

文章编号: 0253-2239(2008)01-0056-06

# 数字全息显微术中重建物场波前的相位校正

邸江磊 赵建林 范琦 姜宏振 孙伟伟

(西北工业大学理学院光信息科学与技术研究所 陕西省光信息技术重点实验室, 陕西 西安 710072)

**摘要** 数字全息显微术克服了传统光学显微术无法直接提取样品相位信息的缺点,可以对活体细胞组织等相位型生物样品进行定量测量和有效观察。但在数字全息显微成像过程中,像场弯曲会对再现像相位分布的测量和观察产生影响。提出一种采用相位相减来校正数字全息再现像像场弯曲的方法。通过在样品加入前后两次拍摄全息图,并对数值重建像分别进行去包裹运算再令其相减,即可实现对像场弯曲的有效校正,对蝉翼和大蒜表皮细胞等相位型物体进行测量,并采用数值校正和相位相减两种方法对像场弯曲进行校正。与现有的数值校正方法相比,利用相位相减获得样品三维相位信息的方法更为简单、可靠,是校正像数字全息再现像场弯曲的有效方法。

**关键词** 全息术; 数字全息显微术; 相位校正; 数值重建; 三维成像

**中图分类号** O438.1 **文献标识码** A

## Phase Correction of Wavefront Reconstruction in Digital Holographic Microscopy

Di Jianglei Zhao Jianlin Fan Qi Jiang Hongzhen Sun Weiwei

(*Institute of Optical Information Science and Technology, Shaanxi Key Laboratory of Optical Information Technology, School of Science, Northwestern Polytechnical University, Xian, Shaanxi 710072, China*)

**Abstract** Compared with traditional optical microscopy, digital holographic microscopy can be used to measure phase information of samples. Therefore it allows quantitative detection and effective observation of transparent biological samples such as living cells. But the field curvature caused by the microscopic imaging in the hologram recording process will affect phase distribution of the reconstructed image. In order to correct the field curvature, a phase-subtraction method is presented. Recording two holograms before and after inserting the sample, unwrapping the numerical reconstructed images of the two holograms solely and subtracting them each other, the corrected phase distribution of the sample image will be obtained. As examples, some cicada wing and epidermal cells of garlic are measured by using digital holographic microscopy and the field curvature is corrected by numerical-correction method and phase-subtraction method, respectively. It is shown that the phase-subtraction method is more credible and convenient to get three-dimensional phase information and more effective to correct the field curvature than current numerical-correction method in digital holographic microscopy.

**Key words** holography; digital holographic microscopy; phase correction; numerical reconstruction; three-dimensional imaging

## 1 引 言

数字全息术利用 CCD 记录全息图,并通过计算机数值重建全息像,可以得到物体的振幅和相位信息,并实现三维物场重构,具有快速、非破坏性、非侵入性、全场等优点<sup>[1]</sup>,广泛应用于形变测量、形貌分

析、显微成像、信息加密以及材料泊松比测定、流场和折射率测量等技术领域<sup>[2~14]</sup>。将数字图像处理技术引入数字全息图的处理过程,可以方便地消除像差、噪声等的影响,改善全息再现像的质量<sup>[15,16]</sup>。数字全息显微术综合了光学显微术和数字全息术的

收稿日期: 2007-05-15; 收到修改稿日期: 2007-07-02

基金项目: 航空科学基金(2006ZD53042)资助课题。

作者简介: 邸江磊(1981—),男,河北石家庄人,博士研究生,主要从事数字全息技术方面的研究。

E-mail: jiangleidi@nwpu.edu.cn

导师简介: 赵建林(1958—),男,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事光信息技术及应用等方面的研究。

