

显微数字全息相位重构的窗口选取和倾斜校正

胡翠英^{1,2} 钟金钢^{1*} 高应俊¹ 翁嘉文^{1,3}

(¹暨南大学光电工程系, 广东 广州 510632; ²暨南大学物理系, 广东 广州 510632)

³华南农业大学应用物理系, 广东 广州 510642

摘要 对显微数字全息相位重构技术中影响重构像质量的两个因素进行了讨论。分析了用角谱法进行重构的过程中频谱滤波窗的大小与形状的选取对重构像质的影响,指出滤波窗口的选取应以刚好将原始像的二维频谱完全包括为原则;分析了在对放在载玻片与盖玻片之间的生物样品进行的实验中,重构像场倾斜的原因及相应的校正方法,并对这些分析和倾斜校正方法进行了实验验证。结果表明,要获得最佳的相位重构,应根据被测物体频谱分布的大小和形状,精确选取滤波窗。CCD探测面和样品的倾斜将导致重构相位像场的倾斜,通过图像处理可以得到一定程度的校正。

关键词 数字全息术; 相位重构; 空间滤波; 倾斜校正

中图分类号 O438 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS20092912.3317

Selection of Filter Window and Correction of Tilt Aberration in the Phase Reconstruction of Microscopic Digital Holography

Hu Cuiying^{1,2} Zhong Jingang¹ Gao Yingjun¹ Weng Jiawen^{1,3}

¹Department of Optoelectronic Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

²Department of Physics, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

³Department of Applied Physics, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract Two main determining factors, which limit the quality of the reconstructed image from the microscopic digital hologram by employing the angular spectrum method, are discussed. First are the shape and the size of the spatial filter selected. The corresponding selection principle of the spatial filter is presented, and the experimental result shows that the manual spatial filter exactly selected according to the distribution of the spectrum of the virtual image should be employed to obtain the optimal reconstructed phase image. Second is the phase tilt aberration of the reconstructed image when the specimen is put between two glasses. It is caused by the CCD plane or the sample plane being not perpendicular to the propagation axes. The correction method by the image processing is presented. The theoretical and the experimental result of an onion specimen are shown.

Key words digital holography; phase reconstruction; spatial filtering; tilt correction

1 引 言

大多数活生物样品属于相位样品,具有高度的透明性,照明光场与之作用后其光强变化不明显,因此,普通光学显微镜很难观察到其细微结构。目前多用泽尼克(Zernike)相衬显微镜进行观察,这种显微镜借助于环状光阑和相差板,将光的相位差转变为振幅差(明暗差),使原本透明的物体表现出明显

的明暗差,从而比较清楚地观察到透明样品中某些细微结构,然而这种转变是非线性的,只能定性观察,从中得不到相位的量化信息。显微数字全息用CCD记录生物样品的全息图,通过数字再现重构其复振幅,根据复振幅可定量分析其强度及相位信息,这为生物样品的定量检测带来很大的方便,已在微小生物物体测量^[1~5]方面得到了很好的应用。

收稿日期: 2009-01-19; 收到修改稿日期: 2009-03-18

基金项目: 国家自然科学基金(60677019)资助课题。

作者简介: 胡翠英(1970—),女,博士研究生,讲师,主要从事信息光学方面的研究。E-mail: hcyhome@163.com

导师简介: 高应俊(1946—),男,硕士,教授,主要从事信息光学方面的研究。E-mail: tyjgao@jnu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: tzjg@jnu.edu.cn

数字重构的复振幅决定着显微数字全息重构相位的质量。在数字全息显微成像的重构算法中,由于记录距离不满足菲涅耳(Fresnel)近似条件,角谱法优于菲涅耳变换法和惠更斯(Huygens)卷积法,从而得到广泛应用^[6~8]。用角谱法进行数值再现,首先是借助于傅里叶变换算法来获得全息图的频谱,然后通过空间滤波提取+1级频谱重构再现像。由于不同物体对应的频谱分布不同,空间滤波中频率滤波窗的大小和形状将影响到重构复振幅的质量,因此,滤波窗口的选择与再现像的质量密切相关,须精确选取。成像过程中物光路与参考光路的显微镜曲率不匹配,样品或 CCD 与光轴不垂直等可能造成再现像场的弯曲和倾斜,也会影响到再现像的质量,对此,一些研究者讨论了像场弯曲的校正方法^[9~12],而有关像场倾斜的讨论很少。

