

球面参考光像面数字全息显微术及 对中药饮片细胞形貌的表征

刘飞飞¹ 廖微¹ 黄敏² 宋修法³ 于梦杰¹ 王华英³

¹ 河北工程大学信息与电气工程学院, 河北 邯郸 056038

² 河北工程大学机电工程学院, 河北 邯郸 056038; ³ 河北工程大学理学院, 河北 邯郸 056038

摘要 为快速、准确地对中药饮片细胞进行形貌表征,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进行了研究。结果表明,通过适当调整参考光源的位置,球面参考光像面数字全息显微术可以准实时地消除显微物镜引入的二次相位畸变,利用自动相位补偿算法能够快速、有效地消除因参考光偏离光轴带来的一次相位畸变,准确再现样品的相位信息。基于研究结果,利用所建立的球面参考光像面数字全息显微术对中药饮片蒲黄细胞进行定量成像,由相位分布给出了细胞的大小及形貌特征。

关键词 全息术;像面数字全息术;球面参考光;相位测量;相位畸变补偿;中药饮片细胞

中图分类号 O436.1

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP50.020904

Morphological Image of Chinese Herbal Medicine Cell by Digital Image-Plane Holographic Microscopy with Spherical Reference Wave

Liu Feifei¹ Liao Wei¹ Huang Min² Song Xiufa³ Yu Mengjie¹ Wang Huaying³

¹ School of Information Science and Electrical Engineering, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China
² School of Mechanical Engineering and Electrical, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China
³ School of Science, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038, China

Abstract In order to rapidly and accurately measure the size and the shape of Chinese herbal medicine cell, the digital image-plane holographic microscopy (DIPHM) with spherical reference wave is studied theoretically and experimentally. The results show that, through appropriately adjusting the location of the reference light source, DIPHM with spherical reference wave can rapidly and accurately eliminate the quadratic phase aberration introduced by microscope objective. The automatic procedure for aberration compensation can rapidly and efficiently eliminate the aberration brought by the bias of spherical point source in the reference light path in DIPHM, and then accurate phase reconstruction of the sample can be achieved. Based on the above study, the elliptical typhaceae pollen as a kind of Chinese herbal medicine cell is quantitatively imaged using DIPHM. Through the accurate three-dimensional phase distribution, the morphological image and the size of elliptical Typhaceae pollen are obtained.

Key words holography; digital image-plane holography; spherical reference wave; phase measurement; phase-aberration compensation; Chinese herbal medicine cell

OCIS codes 090.1000; 090.5694; 090.1995; 180.6900; 120.3890

收稿日期: 2012-08-03; 收到修改稿日期: 2012-09-24; 网络出版日期: 2013-01-11

基金项目: 国家自然科学基金(61077001, 61144005)、河北省自然科学基金(F2010001038, F2012402028, F2012402051)、河北省科技支撑计划(09277101D)和河北省教育厅科学技术研究重点项目(ZH2011241)资助课题。

作者简介: 刘飞飞(1987—),女,硕士研究生,主要从事数字全息技术及位相测量方面的研究。

E-mail: 929323220@qq.com

导师简介: 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方面的研究。

E-mail: pbxsiyngzi@126.com(通信联系人)

1 引言

中药饮片在我国传统医学及日常生活中有着非常重要的作用,鉴别中药饮片品种的真伪、优劣,对保证医院和医药门市配方的安全和临床治疗的效果,促进中药炮制质量的提高以及中药科学研究用药的正确、可靠性,都有十分重要的意义。而饮片所含细胞种类、形态和大小决定了其质量的优劣。

目前光学显微镜是细胞形态或结构测量中最常用的方法,但此方法对细胞只是定性观测,并且需要对样品进行染色处理,染色时往往会杀死细胞且改变细胞的原始结构,从而无法准确测定出细胞的形貌特征。现阶段能够对细胞进行测定的技术有很多,如电子显微镜、相衬显微镜、荧光显微镜等。电子显微镜虽然能够提供很高的空间分辨率,但对环境要求极高,并对探测样品具有较大损伤;相衬显微镜使用方便并且能够实现“非入侵”式的测量,但是传统的相衬和微分干涉相衬法,在本质上仍然是定性的,无法实现定量或半定量的相衬成像;荧光显微镜需要对样本做荧光激发处理,一般会更改细胞的结构和特性。因此,这些方法均不能理想地测定出细胞的结构及生理状态^[1]。