E-mail: jlzhao@nwpu.edu.cn

优点,不仅可以对振幅型样品成像,而且无需经过染色处理即可以直接对相位型样品成像,获得其三维相位分布。但是,在显微成像过程中,显微物镜会使再现像发生像场弯曲。对此,Cuche 等<sup>[5]</sup>提出利用单幅全息图对像场弯曲进行校正的数值方法,Ferraro 等<sup>[6]</sup>提出一种类似二次曝光法的像场弯曲校正方法,Miccro 等<sup>[7]</sup>提出利用泽尼克多项式的二维拟合方法以消除数值重建像的像场弯曲。然而,Cuche 的方法需要逐步调整校正参量,难以保证最终实验结果的可靠性,Ferraro 的方法主要针对利用反射式光路测量微机电系统(MEMS)器件,在后续的相位去包裹运算中会引入误差,Miccro 的方法仅适用于很薄的相位型物体。本文以蝉翼和大蒜表皮细胞等相位型样品的测量为例,分析数字全息显微成像过程中像场弯曲对再现像相位分布影响,在此基础上提出利用相位相减方法对像场弯曲进行校正,获得了相应生物组织样品准确的三维相位信息。

## 2 实验光路及原理

### 2.1 实验光路

图 1 所示为针对相位型物体测量的数字全息显微术实验光路。类似于光学全息显微术,激光器发出的细激光束被平面镜  $M_1$  反射后经分束器  $BS_1$  分为两束。一束被平面镜  $M_2$  反射且扩束准直后作为平面参考光波。另一束经扩束准直并被平面镜  $M_3$  反射后照射待测样品。从样品后表面出射的物光波经过显微物镜  $MO_3$  预放大后与参考光波分别通过分光棱镜  $BS_2$  之后相遇,在 CCD 靶面处发生干涉。利用 CCD 采集干涉图样并经模-数(A/D)转化为数字全息图输入到计算机中,由计算机对数字全息图进行数值重建。

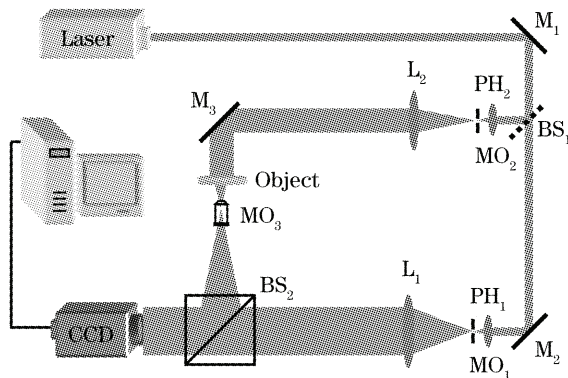


图 1 数字全息显微术实验光路

Fig. 1 Experimental setup for digital holographic microscopy

### 2.2 实验原理

显微全息图的记录过程存在图 2 所示物像关系。物体位于  $x_0y_0$  平面(物平面),经过位于  $x_iy_i$  平面的显微物镜 MO 之后成像于  $\xi\eta$  平面(像平面)。CCD 位于 MO 和像平面之间,与像平面距离为  $d$ 。CCD 所记录的全息图相当于物体经显微物镜所成像场光波与参考光波的干涉图样,设其强度分布为  $I(x,y)$ 。选择原参考光  $R(x,y)$  照明全息图,并利用卷积法对全息图进行数值重建,再现光波场复振幅可表示为

$$U(\xi, \eta) = \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} R(x, y) I(x, y) h_1(\xi, \eta; x, y) dx dy, \quad (1)$$

式中  $h_1(\xi, \eta; x, y)$  为显微全息成像系统的点脉冲响应函数。由此可分别得到再现像的强度和相位分布

$$I(\xi, \eta) = |U(\xi, \eta)|^2, \quad (2)$$

$$\Phi(\xi, \eta) = \arctan\{\text{Im}[U(\xi, \eta)]/\text{Re}[U(\xi, \eta)]\}, \quad (3)$$

由(3)式直接得到的  $\Phi(\xi, \eta)$  为包裹相位,通过去包裹运算可以还原出实际像场光波的相位分布。

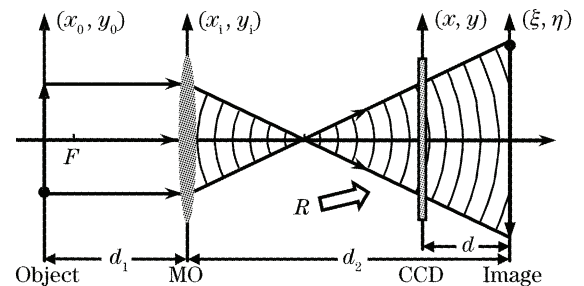


图 2 全息图记录过程中的物像关系

Fig. 2 Relationship between object and image in holographic recording process

### 2.3 像场弯曲的数值校正方法

由图 2 知,像平面光波场  $U(\xi, \eta)$  与物光波场  $O(x_0, y_0)$  之间的关系可表示为

$$U(\xi, \eta) = \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} O(x_0, y_0) h_2(\xi, \eta; x_0, y_0) dx_0 dy_0, \quad (4)$$

