

# 基于像面数字全息术的中药饮片细胞定量 成像技术研究

王华英<sup>1</sup> 郭中甲<sup>2</sup> 张志会<sup>2</sup> 刘飞飞<sup>2</sup> 廖 微<sup>2</sup> 宋修法<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北工程大学理学院, 河北 邯郸 056038

<sup>2</sup>河北工程大学信息与电气工程学院, 河北 邯郸 056038)

**摘要** 细胞三维定量成像为中药饮片显微鉴别提供了新方法。为了提高数字全息显微成像质量,采用理论分析与实验验证相结合的方法,对球面参考光像面数字全息显微术的记录和再现过程进行了研究,提出了利用标准分辨率测试板对系统放大倍数、物距等参数进行标定的方法;并利用实验结果对两种常见的相位解包裹方法进行了对比。结果表明:球面参考光像面数字全息图不仅具有较高的信息容量,而且再现过程非常简单,还可以在记录过程中实时观察被记录样品的情况,并选择恰当的被记录区域。利用美国空军分辨率测试板的强度再现像就可以对全息成像系统的放大倍数等参数进行精确标定;利用基于横向剪切的最小二乘解包裹方法可以得到具有较大纵深细胞的准确相位;采取边缘识别技术,可以提高细胞再现像显示效果。

**关键词** 数字全息术;像面数字全息术;球面参考光;中药饮片;相位测量

**中图分类号** O438.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201239.0209002

## Image-Plane Digital Holography for Quantitative Imaging of Cells of Chinese Medical Decoction Pieces

Wang Huaying<sup>1</sup> Guo Zhongjia<sup>2</sup> Zhang Zhihui<sup>2</sup> Liu Feifei<sup>2</sup> Liao Wei<sup>2</sup> Song Xiufa<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Science, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China

<sup>2</sup>School of Information & Electronic Engineering, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China)

**Abstract** Quantitative three-dimensional imaging of cells of Chinese medical decoction pieces can provide a new method for microscopic identification of decoction pieces. To improve the digital holographic image quality, the recording and reconstruction processes of image-plane digital micro-hologram recorded with spherical reference light are studied theoretically and experimentally. A method for measuring the recording parameters of the holographic imaging system such as the magnification, object distance by using a standard test target is proposed. The two popular phase-unwrapping methods are compared experimentally. The results show that the image-plane digital micro-holography recorded with spherical reference light is characterized by more information recorded, very easy reconstruction and the real-time observation of the investigated specimen for determining the region correctly. The parameters of the holographic system can be determined accurately by using the reconstructed intensity image of a US Air Force test target. The unwrapped phase with big depth sample can be obtained accurately by using the lateral-shearing-based least square (LSBLS) algorithm. Using the edge reorganization technique the cell image can be better displayed.

**Key words** digital holography; image-plane digital holography; spherical reference light; Chinese medical decoction pieces; phase measurement

**OCIS codes** 090.1995; 120.5050

**收稿日期**: 2011-09-20; **收到修改稿日期**: 2011-11-04

**基金项目**: 国家自然科学基金(61077001 和 61144005)、河北省自然科学基金(F2008000750、F2010001038)和河北省科技支撑计划项目(09277101D)资助课题。

**作者简介**: 王华英(1963—),女,博士,教授,主要从事光学信息处理及数字全息技术等方面的研究。

E-mail: pbxsiyngzi@126.com

# 1 引 言

中医中药是中华民族的瑰宝,其在当今社会中的地位和作用越来越显著。中药包括中药材、中药饮片和中成药三种类型,其中中药饮片是中药材经过加工炮制后用于医疗配方的制品,也是中药制剂和科学研究用的原药,因而是三者之核心。中药饮片来源广泛、品种众多,不同产地的同名中药,其疗效差异很大。由于现行的饮片质量鉴别方法不够完善,使得饮片市场异常混乱,严重影响了中药饮片的疗效及信誉,制约了中医、中药的发展。因此,建立和发展一种科学的、精确可靠的方法对中药饮片质量进行评价已成为我国中药产业亟待解决的问题<sup>[1]</sup>。中药讲究地道性,不同产地的同名中药,其化学成分差异不大,但其所含细胞种类、形态和大小却相差很大<sup>[2]</sup>。中药饮片最可靠、独特的指纹信息是它们各自的细胞组成、形态和大小,因此,对细胞形态和大小进行精确表征是鉴别饮片质量最可靠的方法<sup>[2,3]</sup>。