数字全息显微术是全息技术与光电转换技术、数字计算机技术高度融合的产物,该技术既具有干涉测量的高准确性和高灵敏性,又具有高倍显微镜的高分辨能力,同时还具有定量的三维(3D)成像能力,因此被广泛地应用于各种微结构的测量方面^[2~4]。近年来,像面数字全息显微术(DIPHM)及其在微观结构测量领域的应用备受关注,但大都采用了平面光波作为参考光波^[5,6]。基于球面参考光波记录的全息图具有更高的信息容量^[7],同时由于像面数字全息术具有许多优于其他类型数字全息术的优点^[8~10],因此,本文采用理论与实验验证相结合的方法,对基于球面参考光波的像面数字全息显微术中的记录和再现过程进行深入研究,并利用自动相位补偿方法对相位畸变进行校正,从而对中药饮片细胞形状和大小进行测定。

2 像面数字全息图的记录与数值再现

2.1 全息图记录

球面参考光像面数字全息显微记录光路系统如图1所示。由波长 $\lambda=623.8\text{ nm}$ 、功率 $P=60\text{ mW}$ 的He-Ne激光器发出的细光束经半波片后由偏振分束器(PBS)分成两束,并分别经过扩束准直系统BE1和BE2后转变成平行光,其中从PBS中透射出的光束作为照明物光,反射的光束作为参考光。两个完全相同的显微物镜MO1和MO2分别置于物光路和参考光路中,一个用于放大物体,并使之成像于CCD平面上,另一个则用于形成球面参考光波。实验中需精心调整MO2的位置,使MO1和MO2到分束器(BS)中心的距离相等,以完全消除MO2对物体引入的二次相位畸变。调整BS的方位即可实现全息图的离轴记录。本实验所用CCD的参数为:像素大小 $4.65\text{ }\mu\text{m}\times 4.65\text{ }\mu\text{m}$,像素数 $1392\text{ pixel}\times 1032\text{ pixel}$,16 bit灰度级输出。MO1和MO2参数为:60倍放大倍率、数值孔径0.85、焦距3.23 mm。

图2为像面数字全息显微系统的记录坐标示意图,其中 x_0-y_0 为物平面, $x_\phi-y_\phi$ 为透镜所在平面, $x-y$ 为记录平面,也是透镜的成像平面。物平面到显微物镜的距离以及显微物镜到CCD靶面的距离分别为 d_0 和 d_ϕ ,且满足如下关系式:

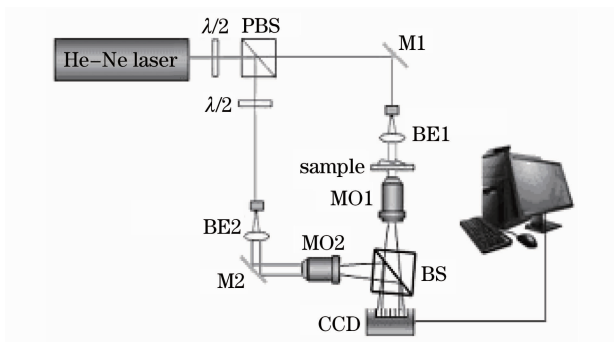


图1 像面数字全息显微实验光路示意图

Fig. 1 Schematic of the experimental setup of DIPHM

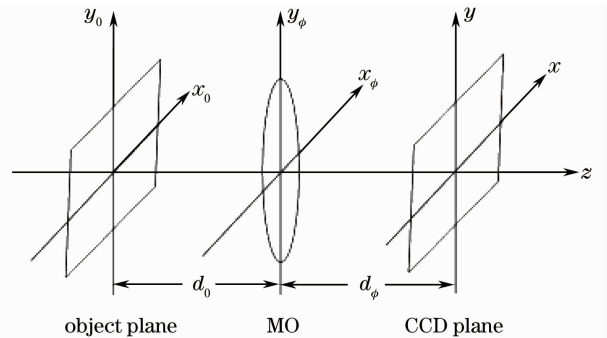


图2 像面数字全息显微系统记录坐标示意图

Fig. 2 Coordinate system schematic for recording digital hologram with DIPHM

$$\frac{1}{d_0} + \frac{1}{d_\phi} = \frac{1}{f}, \quad (1)$$

式中 f 为显微物镜 MO 的焦距。

根据菲涅耳衍射公式,忽略无关紧要的常数相位因子,在不考虑 MO 有限孔径影响的条件下,在 CCD 平面上的物光波复振幅分布为

$$U(x, y) = \exp\left[\frac{jk}{2d_\phi}(x^2 + y^2)\right] \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} O(x_0, y_0) \exp\left[\frac{jk}{2d_0}(x_0^2 + y_0^2)\right] \delta(x + mx_0, y + my_0) dx_0 dy_0 = \\ \exp\left[\frac{jk}{2mf}(x^2 + y^2)\right] \times O\left(-\frac{x}{m}, -\frac{y}{m}\right), \quad (2)$$

式中 $O(x_0, y_0)$ 为物场复振幅透射率, $m = d_\phi/d_0$ 为系统的放大倍数。

同理,参考光波在 CCD 平面的复振幅分布为

$$R(x, y) = \exp\left[\frac{jk}{2(d_\phi - f)}(x - x_r)^2 + (y - y_r)^2\right], \quad (3)$$

式中 x_r, y_r 分别是参考光在 x 方向和 y 方向的偏置量,即平面光波经 MO2 会聚后的焦点坐标。结合(1)式,上式变为

$$R(x, y) = \exp\left\{\frac{jk}{2d_\phi}\left(1 + \frac{d_0}{d_\phi}\right)[(x - x_r)^2 + (y - y_r)^2]\right\}. \quad (4)$$

记录在 CCD 平面上的干涉条纹强度分布为

$$H(x, y) = |R(x, y) + U(x, y)|^2 = |R(x, y)|^2 + |U(x, y)|^2 + R^*(x, y)U(x, y) + R(x, y)U^*(x, y), \quad (5)$$

式中第三项与物体的原始像相关,其中上标 * 代表复共轭运算。为保证(5)式右边 3 个衍射级能够分开,参考光要选择合适的 x_r 和 y_r 。将(2)、(4)式代入(5)式,可得到 CCD 平面实像光场的复振幅分布为

$$u(x, y) = R^*(x, y)U(x, y) = \\ \exp\left\{-\frac{jk}{2d_\phi}\left(1 + \frac{d_0}{d_\phi}\right)[(x - x_r)^2 + (y - y_r)^2]\right\} \exp\left[\frac{jk}{2d_\phi}\left(1 - \frac{1}{m}\right)(x^2 + y^2)\right] O\left(-\frac{x}{m}, -\frac{y}{m}\right) = \\ \exp\left[\frac{jk}{d_\phi}\left(1 + \frac{d_0}{d_\phi}\right)(xx_r + yy_r)\right] O\left(-\frac{x}{m}, -\frac{y}{m}\right). \quad (6)$$

2.2 数值再现

在像面数字全息显微系统中,CCD 位于透镜的成像平面,记录的是物体的像,因此全息图的记录距离和再现距离均为零,再现时光波场无需空间传播而直接在全息图平面处成像,当利用角谱算法再现物光波前时,系统的传递函数为 1。同时,当利用平行于光轴的平面波作为再现光波时,再现光波场的复振幅即为全息图频谱的傅里叶逆变换。为了消除零级衍射项及共轭像的干扰,利用数字滤波技术选取物光波的频谱,然后再经傅里叶逆变换即可得到所需的物光波前分布。因此,在像面数字全息显微术中,由角谱法再现得到物光波前为

$$O(x, y) = \mathcal{F}^{-1}\{\{\mathcal{F}[H(x, y)]\}_{\text{Fil}}\} = \exp\left[\frac{jk}{d_\phi}\left(1 + \frac{d_0}{d_\phi}\right)(xx_r + yy_r)\right] O\left(-\frac{x}{m}, -\frac{y}{m}\right), \quad (7)$$