对于理想成像系统,式中点扩展函数  $h_2(\xi, \eta; x_0, y_0)$  可表示为<sup>[17]</sup>

$$h_2(\xi, \eta; x_0, y_0) = C \exp\left[\frac{i\pi}{\lambda d_2} \left(1 + \frac{d_1}{d_2}\right) (\xi^2 + \eta^2)\right] \times \delta\left(\xi + \frac{d_2}{d_1} x_0, \eta + \frac{d_2}{d_1} y_0\right), \quad (5)$$

式中  $\lambda$  为波长,  $C$  为系数。因此,像平面上的场分布可以看作是放大后的物光波场与一个二次相位因子的乘积。该二次相位因子的存在使像场发生弯曲,影响所成像的相位分布,但并不影响其强度分布。成像过

程中的像场弯曲可以通过在全息图数值重建过程中引入相位校正因子(即上述二次相位因子的共轭项)

的方法加以校正。由(1)式得到经过校正后的再现光波场复振幅分布为

$$U'(\xi, \eta) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} R(x, y) I(x, y) h_1(\xi, \eta; x, y) \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda d_2} \left(1 + \frac{d_1}{d_2}\right) (\xi^2 + \eta^2)\right] dx dy = \exp\left[-\frac{i\pi}{\lambda d_2} \left(1 + \frac{d_1}{d_2}\right) (\xi^2 + \eta^2)\right] F^{-1}\{F[R(x, y) I(x, y)] \cdot F[h_1(\xi, \eta; x, y)]\}. \quad (6)$$

根据(2)式和(3)式即可以得到原始物光波场的准确强度和相位信息。

#### 2.4 像场弯曲的相位相减校正方法

由于测量得到的物距  $d_1$  和像距  $d_2$  容易产生误差等原因,往往难以得到(6)式中相位校正因子的准确值。Ferraro 等<sup>[6]</sup>针对微机电系统器件的测量,提出一种类似二次曝光法的像场弯曲校正方法,该方法需要分别拍摄样品和在样品位置的参考平面的两幅全息图,并求出相应再现像的复振幅分布  $U_1(\xi, \eta)$  和  $U_2(\xi, \eta)$ ,进而通过两者相除得到含有样品信息的包裹相位分布  $\Phi'(\xi, \eta)$

$$\Phi'(\xi, \eta) = \arg[U_1(\xi, \eta)/U_2(\xi, \eta)]. \quad (7)$$

由于微机电系统器件结构的复杂性以及测量过程的精度要求,难以保证参考平面与样品的位置准确重合。此外,相位去包裹过程要求代表包裹相位的离散矩阵相邻两点之间相位差小于  $2\pi$ ,而(7)式的计算过程中有可能不满足该条件。因此, Ferraro 的方法并不具有普适性。本文针对测量相位型样品的透射式数字全息显微光路提出采用相位相减法以消除像场弯曲,具体过程如图 3。利用图 1 所示光路在加入样品前后两次拍摄全息图,并利用(2)式分别对其进行数值重建及相位去包裹,得到相应的相位分布  $\Phi_1(\xi, \eta)$  和  $\Phi_2(\xi, \eta)$ ,将两者相减即可以获得样品的相位分布  $\Phi(\xi, \eta)$ :

$$\Phi(\xi, \eta) = \Phi_1(\xi, \eta) - \Phi_2(\xi, \eta). \quad (8)$$

可以看出,尽管相位分布  $\Phi_1(\xi, \eta)$  和  $\Phi_2(\xi, \eta)$  中均可能含有系统引入的像场弯曲,但相减的结果完全消除该像场弯曲。此外,该方法中因为首先进行相位去包裹运算,只要所记录的全息图满足采样定理,最终相减结果即为样品的准确相位分布。