数字全息术是一种数字化的全场、非接触、高灵敏度干涉成像与测量技术,利用该技术可以同时获得物体定量的强度和相位信息,而相位信息与物体的形貌直接相关。与显微技术相结合的数字全息显微术已经在微结构形貌和形变测量、细胞检测与监测、粒子场表征等方面获得了广泛的应用<sup>[4~9]</sup>。

显微数字全息术最常用的光路是采用平面参考光波的预放大离轴及像面数字全息光路<sup>[10]</sup>。为了消除显微物镜引入的二次相位畸变,本文采用球面参考光波记录的像面数字全息记录光路。该光路还具有以下优点:数值再现过程非常简单,可以在记录过程中随时观察与选择样品被成像的区域。本文首先对球面参考光波像面数字全息的记录和再现过程进行分析,然后给出中药饮片细胞成像的实验结果,并利用实验结果对常见的相位解包裹进行对比研究,最后讨论消除实验中透化液对测量结果影响的方法。

## 2 球面参考光像面数字全息显微术

### 2.1 全息图的记录

图 1 是球面光波作为参考光波的像面数字全息显微记录光路示意图。由 He-Ne 激光器发出的波长为 632.8 nm 的激光经分束器 PBS 后分为两束,一束用来照明样品,并通过显微物镜 MO1 将样品放大,作为物光,另一束经过相同的显微物镜 MO2 后形成球面光波作为参考光。两束光经合束器 BS

合束后发生干涉,记录器件 CMOS 位于 MO1 的像平面,将样品的像面全息图记录下来。实验中所用的 CMOS 具有 1280 pixel × 1024 pixel、像素尺寸 6.7 μm × 6.7 μm、12 bit 灰度级输出,显微物镜放大倍率 40、数值孔径 0.65、焦距为 4.65 mm。为了消除物光路中 MO1 引入的二次相位畸变,精调参考光路中的 MO2 位置,直至两个显微物镜到 BS 前表面的距离相等,且实现离轴记录。

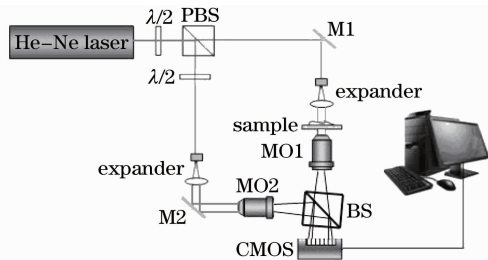


图 1 像面数字全息显微记录光路示意图  
Fig. 1 Schematic of the recording setup of image-plane digital holographic microscopy

为了便于分析,建立如图 2 所示的坐标系,其中  $(x_0, y_0)$ 、 $(x_\phi, y_\phi)$  和  $(x, y)$  平面分别表示物平面、显微物镜平面和 CMOS 平面。 $d_0$  是物体到显微物镜的距离, $d_\phi$  代表 MO 到 CMOS 的距离(即像距),因此, $d_0$ 、 $d_\phi$  满足物像关系  $1/d_0 + 1/d_\phi = 1/f$ 。

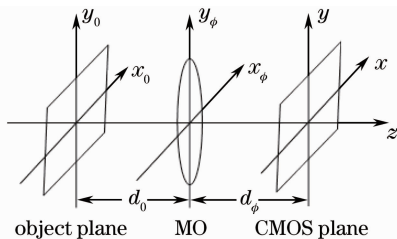


图 2 所采用的坐标系示意图  
Fig. 2 Schematic of the Cartesian coordinate

根据菲涅耳衍射公式,略去常数因子,可推得物平面上任一点  $(x_0, y_0)$  在记录平面上形成的衍射光波复振幅分布为<sup>[11]</sup>

$$O(x, y) = \exp\left[\frac{jk}{2d_\phi}(x^2 + y^2)\right] \times \exp\left[\frac{jk}{2d_0}(x_0^2 + y_0^2)\right] \mathcal{F}\{P(x_\phi, y_\phi)\}, \quad (1)$$