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

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

$$\varphi(x, y) = \arctan \frac{\text{Im } O(x, y)}{\text{Re } O(x, y)}. \quad (9)$$

可见,在球面参考光像面数字全息中,由物光路中显微物镜引入的二次相位畸变已和参考光路中的显微物镜引入的二次相位畸变相抵消,只剩下由于离轴记录所引入的一次相位畸变,从而降低了相位解包裹及相位畸变补偿的难度^[11]。同时,球面参考光像面数字全息中会聚式的参考光减小了物光和参考光的夹角,充分利用了 CCD 有限的带宽,使得全息图的信息容量比较大。

3 实验结果及分析

3.1 记录光路调节

根据上面的分析,当物光路中不放样品时,由图 1 光路得到的全息图条纹为平行等间距直条纹分布,同时,由数值再现得到的原始像包裹相位也为平行等间距直条纹,可以根据这个特点来精确调节参考光路中的 MO2 位置,确保全息图中由 MO1 引入的二次相位畸变被彻底消除。图 3(a)是不放样品时记录的全息图的部分放大图,图 3(b)是由(7)式和(9)式得到的原始像的包裹相位分布。可见,图中条纹均为直条纹分布,表明记录光路中 MO1 与 MO2 到 BS 中心的距离已调至相等,也就是说 MO1 与 MO2 到 CCD 平面的等效距离相等。

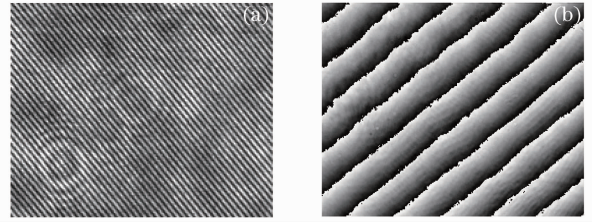


图 3 无样品时全息图及原始像包裹相位图。(a)全息图的部分放大图;(b)包裹相位图

Fig. 3 Hologram and wrapped phase map of the original image without sample. (a) Partially magnified hologram; (b) wrapped phase map

3.2 系统放大倍率标定

为测定中药饮片细胞的形貌及大小,实验中需要精确确定系统的放大倍数,标定样本是一个标准测试板(如 USAF1951 分辨率板)。标定方法如下:在图 1 所示的实验光路中,先遮挡参考光,使分辨率板在 CCD 靶面上清晰成像(清晰成像时粗测物距 $d_0 = 3.19 \text{ mm}$,像距 $d_s = 215.8 \text{ mm}$)。然后记录全息图,并利用数值再现程序得到其强度再现像。最后利用 Matlab 软件中的命令获取某个条纹再现像的长度,其与该条纹的实际长度之比即为再现像的放大倍率。

图 4 为分辨率测试板的实验结果,其中图 4(a)是在没有参考光时显微物镜对分辨率板所成的像,图 4(b)为记录的全息图,图 4(c)为全息图的频谱分布,图 4(d)为分辨率板的再现强度像。由图 4(d)可以看出,该系统能够清楚地分辨 7.6 组条纹,说明该系统分辨率已达到或超过了 $2.19 \mu\text{m}$ 。图 4(d)中用框线标出的部分为分辨率板的第 6.1 组,其条纹长度应为 $569 \text{ pixel} \times 4.65 \mu\text{m}/\text{pixel} = 2645.85 \mu\text{m}$,其实际长度为 $39.0625 \mu\text{m}$,由此得到系统的放大倍数为 $m = 67.7$ 。

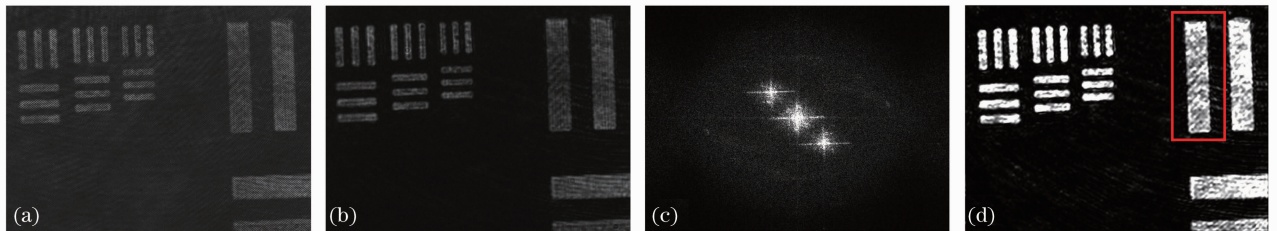


图 4 分辨率测试板的实验结果。(a)直接拍摄的像;(b)全息图;(c)(b)的频谱分布;(d)再现强度像

Fig. 4 Experimental results of the resolution target USAF 1951. (a) Photo; (b) hologram; (c) spectrum of (b); (d) reconstructed intensity image