### 3 实验结果及讨论

#### 3.1 直接数值再现的实验结果

利用图 1 所示光路对蝉翼进行了实验测量。选择 10 倍显微物镜,数值孔径为 0.25。面阵 CCD 选择 Pulnix 公司 TM1400CL 型,其像元大小为  $4.65 \mu\text{m} \times 4.65 \mu\text{m}$ ,像素数为  $1392 \times 1040$ 。实验中为获得蝉翼准确的在焦数字全息再现像,记录其像面全息图。首先遮挡参考光,直接使蝉翼清晰成像在 CCD 靶面上。蝉翼膜状翅呈透明状,难以观察,特意调整位置使部分蝉翼“骨架”出现于视场中并观察其边缘在 CCD 上成像的清晰程度,以判断蝉翼是否在焦成像。清晰成像时物距和像距分别为  $d_1 = 1.47 \text{ cm}$  和  $d_2 = 16.03 \text{ cm}$ 。其次,加入平行参考光使之与物光发生干涉并记录数字全息图,此时全息图记录距离  $d = 0$ 。蝉翼不同部分的折射率不同,造成照明平行光波前发生改变,使最终再现光波场相位发生起伏,因此,可以利用再现像的相位起伏表征蝉翼本身的结构差异。图 4(a)所示为放大 10 倍的蝉翼光学显微照片。对 CCD 记录的像面全息图利用卷积法进行数值重建,再现像的强度分布如图 4(b)所示。图中白框部分为透明膜状翅上的污染物。直接利用(2)式中卷积法进行数值重建而不作相位校正,对再现像复振幅求反正切得到的相位包裹图如图 4(c)。图中膜状翅污染物所造成的相位扰动清晰可见(白框中部分)。图 4(d)是对图 4(c)进行解包裹运算后所得结果。可以看出,由于成像系统存在像场弯曲,物体本身的相位分布完全湮没在系统场曲所导致的相位隆起中。