本文分析了在数字全息显微成像过程中频率滤波窗精确选取的重要性,分析了像场倾斜的原因及校正方法,旨在提高显微数字全息中重构相位的质

量,并以洋葱内层表皮细胞的测量为例,进行了相应的实验验证。

2 数字全息和角谱法再现

数字全息的实现包含两个主要过程,即全息图的记录与物光波的再现。

设记录全息图的 CCD 光敏面位于 $x_H y_H$ 平面,物光与参考光在 $x_H y_H$ 平面的复振幅分布可分别表示为

$$O(x_H, y_H) = O_0(x_H, y_H) \exp[j\varphi(x_H, y_H)], \quad (1)$$

$$R(x_H, y_H) = R_0 \exp[-j2\pi(\xi_r x_H + \eta_r y_H)], \quad (2)$$

式中 $O_0(x_H, y_H)$ 和 R_0 分别表示物光波和参考光波的振幅, $\varphi(x_H, y_H)$ 为物光波的相位分布, $\xi_r = \sin \theta_x / \lambda$, $\eta_r = \sin \theta_y / \lambda$ 分别为参考光在 x 和 y 方向的空间频率, λ 为参考光的波长, θ_x, θ_y 分别为参考光传播方向与 x 轴和 y 轴的夹角。

物光与参考光在 CCD 记录面上叠加后的光强度分布为

$$I(x_H, y_H) = RR^* + OO^* + OR^* + O^*R = |R_0|^2 + |O_0(x_H, y_H)|^2 + O_0(x_H, y_H) R_0 \exp\{j[2\pi(\xi_r x_H + \eta_r y_H)] + \varphi(x_H, y_H)\} + O_0^*(x_H, y_H) R_0 \exp\{-j[2\pi(\xi_r x_H + \eta_r y_H)] - \varphi(x_H, y_H)\}, \quad (3)$$

式中 $*$ 为复共轭,前两项仅依赖于参考光与物光各自的强度,第三、四项依赖于物光波与参考光波的相对相位关系,结果物光波的振幅与相位信息均被记录。

用计算机模拟原参考光与全息图相乘,得到重构的物光波前在全息图平面的复振幅分布为

$$U(x_H, y_H) = |R_0|^2 R + |O_0(x_H, y_H)|^2 R + (OR^*)R + (O^*R)R = U_1 + U_2 + U_3 + U_4, \quad (4)$$

式中 $U_1 + U_2$ 为再现像的零级衍射项;由于参考波的强度是均匀的,因此, U_3 是原物光波前的精确重现,是+1级衍射像,为虚像; U_4 是-1级衍射像,为共轭实像。

设 $U(x_i, y_i; 0)$ 是重建距离 $z_i = 0$ 的平面上的重构复场, (x_i, y_i) 是再现像的平面坐标, $U(x_i, y_i; 0)$ 的角谱为

$$A(\xi, \eta; 0) = \mathcal{F}\{U_1\} + \mathcal{F}\{U_2\} + \mathcal{F}\{U_3\} + \mathcal{F}\{U_4\} = A_1 + A_2 + A_3 + A_4, \quad (5)$$

式中 ξ, η 是与 x_i, y_i 相对应的频率, $\mathcal{F}\{\}$ 表示傅里叶变换, A_3 是物光波的+1级频谱,可通过空间滤波取出。根据角谱理论, A_3 在 $z_i = d$ 的平面上分布为

$$A_3(\xi, \eta; d) = A_3(\xi, \eta; 0) \times \exp\left[j \frac{2\pi d}{\lambda} \sqrt{1 - (\lambda\xi)^2 - (\lambda\eta)^2}\right], \quad (6)$$

则物光波在 $z_i = d$ 平面上的复振幅为

$$U_3(x_i, y_i; d) = \mathcal{F}^{-1}[A_3(\xi, \eta; d)], \quad (7)$$

从而得到重构物光波的强度和相位为

$$I(x_i, y_i; d) = |U_3(x_i, y_i; d)|^2, \quad (8)$$

$$\varphi(x_i, y_i; d) = \arctan\left(\frac{\text{Im}U_3}{\text{Re}U_3}\right).$$