3.3 细胞形貌测定实验结果

蒲黄是香蒲科植物水烛香蒲的花粉,作为中药饮片细胞的一种,在许多疾病的治疗方面起着非常重要的作用。对于香蒲花粉的研究,国外绝大多数学者都是在光学显微镜条件下进行的,国内只有少数研究人员利用光学显微镜和扫描电镜对国产香蒲科部分种类的花粉进行了研究^[12]。本文利用数字全息显微术对正品蒲黄花粉的形态和大小进行了测定,并对测定的结果做了归类总结。

中药饮片粉末是不透光的,记录前需对样品做透化处理。实验中采用了水合氯醛液装片法^[13],该方法仅使细胞的组织透明化,并没有改变细胞的形态,因此不会影响饮片细胞检测的准确性,但是细胞周围透化液的存在降低了相位畸变矫正的准确性,同时也影响了细胞形貌的显现。对于以上问题,本文所采用的解决办法分别是:将物理补偿法与自动相位补偿法相结合来消除相位畸变,这种补偿方式避免了液体对双曝光法中两次记录环境的变化造成的影响;采用边缘识别技术,由畸变矫正后的二维(2D)和三维相位信息中得到并消除细胞周围透化液的相位,进而得到细胞清晰的三维轮廓分布。

利用上述实验光路对蒲黄细胞进行全息记录。图 5(a)为记录的全息图,图 5(b)是全息图的频谱分布。可见,零级衍射项和正、负一级像距离较近,但并无重叠,这样可以避免欠采样发生。此外,频谱图中除含有正常的 3 个衍射级外,还存在由于液体影响造成的寄生干涉项,它们对称地分布于 3 个衍射级两侧,对此部分频谱利用角谱法数值重建并再现,得到的再现结果并不包含物体的信息。对于这些噪声干扰,可以通过频谱滤波的方法滤除。

提取正一级频谱对其进行相位重建,得到含有一次相位畸变的三维相位分布,如图 5(c)所示。一次相位畸变很容易被消除,本文利用自动相位补偿法进行相位畸变补偿^[11]。图 5(e)、(f)分别是在样品玻璃衬底的平坦区域沿水平和竖直线段上提取的相位数据及其拟合曲线。由拟合系数得到一次相位畸变掩模,从畸变相位中减去掩模相位即可得到样品的真实相位分布,校正后所得到的细胞三维相位分布如图 5(d)所示[由于细胞周围存在厚度不均匀的透化液,呈现出以细胞为中心的类高斯函数的分布,于图 5(c)和(d)中有所显现]。