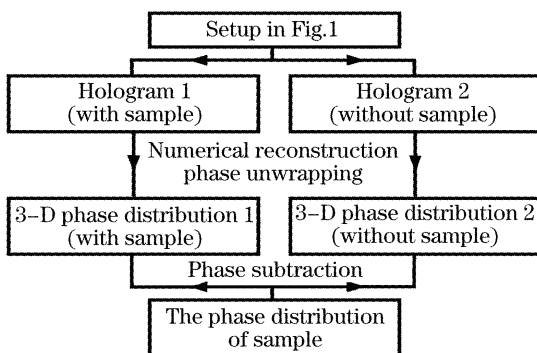


图 3 通过相位相减校正相位分布流程示意图

Fig. 3 Flow chart of phase subtraction method for correcting phase distribution

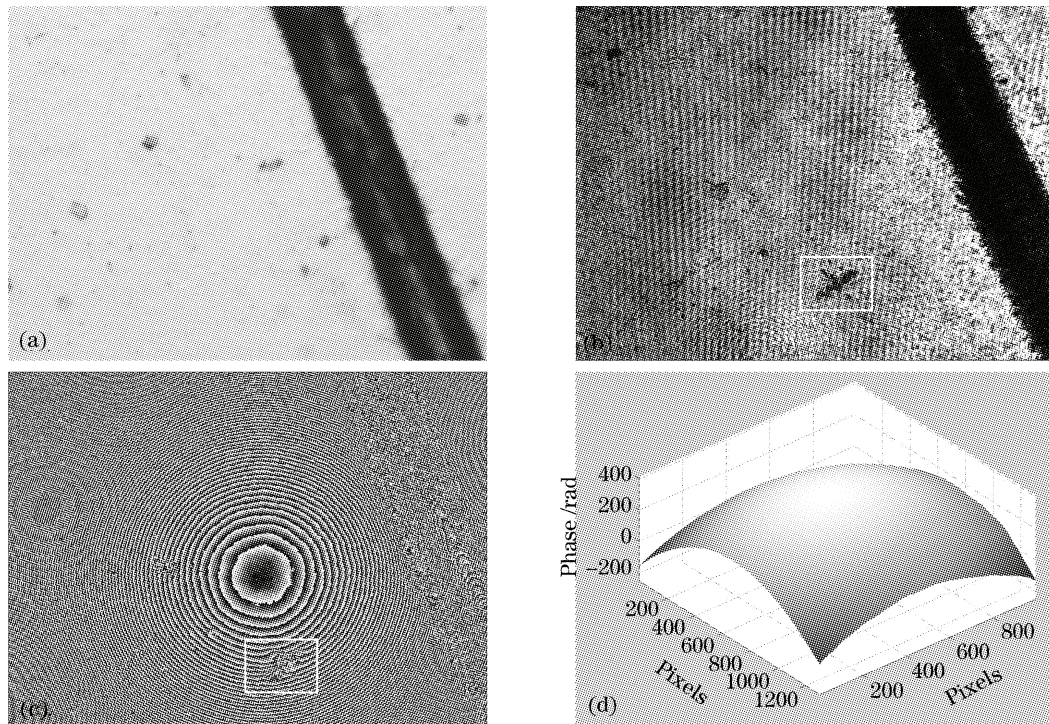


图4 蝉翼的直接数值重建测量结果。(a) 光学显微照片, (b) 再现像的强度分布, (c) 相位包裹图(未作校正), (d) 三维相位分布(未作校正)

Fig. 4 Numerical reconstruction results of cicada wing. (a) Optical microscopic picture, (b) intensity distribution of reconstructed image, (c) Wrapped phase distribution (without phase correction), (d) three-dimensional phase distribution (without phase correction)

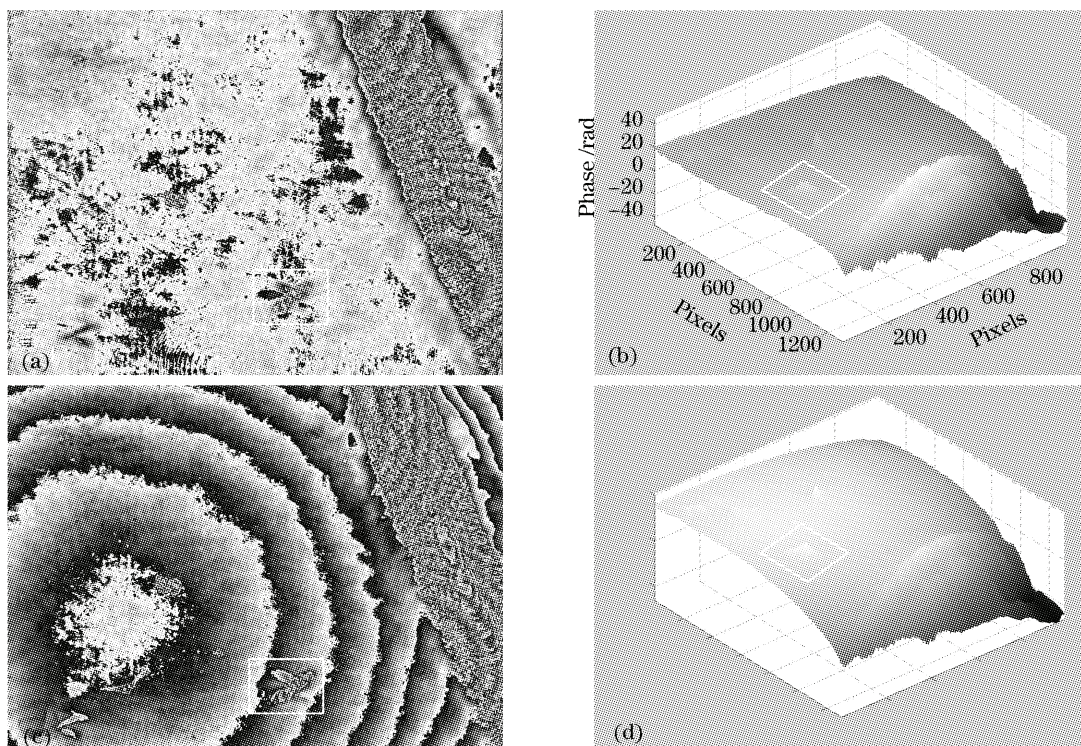


图5 蝉翼的数值校正方法测量结果。(a) 相位包裹图(相位校正参数选择合适), (b) 三维相位分布(相位校正参量选择合适), (c) 相位包裹图(相位校正参数选择不合适), (d) 三维相位分布(相位校正参数选择不合适)

