

文章编号 1004-924X(2007)02-0212-07

PMMA 微流控芯片微通道尺寸的检测

文伟力¹, 左春桢¹, 于建群², 张学军¹, 刘庆民¹, 陈向伟¹, 刘 岩¹

(1. 吉林大学 机械科学与工程学院, 吉林 长春 130022;

2. 吉林大学 生物与农业工程学院, 吉林 长春 130022)

摘要:研究了一种基于光电耦合器件(CCD)及图像处理技术的聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)微流控芯片微通道几何尺寸的测量系统,论述了该系统的关键技术及其实现方法,包括图像的预处理、二值化、轮廓提取以及微通道尺寸的测量等。利用该系统测量的微通道几何尺寸(1~1 000 μm)与轮廓仪和万能工具显微镜的测量结果吻合很好,最大测量误差为 2 μm (半深宽度),分析了测量误差产生的原因。检测实验结果表明:该检测方法提供的微通道几何尺寸评定正确可行、通用性好、应用简便,还可以避免轮廓仪在深结构测量中的误差。

关键词:微流控芯片;微细加工;CCD 图像检测;尺寸测量;图像处理,二次标定

中图分类号:TP391.4;TB92 **文献标识码:**A

Measurement of microchannels of PMMA microfluidic chip

WEN Wei-li¹, ZUO Chun-cheng¹, YU Jian-qun²,
ZHANG Xue-jun¹, LIU Qing-min¹, CHEN Xiang-wei¹, LIU Yan¹

(1. College of Mechanical Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China;

2. School of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: Based on CCD-image and image processing technology, a measuring system for microchannels sizes was developed. The non-contact measuring method for geometrical sizes was presented by means of the digital image manipulation technology, including image preprocessing, image binary-conversion, boundary encoding and calculation of microchannel's geometrical sizes, etc. The measured results show that the maximum measuring error by proposed method is 2 μm , which accords with the results measured by a stylus profiler and a universal measuring microscope. The reasons to cause the error were analyzed, results indicate that this method is correct, feasible, simple to use, and can avoid the errors often made by stylus in deeper structures.

Key words: microfluidic chip; microfabrication; CCD image detection; size measurement; image processing; secondary calibration

收稿日期:2006-03-02;修订日期:2006-12-11.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 10572053);高等学校博士学科点专项基金(No. 20040183057);吉林省科技发展计划资助项目(No. 20020610)

1 引言

当前,微流控芯片已成为微全分析系统(μ -TAS)和芯片实验室(Lab on a Chip)的发展重点和前沿技术^[1,2]。但相应也出现了许多亟待解决的问题,其中一个很重要的方面就是芯片微通道质量的评定问题。由于微通道质量(如微通道的截面形状、尺寸精度、表面粗糙度等)对样品进样、分离、芯片散热等均有重要的影响^[3-6],而目前常用测量微流控芯片微通道的设备多为触针式轮廓仪,轮廓仪测针的针尖角度和针尖圆弧半径会对测量精度产生影响,对不规则的微小通道尺寸测量结果有时会有存在误差。采用触针式轮廓仪测量微流控芯片微通道,测针通常可以完全抵达微通道底部,故深度尺寸测量较准确,但在宽度方向上,依微通道深度及侧壁夹角不同,可能产生测针与微通道侧壁干涉。由轮廓仪测得的轮廓并不总是能反映出真实的微通道截面形状和尺寸。而且,当被测件质地较软时,也会发生不同程度的变形(如测量PDMS基质微流控芯片)。此外,轮廓仪的价格较昂贵,现阶段其通用性在普通实验室还受到一定的限制。

基于计算机视觉的图像测量是近年来在测量领域中发展起来的崭新技术。以 CCD 为图像传感器的测量方法具有非接触、检测速度快、动态范围大、信息量丰富等诸多优点,而且还便于与计算机连接,使得采集到的图像处理起来非常容易,特别适合于小尺寸、薄壁件、易碎件及弹性柔软件的测量,从而使 CCD 在非接触检测方面得到了广泛的应用^[7-11]。

本文研究了一种以 CCD 作为图像传感器,检测 PMMA 微流控芯片微通道尺寸及形状的测量系统,给出了利用该系统进行非接触式尺寸测量的方法。

2 PMMA 芯片测量样品制备

芯片材料选用商品有机玻璃片(PMMA),厚度 2 mm。采用温压可控压机模压芯片微通道,具体工艺过程详见文献[12]。图 1 所示为模压成型后的 PMMA 微流控芯片基片及其微通道。