式中  $k = 2\pi/\lambda$ ,  $P(x_\phi, y_\phi)$  为显微物镜的孔径函数,  $\mathcal{F}$  表示二维傅里叶变换,空间频率坐标与空间坐标之间满足关系

$$f_x = \frac{x_0}{\lambda d_0} + \frac{x}{\lambda d_\phi}, \quad f_y = \frac{y_0}{\lambda d_0} + \frac{y}{\lambda d_\phi}. \quad (2)$$

在理想成像情况下,即 MO 孔径为无限大时,(1)式变为<sup>[11]</sup>

$$O(x, y) = \frac{1}{M} \exp\left(-jk \frac{x^2 + y^2}{2Mf}\right) \delta(x - Mx_0, y - My_0), \quad (3)$$

式中  $M = -d_\phi/d_0$  是像的放大倍数。

设参考光路中的平面光波经 MO2 后的会聚点(焦点)的横向坐标为  $(x_r, y_r)$ , 则参考光在全息图平面上的复振幅分布为

$$R(x, y) = \exp\left\{\frac{jk}{2(d_\phi - f)}[(x - x_r)^2 + (y - y_r)^2]\right\}. \quad (4)$$

将物像关系代入上式可以得到

$$R(x, y) = \exp\left\{\frac{-jk}{2Mf}[(x - x_r)^2 + (y - y_r)^2]\right\}. \quad (5)$$

记录平面上的干涉条纹强度分布为

$$H(x, y) = |R(x, y) + O(x, y)|^2 = |R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2 + R^*(x, y)O(x, y) + R(x, y)O^*(x, y). \quad (6)$$

由于  $d_\phi - f = Mf$ , 上式中第三项和第四项中的二次相位因子完全被抵消, 但还存在一次相位因子, 表明全息图中与正、负一级衍射像相应的条纹总体为平行直条纹分布。

## 2.2 数值再现

对于像面数字全息显微来说, 由于 CMOS 记录的是物体放大的像, 全息图记录距离为零, 再现距离也为零, 因此, 利用角谱衍射公式进行数值再现非常方便。根据数字全息原理, 采用准直光作为再现参考光波, 即可得到物体的像。由于再现距离为零, 角谱衍射公式中的传递函数等于 1, 因此, 全息图的分

布就是再现像的强度分布, 但是为了消除零级项和共轭项的干扰, 采用频域滤波的方法将频谱中的物光波提取出来, 再对其进行逆傅里叶变换即可得到所需要的物光波前。则由球面参考光像面数字全息术得到的物光波前为

$$U(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{\{\mathcal{F}[H(x, y)]\}_{\text{Fil}}\}, \quad (7)$$

式中,  $\mathcal{F}, \mathcal{F}^{-1}$  分别表示正、逆傅里叶变换, 角标“Fil”表示频谱滤波。由(7)式得到相应的强度和包裹相位信息分别为

$$I(x, y) = |U(x, y)|^2, \quad (8)$$

$$\phi(x, y) = \arctan\left\{\frac{\text{Im}[U(x, y)]}{\text{Re}[U(x, y)]}\right\}. \quad (9)$$

需要说明的是, 要得到样品的相位分布, 必须对(9)式进行解包裹, 同时还要对离轴记录引入的一次相位畸变进行补偿。此外, 根据角谱再现原理, 再现像平面的采样间隔等于记录器件的像素大小, 但由于像是放大的, 因此, 被测物体的大小需要结合像的放大倍数来确定。

## 3 实验结果及分析

首先对分辨率测试板进行全息记录及再现, 并据此确定像的放大倍率, 结果如图 3 所示。图 3(a) 是挡住参考光直接拍摄分辨率板的强度像, 图 3(b) 是全息图, 图 3(c) 是全息图频谱分布, 图 3(d) 是利用(7)、(8)式得到的强度再现像。根据图 3(d), 由 Matlab 软件计算得到分辨率板上线条所成像的长度为  $233 \times 6.7 \mu\text{m}$ , 而其实际长度为  $39.063 \mu\text{m}$ , 由此计算得到像的放大倍率为 40.0。