Fig. 5 Measurement results of cicada wing using numerical correction. (a) Wrapped phase distribution (with appropriate parameters), (b) three-dimensional phase distribution (with appropriate parameters), (c) wrapped phase distribution (with inappropriate parameters), (d) three-dimensional phase distribution (with inappropriate parameters)

### 3.2 像场弯曲的数值校正实验结果

利用(5)式对像场弯曲进行校正之后得到再现光波场复振幅,其相位包裹图如图 5(a)所示。图 5(b)是对其进行去包裹运算后的结果。相位校正后,再现像的相位分布范围由图 4(d)中的 600 减小到图 5(b)中的 80,物体自身的相位分布得到了突出,因此可以在图中明显观察到污染物所导致的微小相位起伏(白框中部分)。利用 2.3 节的数值方法校正相位时,由于实验中难以保证物体、CCD 以及显微物镜三者严格同轴,并且很难获得准确的  $d_1$  及  $d_2$  的值,因而全息图数值重建过程中的相位校正因子并不准确,需要反复调整  $d_1$ 、 $d_2$  取值并寻找图 4(c)中的包裹图条纹圆心位置。图 5(c)和图 5(d)是相位校正因子参量选择不合适时样品的相位包裹图以及三维相位分布结果。图 5(c)中可以明显看到相位包裹

条纹,反映在图 5(d)中即为样品的相位分布发生起伏。对比图 5(b)和图 5(d)的结果可见,全息图数值重建过程中相位校正因子的参量选择会显著地影响再现像的相位分布结果。

### 3.3 像场弯曲的相位相减校正实验结果

图 6 所示为利用相位相减方法校正像场弯曲的实验结果。与图 4(c)加入样品时的相位包裹图相对应,图 6(a)是未加入样品时拍摄的全息图的相位包裹图。分别对图 4(c)和图 6(a)相位去包裹,所得结果进行相减即获得样品的相位分布,如图 6(b)。图中的再现像相位分布范围由图 4(d)中的 600 减小到 100。由图 6(b)可见,相位相减方法可以抑制系统所造成的像场弯曲,突出物体的细节信息,其测量结果与图 5(b)基本一致,如白框中膜状翅污染物所造成的相位起伏。

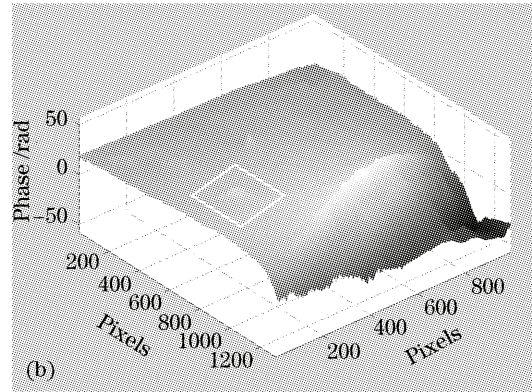
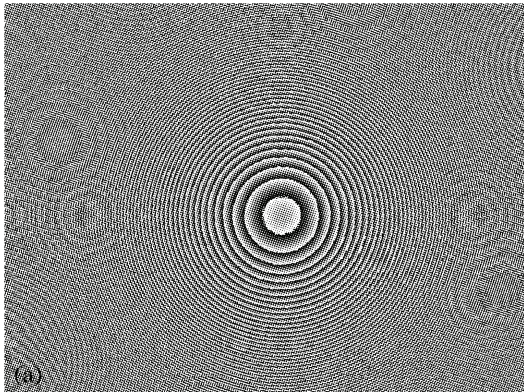


图 6 蝉翼的相位相减方法测量结果。(a) 相位包裹图(未加样品), (b) 三维相位分布(相位相减结果)

