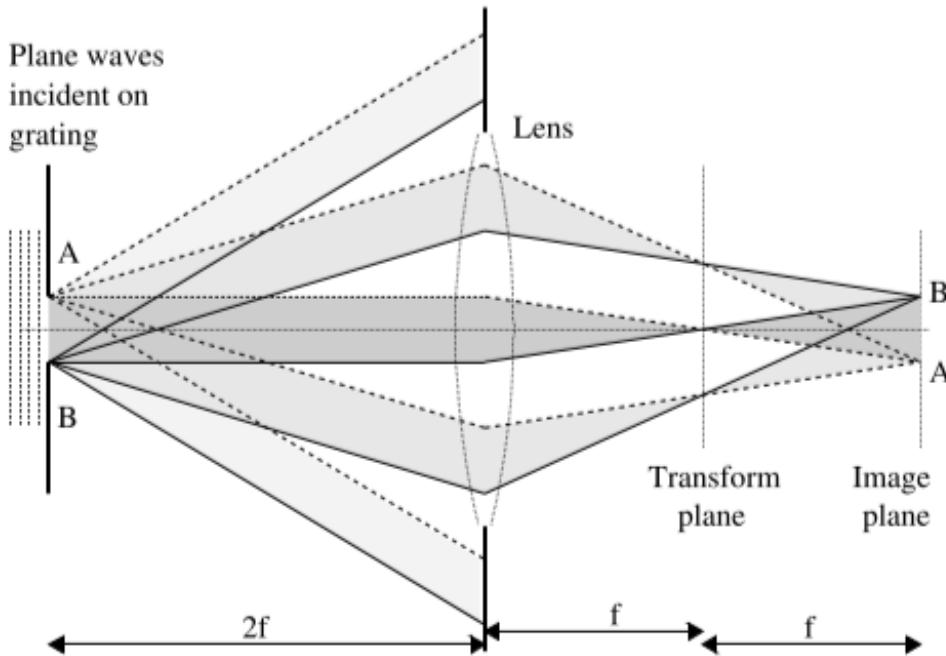


圖 1：背焦面成像原理 [10]

在本計畫中，我們將以「背焦面影像」來實現動量域的觀測。背焦面影像的技術，可以透過圖1中的光線示意來理解。在圖1中，來自樣品上同一位置的光線，將會在實域成像平面（圖1中的 Image plane）的同一對應位置匯聚，因此實域影像代表光線的空間位置訊息。而來自樣品上同樣散射角度的光線，會在背焦面（圖1中的 Transform plane，傅立葉轉換面）的同一個對應位置匯聚成像，因此背焦面影像將代表光線的散射角度。由此可見，來自樣品實域的光線，若在背焦面成像，就相當於經過了一次傅立葉轉換，由實域轉換至動量域，因此背焦面也

被稱為傅立葉轉換面。在透鏡的成像側，我們能夠選擇於實域的成像面上成像，或是在動量域的背焦面上成像。在背焦面成像，即能在動量域觀測光線，同時也可以在該平面進行濾波或其他光線的調變，以對實域做影像處理。

若將圖中的透鏡想像為顯微鏡的物鏡與成像鏡，則可以輕易了解，只要分別在成像面與背焦面觀測，即可在實域影像與動量域影像之間切換。但由於多數顯微物鏡的背焦面位在鏡筒中，無法直接在該處成像，因此本研究參酌其他文獻 [11] 所描述的方式，透過加上另一片成像鏡，將原本的背焦面影像移動 (relay) 至易於成像的位置，如此才能在同一部影像感測器上切換實域與動量域的觀測。在圖2中，樣品的發散光經物鏡後，透過 L3 透鏡匯聚於針孔處。在針孔後放置一個 L4 透鏡，與針孔的距離正好是 L4 的焦距，此時針孔處的影像就相當於是 L4 的待測物，若將光譜儀或 CCD 放置於 L4 的背焦面，即可觀測樣品的動量域影像；若在 L4 後方加上另一成像鏡 L5，則可在 L5 的焦點觀測到實域影像。

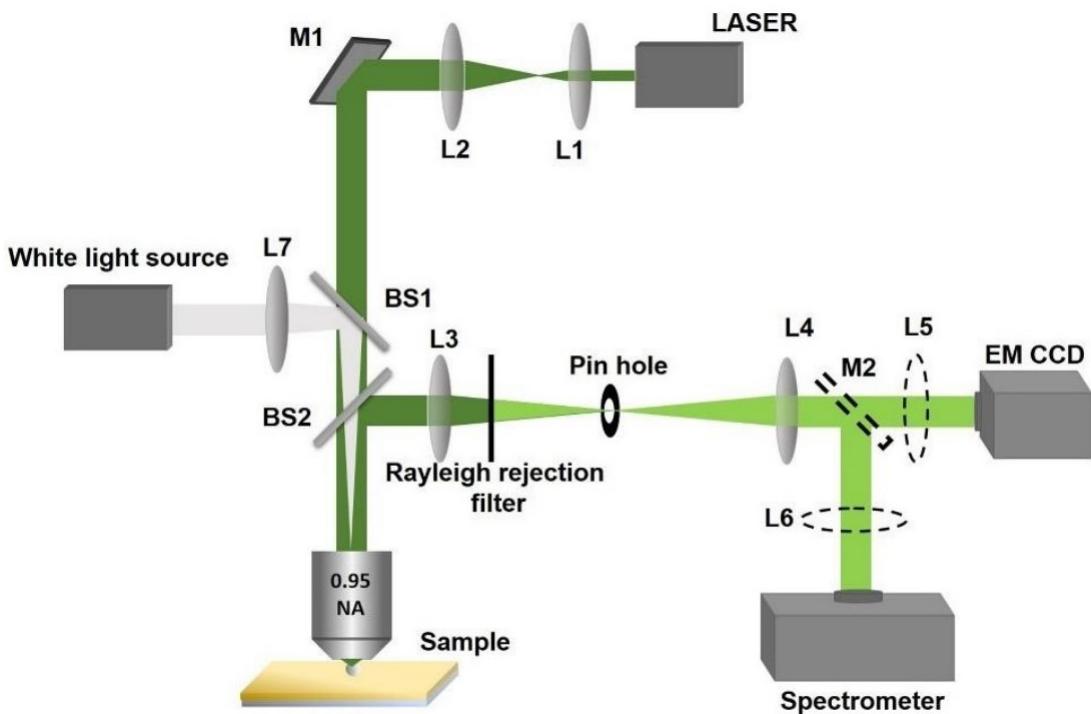


圖 2：動量域影像的成像光路參考 [11]

在背焦面影像的領域，則多半以應用於微結構與光線散射分布的研究為主。例如以背焦面影像觀測電漿子的研究，或是光子晶體相關的研究 [12, 13, 14]。透過干涉的背焦面影像技術實現其他微結構觀測方法的研究也有許多，例如透過背焦面影像實作光線散射觀測的研究 [15]，或是橢圓偏振技術的實現 [16]。

近年來專注於高光譜技術與背焦面影像技術整合的研究則較為稀少，在一些高光譜影像系統開發的研究中，確實有提及在背焦面對影像進行調變 [17]，但與本研究希望以背焦面影像成像為主的目標仍有差異。

3 研究方法

3.1 巨觀實域觀測

本系統為較基礎的光路規劃，亦是最常見的高光譜影像技術系統，將用於尺寸在公分等級的樣品之實域觀測，系統將採用外部線光源的方式照明，以電動載台進行掃描，且使用廣角焦距的物鏡搭配分光儀，觀測樣品的反射光譜影像。開發本子系統的主要目的，在於熟悉高光譜影像技術與其基本光路的架設。

在這階段，我們希望可以透過本系統更深入了解高光譜影像對光源的要求，例如：是否一定必須使用線光源？光源需涵蓋的光譜範圍必須多大？強度必須多強？另外，對於所使用的 CCD，其輸入/出解析度、靈敏度、訊噪比、遲滯、線性表現等性質，也希望能有更深入的了解。各個光學元件的 NA 匹配、是否需要合適的濾波、如何節省所需的空間與元件數量等，也都是開發本子系統的過程中希望習得的知識與經驗。

3.2 微觀實域觀測

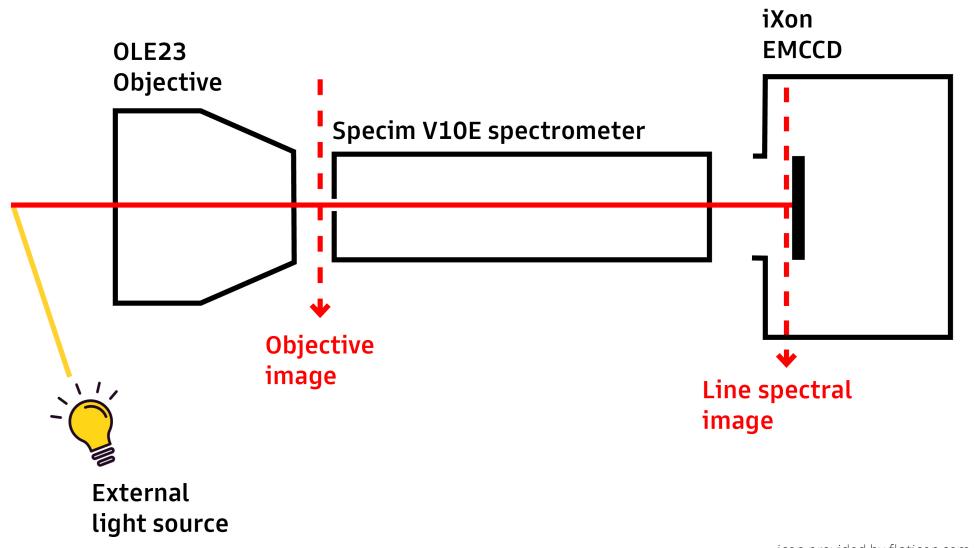
本系統的主要應用場域是微米等級樣品的實域觀測，因此將原本使用的廣角物鏡改為顯微物鏡，並與雷射掃描共軸顯微鏡系統結合，兩套技術之間的整合問題可能是本子系統最大的挑戰。

傳統顯微物鏡的 NA、景深、各波段穿透率、成像圈...等規格，是否能和符合高光譜影像之需求，是本子系統開發的重點項目。如何操控雷射、同步 galvo 掃描、如何確保樣品上每個位置的光線皆能同步精確量測、如何實作線掃描，及撰寫軟體以符合研究需求等，都是本系統所必須完成的目標。

3.3 動量域觀測

本階段我們將在第二套子系統的光路中加入可進行動量域影像的量測功能，因應這樣的研究需求，我們相信在光路的設計規劃上勢必更加複雜。如何設計出能在實域觀測與動量域觀測之間切換的光路，是本系統的主要目標與挑戰。有效地建立能夠在背焦面實作雷射共軸顯微高光譜影像的系統後，本計畫規劃的光學系統即告完備。¹

¹惟動量域的光譜分析屬高等研究領域，本計畫的研究目標僅設定在於光學系統與量測技術的建立，研究樣品的背焦面光譜影像分析將不在本計畫的研究範疇。



icon provided by flaticon.com

圖 3: 巨觀系統光路圖

3.4 軟體開發

本研究的軟體系統，主要功能在於線掃描高光譜影像擷取與分析功能的建立，相較於傳統雷射掃描方式，高光譜影像一次須處理的資料更龐大，軟體系統必須有效地進行資料擷取與分析。另外，如何計算不同物鏡下分光儀不同的空間解析度，並在 CCD 上的合適範圍讀取資料進行影像拼接，也是軟體系統開發的關鍵問題。除此之外，掃描元件的控制、影像的截取與呈現、CCD 的同步控制、使用者介面的建立等，亦是軟體開發的範疇。影像資料分析功能的建立，更是軟體開發後期的主要任務，尤其面對不同觀測域的影像，分析功能的內容勢必更加複雜。我們將採用 LabVIEW 來開發操作介面 (GUI) 及應用程式主體，並以 C++ 實作動態含式庫 (.dll) 輔助後台的影像處理及資料流。

4 研究結果與討論

4.1 第一階段: 技術驗證

4.1.1 巨觀用系統硬體

第一階段系統是為了在巨觀尺度下觀測實域影像而設計，在本計畫中也是作為概念驗證與軟體開發的雛型。在這個階段中，整個系統主要由以下幾個部建構成：

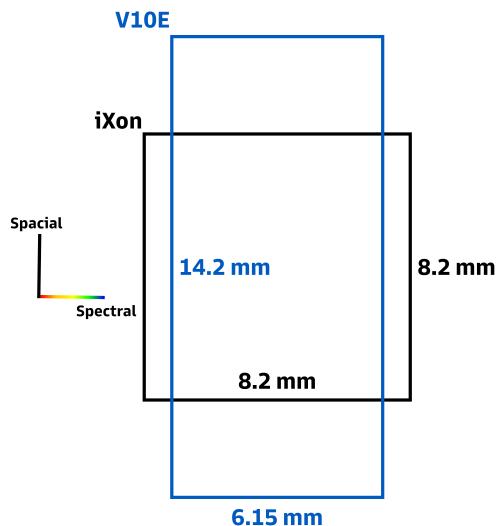


圖 4: Image size when combined

1. Specim V10E 線光譜儀

- 搭配 Specim OLE 23(mm) 物鏡
- 光譜範圍: 400-1000 nm
- 入射狹縫寬: 30 μm
- 成像尺寸: Image size: 6.15(spectral) \times 14.2mm

2. Andor iXon DU897 EMCCD

- 512×512 pixels
- 8.2×8.2 mm
- TE cooler
- Electron Multiplying gain

3. Suruga Seiki 電動載台

- 搭配 D120 控制器

由於 V10E 線光譜儀的成像尺寸與 iXon 的正方形 CCD 尺寸並不同，因此當兩部儀器接合使用後，有部分的像是我們無法觀測到的，如圖4所示，我們將能在系統中能看到 V10E 的整個光譜範圍，但觀測物的 Y 軸方向，卻因為 iXon CCD 的高度較小，因此無法完整觀測。