3 实验装置

图 1 为 Mach-Zehnder 型显微数字全息实验系统。图中 BE_1 和 BE_2 为扩束准直系统, MO_1 和 MO_2 为两个 $16\times$ 的显微物镜。平行光照射固定于

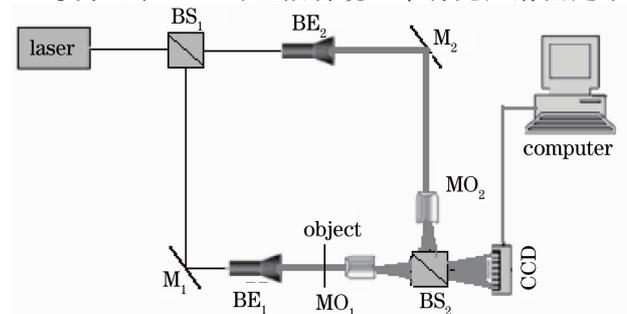


图 1 显微数字全息的实验装置图

Fig. 1 Experimental set-up for microscopic digital holography

载波片上的洋葱切片,成为携带物体信息的物光波, MO_1 置于物光路,在 CCD 面附近形成物体放大的像。 MO_2 置于参考光路,以便与物光路的波前曲率相匹配,消除物光路因使用显微镜而带来的相位弯曲失常,为此 MO_1 和 MO_2 到 BS_2 的距离必须相等。物光与参考光经 BS_2 在 CCD 靶面上形成干涉图样。实验中仔细调整 BS_2 的方位,实现离轴显微数字全息的记录。

实验所用激光的波长为 $\lambda = 632.8 \text{ nm}$,用于记录全息图的 CCD 具有有效像素数为 $720 \text{ pixel} \times 576 \text{ pixel}$ 。计算中截取全息图中 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ 进行数据处理。被记录物体是新鲜的洋葱内层表皮细胞。图 2(a) 是实验记录的显微数字全息图,图 2(b) 与图 2(c) 是其对应的对数坐标下的频谱分布。

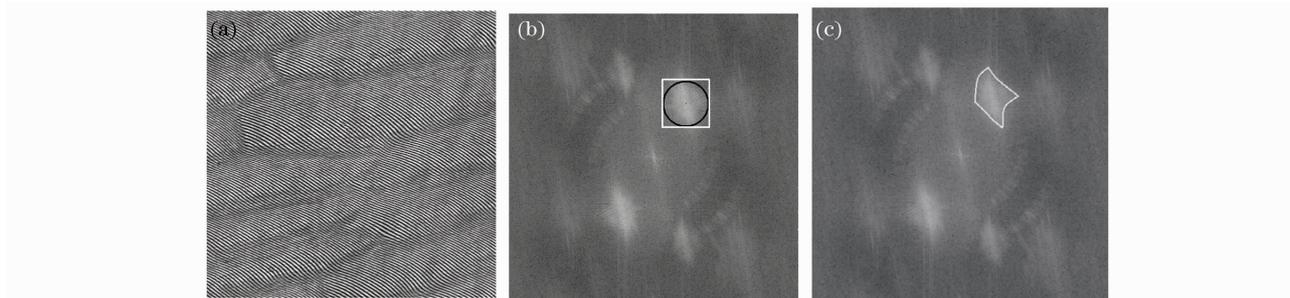


图 2 显微数字全息图及其频谱。(a) 全息图;(b),(c) 对数坐标下的频谱

Fig. 2 Microscopic digital hologram and its spectrums,(a) digital hologram;(b) and (c) their spectrums in logarithmic coordinates

4 滤波窗口的选取对重构像的影响, 像场倾斜原因及校正方法

4.1 频谱滤波窗口选取对重构像的影响

在角谱法再现过程中,空间滤波决定着重构物光波的质量,影响着再现像的像质,因此空间滤波中滤波窗的大小和形状应精确选取。为了取出原始像(或共轭像)的频谱,参物光夹角 α 必须满足 $\alpha > \arcsin(3B\lambda)^{[13-15]}$ (B 为物光波对 CCD 的带宽),这样频谱面上正负一级谱与零级谱才能够完全分离,此时适当选取滤波窗可使通过滤波取出的原始像(或共轭像)不受零级谱的干扰。