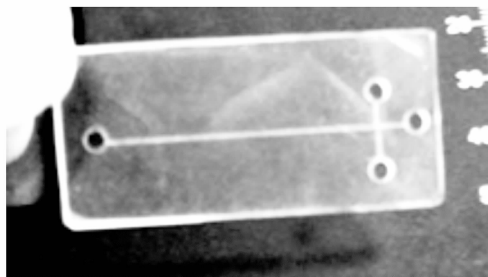


图 1 模压成型后的 PMMA 芯片基片
Fig. 1 Substrate of PMMA microchip made by hot embossing

在 PMMA 芯片上的待检测点处沿微通道长度方向,切下 2 mm 厚的样品进行检测,以得到该点截面微通道的截面轮廓。切割样品时,应保持切割面与芯片平面垂直以防止截面变形,及便于在显微镜下得到焦距一致、清晰真实的微通道截面图像。切割后的样品水平放置在显微镜的载物台上进行图像采集处理。

3 测量系统组成及测量原理

3.1 测量系统组成

测量系统由光学照明系统、CCD 摄像头(SEIKO)、荧光生物显微镜(XSZ-HS7,重庆光电仪器有限公司)、图像采集卡(DH-CG300 daheng-image Technologies, Beijing)、计算机及相应图像处理软件组成,如图 2 所示。其中图像处理软件是在 WindowXP 环境下,用标准 C++ 语言编写而成,包括图像预处理、二值化、轮廓提取及微通道尺寸测量等功能。

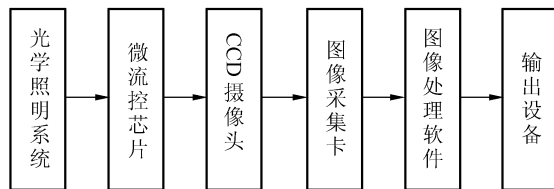


图 2 测量系统组成框图
Fig. 2 Diagram of measuring system

3.2 测量过程

PMMA 样品放置在载玻片上,然后置于显微镜 x - y 载物平台上,利用卤灯发出的透射光线使被测样品产生阴影轮廓,经透镜系统聚焦后成像

于 CCD 上,通过图像采集卡存入计算机内存,利用自编制的图像处理软件对所采集到的图像进行处理和计算。测量过程如图 3 所示。

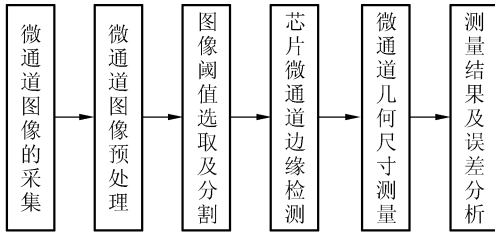


图 3 测量系统流程图

Fig. 3 Process of measuring system

3.3 图像预处理

为了得到芯片微通道轮廓和尺寸,首先应对 CCD 采集的微通道图像进行预处理。图 4(a)为 CCD 采集的微通道截面原始灰度图像,它是 BMP 格式的 256 灰度级图像。为了减弱图像在采集、传输和恢复等过程中引入的噪声污染,需对图像进行降噪预处理。由于本系统采集的图像其微通道和背景的亮度各自均匀且单一、对比度较大,故本系统采用中值滤波进行降噪处理,实验表明该方法可达到很好的效果,图 4(b)为预处理后的图像。

3.4 图像的二值化

降噪后的芯片截面图像包括微通道和背景,为了将微通道分离出来,还需要对图像进行分割。对灰度图像通常实施两类分割,一类是阈值法,另一类是梯度法。在图 4(b)中,由于图像相对简单,且微通道与背景之间对比度较大,具有较均匀单一的灰度,故采用基于阈值的灰度直方图进行二值化分割处理。设图像 f 的灰度值范围为 $[a, b]$,二值化阈值取 $T(a \leq T \leq b)$,二值化处理可用下式表示:

$$f_g(x, y) = \begin{cases} 1 & f(x, y) \geq T \\ 0 & f(x, y) < T \end{cases}, \quad (1)$$

式中 f_g 是二值图像。阈值化是输入图像 f 到输出图像 f_g 的变换,如果像素是微通道上的, $f_g(i, j) = 1$,而处于背景上的像素,其 $f_g(i, j) = 0$ 。图 4(c)为分割处理后灰度直方图,采用迭代阈值分割算法确定的阈值为 $T = 135$,图 4(d)为二值图像。对图 4(d)进行轮廓提取,并对轮廓进行跟踪和细化处理,得到单像素宽度的宏观几何图形,即