圖5呈現出第一階段系統的樣貌，在照片中另外可以看到 LED 光源，從外部的黑色手電筒照射觀測物。

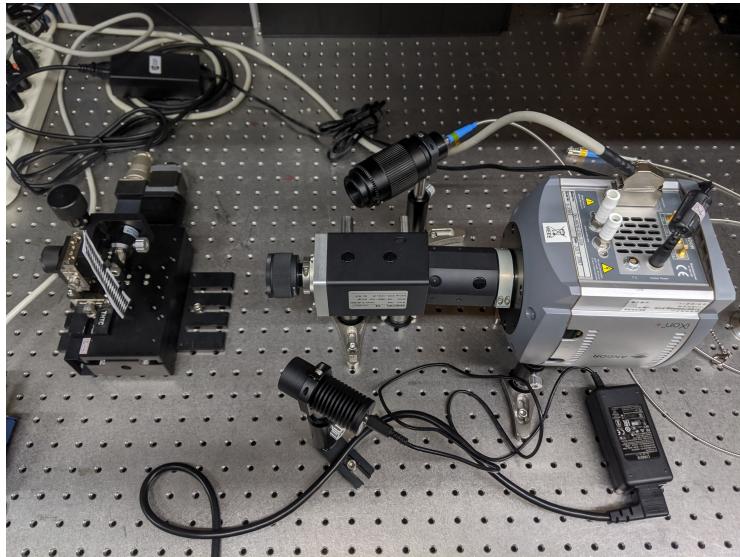


圖 5: Stage, spectrograph, ccd

4.1.2 Order Blocking Filter

由於 Specim V10E 的前玉為一狹縫，光線進入後，理應會發生單狹縫干涉，產生二階影像 (Second order image)，因此 Specim 系統中視時尚須搭配一個二階濾鏡 (Order Blocking Filter)，根據原廠的說明書，該濾鏡可以 C-Mount 安裝，或是直接黏貼在影像感測器上，不論以何種方式安裝，皆須盡量靠近影像感測器，實務上與影像感測器不宜超過 6mm 的距離 [18]。觀察該濾鏡的外觀，可發現其阻擋二階干涉影像的方式，應該就是在鏡面上二階影像出現的位置度上塗層進行濾波。由於我們的系統上，不宜將濾鏡直接黏貼在昂貴的 iXon EMCCD 上，原本希望以 C-mount 方式安裝，但可行的安裝位置與影像感測器的距離都會超過 6mm，就算克制專用的 c-mount 轉接環，仍至少會有約 9.55mm 左右的距離，我們擔心這樣反而會造成該濾鏡阻擋到原初的一階影像，因此最後決定先不安裝該濾鏡，待過後再來檢視二階影像的影響。事實上，在本系統的往後開發過程中，皆沒有在任何影像中看到二階干涉的影響，不過這是由於我們未曾使用超過 30ms 的曝光時間，在更長的曝光時間下，二階干涉是否會造成影響，值得後人加以深究。

4.2 後端軟體基礎

4.2.1 三維影像的建立

本系統所採用的線掃描 (Line scan or Push-broom) 影像原理，可以圖7來說明。首先，系統中包含一個簡單的光學顯微鏡，能將樣品的像成在一部線光譜儀的入射狹縫上 (圖中的 input slit)，線光譜儀會同時對狹縫上的每個位置進行光



圖 6: The order blocking filter.

譜量測（圖中的 dispersion 示意），並在影像感測器上形成一個二維影像（圖中 on sensor image），其包含了樣品掃描線上 512 個不同 Y 位置的光譜。接著只要再對樣品進行 X 方向的移動掃描，就能將各處單線的光譜影像組合成一張完整的高光譜影像 (Hyperspectral image)。

本系統在拍攝時，實際上從 iXon EMCCD 上擷取的 On sensor image，如圖8所示，其縱軸與分光儀的狹縫同方向，因此也是代表樣品的空間縱軸，至於影像的橫軸刻度，則是代表不同波長。換句話說，在這張影像的每一個 y 位置，都有一條光譜線，在 iXon EMCCD 512×512 像素的設定下，代表每一張 on sensor image 上都有 512 個不同位置的光譜線。圖8是 10X 物鏡下，拍攝小型網格圖樣的影像，因此可以看見途中的亮帶與暗帶交錯。

實際上進行掃描時，只要在樣品上不同位置的掃描線擷取影像，就能得知樣品上每個位置的光譜資訊。每張線掃描影像皆是 512×512 像素的二維影像，在掃描後，會得到數張這樣的二維影像，疊合後成為一張三維的影像，在程式中，是以三維的矩陣形式處理。一開始所疊合而成的三維影像，其 x,y,z 軸分別為波長、樣品 y、樣品 x 軸，與實際的樣品空間座標有出入，因此必須將矩陣的 x 與 z 軸調換 (transpose)，才能產生出一個與樣品空間相同的影像。該影像即是由 512 張 (由於 on sensor image 在波長方向有 512 個 pixel) 各個波長下的樣品二維影像所組成。

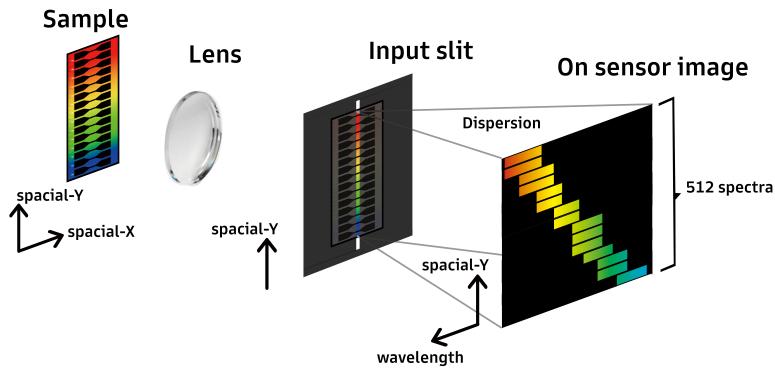


圖 7: 線掃描的原理

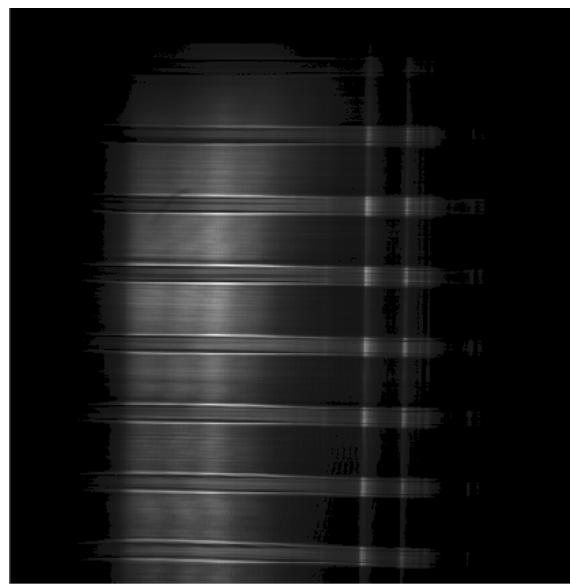


圖 8: 網格的線掃描影像

4.2.2 影像儲存

掃描完成後的三維矩陣，我們將其儲存為 TIFF 影像格式。TIFF 全名維 Tagged Image File Format，顧名思義，其檔案中能儲存影像與描述影像的各式標籤 (Tag)。除此之外，Tiff 格式支援儲存多個的影像在一個檔案中，故我們能將三維矩陣的每一層二維影像，都儲存在同一個檔案中。

Tiff 檔案大致可分為兩部分，前半部分儲存的是檔案中每一張影像的標籤，描述了各式的影像資料，包括公版的影像資料標籤，如影像的像素數與位元等，也包括了我們自行加入的其他影像資料標籤，如每一層二維影像所在的波長，即是以一個一維陣列的方式儲存維一個自定義的影像資料標籤。

檔案的後半部分，才是各張影像的實際資料。在我們的系統中，每個檔案一慮

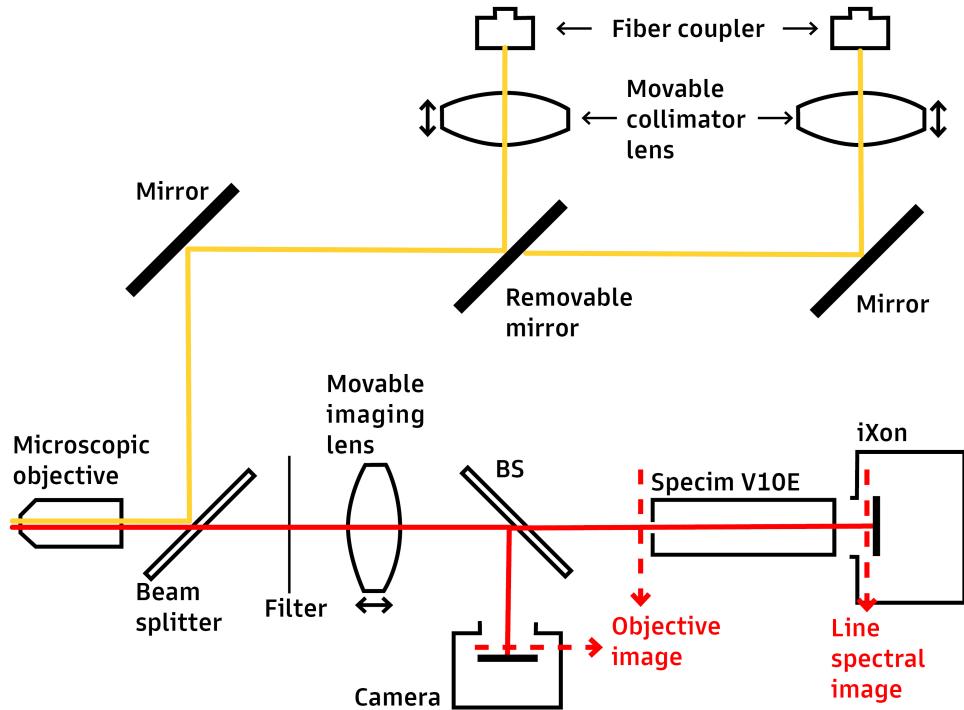


圖 9：微觀系統光路圖

都會包含 512 張不同波長下的影像，這些影像也各都會有自己的一組影像資料標籤，這 512 組影像資料標籤也是都儲存在前半部分。

我們使用實驗室過去留下的公版 tiff labview library 來進行影像檔案的儲存與其中影像資料標籤的管理，在開發初期遇到該 library 內資料寫入檔案時，端序 (byte order) 不一致的問題，有些資料是以大端序 (big endian)，寫入，有些是以小端序 (little endian) 寫入，為了配合實驗室 Analyser 軟體，我們最後一慮皆使用小段序寫入資料。另外，將 data cube 寫入檔案時，若將三維矩陣直接寫入，會有 array index 倒置的問題，正確的寫入方式應該是以 for 迴圈依序將 data cube 內的單張影像一張一張寫入。

4.2.3 座標校正

4.3 第二階段：系統開發

第二階段的系統，主要目的在於將同樣的線掃描技術，應用於微觀尺度，硬體上的變更，首要就是將原本第一階段所採用的 23mm camera lens，置換成一具簡單的光學顯微鏡。我們採用了 Olympus 的 10X 顯微物鏡，並搭配 15 cm 的 tube lens，將放大過後的樣品影像成在分光儀的入射狹縫上，至於分光儀與 iXon 影像感測器的設置，則沒有不同。

除此之外，系統的照明方式也有改變。原初以外部照光的方式，對於所需照

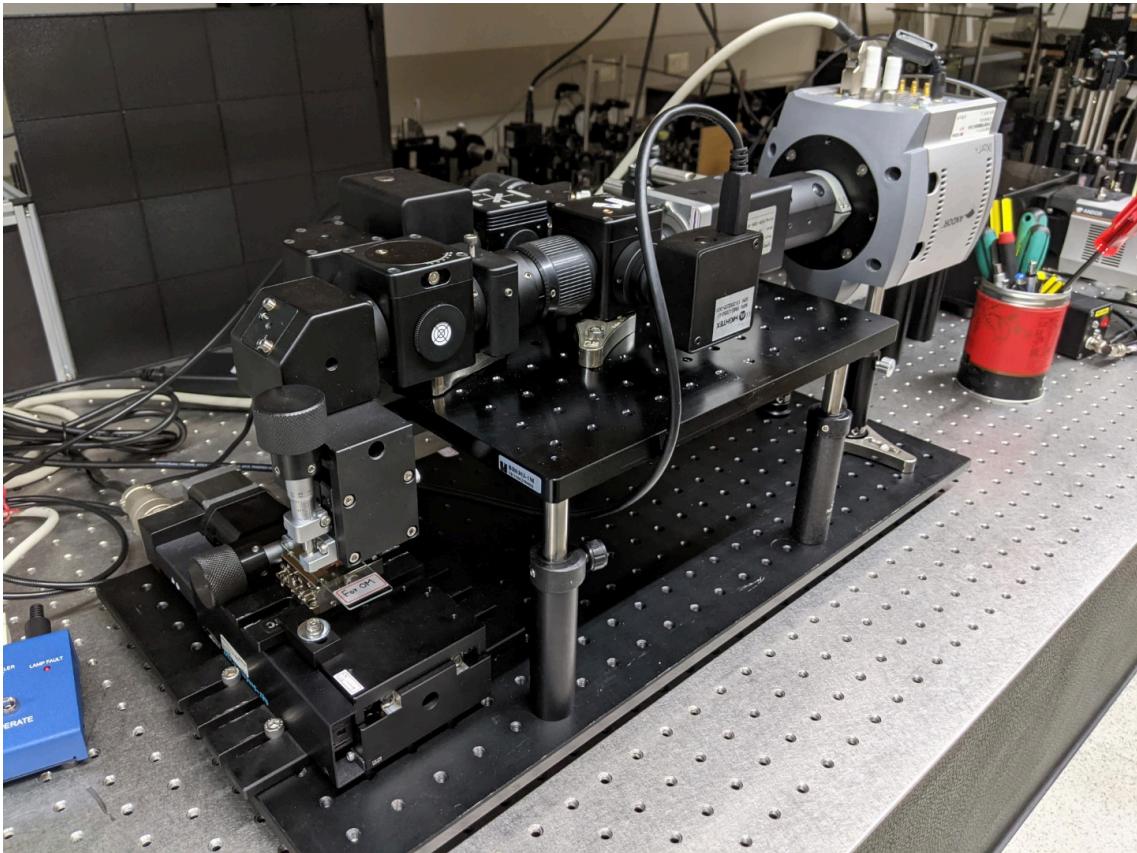


圖 10: Micro system.