在实验中,由各种光学元件引起的反射、散射等杂散光均可能被 CCD 接收,形成频谱面上的寄生噪声,如果滤波窗内包含较多的寄生噪声,必将对再现像产生严重干扰。因此,滤波窗口的选取原则应是刚好将原始像的二维频谱完全包括为准,这样可以在不丢失物体信息的同时,减少寄生噪声的干扰。

由于二维频谱的分布与被测物体有关,形状大都不规则,因此要想不丢失物体信息,形状规则的滤波窗一定要比原始像的频谱分布大,这样滤波窗内很可能包含寄生噪声,这必将影响到再现像的质量。若能按照物体二维频谱分布的轮廓选取滤波窗口,就能最大限度地减少这类噪声,从而使再现像的质量得到提高。下面给出选取不同滤波窗口对再现像

质量造成影响的具体实例。

图 2(b) 中标出了正方形与圆形滤波窗,各滤波窗的中心均在频谱 +1 级像的中心点,正方形滤波窗的大小为 $82 \text{ pixel} \times 82 \text{ pixel}$;圆形滤波窗的半径为 40 pixel ;图 2(c) 是根据原始像频谱的轮廓手工选取的滤波窗。图 3 是与各种滤波窗相对应的重构强度和相位图像,其中,图 3(a1)~(a3) 对应于正方形、圆形和根据频谱分布的轮廓手动选取滤波窗口得到的重建强度图像,图 3(b1)~(b3) 分别为对应的未解包裹的相位图像,可以看到选取不同的滤波窗对强度和相位重构均有影响。对于相位物体,我们更关心其相位,下面着重讨论滤波窗口的选取对重构相位的影响。

用同一种解包裹程序对图 3(b1)~(b3) 进行解包裹,得到图 3(c1)~(c3),其中图 3(c3) 是手动取窗所得,图像平滑,没有明显的相位畸变点。进一步对图 3(c1)~(c3) 进行手动解包,得到图 3(d1)~(d3),可以看到选取形状规则的滤波窗得到的相位图像中含有跳变点的部分不能解包,而对本样品而言这些地方是不应该有这种跳变的,这些跳变应该是由滤波窗中包含的寄生噪声引起的。根据频谱的分布手动精确选取滤波窗,可以避开这种噪声,得到了平滑的细胞相位重构图像。就不同的滤波窗口,分别提取未解包与解包相位图像中的第 60 列的数

据进行比较,如图 4(a)和图 4(b)所示,可以看到选取不同滤波窗口的相位数值有一定的差异,尤其是手动窗口的相位和其他两种窗口的相位差异较大。这是由于全息图频谱分布与被测物密切相关,其形状和大小是不规则的,而形状规则的滤波窗口不能准确地提取所需的频谱,对相位重构影响较大。如

果窗口取大了,包含的物的信息多了,但同时包含的寄生噪声也多了;窗口取小了,频谱中的寄生噪声少了,但物的信息也少了。要做到在减少寄生噪声的同时又不缺失物的信息,提高再现像的质量,必须根据频谱的形状来确定滤波窗的形状和大小。