微通道轮廓如图 4(e)所示。

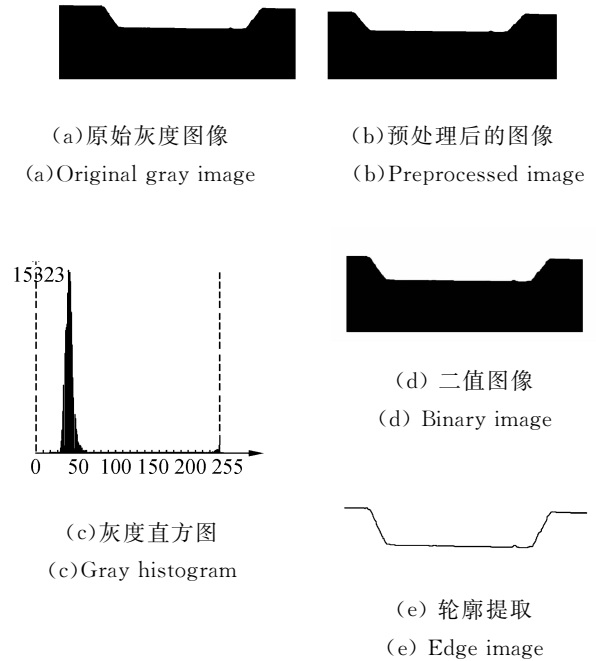


图 4 图像预处理及二值化

Fig. 4 Image preprocessing and binary conversion

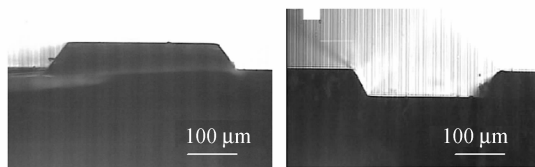
3.5 几何尺寸测量

对 CCD 图像进行上述处理后,获得的是微通道表面轮廓上离散的像素点坐标。为了从目标图像计算其实际尺寸,要对测量系统进行标定,即通过对标准量块的测量实验确立物像之间的尺寸比例关系。标定的具体方法是:在图像测量系统的工作距离(焦距),对已知尺寸为 W 的标准量块成像,由该量块成像所占有的 CCD 像素个数 N 算得每个像素对应的标定系数 $k = W/N$,也就是一个像素所对应的实际尺寸,然后采用空间距法进行亚像素级精确标定。完成标定后,图形上两点间的距离则可以通过标定值乘以像素个数来得到。

本文采用万能工具显微镜测量标准量块的尺寸,其中显微镜的分辨率 $1 \mu\text{m}$,由此得到像素标定系数 k 为 $0.788 \mu\text{m}$,其在 x 和 y 方向的相对偏差为 0.6% 。

图 5(a)给出了由 CCD 采集的硅模板截面图,图 5(b)为由该硅模板模压制作的 PMMA 芯片微通道截面图。图 6 是 УИW-21 型万能工具显微镜(分辨率为 $1 \mu\text{m}$,示值误差 $\pm 1 \mu\text{m}$,测量范围 $100 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$)测量的 PMMA 芯片微通

道截面图,图7是采用轮廓仪(英国 Taloy-4 型触针式电动轮廓仪,针尖半径为 $(2 \pm 0.5) \mu\text{m}$,尖针角度 $90 \pm 10^\circ$)测得的硅模板微凸起和芯片微通道截面轮廓图。



(a) 硅模板

(b) 芯片微通道

(a) silicon template

(b) chip microchannel

图5 荧光显微镜测得的硅模板及芯片微通道截面形状

Fig. 5 Section shape of silicon template and chip microchannel measured by microscope

将图4(e)所示的轮廓缩放到和图7(b)在 x 和 y 方向相同的比例尺寸,结果如图8所示。实验结果表明,轮廓仪测量所得截面形状与图像处理所得结果基本一致,但轮廓仪所测微通道在拐角处的轮廓存在变形失真,底部宽度偏小。相比之下,采用图像处理方法测量较轮廓仪更接近工具显微镜的测量结果。