明範圍相對較小的顯微影像來說，會浪費較多光源，也不適合進行雷射螢光等觀測，因此將照明方式改為內部照明，系統上有兩個光纖 collimator，能夠彼此切換。光源經過 tube lens 匯聚在物鏡的背焦面上，通過物鏡後變成平行光，以期照射在樣品上的光線最為均勻。

裝設物鏡的鏡架，能夠上下移動以進行對焦，光源的 tube lens 也能微調位置。物鏡的 tube lens 雖然裝設在可調的鏡筒內，但不應任意移動。至於電動載臺的裝設與使用，則沒有不同。系統上另外再成像進入分光儀狹縫前，已一片半反射鏡將 OM 影像投至一臺 Canon M200 相機中，借助其 APS-C 尺寸的感光元件，能夠完整顯示出 OM 的視野，以幫助使用者尋找 ROI。

4.3.1 Galvo

在最早的規劃中，第二階段的系統應該要從第一階段移動樣品的方式，改成以 Galvo 進行移動光源的方式掃描，但經過評估後，發現 Galvo 的運作方式並不適合線掃描系統。Galvo 掃描的原理，是改變點光源照射在樣品上的位置，以一對樣品上各個位置進行光譜量射。由於線掃描方式一次至少要將樣品上的整條掃描線完整照明，若以 Galvo 調動點光源的位置，則代表需要將光源在曝光時間內完整掃描一次樣品上的掃描線，並將掃描線上不同位置的像對應到狹縫上的不

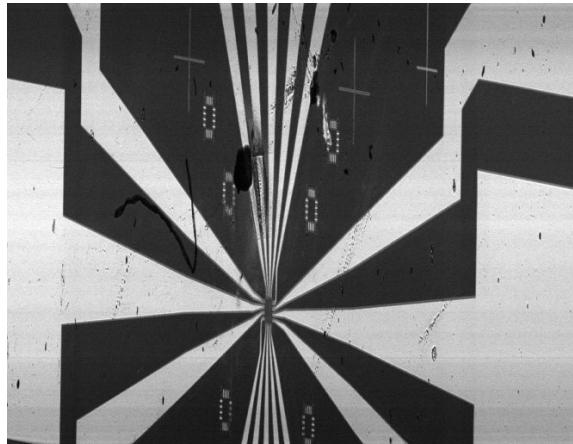


圖 11: HL-2000

同位置。然後，這樣勢必代表仍必須以電動載台移動樣品，才能將樣品上不同位置的掃描線之影像成在固定位置的狹縫上，如此的作法與現階段以面光源照滿光學顯微鏡視野，並移動載台的方式，並無效率上的優勢，且以面光源照明尚有更方便使用者尋找 ROI 的優點。雖然以點光源方式理應可以相同的光源提供更強的照明，但在系統開發過程中亦沒有遇到照明強度不足的問題，因此就沿用第一階段以電動載台移動樣品的掃描方式。

4.4 照明

本系統現階段的照明設備，分別是高頻寬的 Energetic LDLS 與 405 nm 的 DPSSL Laser，從兩個光纖 collimator 進入系統。照明光路的目標是希望能進樣擴大照明範圍，並使照明盡量均勻。然而在系統架設的初期，energetic 的照明存在明顯的上下不均勻現象，如圖與圖的比較所示，圖是初期進行光陸校正時使用的 HL-2000 光源照明下的影像，可以看見將同樣的光纖接頭改接 LDLS 光源後，照明變得非常不均勻。且視野上下幾乎已經超出照明範圍。請這些都是在確認照明光路經過校正後的影像。為了改善照明的均勻度，我們首先將原本使用的 12.5cm tube lens 換成現在所使用的 15cm tube lens，希望能更集中使用成像中間較亮的部分，不過改善的效果有限，且系統上也沒有空間再裝設焦聚更長的透鏡。為了要進一步改善照明的均勻度，我決定嘗試調整 LDLS 光源系統內，光線進入光纖的 Coupler，以及光線離開光纖，進入影像系統的 Collimator。經過多次嘗試後，最終得出三種組態，可以藉此瞭解前述兩個組件對於照明的影響。

4.4.1 最高亮度、匯聚於背焦面

簡言之，平移調整光線進入光纖的 Coupler，會決定 LDLS 的照明光譜中進入光纖的波段。該 Coupler 原先的狀態，是調整至照明显亮度最高，也可視為是最寬的



圖 12: Energetic

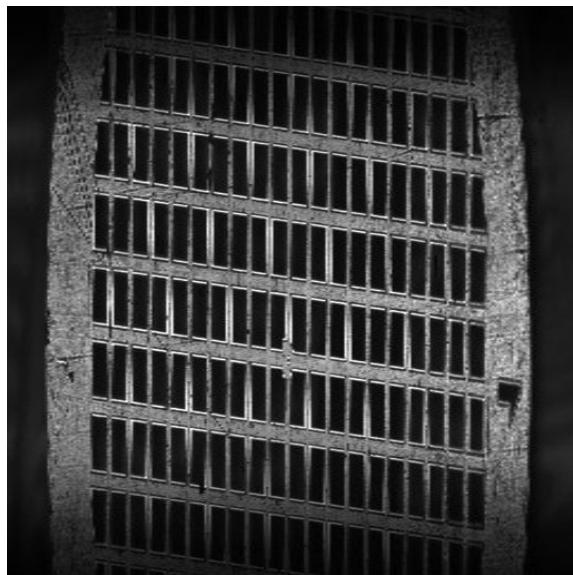


圖 13: Coupled at brightest, collimated on BFP.

頻寬進入光纖的狀態。而光線離開光纖，進入照明系統的 Collimator，即是一個可前後調整的透鏡，則會決定照明光源在影像系統內的何處匯聚。原先是調整至會剛好使照明光源正好匯聚在顯微物鏡背焦面的位置，使打在樣品上的光線為平行光。在這個設定下，掃描所得的影像如圖13，可以看到影像上下明顯較暗，表示照明範圍還不夠大。從圖14的彩色 OM 影像可以看到，照明光源有類似色相差的情形出現，照明光源的影像不完整，且顏色也有分布偏移的情形。不過整體的照明尚算均勻，沒有明顯的干擾。

4.4.2 最高亮度、不匯聚於背焦面

從前述的設定開始做調整，若將 Collimator 稍微調動，使光源不要匯聚在顯微物鏡的背焦面上，可以把照明的範圍再做擴大，並完整的照滿整個物鏡視野，如圖15、16所示，影像不再有上下明顯的暗帶。由於光線並未匯聚於物鏡的背焦

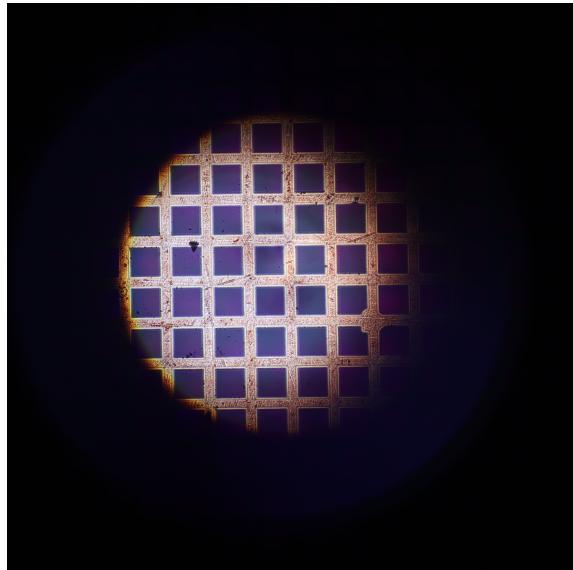


圖 14: OM: Coupled at brightest, collimated on BFP.

面，打在樣品上的光線並非平行光，因此容易產生干擾的照明圖樣。以該螢光便樣品為例，由於螢光片半透明且具有厚度，不平行的光線穿過螢光片後，經反射後會產生不均勻的照明圖樣。

4.4.3 較低亮度、匯聚於背焦面

為了避免上一個設定方式明顯的干擾紋路，我重新調整 Colimator，將光源匯聚至物鏡背焦面，並改為調整光纖的 Coupler，以解決原初的設定中照明範圍不足的問題。在圖17、18中可以看見，經過調整後，照明闊線的頻寬大幅減少，原先在4.4.1節中色相差的問題，幾乎完全消失，因此也確實可以完整的照明整個視野範圍，但由於實際進入光纖的光線已經減少許多，因此影像的整體亮度已有明顯的下滑。

綜上所述，照明的設定可以說是在光源光譜的完整度（頻寬）與照明範圍中做取捨，我們最後決定採取4.4.1節中的設定方式，雖然照明最後所得的影像會在上下有明顯的暗帶，但情形不算特別嚴重，且可以透過軟體進行後期處理。若為了排除上較暗的問題，而採取4.4.3的設定方式，形同於浪費了 LDLS 光源系統多數的光譜頻段，相形之下比上下的邊緣暗帶是更為嚴重問題，且也與我們因為需要更高頻寬的白光而使用 LDLS 的初衷背道而馳。

4.5 使用者介面與功能

在軟體的前端介面上，我們希望讓使用者一目瞭然，能夠以最快的方式在螢幕上找到他所需要的控制項。因此將所有的控制按鈕分為數個類別，並從視覺上以背景圖塊 (LabVIEW decorations) 做出區別。另外，為了避免介面整體太過雜

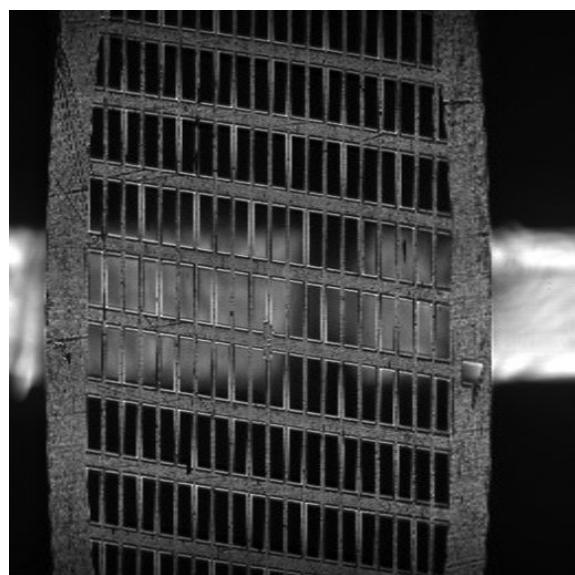


圖 15: Coupled at brightest, collimated off BFP.

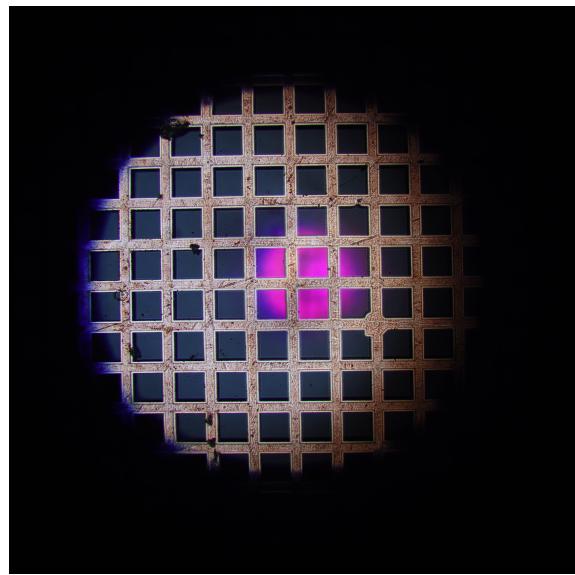


圖 16: OM: Coupled at brightest, collimated off BFP.

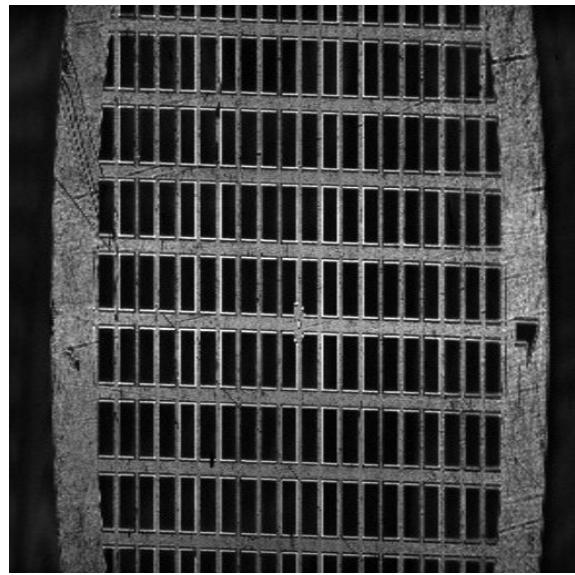


圖 17: Coupled at evenest, collimated off BFP.

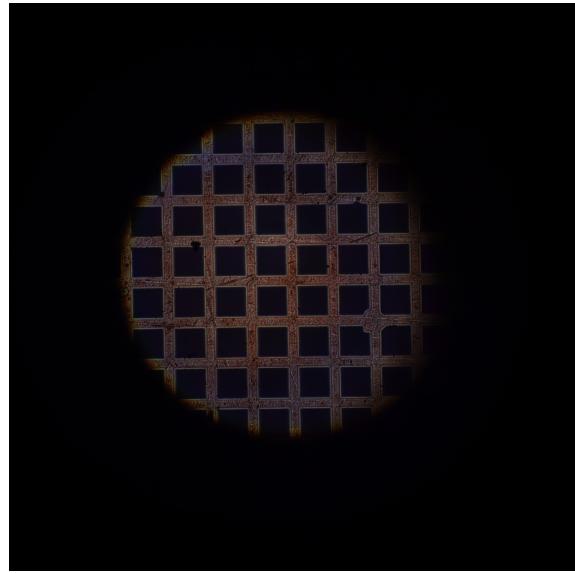


圖 18: OM: Coupled at evenest, collimated off BFP.