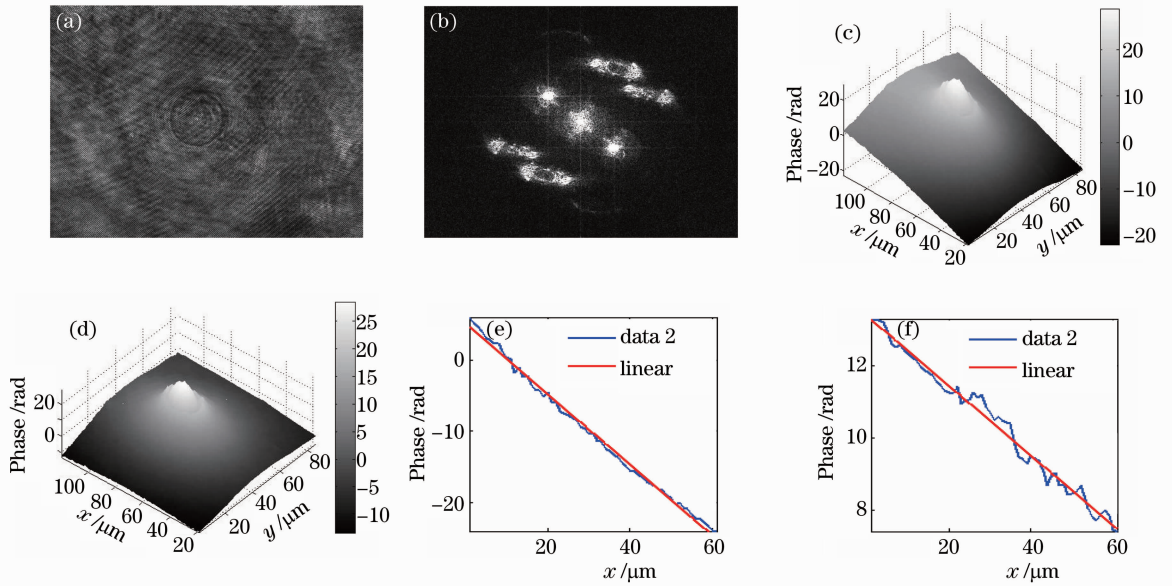


图 5 蒲黄细胞的重建结果。(a) 全息图;(b) (a)的频谱分布;(c),(d)含有畸变和畸变修正的三维相位分布;(e),(f) 水平和竖直方向的相位数据及其拟合曲线

Fig. 5 Reconstructed result of elliptical typhaceae pollen. (a) Hologram; (b) spectrum of (a); (c), (d) 3D phase distribution with and without phase aberration; (e), (f) plot of unwrapped phase data and fitting curves in the horizontal and vertical direction

采用边缘识别技术消除透化液影响后,两种较典型的蒲黄细胞的二维和三维相位分布结果如图 6 所示,处理后结果清晰地呈现了细胞的形态特征。实验中发现蒲黄细胞有多种形态,大多数呈近球状或三角状,细胞的大小在 $20 \mu\text{m}$ 左右。图 6(a)、(b)为近球形细胞的二维和三维相位重建结果,图 6(d)和(e)为三角形细胞的二维和三维相位重建结果。由相位重建结果可以看出蒲黄细胞具有双层结构,而且内外分层明显;图 6(c)和(f)分别为图 6(b)和(e)的中间放大结果,图中框线部分为细胞三维相位分布的局部显示,由图 6(c)的框内部分可以看出:蒲黄细胞表面呈网状,网脊相互连接组成多边形的网眼,网眼形状不一,有长六边形、三角形和长条形等,网脊细而平滑。由图 6(f)的框内部分可见,细胞内外层的分界处轮廓线光滑,多呈锯齿状或凸波状,这与利用扫描电镜得到的结果基本一样^[13],只是分辨率较低。

4 结 论

实验结果表明,采用精心调整的球面参考光像面数字全息显微记录光路,可以有效消除由显微物镜引入的二次相位畸变,降低了相位解包裹及相位畸变补偿的难度;利用自动相位补偿算法可以快速、有效地消除