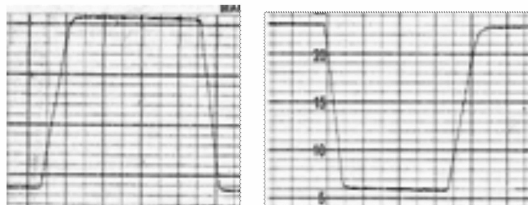
图6 工具显微镜测量的微通道轮廓

Fig. 6 Profile of microchannel measured by UMM

几何尺寸测量包括微通道的顶宽、底宽、深度、半深宽度和芯片(或模板的)微通道的侧边底角夹角。本实验依据提取的边缘选取各段轮廓,自编程序将各线段上的像素拟合成直线和圆弧。微通道顶宽和底宽分别为直线交点间的距离,通道深度由上底和下底两直线间距离求出。芯片微通道的侧边底角由两直线间的夹角公式求出。表1为分别利用轮廓仪、万能工具显微镜和 CCD 图像处理技术对 50 个样本进行几何尺寸和形状测量的实验结果,表中测量结果为 50 个样本的平

均值。

由表1可知,在典型的芯片尺寸范围内,测量的相对标准误差在 5% 以内,与轮廓仪和万能工具显微镜进行了对比测量,测量结果吻合很好。尺寸最大测量误差为 $2 \mu\text{m}$ (半深宽度)。



(a) 硅模板

(b) 芯片

(a) silicon template

(b) chip microchannel

图7 采用轮廓仪测得的硅模板微凸起和芯片微通道截面轮廓

Fig. 7 Section shape of silicon template and chip microchannel measured by stylus profiler



图8 轮廓提取后的放大图

Fig. 8 Magnified edge image

测量实验结果表明,应用图像处理的方法可以快速、简便地进行微流控芯片微通道结构深度、宽度及角度的测量,测量结果满足精度要求,特别是宽度尺寸测量还可以避免用轮廓仪测量宽度时,依被测件结构的形状和轮廓仪的测针半径不同而可能发生的干涉问题。

4 误差分析

分析表1中的测量结果可知,对于微通道深度尺寸测量,图像处理方法和轮廓仪测量结果基本相同(相差 $0.2 \mu\text{m}$),接近或等于 $68 \mu\text{m}$;对于微通道顶部宽度测量,两者测量结果接近,精度为 $\pm 1 \mu\text{m}$,这是由于对于微通道顶部测量,轮廓仪测针没有与管道侧壁发生干涉;对于微通道底部

宽度测量,由于轮廓仪测针半径与微通道侧壁的干涉,图像处理方法测量精度高于轮廓仪测量结果,轮廓仪测量误差为 $-3\ \mu\text{m}$,而图像处理方法测量误差为 $0.8\ \mu\text{m}$;对于半深宽度,由于芯片样本截面图像的投影关系,图像处理方法测量的误差大于轮廓仪测量结果。因此,为减小误差,提高测量精度,本文采取了如下的误差应对措施:

在制备测量样本时,切割面与芯片平面应尽可能保持垂直,否则在对样本进行采集时就会因投影关系而发生轮廓的变形,造成尺寸失真。为减小因切割截面对微通道形状造成的影响,切割面选在芯片没有微通道的一面,切入适当深度后,沿切割线折断芯片即可,这样得到的断面平整,易于处理。

表 1 微流控芯片微通道的几何尺寸测量结果

Tab.1 Results of microchannel's size

尺寸名称	图像处理		轮廓仪		万能工具显微镜		偏差 μm	
	测量结果 μm	RSD% $n=50$	测量结果 μm	RSD% $n=50$	测量结果 μm	RSD% $n=50$	图像 处理	轮廓仪
顶宽	350	2.8	348	4.8	349	3.2	1	-1
底宽	479.8	4.2	476	6.4	479	4.4	0.8	-3
深度	68	1.2	67.8	1.4	68	1.4	0	-0.2
半深宽度	410	2.1	408	4.4	408	2.6	2	0
底角	80°	1.6						

由镜头形状引起的径向畸变误差的数学模型可用公式(3)描述。

$$\begin{cases} \delta_{xr} = x(n_1 r^2 + n_2 r^4 + n_3 r^6 + \dots) \\ \delta_{yr} = y(n_1 r^2 + n_2 r^4 + n_3 r^6 + \dots), \end{cases} \quad (3)$$

其中 $r^2 = x^2 + y^2$, n_1, n_2, \dots 为径向畸变系数。

由于镜头设计缺陷及加工安装误差所致的薄棱镜畸变可用数学模型公式(4)描述,其中 h_1, h_2, \dots 为薄棱镜畸变系数。

$$\begin{cases} \delta_{xp} = h_1 r^2 + \dots \\ \delta_{yp} = h_2 r^2 + \dots, \end{cases} \quad (4)$$