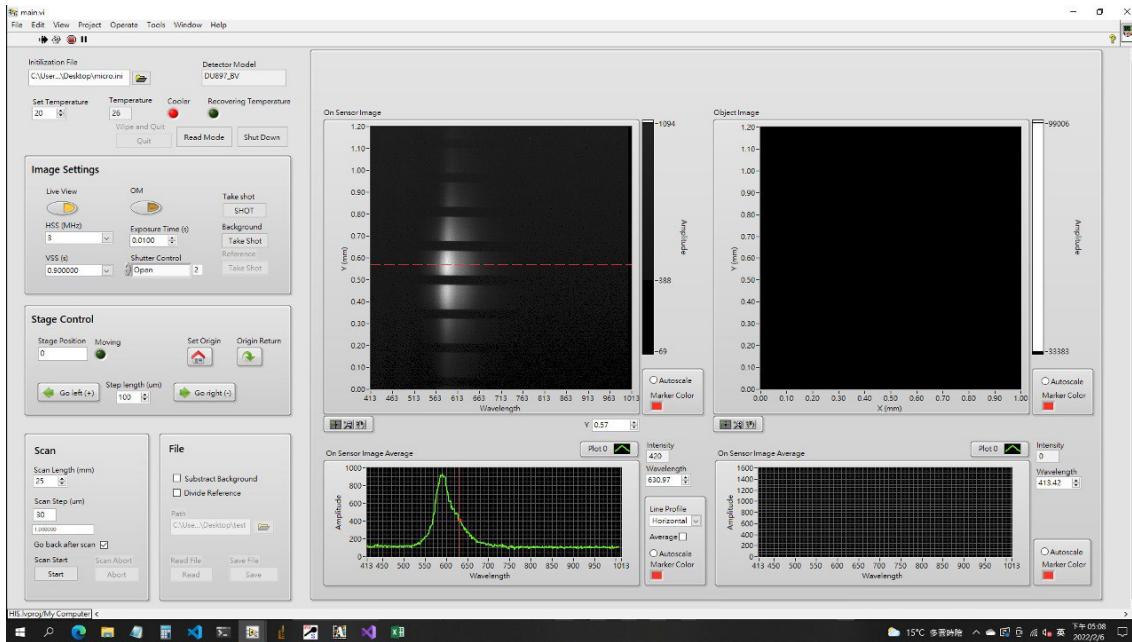


圖 19: 在影像模式下的軟體介面。

亂，在控制項的造型上都選用 LabVIEW 中內建與 Windows 系統風格一致的 system 控制項系列。因此整體的畫面簡潔，且不會有過多且不必要的視覺元素干擾使用者對整體介面的理解，僅輔以部分的 silver decorations 幫助使用者理解各類別控制項的分區，達到操作上直觀與美觀的目的。

除此之外，操作介面除了靜態上的設計外，也有許多會需要因應使用者輸入來進行回應的動態變化。首先是希望使用者所有的輸入都能得到介面上的反應，讓使用者知道操作是否成功。另外，也盡量使用一些視覺元素，例如表達系統冷卻情形的顏色、載台移動中的燈號、矩陣旋轉的進度條等，來提醒使用者目前系統的狀態。這些動態的設計能避免讓使用者對於系統的操作狀態感到困惑。

接著，雖然介面上布局排版不會在操作過程中有重大改變，但許多文字、圖表標題、尺規，會隨著顯示的內容不同，做出相應的變化。而在當下不應該被使用的控制項，也會在視覺上明顯的被淡化，從圖19與圖20的比較即可看到，進行掃描時所有的影像設定皆不應被更動，因此在介面上相關的控制項皆被淡化關閉。

4.5.1 ROI 框取

本階段中重要的軟體功能之一，就是圖21中的 ROI 框取功能。當使用者打開 OM 影像畫面後，可以透過下方的拉桿調整掃描起始與結束的位置，接著只要按下 ROI Scan，系統自動完成範圍內的掃瞄。該功能的開發過程中，最重要的是 OM 影像上所框取出的範圍，要如何轉換為實際的長度。我採用了一個已知大小的網格樣品，在我所設計的校正介面 (Control_demo.vi) 中，讀取每個網格在螢幕上所佔的範圍大小，並以此來計算出螢幕與實際尺度的換算比率，並將這個

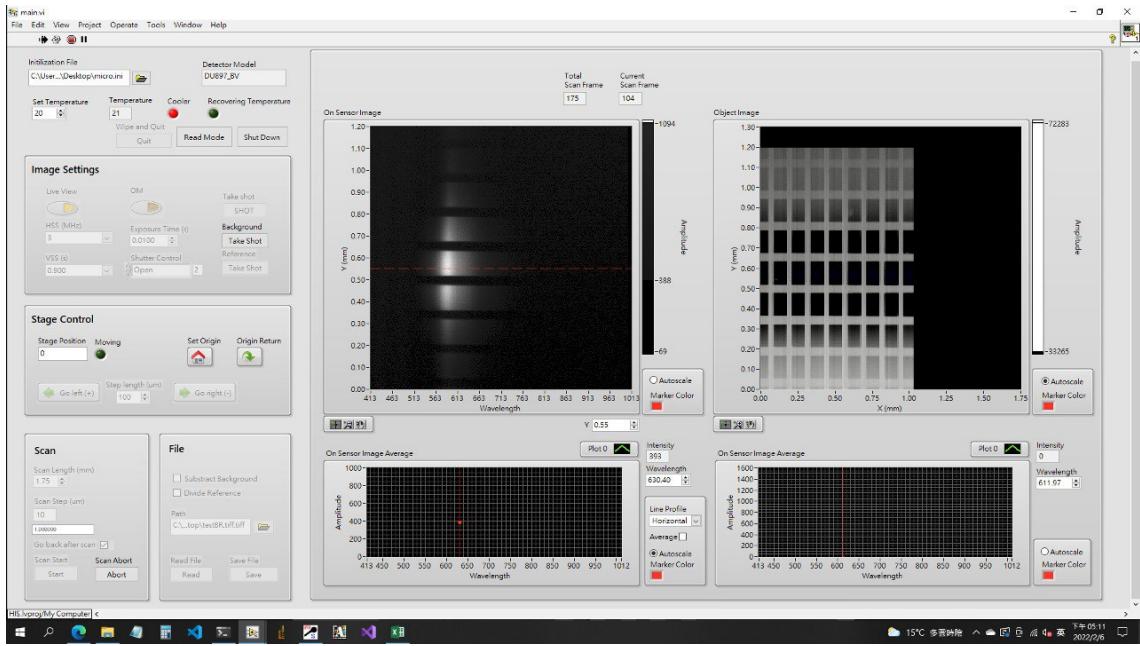


圖 20: 掃描時的軟體介面。

比率儲存在.init 檔中，請參考.init 檔說明文件中的 Scale Factor 參數說明。

除此之外，這個功能的開發，也牽扯到許多 OM 顯示的設計。由於我們並沒有使用到 Canon M200 影像感測器的全幅畫面，因此 OM 影像需先經過裁切，這些裁切的設定也都儲存在.init 檔中，可以參考.init 檔的 OM 章節。同時還要在 OM 影像上顯示線分光儀當下所觀測的位置（圖21中白色垂直虛線），以及線分光儀的 Y 軸視野範圍（圖21中兩條白色水明虛線），這些都需要以校正介面與具有已知特徵的樣品來協助判斷，在.init 檔的說明文件中有較詳細的校正方法敘述。

4.5.2 背景/參考光譜

由於本系統以平行光進行照射的特性，非常適合作反射光譜的量測。然而，量測反射光表示我們必須對光源在光譜或空間中的不均勻進行校正，換句話說，我們希望量測的是樣品在各波長下的反射率，而非光譜本身。同時，在多數的光譜量測中，我們也都必須對量測系統的背景雜訊進行校正，因而著手開發背景光譜（背景雜訊）與光源參考光譜的擷取與校正功能。實際進行校正時，是將背景光譜（雜訊）由源資料中減去，再除以參考光譜。在操作的介面上，由於背景光譜幾乎可以適用於所有類型的光譜量測，而參考光譜只需要用於反射光譜的量測，因此我將其設計為兩個按鈕，可以分別進行擷取。然而需要注意的是，根據反射率的計算式

$$\text{reflection rate} = \frac{\text{measurement} - \text{background}}{\text{reference} - \text{background}} \quad (1)$$

若沒有擷取背景光譜，則參考光譜本身是無法用於校準的，因為參考光譜也必須減去背景雜訊後才能用於校準。因此介面的設計上，在沒有擷取背景光譜前，擷

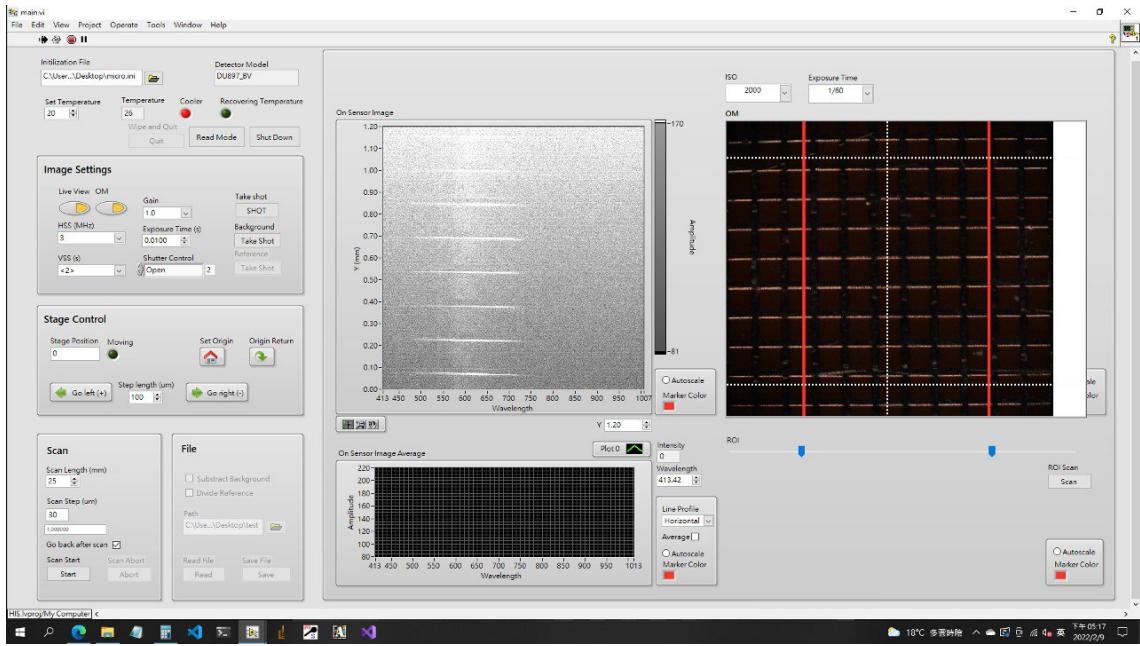


圖 21: ROI 框取功能。

取參考光譜的按鈕將會是淡化且關閉的。

使用者按下背景光譜按鈕後，系統會關閉 iXon 的快門，以當前所設定的影像參數拍攝一張張片，並顯示於右側螢幕，再將快門恢復至原本的狀態。該影像會被儲存到名為 background.vi 的 FGV 中，同時 imagesetting.vi 中的 global variable hasBkg? 會被設定為 true。相似的，當使用者按下參考光譜的按鈕後，系統會開啟 iXon 的快門並以當前所設定的影像參數拍攝一張張片，該影像會被減去背景光譜²，接著儲存到名為 reference.vi 的 FGV 中，同時 imagesetting.vi 中的 global variable hasRef? 會被設定為 true。請特別注意，系統並不會強制使用相同的影像參數拍攝背景/參考光譜與掃描，這使使用者在某些特殊情況下可以自行決定拍攝背景或參考光譜的數值（例如拍攝參考光譜時反射面並不理想，可以用影像參數稍微彌補），但一般情形來說請務必確保這些影像以相同的參數拍攝。

拍攝參考光譜時，使用者必須暫時將樣品改為一個反射面，確認對焦後，再拍攝參考光譜，以忠實擷取光源的樣貌。其餘對於掃描相關的操作皆相同，掃描完成後，將影像資料存進 FGV(dataCube.vi) 中時若 hasBkg? 與 hasRef 兩個全域變數有至少其一為 true，系統就會在 FGV 內進行相應的校準運算，首先從 background.vi 中讀取出背景光譜，將掃描資料減去背景光譜，相減後所有小於 0 的矩陣元素會一律被設為 0³，接著再從 reference.vi 中讀取參考光譜，並

²相減後數值小於 0 的矩陣元素會一律被設為 0。

³我曾經試過相減後，將所有數值同步向上平移調整至矩陣中最小值為 0，但這會導致相減的效果近乎消失。

將減去背景雜訊的掃瞄資料除以參考光譜⁴。

掃描結束，FGV dataCube.vi 的寫入完成後，進行影像瀏覽時，若 hasBkg? 與 hasRef? 兩個全域變數有至少其一為 true，Data 操作區就會出現 subtract background 或與 divide reference(若 hasRef? 為 true) 兩個 checkbox，使用者勾選後，系統就會從 FGV 中讀取相應的影像資料。勾選 subtract backgroundc 後，螢幕上所出現的影像與光譜皆會是減去背景雜訊後的光譜；相應的，勾取 divide reference 後，系統會自動將 subtract background 也勾取，並且螢幕上皆會呈現反射率資料(式1)。請特別注意，當使用者沒有勾選 subtract background 時，是無法勾選 divide reference 的；同時，若使用者只有拍攝背景光譜(則 hasRef? 應為 false)，則也會無法勾選 divide reference。

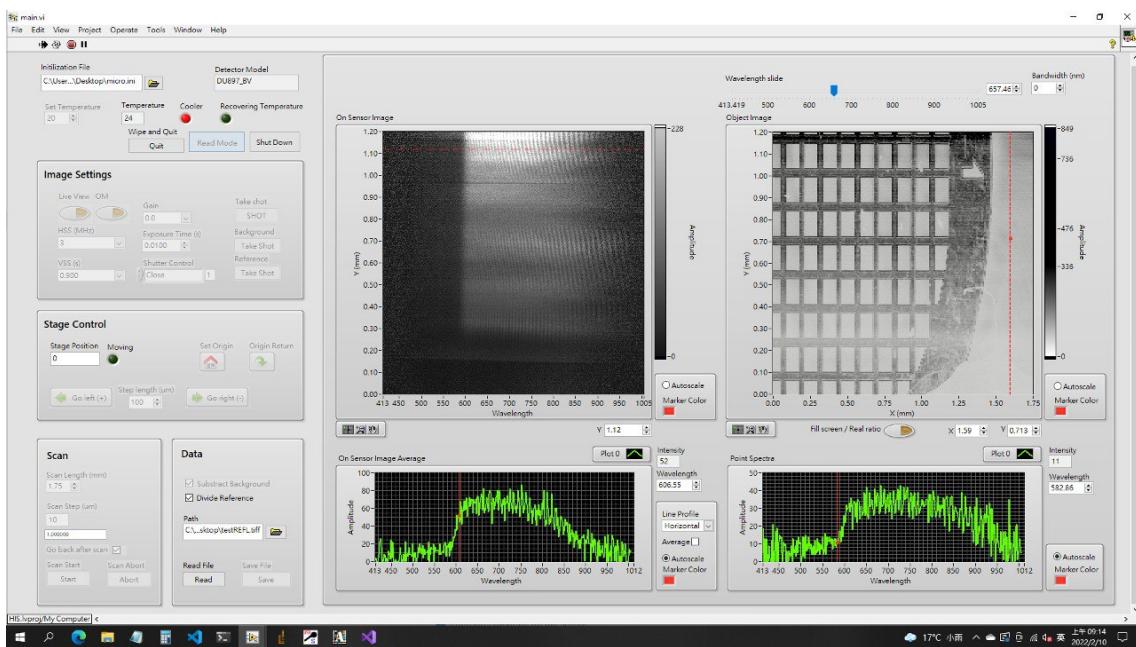


圖 22: 檢視反射率影像時的軟體介面。

4.6 .init 檔

軟體的.init 檔案，目標是將一些重要的參數，如系統的影像大小、xyz 三軸的校正等，儲存在一個可以更改的文字檔案中，當系統的硬體有更動時，只要調整該.init 檔案內的參數值，軟體就可以做出相應的改變，例如依據不同的影像尺寸進行記憶體的控管等。換句話說，透過 init 檔案儲存系統參數，就可以讓同一套軟體適用於不同的硬體上，只要檔案內的參數經過相應的調整即可。