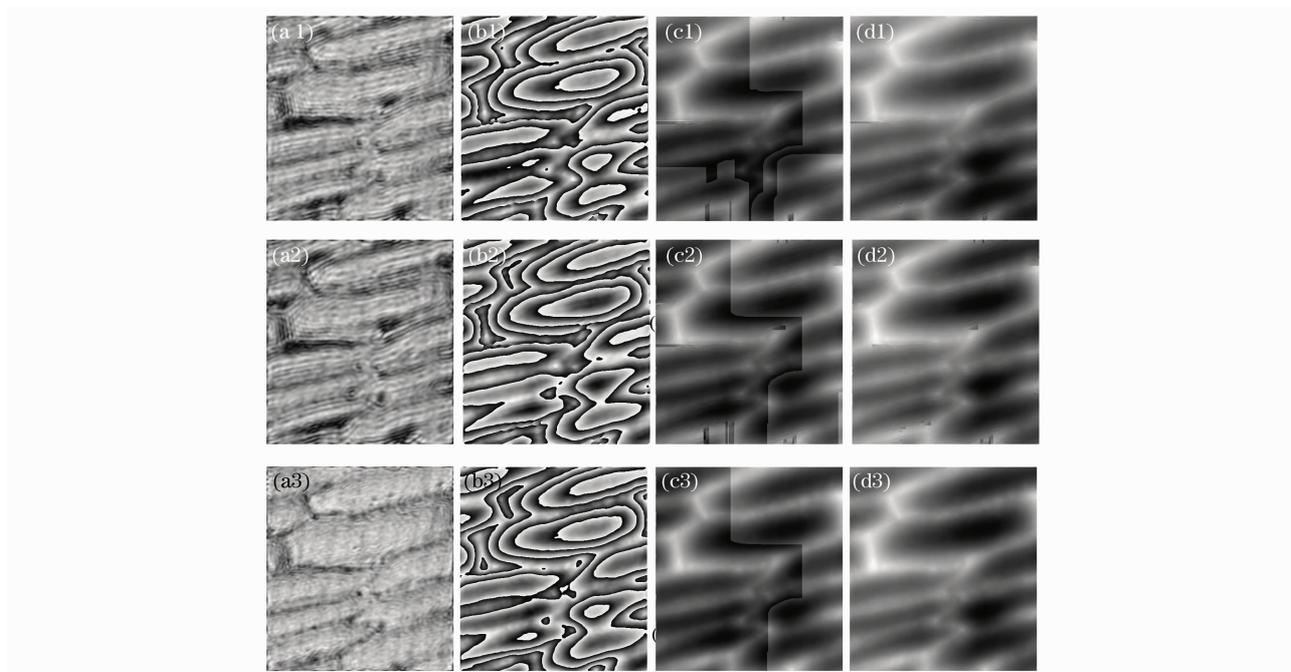


图 3 选取不同滤波窗所得的重构像。(a1)~(a3)是分别用正方形、圆形及手工滤波窗重构的振幅图像;(b1)~(b3)是分别对应的未解包裹的相位图像;(c1)~(c3)是与(b1)~(b3)对应的用相同解包裹程序得到的相位图像;(d1)~(d3)是与(c1)~(c3)对应的手工解包裹后的相位图像

Fig. 3 Reconstructed images under different filter windows. (a1)~(a3) Amplitude images with square, circular and manual filters, respectively; (b1)~(b3) wrapped phase images with corresponding filters, respectively; (c1)~(c3) unwrapped phase images corresponding to (b1)~(b3); (d1)~(d3) manual unwrapped phase images corresponding to (c1)~(c3)

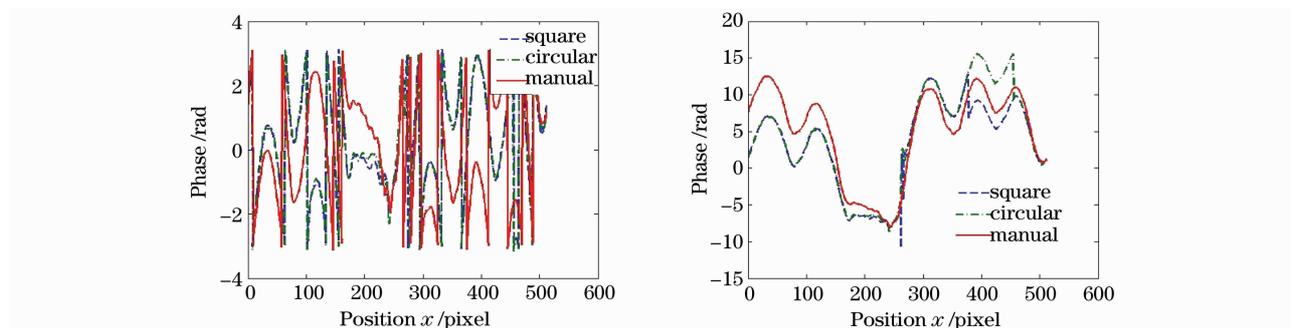


图 4 相位图像中的第 60 列数据比较。(a) 未解包的相位数据;(b)解包的相位数据

Fig. 4 Data comparison of the 60th column in the reconstructed phase images. (a) Wrapped phase data; (b) unwrapped phase data