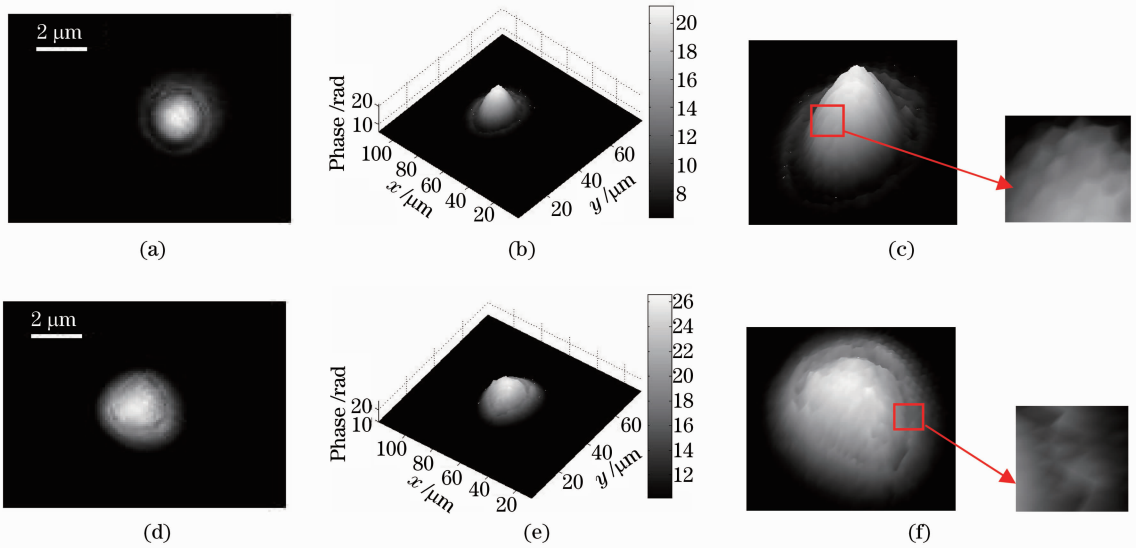


图6 蒲黄细胞的重建结果。(a),(b) 近球形细胞的二维和三维相位分布;(c) (b)的中心区域放大图;
(d),(e) 三角形细胞的二维和三维相位分布;(f) (e)的中心区域放大图

Fig. 6 Reconstructed result of elliptical typhaceae pollen. (a), (b) 2D and 3D phase distributions of nearly spherical pollen;
(c) magnified image of the central area in (b); (d), (e) 2D and 3D phase distributions of triangular pollen;
(f) magnified image of the central area in (e)

离轴记录引入的一次相位畸变;像面数字全息显微术提供了一种快捷、方便的对相位型样品进行成像和测量的手段。利用像面数字全息显微术对蒲黄细胞的形貌进行了测定,所得结果与用扫描电镜结果非常接近。

参 考 文 献

- 1 G. Popescu, Y. K. Park, W. Choi *et al.*. Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy [J]. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2008, **41**(1): 10~16
- 2 Li Junchang, Peng Zujie. Statistic optics discussion on the formula of digital holographic 3D surface profiling measurement [J]. *Measurement*, 2010, **43**(3): 381~384
- 3 L. Miccio, A. Finizio, R. Puglisi *et al.*. Dynamic DIC by digital holography microscopy for enhancing phase-contrast visualization[J]. *Bio. Opt. Express*, 2011, **2**(2): 331~344
- 4 N. Pandey, B. Hennelly. Quantization noise and its reduction in lensless Fourier digital holography[J]. *Appl. Opt.*, 2011, **50**(7): B58~B70
- 5 Ren Jianfeng, Guo Peiji. Design of original structure of illuminating system in off-axis convex aspherical lens testing system with computer-generated hologram[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, **32**(2): 0222005
任建锋, 郭培基. 计算全息法检测离轴凸非球面照明镜组初始结构设计[J]. *光学学报*, 2012, **32**(2): 0222005
- 6 Yang Kun, Liu Zhe, Wang Wensheng. Study on object displacement measure using double-exposure digital image hologram method[J]. *J. Changchun University of Science and Technology*, 2009, **32**(1): 25~27
杨 坤, 刘 喆, 王文生. 数字像面全息双曝光法测量物体位移的研究[J]. *长春理工大学学报*, 2009, **32**(1): 25~27
- 7 Zhao Hong, Hang Xiaodi. A study on morphology of family Typha Juss in northeast China[J]. *J. Shangdong University*, 2004, **34**(4): 81~86
赵 宏, 韩晓弟. 东北香蒲科植物花粉形态[J]. *山东学报*, 2004, **34**(4): 81~86
- 8 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
- 9 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
- 10 Zhong Liyun, Zhang Yimo, Lü Xiaoxu *et al.*. Analysis of the characteristic about the digital holography of the spherical

reference wave[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(9): 1209~1213

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): 1209~1213

11 Tristan Colomb, Etienne Cuche, Florian Charrière *et al.*. Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation[J]. *Appl. Opt.*, 2006, **45**(5): 851~863

12 Tian Shuzhen, Cai Xiuzhen, Liu Keming. A study on the leaf epidermis and pollen grains of Typhaceae I by SEM[J]. *J. Natural Science of Human 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

13 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