为减弱非线性畸变误差,本文采用标定实验,使用标准量块作为标定参照物,把标准件的精确尺寸传递给微通道截面图像,同时选用低光学失真率和高度聚焦远心特征及畸变小的光学远心镜头,来对该类误差进行校正。这样就不必标定摄像机的内外参数,只需标定出摄像机的物面分辨率,从而既简化了标定过程,又保证了系统的标定

光学系统的误差往往是多种误差的组合,如透镜像差、感光像元排列误差和透视误差等,提高系统分辨率及采取各种标定方法能有效降低系统误差。当采用普通光学镜头时,光学成像系统产生的图像非线性几何畸变较为显著,对测量精度影响较大。这种非线性畸变通常可分为三种^[13]:切向畸变、径向畸变和薄棱镜畸变。

由于光学系统光心与几何中心不一致造成的切向畸变可用数学模型公式(2)描述,其中 m_1, m_2 为切向畸变系数。

$$\begin{cases} \delta_{xd} = 2m_2 xy + m_1(r^2 + 2x^2) + \dots \\ \delta_{yd} = 2m_1 xy + m_2(r^2 + 2y^2) + \dots, \end{cases} \quad (2)$$

精度和稳定性,使得测量具有很好的精确性和重复性。

图像实质是光电信息,因此图像在成像、数字化和传输等过程中受到各种干扰,如摄像头及视频图像采集的像素抖动等都会形成噪声,有效利用相关滤波可减弱或抑制各种噪声。本文根据系统采集的芯片截面图像上微通道和背景的亮度及对比度,采用中值滤波抑制方法有效减弱了噪声的影响。

软件算法误差主要是二值化图像时阈值的选取误差及差分近似导数时的算子误差,文中采用迭代阈值分割算法来确定选取的阈值。其数学模型为:

$$T_{i+1} = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\sum_{m=0}^{T_i} h_m \cdot m}{\sum_{k=0}^{T_i} h_m} + \frac{\sum_{m=T_i+1}^{L-1} h_m \cdot m}{\sum_{m=T_i+1}^{L-1} h_m} \right\}, \quad (5)$$

式(5)中的 h_m 是灰度为 m 值的像素个数,共有 L

个灰度级。选取图像灰度范围的中值 T_0 作为初始值进行迭代求解,直到 $T_{i+1} = T_i$ 为止,选取结束后的 T_i 即为所求阈值。

标定过程也会引入误差。实验证明,被测物体的实际尺寸 W 和对应的像素个数 N 之间满足下列关系: $W = kN + b$, 其中 b 为测量中的系统误差, k 为比例系数。而且,由于视觉检测系统实质上是对被测物体辐亮度分布的几次卷积过程以及图像边缘点上接收到的来自于物体和背景光的反射特性不一样,从而造成了敏感器件对阶跃边缘的响应信号存在一个由明到暗(或由暗到明)的渐变过程,边缘点的亚像素位置恰好存在于这一过渡阶段,也即图像边缘灰度是连续分布而非阶跃分布,所以采用常规边缘提取方法的定位精度为整像素级,而实际上微通道边缘可能位于像素的任何位置,理论上整像素边缘定位的最大误差为 0.5 个像素。因此,在测量微通道尺寸时,通道边缘间距可能存在一个像素的误差。为了去掉系统误差,提高标定精度,本文采用文献[14,15]的二次标定技术,即先采用量块标准件法,在微通道截面图像的宽度和深度两个方向上分别标定两次来

确定 k 和 b 的值,消除系统误差 b ,得到单像素的标定精度,然后采用空间距算法对微通道边缘特征点进行亚像素级精确标定。通过上述方法,有效降低了标定过程中引入的误差,提高了测量精度。

5 结 论

利用 CCD 图像处理技术、图像采集卡及计算机等组成的测量系统,对 PMMA 微流控芯片微通道进行了非接触测量,测量结果表明微通道的宽度最大误差为 $2 \mu\text{m}$,微通道两直边夹角误差为 2.873° ,微通道深度误差为 $1 \mu\text{m}$,测量相对标准误差在 5% 以内,能够满足微通道尺寸的测量要求。该测量方法操作方便、测量速度快、通用性好、成本低,特别适合聚合物微通道这样的小尺寸、易破坏及弹性柔软件等不宜用接触法进行测量的样品,而且还可以避免用轮廓仪测量时测针与壁的干涉问题,为微流控芯片几何尺寸及形状的非接触测量提供了一种新方法。

参考文献:

- [1] DARWIN R R, DIMITRI L, PIERRE A A, *et al.*. Micro total analysis systems. 1. introduction, theory, and technology[J]. *Anal. Chem.*, 2002,74: 2623-2636.
- [2] TORSTEN V, DIRK J, ANDREAS M. Micro total analysis systems. recent developments[J]. *Anal. Chem.*, 2004,76: 3373-3386.
- [3] XIANG Z, FRED E R. Analysis of channel-geometry effects on separation efficiency in rectangular-capillary electrochromatography columns[J]. *J. Chromatogr. A*, 2000,869: 319-328.
- [4] LUNG M F, RUEY J Y, GWO B L. Analysis of geometry effects on band spreading of microchip electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2002,23: 602-612.
- [5] MAYNES D, WEBB B W. Fully developed electro-osmotic heat transfer in microchannels[J]. *Int. J. Heat Mass Tran.*, 2003,46: 1359-1369.
- [6] WU H Y, CHENG P. Friction factors in smooth trapezoidal silicon microchannels with different aspect ratios[J]. *Int. J. Heat Mass Tran.*, 2003,46: 2519-2525.
- [7] 李佳列,丁国清,颜国正,等.采用 CCD 的非接触测量中提高精度的一种方法[J]. *光学精密工程*, 2002,10(3): 281-284.
LI J L, DING G Q, YAN G ZH, *et al.*. Method for improving precision in noncontact measurement by linear CCD [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2002,10(3): 281-284. (in Chinese)
- [8] 张少军,苟中魁,李庆利,等.利用数字图像处理技术测量直齿圆柱齿轮几何尺寸[J]. *光学精密工程*, 2004,12(6): 619-625.
ZHANG SH J, GOU Z K, LI Q L, *et al.*. Digital image processing technology for spur gear measurement[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2004,12(6): 619-625. (in Chinese)
- [9] 陈岳林,汪杰君,许廷丽.金相组织数字化数据采集系统[J]. *光学精密工程*, 2005,13(增): 183-186.

- CHEN Y L, WANG J J, XU T L. Data collecting system for metallography tissue digitalization[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2005, 13(supp.): 183-186. (in Chinese)
- [10] 张泰石, 李刚, 郑羽, 等. 用线性补偿算法和 CCD 响应补偿来提高频谱 OCT 图像质量[J]. *光学精密工程*, 2006, 14(5): 929-933.
ZHANG T SH, LI G, ZHENG Y, *et al.*. Improvement of spectral domain OCT image quality by linear interpolation and CCD response compensation[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2006, 14(5): 929-933. (in Chinese)
- [11] 赵渊博, 赵慧洁. 挠性接头薄筋厚度在线测量图像分割方法研究[J]. *光学精密工程*, 2005, 13(增): 153-157.
ZHAO Y B, ZHAO H J. Study on image segmentation method for on-line measurement of tendon thickness for flexible connector[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2005, 13(Supp.): 153-157. (in Chinese)
- [12] 于建群, 王立鼎, 刘军山, 等. 塑料电泳芯片微结构模压的试验研究[J]. *机械工程学报*, 2004, 40(11): 93-97.
YU J Q, WANG L D, LIU J SH, *et al.*. Experimental research of hot embossing of microchannels for plastic capillary electrophoresis chips[J]. *Chin. J. Mech. Eng.*, 2004, 40(11): 93-97. (in Chinese)
- [13] 朱铮涛, 黎绍发. 镜头畸变及其校正技术[J]. *光学技术*, 2005, 31(1): 136-141.
ZHU ZH T, LI SH F. Lens distortion and proofreading technology[J]. *Opt. Tech.*, 2005, 31(1): 136-141. (in Chinese)
- [14] LYVERS E P, MITCHELL O R. Subpixel measurements using a moment based edge operator[J]. *IEEE Trans Pattern Anal. Mach. Intell.*, 1989, 11(12): 1293-1309.
- [15] 薛向东, 吴黎明, 邓耀华, 等. IC 晶片关键尺寸标定的新方法研究[J]. *半导体技术*, 2005, 30(12): 35-37.
XUE X D, WU L M, DENG Y H, *et al.*. Study on the new method of CD calibrating for IC wafer[J]. *Semicond. Technol.*, 2005, 30(12): 35-37. (in Chinese)

作者简介: 文伟力(1975—), 男, 河北唐山人, 博士研究生, 主要研究方向为 MEMS 系统设计、制作、仿真及图像处理、模式识别等。E-mail: whpnr@163.com