本系統的 init 檔共分為五個區段，分別儲存系統視野、iXon、電動載台、光譜校正與 OM 相關的參數。軟體在啟動時會將這些參數一次讀取，並儲存到相應

⁴請注意 reference.vi 中的參考光譜為已經減去背景雜訊的參考光譜。

的 run-time 變數中，以方便隨時取用。我們使用的檔案語法是 LabVIEW 內建的 Configuration file VIs 所產生的語法，其易於閱讀的特性，讓使用者可以直接透過一般的文字編輯器進行修改。其中某些參數，也會在軟體操作過程中由軟體自行做合適的修正。

關於.init 檔案的詳細使用說明，與每個參數所代表的意義和用處，請參閱本系統的.init 檔說明文件 (.init file documentaion of HSI system)。

4.7 軟體結構調整

隨著程式的軟體功能漸趨完備，操作上越來越複雜，各個功能所需的程式碼也都會佔去龐大的空間，使的程式碼的原檔變得過於冗長，變得非常難以閱讀與 debug。且許多會重複使用、或是功能相近的程式碼也浪費了不少空間。另外，許多資料或變數必須在程式的不同區塊間傳遞，常常需要拉很長的 data wire，且每個需要取用資料的地方都必須拉一條線，也造成資料流變得混亂。為了改善這些問題，並使後續的軟體開發更加便捷，我們決定將程式進行大規模的改造，將程式碼全部模組化，主程式只要控制 UI 與執行流程，其餘功能皆以 subVI 方式呼叫執行。另外，也以各種 local variable、global variable 與 functional global variable 來儲存並傳遞資料，使程式的資料流變的清楚明確。

首先，將程式完全模組化，所有大小功能都以 subVI funcation call 來取代後，主程式的檔案尺寸縮減至一半，整體的程式碼也變得更加整齊、一目瞭然。在前端使用者介面完全不變的情形下，這些 sunVI 之間的 API 需要經過不少設計與調整，才能確保基本的運作都能以正確的參數完成，且必要的資訊資訊可以呈現在使用者面介面上。我們也使用了許多 control reference 的傳送，來使 subVI 能夠直接控制主程式上的使用者介面，這樣的操作方式減少了許多不必要的資料流，在整個模組化的過程中相當重要。我們也同時順便確立了程式的執行流程，在原始碼更易讀的情形下，更容易看出程式目前的所在階段，對於 UI 要因應不同階段的控制，也很有幫助。

接著，我們將程式的資料流大幅精進。主要透過以下三種方式來操作：

- 若是主程式內的 UI 相關資訊，例如使用者的滑鼠點擊位置，就以 local variable 來儲存，以方便主程式內不同的 event 或不同階段的程式取用資料。
- 若是.init 檔或是影像擷取設定相關的資料就以 project global variable 的方式儲存，如此一來每一個 subVI 都可以自行對同一個變數進行讀取，能夠簡化 API 的設計。
- 最主要的 data cube，以一個 functional global variable 的方式儲存，主要的原因是三維影像資料的數據較多，若以傳統的全域變數方式儲存，每

次讀取時資料都會被複製一次，造成記憶體的浪費。另外，FGV 能夠在資料儲存時一並執行程式，除了可以對 racing 的狀況進行處理外，也方便做一些基礎的資料處理。

4.8 第三階段：功能優化

本階段的軟體開發主要集中在影像資料的分析功能。

4.9 掃描速度

4.9.1 掃描迴圈

為了要了解決定掃描速度的各個因素，首先要先說明整個掃描的行程是如何進行的。所謂掃描，其實就是在樣品的數個不同位置上以相同的參數拍攝線掃描影像，在使用者設定好掃描範圍與掃描步進（也就是每條掃描線之間的距離），電腦軟體會執行以下的迴圈，控制 iXon 與電動載台進行掃描：首先，將電動載台移動到欲拍攝線掃描影像的位置，在每個迴圈中，這個移動的距離是固定的，也就是掃描步進。接著，在確認電動載台已經移動到正確位置後，下指令使 iXon 開始擷取影像，確認 iXon 已經完成影像擷取後，iXon 會將資料傳回電腦，程式並會進入下一次迴圈，重複執行以上動作的次數，是由程式以使用者設定的掃描距離與掃描步進進行計算。迴圈次數執行完成後，電腦會將每條掃描線上所取得的線掃描影像接合成三維矩陣，為了確保該三維矩陣的「正面」是如肉眼所見的樣品影像，該矩陣還須經過旋轉，此矩陣旋轉的過程也需要時間。

以下對於掃描時間的討論，皆是以一掃描範圍長 3.5mm，掃描步進 $10\mu m$ （也就是總共拍攝 350 張線掃描影像並接合），曝光時間 10ms 的高光譜影像掃描為例。為了瞭解其他各項影像參數 (HSS, VSS) 對於掃描速度的影響，我調整 iXon 的 HSS, VSS 進行拍攝，並量測不同組合下所有迴圈執行完成所需的時間、迴圈執行後矩陣建立與轉向所需的時間，並以 LabVIEW 的 precision timer(High Resolution Relative Seconds.vi) 量測影像擷取完成後傳輸到電腦所需的时间。在以下的測試中，整個掃描迴圈中有三個等待時間，分別是等待電動載台移動至定點的時間，另一是等待 iXon 影像擷取完成的時間，以及等待 iXon 將資料傳輸到電腦所需的时间。這三個等待時間的設定方式如下所述：

1. 等待電動載臺：電腦將電動載台移動的指令傳輸給電動載台控制器後，會等待

$$\text{掃描步進} \times 200 \div 750 \text{ milliseconds} \quad (2)$$

，再進行迴圈內的下一個動作。

| HSS | VSS | Expo | Pull sum | Scan | t_1 | t_2 | $t_2 - t_1$ |
|-------|-----|------|----------|---------|---------|-------|-------------|
| 3 | 0.9 | 0.01 | 554 | 44.1 | 01:28 | 43.9 | |
| 3 | 1.7 | 0.01 | 502 | 45.25 | 01:10.1 | 25.55 | |
| 3 | 0.5 | 0.01 | 581 | 43.76 | 01:09.7 | 25.94 | |
| 1 | 0.9 | 0.01 | 497 | 01:48.9 | 02:20 | 71.1 | |
| 1 | 1.7 | 0.01 | 633 | 01:50.0 | 02:16.2 | 26.2 | |
| 1 | 0.5 | 0.01 | 588 | 01:48.7 | 02:13.9 | 25.2 | |
| (MHz) | (s) | (s) | (ms) | (mm:ss) | (mm:ss) | (s) | |

表 1: 影像設定對掃描時間的影響。

2. 等待 iXon 擷取影像資料: 電腦在下指令給 iXon 進行影像擷取後，以一個 while loop 每 1.5 倍的曝光時間就詢問一次 iXon 的狀況，直到 iXon 回報擷取已完成後，才會進入迴圈內的下一個動作。
3. 等待 iXon 傳輸影像資料: 電腦會等到「讀取 iXon 影像資料」的程式全部執行完成後，才會繼續迴圈內的下一個動作。

再以上的設定下，所進行的測試結果如表4.9.1所示，表中的 Pull sum 代表 350 次迴圈中等待 **iXon** 傳輸影像資料所需時間的和， t_1 代表 350 次迴圈執行所需的總共時間， $t_2 - t_1$ 則是代表掃描結束後矩陣接合與轉換所需的時間。該測試提供了以下資訊，首先，若 HSS 頻率設定為 1/3，掃描所需時間幾乎也會正好三倍，相對的，VSS 對掃描的速度影響較小。HSS 與 VSS 對於 iXon 運作的影響，可以參考 iXon 說明書的附錄。[\[19\]](#) 接著，等待 **iXon** 傳輸影像資料所需的時間極短，每張照片約 1-2 milliseconds。最後，矩陣接合與轉換的時間雖然只與電腦的效能有關係，但所需的時間可能會占總掃描時間的將近 1/3。

4.9.2 速度提升

為了要使掃描的速度進一步加快，我們決定從前述的三個等待時間開始進行優化。首先，在前述的測試中已經顯示出，第三項等待 **iXon** 傳輸影像資料所需的等待時間極短，並不是決定掃描速度的關鍵因素。因此以下將集中討論等待電動載臺、等待 **iXon** 擷取影像資料兩個等待時間的調整。

4.9.3 電動載臺等待時間

原先用來計算電動載台等待時間的算式2，在其他掃描時被發現可能會有等待不足就下指令給 iXon 進行拍攝的問題，因此改以一個 while loop，在下指令給電動載台控制器後，不斷詢問電動載台目前的狀況，直到控制器回報電動載台已經停下後，程式才跳出 while loop 並繼續下一個動作。然而，這樣的等待方式

會造成掃描速度在各項設定下大致都變成表4.9.1的三倍，雖然最為保險，但其速度較難令人接受。最後，我們將電動載台的 Drive speed (F)、acceleration/deceleration speed (R)、Startup speed (L) 皆設為 400，並且就「相信」電動載臺應該以 400 pulse per seconds 的速度前進，也就是說，我們可以確認電動載台的移動速度是 400 micron per seconds(在 division number 為 1 的情形下)，並以計算電動載台移動所需的確切時間。實務上，我還加上了 10ms 的等待時間做為緩衝。這樣的設定方式目前皆沒有遇到任何問題，且掃描時間也回復到表4.9.1中的速度。

4.9.4 iXon 摄取影像資料的等待時間

如前所述，這段等待時間是以 while loop 不斷詢問 iXon 的方式決定，經過 LabVIEW 的 precision timer 量測後，發現以這樣的方式操作，在 350 張影像的掃描中，以表4.9.1第一列的參數設定，平均每張影像需要 0.13213 seconds 的時間 iXon 才會回報攝取完成。為了要減少這段等待時間，我們翻閱 Andor SDK 的說明書，希望能找到更快確認 iXon 影像攝取完成的方法，最後嘗試了下列幾項，羅列於此：

1. 使用 Wait Acquisition 程式來取代 while loop 不斷詢問的方式，能將等待時間減少至 0.119 seconds。
2. 將 while loop 中每次詢問的間隔時間拉長，對於等待時間沒有影響。以 60 ms 為例，反而使等待時間變長為 0.154 seconds。
3. 使用 Wait Acquisition 程式，並且下指令讓 iXon 只攝取影像感測器上我們會使用到的區域(參見圖4)，等待時間減少至 0.10662 seconds。
4. 我曾資思考過以 kinetic mode 方式驅動 iXon 連續攝取影像，並設定很低的 cycle time，讓 iXon 將影像存入 buffer 後就直接準備進行下一次拍攝，而不必先把影像在從 buffer 中讀出傳輸給電腦。但在同樣的影像設定下，Andor SDK 的 GetAcquisitionTiming 所傳回的最低可設定 cycle time，高達 0.117 seconds，換句話說，這與單張影像方式驅動的等待時間是相同的。
5. Andor SDK 中有提供 Crop mode，理論上可以提升 iXon 的 readout speed，但我們的 iXon 與控制板並不支援。另外也有 Fast kinetic mode，會以 sensor 的一部份區域來做為暫存器，藉此提升速度，但由於我們須用到 iXon sensor 的整個高度，因此不適用。

最後我們決定以 3. 的方式執行，影像感測器上所會用到的子區域則是定義於 init 檔中。

4.9.5 矩陣接合與旋轉

原先可能需耗費 40 秒進行的矩陣運算時間，在改以 LabVIEW 的 loop parallelism 操作後，能夠減少至約 7 秒的時間就完成。⁵ 在經過以上的各式調整後，同樣進行 350 張線掃描，掃瞄範圍 3.5mm，以 0.01 秒的曝光時間、0.9 HSS、3MHz VSS，掃描時間 t_1 正好為一分鐘，另約需 4 秒進行矩陣轉換，總計 1:05 即可完成掃描，並開始進行觀測。

4.10 影像檔案讀取與進階存檔

4.10.1 檔案讀取

本系統軟體截至目前為止皆以掃描功能為核心進行開發，只有在掃描結束後能對掃描的資料進行瀏覽，存檔並關閉後只能使用其他軟體來瀏覽掃描資料。為了讓使用者能有便捷的界面對過去掃描的資料進行瀏覽，我決定以原有的瀏覽介面，直接加上讀取檔案的功能。在開發上，讀取檔案的程式碼並不複雜。由節4.2.2所述可知，Tiff 檔案由影像資料標籤，與影像資訊本身組合而成。讀取 Tiff 檔案的方式相當直觀，首先讀取影像資料標籤，並透過影像資料標籤得知影像在檔案中的位置與大小，再讀取影像本身。不過由於我們所採用的為經過擴充之後的 Tiff 檔案，除了有公版的 Tiff 標籤外，尚有其他實驗室自行開發的軟體會需要的標籤，這些標籤分別儲存在兩個影像資料索引中 (Image File Directory): 公版 IFD 與實驗室的 ULS IFD⁶，可以參閱 lib/Halloween/Specification21_01_27HSI.xlsx 檔案詳列本系統所使用到的影像資料標籤與影像資料索引。整體讀檔的操作順序大致如下所述。