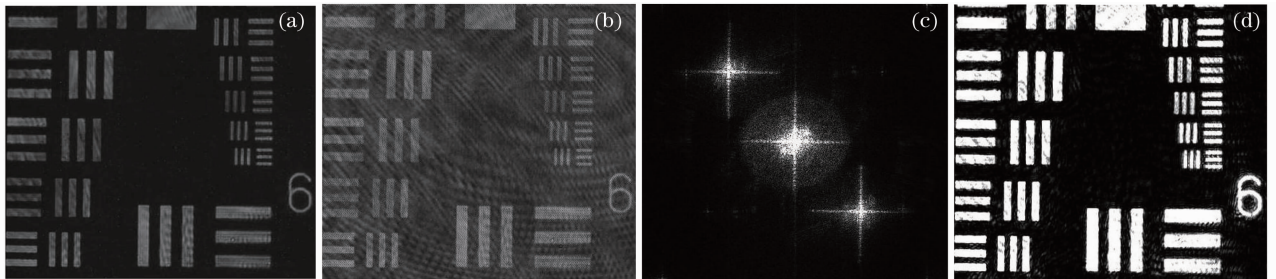


图 3 美国空军分辨率板的实验结果。(a)直接拍摄的强度像;(b)全息图;(c)全息图频谱;(d)强度再现像

Fig. 3 Experimental results of the US Air Force test target. (a) Photo; (b) hologram; (c) spectrum of (b); (d) reconstructed intensity image

在保持光路结构和物距、像距等参数不变的情况下, 对透化处理<sup>[2]</sup>过的海金沙细胞进行全息记录与再现, 结果如图 4、5 所示。图 4(a) 为在相干光照明下拍摄的细胞强度像, 图 4(b) 为记录的全息图, 比较图 4(a), (b) 可见, 二者很接近, 并且全息图的分

对比度也比较高; 图 4(c) 是全息图的频谱分布, 可见, 零级和正、负一级项已经完全分离; 图 4(d) 是根据样品附近的平坦区域拍摄的无样品全息图, 用于相位畸变矫正。



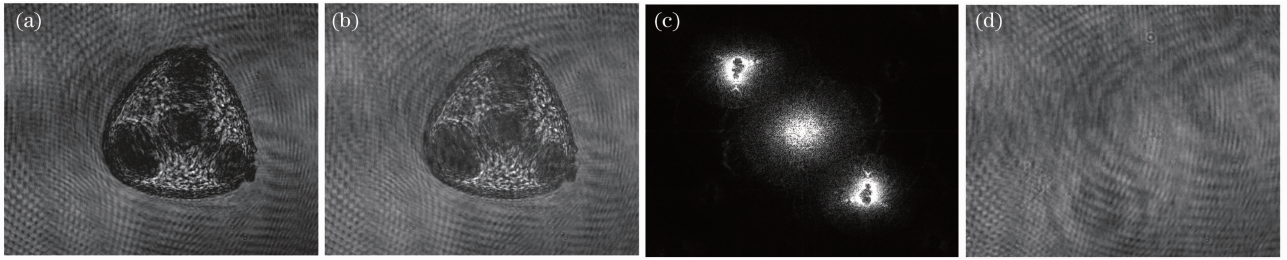


图 4 海金沙细胞的实验结果。(a)直接拍摄的像;(b)全息图;(c)全息图频谱;(d)无样品全息图

Fig. 4 Experimental results of *Lygodium japonicum* cell. (a) Photo; (b) hologram of the cell; (c) spectrum of (b); (d) hologram without cell