4.2 像场倾斜原因及校正方法

实验中被测生物样品放在两玻璃片之间(载玻片与盖玻片),尽管生物样品内部折射率分布有起

伏,但将其作为一个整体来看,其整体相位不应存在倾斜,而图 3(d3)所示相位图像在水平方向明显倾斜。经分析并通过实验证明这是由于样品或 CCD

的放置与光轴不垂直而带来的像场倾斜失常现象, 需要进行图像处理以消除。下面从理论上进行分析, 并对倾斜予以消除。

先分析 CCD 平面与光轴 (z 轴) 不垂直的情况。如图 5(a), 假设 CCD 平面与 x_H 轴的夹角为 θ_x , 与 y_H 轴的夹角为零, 物光场在 $x_H y_H$ 平面上的复振幅分布为 $O_H = O_{0H} \exp(i\varphi_H)$, 其中 O_{0H} 表示振幅, φ_H 表示相位。由于 CCD 与 x_H 轴的夹角为 θ_x , CCD 面上各点与其在 $x_H y_H$ 平面的投影相比较有一附加光程 $\delta_x = x_H \sin \theta_x$, 从而有附加相位 $\varphi_x = |\mathbf{k}| \cdot \delta_x = k_x x_H$, \mathbf{k} 为波矢量, k_x 为 \mathbf{k} 在 x_H 方向的分量, 因此, CCD 实际记录的复振幅为

$$O'_H = O'_{0H} \exp(j\varphi_H + k_x x_H), \quad (9)$$

如果 CCD 平面与 y_H 轴也有夹角 θ_y , 则

$$O'_H = O'_{0H} \exp(j\varphi_H + k_x x_H + k_y y_H), \quad (10)$$

k_y 为 \mathbf{k} 在 y_H 方向的分量。这样, 重建后的再现像必将在 x_H 和 y_H 方向有倾斜。

如果实验中样品放置与光轴不垂直, 如图 5(b) 所示, 也会造成像场的倾斜。设样品与 x 轴的夹角为 θ_x , 与 y 轴的夹角为 θ_y , 样品被准直光照射。若样品与光轴垂直, 透过样品的波前设为 $O = O_0 \exp(j\varphi)$, 样品倾斜后, 其作为衍射屏的屏函数的性质并没有改变, 只是由于倾斜使入射到样品不同位置上的波前附加了一个线性相位因子

$$\varphi' = \exp[j(kx \sin \theta_x + ky \sin \theta_y)] = \exp[j(k_x x + k_y y)], \quad (11)$$

因此, 透过样品的波前实际上为

$$O = O_0 \exp[j(\varphi + k_x x + k_y y)], \quad (12)$$

这样, 重建后的再现像也同样存在倾斜。

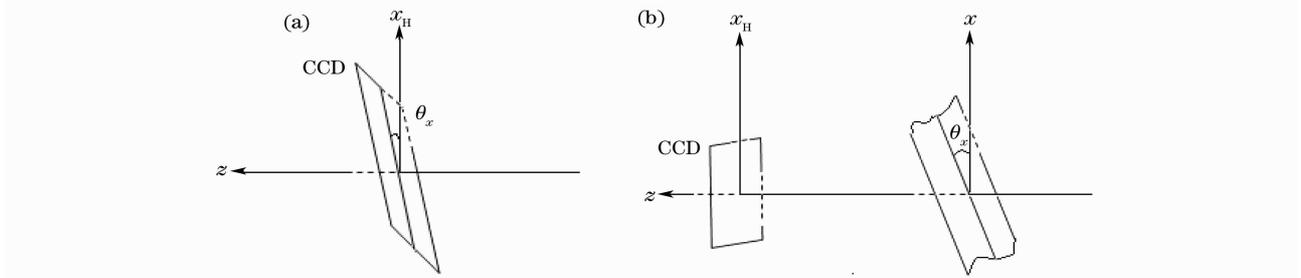


图 5 倾斜失常的分析。(a) CCD 平面与光轴 (z 轴) 不垂直; (b) 样品与光轴不垂直

Fig. 5 Analysis of the tilt aberration, (a) CCD plane is not vertical to z axis; (b) the sample plane is not vertical to z axis