Fig. 6 Measurement results of cicada wing using phase subtraction. (a) Wrapped phase distribution (without sample), (b) three-dimensional phase distribution (using phase subtraction)

数值校正方法利用一幅全息图即可以校正相位,在获得准确参量情况下的计算量相对较小,但是需要反复尝试以寻找最佳校正参量,数值再现结果具有不确定性。与数值校正方法相比,相位相减方法含有一

次相减运算,可以有效消除系统误差,实验简单方便,结果准确。不过该方法需要拍摄两张全息图,对系统的稳定性和重复性要求较高。因此,在数字全息显微术中可以根据不同情况选择合适的相位校正方法。

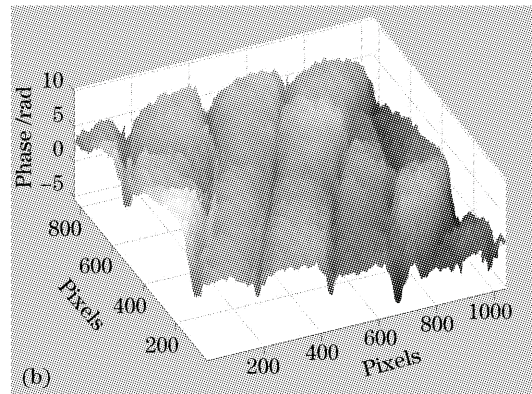
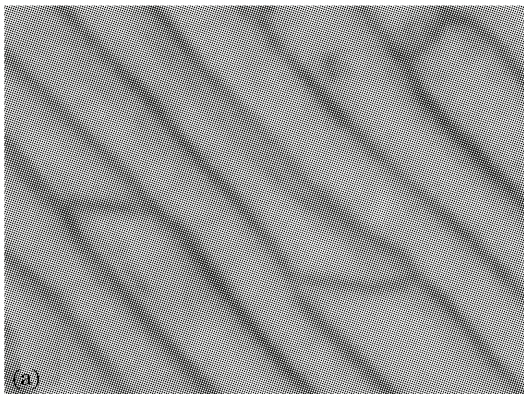


图 7 大蒜表皮细胞的相位相减方法测量结果。(a) 光学显微照片, (b) 三维相位分布(相位相减结果)

Fig. 7 Measurement results of epidermal cells of garlic using phase subtraction. (a) Optical microscopic picture, (b) three-dimensional phase distribution (using phase subtraction)

图 7 所示为利用相位相减方法获得的大蒜表皮细胞的实验测量结果。其中,图 7(a)为其光学显微照片,图 7(b)为通过相位相减得到的大蒜表皮细胞三维相位分布。由于其细胞壁部分折射率较其它部分大,使最终的再现光波场相位发生起伏。从图 7(b)蒜表皮细胞三维相位分布结构中可以看到细胞壁等折射率较高部分的相位明显滞后于其它折射率较低的部分,其相位分布与图 7(a)中所示的细胞结构一致。

## 4 结 论

在生物学中,活体细胞组织等生物样品往往为相位型透明样品,其颜色及吸收率等与周围环境差异不大。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显微观测的手段。利用数字全息显微术对蝉翼和大蒜表皮细胞等相位型样品进行了测量。在分析成像过程中像场弯曲对再现像相位分布影响的基础上,提出利用相位相减方法对像场弯曲进行校正。通过与数值校正方法进行比较,证明了该方法的有效性。作为生命过程的定量研究以及人类健康与疾病生物学中一种新颖、有效的检测手段,数字全息显微技术在人类细胞病理分析、疾病诊断、生命活动观察等方面具有很好的应用前景。