1. 檔案起始處，跳過位元端序宣告⁷等數個位元組後（請參閱原始碼），即是公版 IFD，從此處開始讀取基本的影像資料標籤。
2. 因為每個影像資料標籤的大小皆為固定的 12 位元組，從此處開始每 12 個位元組即為一個影像資料標籤，依序讀取即可。
3. 每個影像資料標籤皆依序包含:2 個位元組儲存其 ID(一個 U16 數字)、2 個位元組儲存其檔案類型、4 個位元組儲存其數量，剩下 4 個位元組儲存標籤資料本身。依此方式，即可讀出影像資料的 ID，從前述.xlsx 檔案即可對照出其意義，接著讀資料檔案型態後，即可以相應的方式將其最後幾個位元組的資料 unflatten 出來。

⁵ 不過該耗時仍與電腦的效能高度相關，實測在一樣的設定下，有可能僅需 3 秒即完成。

⁶ IFD 基本上就是將一群用途相似的影像資料標籤放在檔案中的相鄰位置，組成一個影像資料標籤的群組。

⁷ 讀取檔案時理應先確認檔案寫入的端序設定，但由於本系統寫檔時一律以 little-endian 方式，因此讀檔時也一律採取 little-endian 設定，故不再讀取檔案起始處的端序宣告。

4. 公版影像資料標籤中，有一個標籤是實驗室 IFD 的位置，從這個位置資訊即可以相同方式讀出所有必須的影像資料標籤。
5. 公版影像資料標籤中，另有一個標籤是影像資料的位置 (image strip offset)，透過該位置資訊即可知道影像資料的位置，並存其他影像資料標籤計算出其大小，直接到該位置將正確大小的資料 unflatten 為正確大小的三維 I32 矩陣，所得的矩陣就跟剛掃描完時的矩陣擁有相同的性質，可以被原本的軟體直接讀取。
6. 將該矩陣寫入 dataCube.vi FGV 中，就與剛掃描完時一樣，軟體即可以原本的方式讀取並呈現檔案中的資料。

4.10.2 建立「讀取模式」

有時使用者開啟軟體，僅是需要讀取檔案並瀏覽光譜，此時可以點按進入 Readout Mode，系統即會跳過軟體的影像設定與掃描程序，直接進入瀏覽模式。此部分的程式與 Shut Down 按鍵相同，皆是透過控制 while loop 的離開來達成軟體程序的切換。另外，系統軟體開啟時，會自動啟動 iXon 的 Andor SDK 與 Canon EDSDK，軟體會透過這兩個外部程式庫的執行錯誤來判定軟體系統是否有成功與硬體系統連接，並跳出視窗提醒使用者，同時也會避免對沒有連接的硬體系統下達指令，以避免更多錯誤產生。若軟體偵測到系統的主要影像感測器 iXon 沒有連接上，即會自動進入讀取模式。

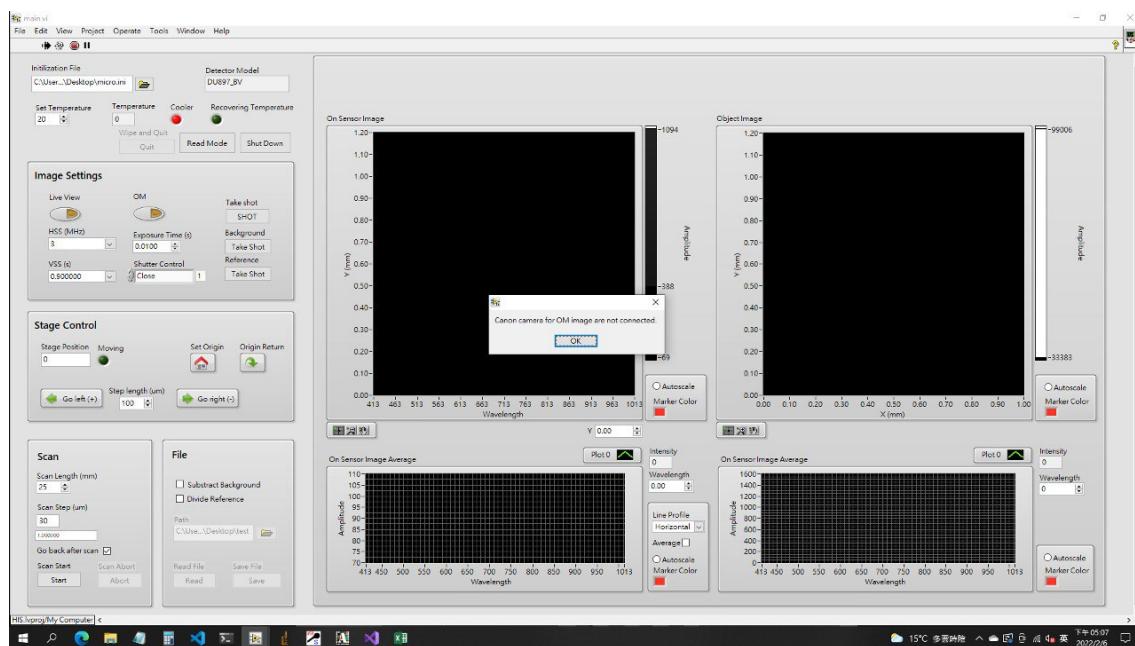


圖 23: 軟體會自行偵測硬體系統是否存在。

4.10.3 TIFF 格式之擴充

為了要使軟體在讀檔時能夠適當地調整 UI，例如顯示實際掃描尺寸的圖標，並在掃描影像檔案內儲存影像分析與比較時必要的資訊，我將原本的實驗室 IFD 內的影像資料標籤進行了擴充，可以參閱前述的.xlsx 規格檔案，其中編號 (ID)70-77 者為本次所新增的標籤。要在存檔時新增標籤，可以如節4.2.2所述一般以實驗室內原有的 Tiff 存檔程式庫進行操作即可。基本上，在 SaveScan_mk3.vi 中，有一個 ULSIFD subVI 負責所有實驗室 IFD 影像資料標籤的整理，只要在這個 subVI 內以 newTag VI 建立新的標籤，並以常數方式指定好標籤的 ID、類型、數量、與內容即可。其中，標籤的資料內容需要建立起合適的 API 從主程式傳送到該 VI 內，我以一個 cluster 來將許多欲儲存的資料包裹起來傳送，並在這個 VI 中再進行 unbundle，其中，project 內的 tiffHsiInfo.ctl 與 tiffInfo.ctl 兩個 type define 即為了這個以 cluster 作為引數傳送的操作所建立。表2列出這次所新增的所有標籤，這些標籤都在實驗室 IFD 區段，讀取方式與原本的標籤亦都相同。

| ID | Type | No. | Content | Description |
|----|---------|-----|-----------------------|-------------------------|
| 70 | 4(U32) | 1 | HSI: Step Length | in um |
| 71 | 11(SGL) | 1 | HSI: Real Y Dimension | in mm |
| 72 | 11(SGL) | 1 | HSI: Real X Dimension | in mm |
| 73 | 11(SGL) | 1 | HSI: VSS of iXon | in sec |
| 74 | 4(U32) | 1 | HSI: HSS of iXon | in MHz |
| 75 | 1(U8) | 1 | HSI: bkg exist? | 1 for true, 0 for false |
| 76 | 1(U8) | 1 | HSI: ref exist? | 1 for true, 0 for false |
| 77 | 11(SGL) | 1 | HSI: Gain | |

表 2: 新增的影像資料標籤。

4.10.4 背景/參考光譜之儲存

參見 SaveScan_mk3.vi 可以發現，若是掃描時 backgroundExist 或 referenceExist 為 true，軟體會將背景光譜與參考光譜寫入在檔案的最後面。由 iXon 每次擷取影像時的影像尺寸皆為固定，因此背景/參考光譜影像的尺寸與其所需的位元組數量，也可以由其他影像資料標籤，如影像長寬與 data cube 層數等標籤得知，因此讀檔時軟體僅須由檔案最後，往回已推得的位元組開始讀取⁸，即可讀出背景/參考光譜影像，並如掃描時一般，將其導入 background.vi

⁸此方式實非標準的 tiff 檔案寫入方式，只是較方便的解決之道。標準的作法應該是多建立新的 tag，用以儲存背景/參考光譜影像的位置，讀檔時先從 tag 讀到影像的位置，再到該位置讀取

與 reference.vi 中。由於背景/參考光譜的校準是在 dataCube.vi FGV 中進行，且是該 FGV 偵測到 backgroundExist 或 referenceExist 為 true 時才會進行，因此將背景/參考光譜讀入相應的 FGV 之後，請確保 backgroundExist 或 referenceExist 已設為 true，再將已經 unflatten 的三維掃描影像矩陣寫入 dataCube.vi 中，即可完成讀檔時的背景/參考光譜校準。

4.11 光譜瀏覽功能

在軟體介面中，共有兩個影像顯示螢幕與兩個光譜顯示螢幕，在這些顯示螢幕上，當畫面有顯示資料時，使用者可以與這些顯示螢幕以不同方式互動，來更仔細的瀏覽影像資料。最簡單的方式是以滑鼠點擊想要瀏覽的位置，軟體即會把該位置的光譜資料更詳盡的顯示出來。但軟體除了把該位置的光譜資料讀出外，也會在這些螢幕上顯示出一些相應的圖標，來輔助使用者了解目前正在進行瀏覽的資料，是從哪個位置所讀出。舉例來說，在瀏覽模式中，當使用者點擊右側螢幕上樣品影像的任一位置時，event structure 中的 right graph mouse down event 中的程式，會在滑鼠點擊位置上畫上圖標，並換算且在畫面上顯示目前點擊的空間座標位置，來標示目前的瀏覽位置，並將滑鼠點擊位置轉換成目前顯示資料的 array index，並以此 index 來讀取該位置的光譜，顯示在右側的光譜螢幕上，左側的影像螢幕則會顯示出該位置的線掃描光譜影像 (on sensor image)，若使用者點擊該線掃描光譜影像，程式會以 event structure 將滑鼠點擊位置送入 drawIntensityGraph.vi 中，此 vi 會將滑鼠點擊位置換算成 array index，並畫上圖標，讀出該位置的 line profile，並將其顯示在左側的光譜螢幕上。使用者在任何時候若點擊光譜螢幕，系統同樣會將滑鼠點擊位置送入另一個 waveformGraphDraw.vi 中，此 vi 會將滑鼠點擊位置換算成 array index，並畫上圖標，讀出該波長下的強度，並把波長與強度顯示在畫面上。

這些讀取滑鼠位置的 vi 與 event structure 內部的程式皆大同小異，首先會透過該螢幕的 property node，讀出顯示幕在電腦螢幕上的所在位置與尺寸，並以此些資訊與得到的滑鼠點擊位置，換算出 array index 與空間座標 (或是波長)，將這些資訊回傳到主程式的 control 上，或是依 index 讀取相應的光譜。同時這些程式碼也會在正確的顯示螢幕上以一系列的 draw picture functions 畫出圖標。

軟體畫面上負責顯示目前所點擊位置的空間與波長座標的這些 control，也可用來調整瀏覽位置。使用者可以直接輸入欲瀏覽的座標位置，或是以 control 上的 increment/decrement 小按鈕來做調整。當這些 control 的值被使用者以上述兩種方法更動時，軟體會以與前一段所述相同的方式呼叫相同的程式碼或影像。

`vi`，來重新繪製顯示幕上的圖標與各個顯示幕上所應顯示的資訊，需要特別注意的是，由於程式碼與 `vi` 皆是接收滑鼠點擊位置作為繪製與換算的參數，當使用者是直接更改這些座標值時，需先在 event structure 中把座標值換算成滑鼠點擊位置（跟前一段使用相同的 property node），再送入這些 `vi` 或程式碼中。這麼做會因為多次換算時四捨五入的問題，導致換算出一樣的 array index，因此需要一些 case structure 來做判定與換算的輔助。

請特別注意，在這些相關的程式碼中，有一些 while loop，是用來確保軟體不會顯示出不在波長軸校正陣列中的波長。`iXon` 上波長軸的每一個 pixel 都代表一個波長，這是經過波長軸校正資料算出來的（見節??），這些波長並會被儲存在一個陣列中，有時前述的程式碼會換算出不再這個陣列中的波長，程式會以這些 while loop 來尋找陣列中與換算值最接近的波長，將其顯示在螢幕上。

4.12 光譜量測實例

以下說明本系統以不同照明方式進行掃描時，在影像瀏覽介面所能進行的各項觀測操作，我們以同樣的橘色螢光片 + 銅網樣品，分別進行雷射光源照明的螢光光譜觀測，以及高頻寬白光照明的反射光譜觀測，藉此印證系統的觀測能力與瀏覽功能。該螢光片樣品的結構，是在約 3.5mm^2 平方的橘色螢光片上，放上一個微小的銅網，銅網的正方形網格尺寸約為 $127\mu\text{m}$ 。

4.12.1 螢光光譜

所謂螢光觀測，是以 405nm 雷射平行光照明樣品，激發橘色螢光片僅在 600nm 左右才有的螢光，並在系統的成像鏡前將反射的 405nm 雷射光濾除，因此最終觀測到的影像，在網格下的螢光片露出處，應觀測到集中於 600nm 左右的光譜，而在銅網格本身上，則因為銅網所反射的 405nm 雷射皆已被濾除，理應不會觀測到明顯的光譜特徵。

在圖28中，右側螢幕上所點擊到的位置，如螢幕上垂直紅色虛線上的紅點所示，該處為上層的銅網網格本身，因此從右下方的光譜顯示幕上，確實不會看見集中於 600nm 的光譜。至於該螢幕上的紅色虛線處，與其上的紅點相同，都是隨著滑鼠點擊的位置移動，紅點是點擊位置，虛線則是紅點所在的掃描線，而該掃描線上的線掃描影像，則呈現在左側螢幕上。左側螢幕上，亦有一條紅色虛線，也是隨著滑鼠在左側螢幕的點擊位置移動，虛線上的每一個像素，就是對應到左下方光譜螢幕的橫軸座標，而左下方光譜螢幕的縱軸，就是每個像素的強度，換句話說，該光譜螢幕即是呈現出左側大螢幕上 $y=0.55$ 處的光譜，也就是右側紅色虛線上 $y=0.55$ 處的光譜。該處所在之處是露出的下層螢光片，因此左下光譜螢幕所呈現出的是一個集中在 600nm 處的光譜。