根据重建相位数据拟合一斜面, 将重建相位的原始数据与拟合斜面数据相减, 便可消除倾斜。图 6(a) 为重建后相位图像、拟合斜面及相减后图像中的第 120 列的数据, 图 6(b) 为消除倾斜后的相位图像。图 7(a) 与图 7(b) 分别为倾斜消除前后相位图像的三维显示。从图 6 与图 7 中, 我们看到倾斜已有一定程度的消除。

因此, 对于放置在载玻片与盖玻片之间的生物

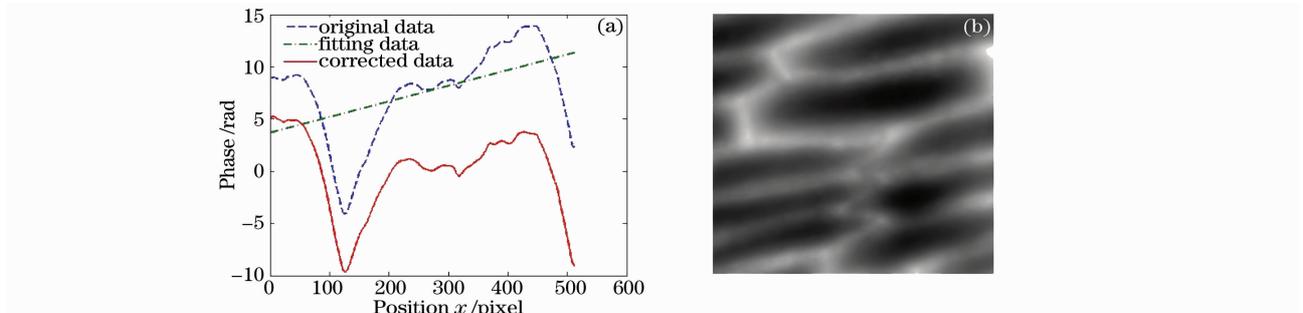


图 6 (a) 消除倾斜前后的第 120 列相位数比较; (b) 消除倾斜后的相位图像

Fig. 6 (a) Data comparison of the 120th row with and without eliminating the tilt aberration, and (b) the phase image after eliminating the tilt aberration

样品而言, 如果再现的相位图像整体上有倾斜, 为使相位数据更加准确, 这种倾斜有必要进行校正, 而且可以得到校正; 但需要注意的是, 这里提出的相位倾斜校正基于被测样品的整体相位分布不存在倾斜情况, 对于被测样品的整体相位分布存在倾斜情况, 由于不能确定校正基准, 本文提到的校正方法将不再适用。

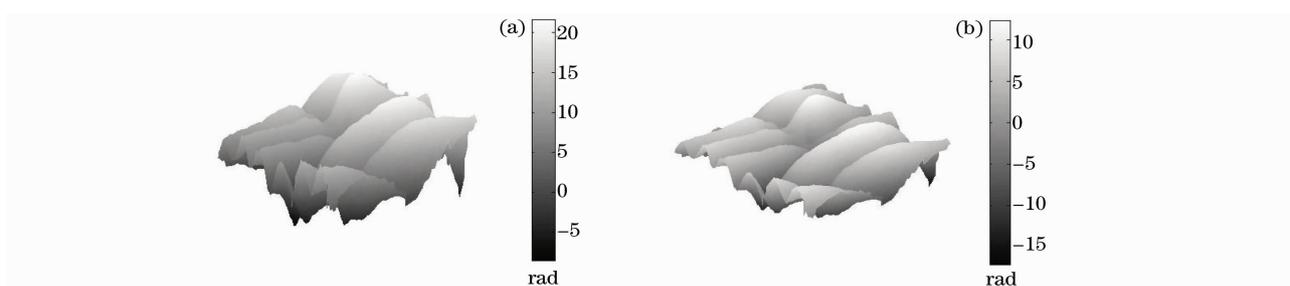


图 7 倾斜校正前后相位图的三维显示。(a)倾斜消除前;(b)倾斜消除后

Fig. 7 3D display of the phase images (a) before eliminating the tilt aberration; (b) after eliminating the tilt aberration