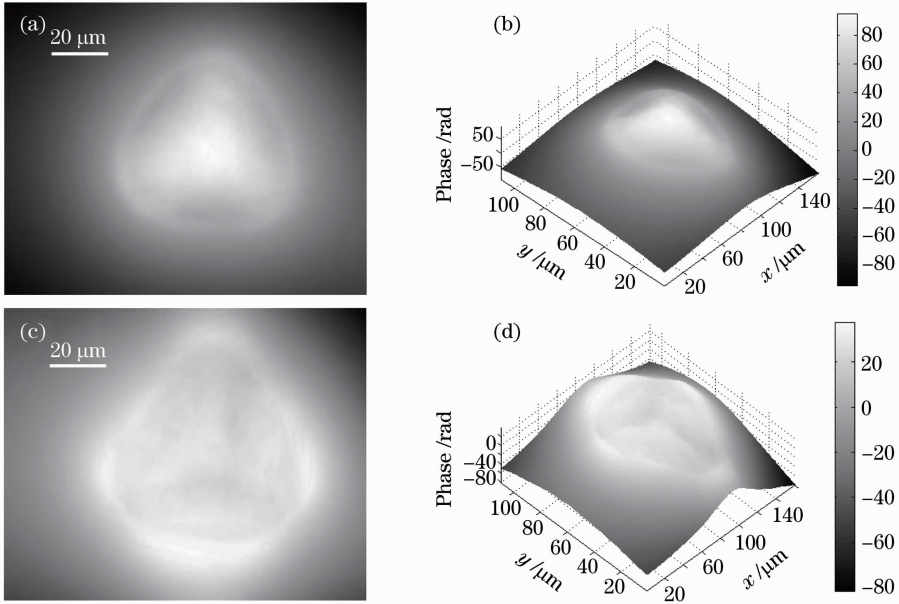


图 5 海金沙细胞相位重建结果。(a)、(b)由横向剪切最小二乘法得到的展开相位的二维和三维分布;

(c)、(d)由离散余弦变换最小二乘法得到的展开相位的二维和三维分布

Fig. 5 Reconstructed phase of *Lygodium japonicum* cell. (a), (b) 2D and 3D unwrapped phase by LSBL algorithm; (c), (d) 2D and 3D unwrapped phase by DCT algorithm

对图 4(c)、(d)分别做频谱滤波后进行数值再现,得到包裹相位图,然后进行相位解包裹,再将得到的展开相位相减,即可获得细胞的相位分布信息,结果如图 5 所示。图 5(a)、(b)是利用横向剪切最小二乘法(LSBL)解包裹得到的二维和三维相位分布<sup>[12,13]</sup>;图 5(c)、(d)是利用基于离散余弦变换(DCT)的最小二乘法得到的二维和三维相位分布<sup>[14,15]</sup>。将图 5(a)、(c)与图 4(a)、(b)进行比较可知,图 5(c)所示结果误差较大,而图 5(a)所示结果与用扫描电镜得到的结果很接近<sup>[3]</sup>,只是分辨率不如后者高。由图 5(a)可得出细胞的直径大小约为  $77\ \mu\text{m}$ 。为了检验相位解包裹的准确性,给出了细胞的原始包裹相位图、原始包裹相位图的余弦分布以及利用横向剪切最小二乘法得到的展开相位的余弦分布,如图 6(a)~(c)所示。由图 6(a)可见,细胞边界处条纹非常密集,并出现了重叠,表明包裹相位

图存在欠采样。比较图 6(b),(c)可知,条纹的整体轮廓是一样的,但在细胞边缘及中心存在较小的差异,这是由于细胞较厚,使得原始包裹相位图存在轻微欠采样以及细胞透化不够彻底而造成的。

从图 5(b)可以获得细胞的形貌,但由于细胞外围存在少量的透化液,影响了细胞的形貌显示效果。为了消除细胞外围液体的影响,提高细胞再现像质量,利用边缘识别技术对图 5(a)所示的图像进行处理,通过改变阈值寻找细胞边缘,然后将细胞外围的像素值设为与细胞边界相同的灰度值,消除了液体的影响,处理后的结果如图 7 所示。