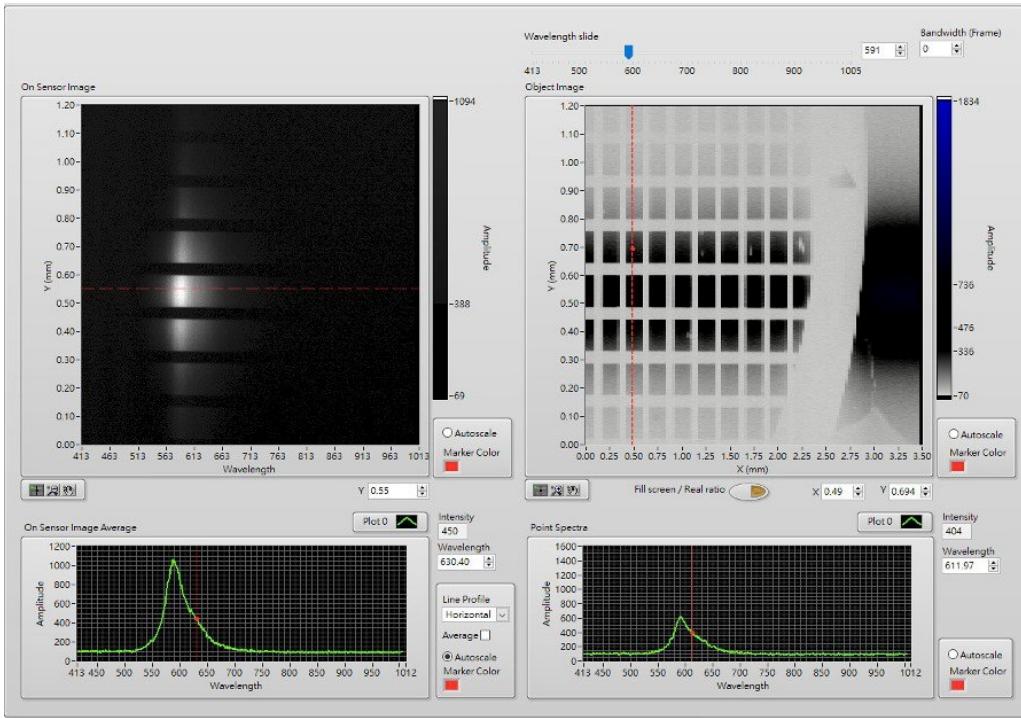


圖 24: 雷射螢光光譜的觀測

在左側的大螢幕上，也可以看見，所有亮帶都集中在 600nm 附近，與螢光片受雷射激發後的螢光波長一致。

由於本系統所儲存的影像資料符合正規的 TIFF 格式，訪問所有能夠讀取多層 TIFF 格式的影像瀏覽器，接能夠讀取本系統所擷取的影像。我們以免費、開源且普遍的 ImageJ 軟體，開啟一張同樣以雷射照明觀測本螢光片 + 銅網樣品的影像，輕易的就可以對該影像進行各項處理，包括沿波長軸的影像平均、影像比例的校正，並將多層的影像轉存為更易於在不同軟體、裝置或書面進行呈現的單張 JPEG 檔。如圖 25、26、27 所示，展現出本系統掃描檔案的使用彈性與廣泛的相容性。

4.12.2 反射光譜

同樣的螢光片 + 銅網樣品，在高頻寬的白光照射下，銅網網格處應會完整反射光源的光譜，而螢光片露出處則會較集中反射在 600nm 處。不過由於白光照明的強度極強，原始的反射光譜較難判別出其差異，但本系統具有背景光譜與參考光譜的校準功能，能夠計算出樣品在每個位置與波長的反射率，更精確呈現出樣品的反射特徵。

圖 22 中，右下方的光譜螢幕呈現出右側大螢幕上紅點位置的反射率，由於觀測位置（紅點）在銅網上，在各個波長處的反射率大致相同。而左下光譜螢幕則呈現出樣品在 $y=$ 處，也就是螢光片露出處的反射率，可以看見其反射率在 600nm 處有明顯的提升，橘色螢光片在橘色波長處有較強的反射率，顯然是合理的觀測。

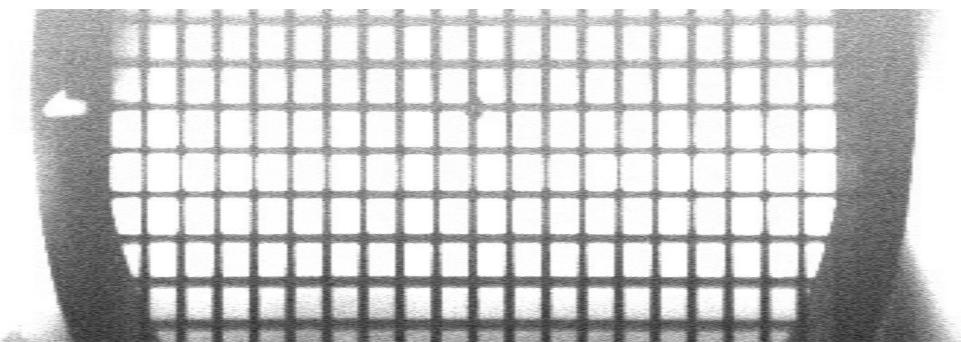


圖 25：平均過後的螢光高光譜影像，以 405nm 雷射激發。本照片的比例經過調整，以符合樣品實物。實際大小約為 $1.2\times3.5\text{mm}$ ，由 350 張單線光譜影像所接合而成

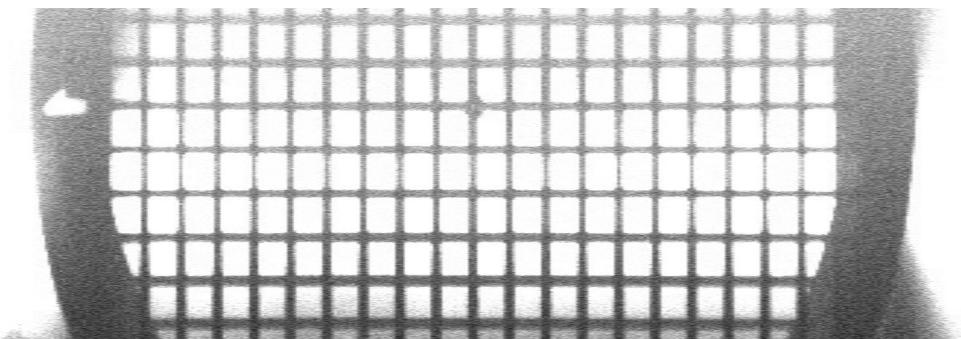


圖 26：螢光的高光譜影像，僅擷取約在 628nm 下的樣品影像。

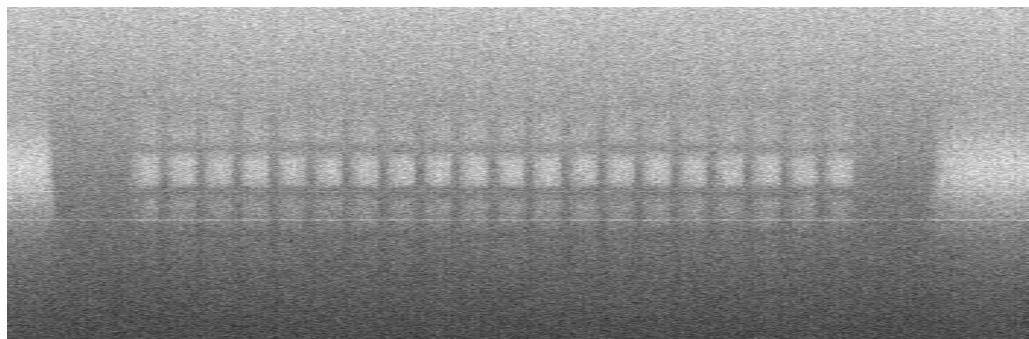


圖 27：螢光的高光譜影像，僅擷取約在 526nm 下的樣品影像，已經幾乎不可見。

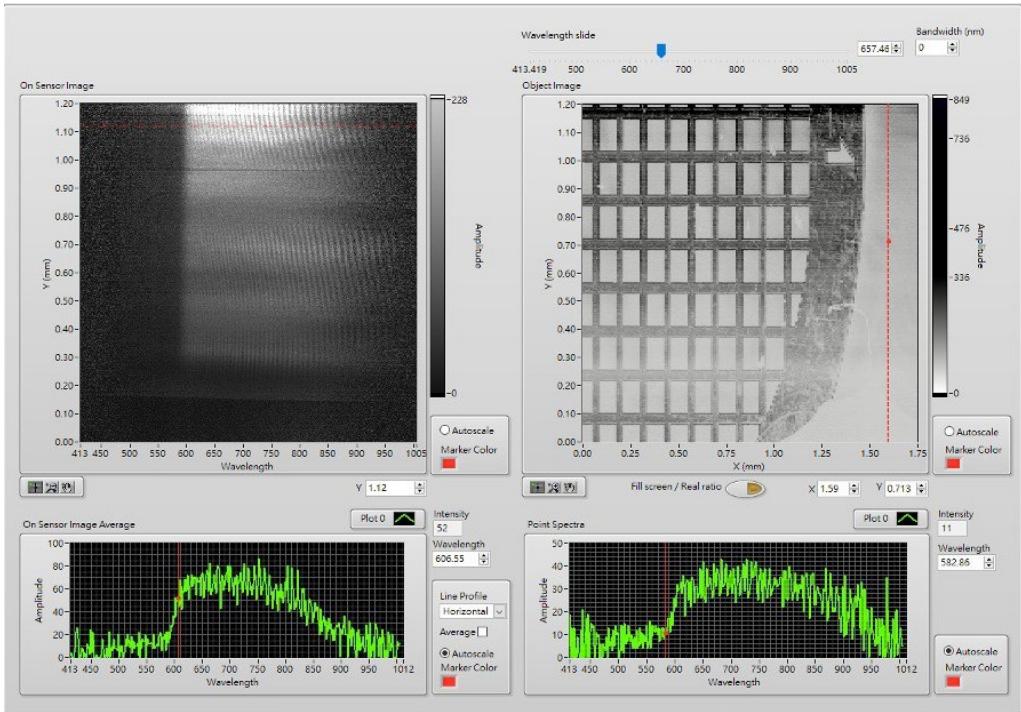


圖 28: 反射光譜的觀測

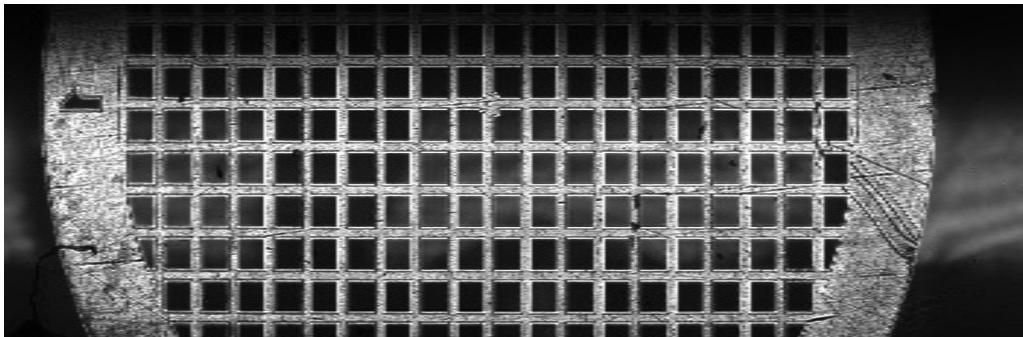


圖 29: 白光的高光譜影像，僅擷取約在 628nm 下的樣品影像。

結果。

若反射光譜未經過背景光譜與參考光譜的校準，由於照明光源相當亮，其在整個可觀測的光譜範圍，都會有明顯的訊號。圖29、??同樣是以 ImageJ 調整並擷取的圖片，極清楚呈現出射觀測的原始影像，在不同波長(無論大於或小於 600nm)都有相當強的訊號，與螢光光譜僅集中在 600nm 處，或是反射光譜經背景/參考光譜校準後，在 600nm 有 cutoff 的特徵，都相當不同。

透過圖22右側大螢幕的影像與圖29、??的比較，也可以發現經過參考光譜的校正後，不但反射率光譜不再存有照明光源的光譜特徵，照明在空間上的上下不均勻也改善許多。本系統的最終目標是用於背焦面影像的觀測，而背焦面影像的取得勢必得透過反射照明的方式，其亦是一種反射光譜的觀測，因此此處所呈現的反射光譜瀏覽能力對於背焦面影像的觀測相當重要。

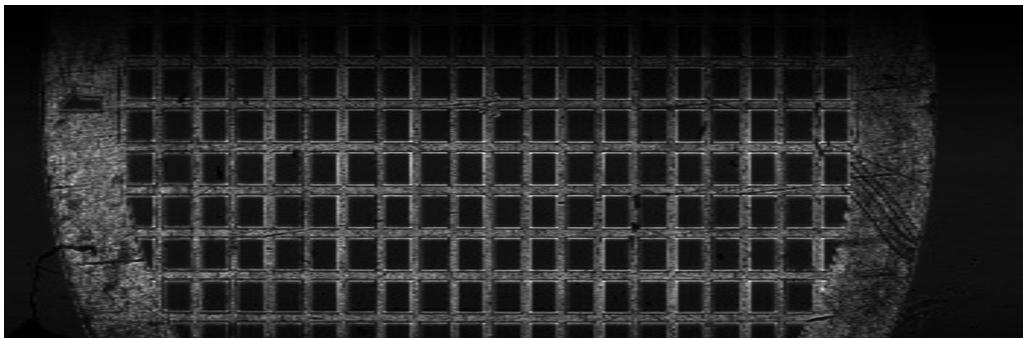


圖 30: 白光的高光譜影像，僅擷取約在 526nm 下的樣品影像，仍然相當清楚。

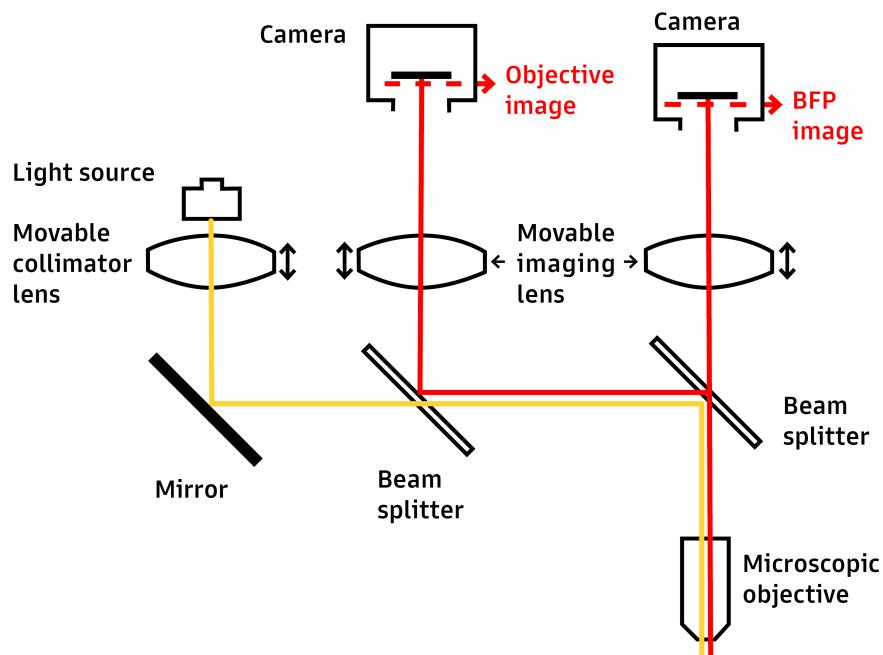


圖 31: 背焦面影像系統光路圖

4.12.3 OBF Revisited

4.13 背焦面影像的探討

本系統奠基于平行光照明、掃描迅速，且具有完整反射光譜觀測功能等特性上，非常適宜結合背焦面影像的觀測技術，作為新穎材料表面特性的量測工具。至此，本系統已具備高光譜掃描所必需的硬體架構與軟體功能，原則上僅需將原系統線光譜儀入射狹縫上的顯微影像，改換為樣品的背焦面影像，即具備背焦面影像的高光譜量測能力。不過這樣的光學系統置換，實際上仍要面對許多問題，本研究中用於背焦面影像的光學系統，如圖31所示，其與原先在節3.3中設想者，有以下不同之處：首先，由於原本的雙光源雙成像顯微影像系統，已將光學載板的空