## 参 考 文 献

- U. Schnars, W. P. O. Juptner. Digital recording and numerical reconstruction of holograms[J]. *Meas. Sci. Technol.*, 2002, **13**(9): R85~R101
- P. Ferraro, G. Coppola, D. Alfieri *et al.*. Controlling images parameters in the reconstruction process of digital holograms[J]. *IEEE, J. Selected Topics in Quant. Electron.*, 2004, **10**(4): 829~839
- L. Xu, X. Y. Peng, J. M. Miao *et al.*. Studies of digital microscopic holography with applications to microstructure testing[J]. *Appl. Opt.*, 2001, **40**(28): 5046~5051
- D. Carl, B. Kemper, G. Wernicke *et al.*. Parameter-optimized digital holographic microscope for high-resolution living-cell analysis[J]. *Appl. Opt.*, 2004, **43**(6): 6536~6544
- E. Cucho, P. Marquet, C. Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms[J]. *Appl. Opt.*, 1999, **38**(34): 6994~7001
- P. Ferraro, S. de Nicola, A. Finizio *et al.*. Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging[J]. *Appl. Opt.*, 2003, **42**(11): 1938~1946
- L. Miccio, D. Alfieri, S. Grilli *et al.*. Direct full compensation of the aberrations in quantitative phase microscopy of thin objects by a single digital hologram[J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **90**(4): 041104
- Lü Qieni, Ge Baozhen, Zhang Yimo. Digital microscopic image plane holography[J]. *J. Optoelectron · Laser*, 2006, **17**(4): 475~478  
吕且妮,葛宝臻,张以谟. 数字显微像面全息技术研究[J]. *光子·激光*, 2006, **17**(4): 475~478
- Wang Xiaolei, Wang Yi, Zhai Hongchen *et al.*. Pulsed digital micro-holography for femtosecond order ultrafast process recording by using wavelength division multiplexing technology[J]. *Acta optica Sinica*, 2006, **26**(11): 1632~1635  
王晓雷,王毅,翟宏琛等. 应用波分复用技术实现飞秒级超快动态过程的脉冲数字显微全息记录[J]. *光学学报*, 2006, **26**(11): 1632~1635
- J. L. Zhao, H. Q. Lu, X. S. Song *et al.*. Optical image encryption based on multistage fractional Fourier transforms and pixel scrambling technique[J]. *Opt. Commun.*, 2005, **249**(4~6): 493~499
- Xu Ying, Zhao Jianlin, Fan Qi *et al.*. Determination of the Poisson's ratio of material by digital holographic interferometry[J]. *Chin. J. Lasers*, 2005, **32**(6): 787~790  
徐莹,赵建林,范琦等. 利用数字全息干涉术测定材料的泊松比[J]. *中国激光*, 2005, **32**(6): 787~790
- Zhang Lin, Li Enpu, Feng Wei *et al.*. A study of acoustic levitation process based on laser holographic interferometry[J]. *Acta Physica Sinica*, 2005, **54**(5): 2038~2042  
张琳,李恩普,冯伟等. 声悬浮过程的激光全息干涉研究[J]. *物理学报*, 2005, **54**(5): 2038~2042
- J. L. Zhao, P. Zhang, J. B. Zhou *et al.*. Visualizations of light-induced refractive index changes in photorefractive crystals employing digital holography[J]. *Chin. Phys. Lett.*, 2003, **20**(10): 1748~1751
- Yuan Boyu, Wu Xiaojuan, Chen Shenhao *et al.*. Measurement of concentration change distribution based on theory of interference and image processing methods[J]. *Chin. J. Lasers*, 2007, **34**(1): 82~88  
袁博宇,吴晓娟,陈慎豪等. 基于干涉原理和图像处理方法的浓度变化分布测量[J]. *中国激光*, 2007, **34**(1): 82~88
- Chai Xiaodong, Zhou Chengpeng, Feng Zhaoyan *et al.*. Complex-wave retrieval based on blind signal separation[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(1): 11~14
- Fan Qi, Zhao Jianlin, Li Shiyang *et al.*. Detail displaying and vision aberration rectifying of reconstructed image in digital holography[J]. *Chin. J. Lasers*, 2005, **32**(10): 1401~1405  
范琦,赵建林,李世扬等. 数字全息再现像的细节显示和视觉畸变矫正[J]. *中国激光*, 2005, **32**(10): 1401~1405
- Su Xianyu, Li Jitao. *Information Optics* [M]. Beijing: Science Press, 1999. 57~79  
苏显渝,李继陶. *信息光学* [M]. 北京: 科学出版社, 1999. 57~79