## 4 结 论

利用数字全息显微方法对中药饮片细胞进行定量成像,获得了细胞大小和形貌分布,其结果与用扫描电镜方法得到的结果很相近,表明了该方法的有

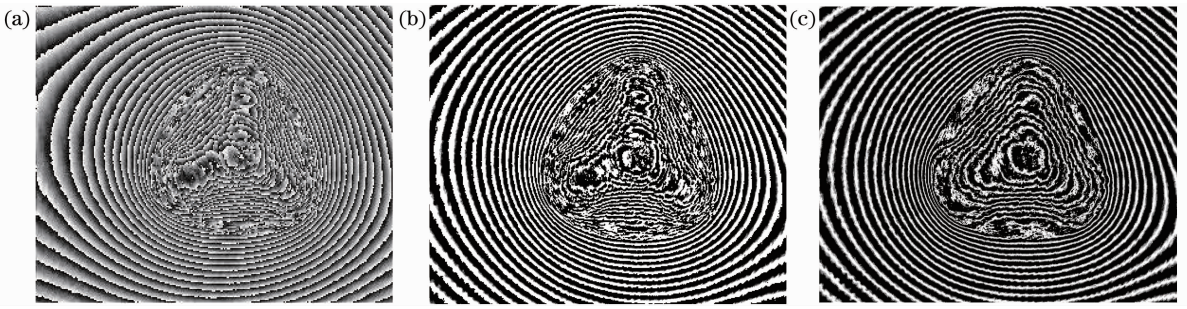


图6 相位及其余弦分布。(a)原始包裹相位;(b)原始包裹相位的余弦;(c)展开相位余弦分布

Fig. 6 Phase and its cosine distributions. (a) Original wrapped phase; (b) cosine of the original wrapped phase; (c) cosine of the unwrapped phase

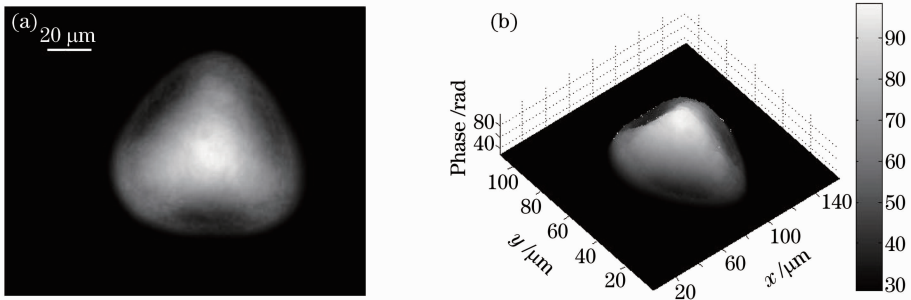


图7 消除细胞外围液体影响后的结果。(a)二维相位分布;(b)三维相位分布

Fig. 7 Results after the outside liquid of the cells eliminated. (a) 2D phase distribution; (b) 3D phase distribution

效性。文中对球面参考光像面数字全息显微术的特点及其记录与再现进行了分析,然后给出了利用标准测试板对系统放大倍率等参数进行标定的方法,并利用两种相位解包裹方法对实验结果进行相位再现和比较,最后给出了消除细胞外围液体对相位测量结果影响的方法。结果表明:球面参考光像面数字全息图不仅具有较高的信息容量,数值再现过程简单,而且还可以在记录过程中实时观察与选择合适的成像区域;利用标准分辨率测试板的强度再现像可以对数字全息显微系统的放大倍率等参量进行准确标定;基于横向剪切干涉的最小二乘算法能够较好地解决欠采样包裹相位图的正确解包裹问题;利用边缘识别方法可消除细胞外围液体对细胞相位显示效果的影响,更便于观察细胞的形貌。

### 参 考 文 献

- 1 Tian Shuzhen, Cai Xiuzhen, Liu Keming. A study on the leaf epidermis and pollen grains of typhaceae by SEM[J]. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2008, **31**(4): 100~107
- 田淑珍,蔡秀珍,刘克明. 广义香蒲科植物的叶表皮及花粉形态特征研究[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2008, **31**(4): 100~107
- 2 Wu Mali, Kong Zengke. Identification of Chinese Herbal Medicine[M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1993. 22~37
- 吴玛俐,孔增科. 中药饮片鉴别[M]. 天津:天津科学技术出版社, 1993. 22~37