間大致用盡，我們希望能在不影響原系統的情形下先對背焦面影像的成像進行研究，因此未將原系統進行升級，而是另組一部具有基礎觀測能力的顯微影像系統來使用。另外，原先設想背焦面影像系統能在背焦面影像與實域影像的觀測之間進行切換，但在系統開發的過程中，我們發現在系統上以另一部相機同時觀測實域影像，以方便使用者對找尋欲觀測的樣品特徵，比背焦面/實域影像的切換功能較為實用，因此背焦面影像的觀測系統，採用了與顯微影像觀測系統類似的雙成像架構，在圖31中可以看到，兩部相機搭配不同焦距的成像鏡與成像位置，經過數次調整後，可以同時分別觀察實域影像與背焦面影像。

為了方便對成像鏡與成像位置進行調整，我們以一部小巧的彩色 CCD 相機取代龐雜的線光譜儀 +iXon 影像系統，透過彩色 CCD 在可見光範圍附近的基礎光譜解析能力，先對背焦面影像進行初步的研究。圖32呈現出 300 grating 在 LED 白光照明、40 倍顯微物鏡下，於本系統所觀測到的背焦面影像，同時在系統上的另一部相機，則可以觀測到如圖33的 grating 實域影像。關於 grating 的背焦面影像，則能以圖34來相互瞭解比較。grating 在白光照射下，會將同樣波長的光線以同樣的角度反射；而背焦面影像的主要性質，則是會將物鏡前同樣角度的入射光線，成像於同樣的位置（見節1），因此，在 grating 的背焦面影像上，同樣波長的光線應會被成像於背焦面影像影像的同樣位置。圖34與32中皆可看見不同顏色（不同波長）的光線被成像在不同位置，而產生類似彩虹一般的顏色分布。透過兩圖之間的比較，也可以看見，由於不同波長的光線經 500 grating 反射後散開的角度會比 300 grating 來的更開，因此圖34上不同顏色的位置分布區隔更明顯。另外，500 grating 的各階干涉之間的距離也理應會比 300 grating 來的更遙遠，也可以透過兩圖的比較來驗證，圖32中 300 grating 的各階干涉非常接近，導致有明顯的重疊。

透過上述的初步研究，已印證該光學系統具有基礎的背焦面影像觀測能力，若能將彩色 CCD 換回線光譜儀 +iXon 的影像系統，即能實線背焦面影像的高光譜影像量測，不過由於影像系統的轉移勢必牽涉大量參數的重新校正，且背焦面影像的線掃描尚有其他問題須待解決，礙於研究時間的限制，背焦面高光譜影像系統的整合須待由後續的研究者繼續開發，下章則會簡述該技術尚需克服的挑戰。

5 未來展望

References

- [1] Gary A Roth et al. "Hyperspectral microscopy as an analytical tool for nanomaterials". In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 7.4 (2015), pp. 565–579.

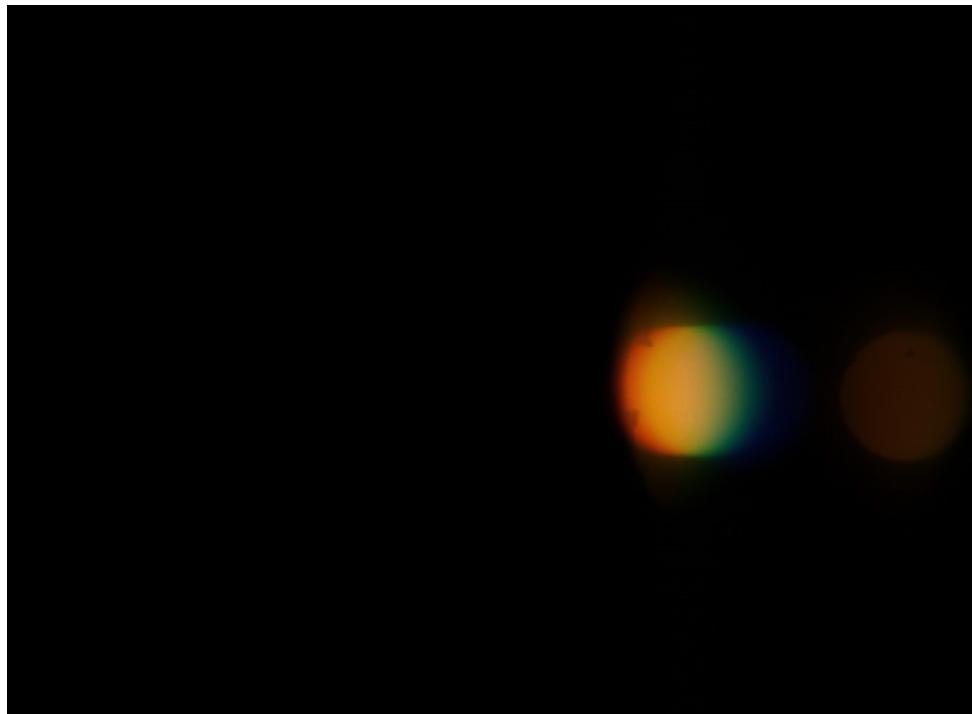


圖 32: BFP of 300 grating

- [2] Delong Zhang et al. “Quantitative vibrational imaging by hyperspectral stimulated Raman scattering microscopy and multivariate curve resolution analysis”. In: *Analytical chemistry* 85.1 (2013), pp. 98–106.
- [3] Adrian F Pegoraro et al. “Hyperspectral multimodal CARS microscopy in the fingerprint region”. In: *Journal of biophotonics* 7.1-2 (2014), pp. 49–58.
- [4] Silas J Leavesley et al. “Hyperspectral imaging microscopy for identification and quantitative analysis of fluorescently-labeled cells in highly autofluorescent tissue”. In: *Journal of biophotonics* 5.1 (2012), pp. 67–84.
- [5] Vincent Studer et al. “Compressive fluorescence microscopy for biological and hyperspectral imaging”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.26 (2012), E1679–E1687.
- [6] Dimitris Manolakis and Gary Shaw. “Detection algorithms for hyperspectral imaging applications”. In: *IEEE signal processing magazine* 19.1 (2002), pp. 29–43.
- [7] José MP Nascimento and José MB Dias. “Vertex component analysis: A fast algorithm to unmix hyperspectral data”. In: *IEEE transactions on signal processing* 53.7 (2005), pp. 2535–2547.

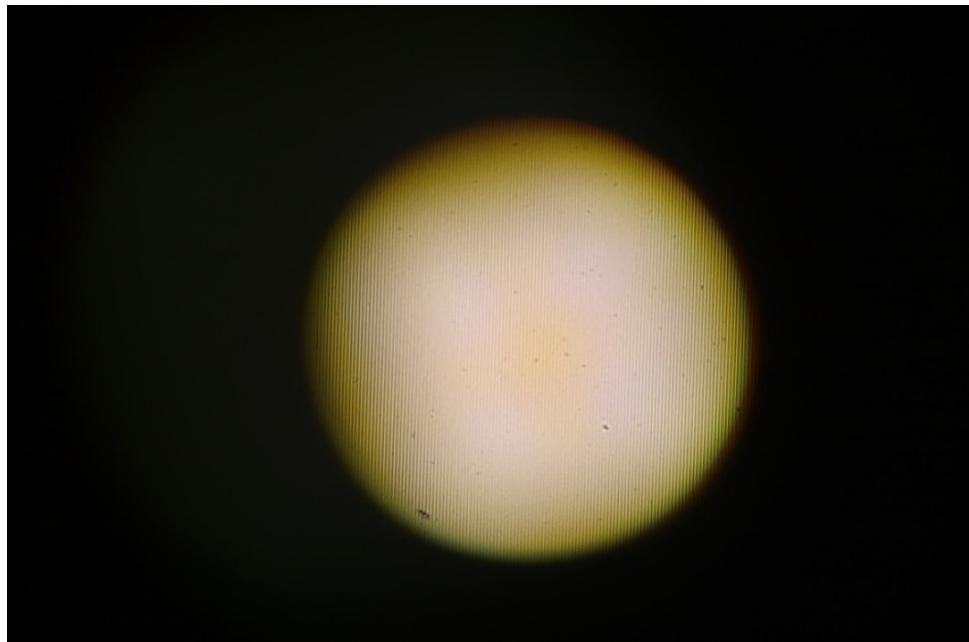


圖 33: Real space image of 300 grating

actions on Geoscience and Remote Sensing 43.4 (2005), pp. 898–910.

- [8] Dimitris Manolakis et al. “Is there a best hyperspectral detection algorithm?” In: *Algorithms and technologies for multispectral, hyperspectral, and ultraspectral imagery XV*. Vol. 7334. International Society for Optics and Photonics. 2009, p. 733402.
- [9] Yushi Chen et al. “Deep learning-based classification of hyperspectral data”. In: *IEEE Journal of Selected topics in applied earth observations and remote sensing* 7.6 (2014), pp. 2094–2107.
- [10] Ian Kenyon. *The light fantastic: a modern introduction to classical and quantum optics*. Oxford University Press, 2008.
- [11] Deepak K. Sharma darsh B. Vasista and G V Pavan Kumar. “Fourier plane optical microscopy and spectroscopy”. In: *Wiley-VCH Encyclopedia of Applied Physics* (2003).
- [12] Nicolai Hartmann et al. “Radiation channels close to a plasmonic nanowire visualized by back focal plane imaging”. In: *ACS nano* 7.11 (2013), pp. 10257–10262.
- [13] Douguo Zhang et al. “Back focal plane imaging of directional emission from dye molecules coupled to one-dimensional photonic crystals”. In: *Nanotechnology* 25.14 (2014), p. 145202.

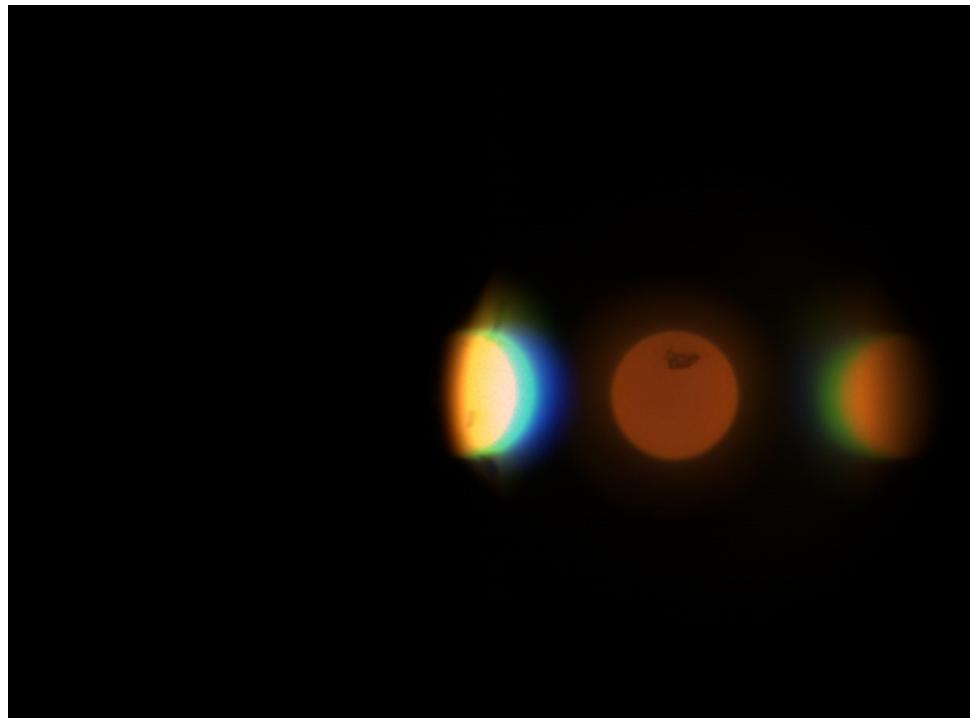


圖 34: BFP of 500 grating

- [14] Rebecca Wagner et al. “Back focal plane imaging spectroscopy of photonic crystals”. In: *Applied Physics Letters* 101.8 (2012), p. 081904.
- [15] Mark P Davidson. *Interferometric back focal plane scatterometry with Koehler illumination*. US Patent 7,061,623. June 2006.
- [16] Gilbert D Feke et al. “Interferometric back focal plane microelipsometry”. In: *Applied Optics* 37.10 (1998), pp. 1796–1802.
- [17] Liang Gao et al. “Snapshot image mapping spectrometer (IMS) with high sampling density for hyperspectral microscopy”. In: *Optics express* 18.14 (2010), pp. 14330–14344.
- [18] SPECTRAL IMAGING LTD. SPECIM. “User Manual of Specim Hyperspectral Spectrograph”. In: (2021).
- [19] Andor Technology Plc. “EMCCD readout sequence”. In: *Andor iXon Users Guide Appendix* (2007), p. 155.