5 结 论

本文用角谱法对新鲜洋葱内层表皮细胞的振幅和相位进行了重构。分析了频率滤波窗口选取与倾斜失常对重构相位的影响。比较了选取不同滤波窗的重构相位,结果表明滤波窗的选取直接影响到重构相位的质量,要获得最佳的相位重构,应根据频谱的大小和形状,精确选取滤波窗。CCD 探测面和样品的倾斜将导致重构相位像场的倾斜,通过图像处理可以得到一定程度的校正。

参 考 文 献

- 1 Kwan Jeong, Leilei Peng, John J. Turek *et al.*. Fourier-domain holographic optical coherence imaging of tumor spheroids and mouse eye [J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(10): 1798~1805
- 2 J. Yamaguchi, J. Kato. Image formation in phase-shifting digital holography and application on microscopy [J]. *Appl. Opt.*, 2001, **40**(34): 6177~6186
- 3 Kwan Jeong, Leilei Peng, John J. Turek *et al.*. Fourier-domain digital holographic optical coherence imaging of living tissue[J]. *Appl. Opt.*, 2007, **46**(22): 4999~5008
- 4 Lluís Martínez-León, Giancarlo Pedrini, Wolfgang Osten. Applications of short-coherence digital holography in microscopy [J]. *Appl. Opt.*, 2005, **44**(19): 3977~3984
- 5 Florian Charrière, Anca Marian, Frédéric Montfort *et al.*. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy [J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(2): 178~180
- 6 Christopher J. Mann, Lingfeng Yu, Chun-Min Lo *et al.*. High-resolution quantitative phase-contrast microscopy by digital holography[J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(22): 8693~8698
- 7 S. De Nicola, A. Finizio, G. Pierattini *et al.*. Angular spectrum method with correction of anamorphism for numerical reconstruction of digital holograms on tilted planes [J]. *Opt. Express*, 2005, **13**(24): 9935~9940
- 8 Jiawen Weng, Jingang Zhong, Cuiying Hu. Digital reconstruction based on angular spectrum diffraction with the ridge of wavelet transform in holographic phase-contrast microscopy[J]. *Opt. Express*, 2008, **16**(26): 21971~21981
- 9 Pietro Ferraro, Sergio De Nicola, Andrea 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
- 10 Tristan Colomb, Frédéric Montfort, Jonas Kühn *et al.*. Numerical parametric lens for shifting, magnification and complete aberration compensation in digital holographic microscopy [J]. *J. Opt. Soc. Am. A-Opt. Image Sci. Vis.*, 2006, **23**(12): 3177~3190
- 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 Di Jianglei, Zhao Jianlin, Fan Qi *et al.*. Phase correction of wavefront reconstruction in digital holographic microscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(1): 57~61
- 13 邱江磊, 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): 57~61
- 13 Lü Qieni, Ge Baozhen, Zhang Yimo. Analysis of digital in-line and digital off-axis holography[J]. *Opto-Electronic Engineering*, 2005, **32**(2): 15~18
- 14 吕且妮, 葛宝臻, 张以谟. 数字同轴和数字离轴全息系统分析 [J]. *光电工程*, 2005, **32**(2): 15~18
- 14 Wang Huaying, Wang Dayong, Xie Jianjun. Analysis of recording conditions of digital hologram by maximum spatial frequency[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(4): 645~649
- 14 王华英, 王大勇, 谢建军. 用极值频率法分析数字全息的记录条件[J]. *光子学报*, 2007, **36**(4): 645~649
- 15 Zhong Liyun, Zhang Yimo, Lü Xiaoxu *et al.*. Analysis of some fundamental issue about digital hologram[J]. *Acta Optica Sinica*, 2004, **24**(4): 465~471
- 15 钟丽云, 张以谟, 吕晓旭等. 数字全息中的一些基本问题分析 [J]. *光学学报*, 2004, **24**(4): 465~471