- 3 Dai Xiling, Cao Jianguo, Zhu Ruiliang *et al.*. Structure and development of sporoderm of *Lygodium japonicum* (Thunb.) sw. (lygodiaceae)[J]. *Acta Bot. Boreal. Occident. Sin.*, 2009, **29**(7): 1328~1334
- 戴锡玲,曹建国,朱瑞良等. 海金沙孢子壁结构和发育的研究[J]. *西北植物学报*, 2009, **29**(7): 1328~1334
- 4 N. Pandey, B. Hennelly. Quantization noise and its reduction in lensless Fourier digital holography [J]. *Appl. Opt.*, 2011, **50**(7): B58~B70
- 5 Zhong Liyun, Zhang Yimo, Lü Xiaoxu *et al.*. Analysis of the characteristics about digital holography of spherical reference wave[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(9): 1503~1506
- 钟丽云,张以谟,吕晓旭等. 球面参考光波数字全息的一些特点分析及实验[J]. *光学学报*, 2004, **24**(9): 1503~1506
- 6 B. Kemper, G. Von Bally. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection[J]. *Appl. Opt.*, 2008, **47**(4): A52~A61
- 7 Li Junchang, Peng Zujie. Statistic optics discussion on the formula of digital holographic 3D surface profiling measurement [J]. *Measurement*, 2010, **43**(3): 381~384
- 8 Di Jianglei, Zhao Jianlin, Fan Qi *et al.*. Phase correction of wavefront reconstruction in digital holographic microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(1): 56~61
- 邸江磊,赵建林,范琦等. 数字全息显微术中重建物场波前的相位校正[J]. *光学学报*, 2008, **28**(1): 56~61
- 9 Hu Cuiying, Zhong Jingang, Gao Yingjun *et al.*. Selection of filter window and correction of tilt aberration in the phase reconstruction of microscopic digital holography[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(12): 3318~3322
- 胡翠英,钟金钢,高应俊等. 显微数字全息相位重构的窗口选取和倾斜校正[J]. *光学学报*, 2009, **29**(12): 3318~3322
- 10 Yu Fu, Giancarlo Pedrini, Bryan M. Hennelly *et al.*. Dual-wavelength image-plane digital holography for dynamic measurement[J]. *Opt. Lasers Eng.*, 2009, **47**(5): 552~557
- 11 Wang Huaying. Imaging Theory and Experimental Demonstration of

- Digital Holographic Microscopy[D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2008. 67~71
- 王华英. 数字全息显微成像的理论和实验研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2008. 67~71
- 12 Qian Xiaofan, Wang Zhanliang, Hu Te *et al.*. Reconstructing the phase of wavefront using digital hologram and the principle of shearing interferometry[J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(7): 1821~1826
- 钱晓凡, 王占亮, 胡 特 等. 用单幅数字全息和剪切干涉原理重构光场相位[J]. *中国激光*, 2010, **37**(7): 1821~1826
- 13 Zeng Xin, Ding Jianping, Liang Peiyong *et al.*. Wave front reconstruction from shearing interferograms using least square fitting[J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(3): 335~340
- 曾 新, 丁剑平, 梁佩莹 等. 二维剪切干涉波前的最小二乘法重建[J]. *光学学报*, 2005, **25**(3): 335~340
- 14 Fan Qi, Yang Hongru, Li Gaoping *et al.*. Method for phase recovery from a single undersampled wrapped phase map[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(3): 0310002
- 范 琦, 杨鸿儒, 黎高平等. 欠采样包裹相位图的恢复方法[J]. *光学学报*, 2011, **31**(3): 0310002
- 15 Liu Zhiming. Study on the Phase Unwrapping Algorithm in Interferometric Synthetic Aperture Radar[D]. Zhengzhou: The PLA Information Engineering University, 2004. 31~43
- 刘志铭. 干涉合成孔径雷达相位解缠算法研究[D]. 郑州: 中国人民解放军信息工程大学, 2004. 31~43

栏目编辑: 马 沂