

高精度定量相位显微成像方法研究

闵俊伟¹, 郜鹏², 但旦¹, 郑娟娟², 于湘华¹, 姚保利^{1*}¹中国科学院西安光学精密机械研究所瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710119;²西安电子科技大学物理学院, 陕西 西安 710071

摘要 定量相位显微成像在工业检测、生物医学和光场调控等领域具有重要的应用价值。常用的定量相位显微成像技术通过干涉的方法来获取相位的定量分布,干涉装置的稳定性、光学衍射极限的限制、相位再现时的解包裹问题、激光照明下的相干噪声,以及动态观测过程中的样品离焦等因素都会影响定量相位显微成像的分辨率和精度。本文围绕高精度定量相位显微成像中的上述关键问题展开研究,通过构建物参共路的同步相移数字全息显微结构实现稳定的实时测量;采用结构照明的超分辨率成像方法实现对微小物体的超分辨率成像;利用双波长照明将纵向无包裹相位测量范围扩大到微米量级;使用低相干LED照明解决相干噪声问题;提出了基于结构照明和双波长照明的数字全息显微自动调焦方法,可以满足对不同类型样品的长时间跟踪观测。

关键词 定量相位显微成像; 物参共路; 结构照明; 相位解包裹; 自动调焦

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/AOS231191

1 引言

相位是光波的基本物理属性之一,它的空间分布直接影响聚焦光斑的三维分布和光学成像的空间分辨率等特性。通过定量相位成像可以实现对透明物体的三维形貌和内部折射率分布的观测,而折射率是反映透明物体内部结构以及状态的重要特征物理量之一。因此,开展定量相位成像技术研究具有重要的意义^[1]。迄今为止,已经诞生了许多定量相位成像技术,其中数字全息(DH)是一种被广泛使用的定量相位成像技术^[2]。它使用CCD或CMOS等光电探测器代替传统光学全息干板作为记录介质,免去了复杂耗时的湿法全息图再现步骤,使用计算机实现实时的全息图再现,同时可以结合数字图像处理方法优化再现测量结果。数字全息显微(DHM)是数字全息技术与光学显微成像技术结合后诞生的新型显微成像技术,是数字全息技术在显微成像领域中的应用^[3]。它既具备普通光学显微镜对样本无接触、可实时动态观测等优点,还能通过获取目标的相位信息实现三维成像和折射率定量测量,已经成为定量相位显微成像的重要方法,在诸多领域中有了广泛的应用^[4-9]。

作为一种干涉式定量相位显微成像技术,DHM装置的结构稳定性、光学衍射极限的分辨率限制、全息

再现时的相位解包裹问题、激光照明产生的相干噪声,以及动态观测过程中样品离焦等因素都会影响定量相位显微成像的分辨率和精度。为了解决这些问题,国内外有许多研究团队从事相关方面的研究工作^[10-13]。在装置结构优化方面,先后经历了离轴光路结构^[14]、同轴相移光路结构^[15]、物参共路结构^[16]的演变。为了提升成像分辨率,加入显微物镜^[17]、采用多角度照明^[18]、采用结构照明^[19]等方法相继被提出。各种相位解包裹算法和双波长乃至多波长照明方法陆续诞生^[20-23]。国内外科科研人员研发了基于照明调制或基于算法的相干噪声抑制方法,来提升成像质量和精度^[24-28]。通过不同的自动调焦技术,可以实现对运动目标的长时间跟踪观测^[29-33]。虽然DHM在上述一些关键问题上已经有了许多解决方案,但并未形成完整的理论和技术体系,部分解决方案相互限制,给实际使用带来了一些困扰。

本文围绕提高定量相位显微成像的测量精度和空间分辨率、扩大纵向测量范围、抑制相干噪声、自动调焦等方面展开研究,形成了以高精度定量相位显微成像为核心的理论和技术体系,期望能为开发满足特定条件下使用的高精度实用化DHM装置提供有益的参考。

收稿日期: 2023-06-27; 修回日期: 2023-07-31; 录用日期: 2023-08-04; 网络首发日期: 2023-08-15

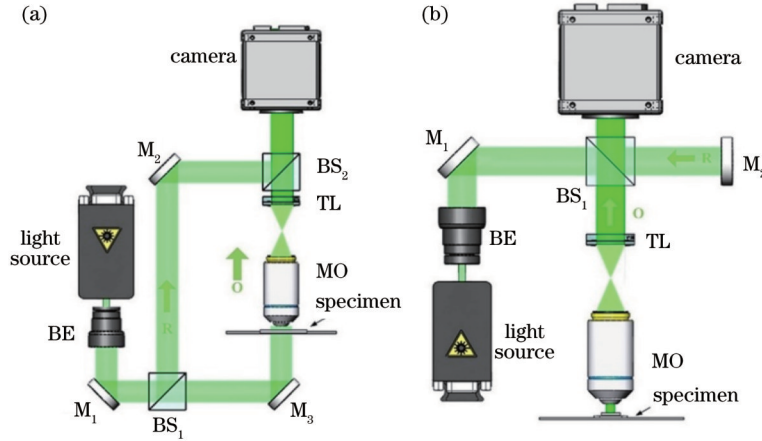
基金项目: 国家自然科学基金(61077005, 61107003, 61377008, 61475187, 61405242, 61975233, 62075177)、中国科学院青年创新促进会资助项目(2019393)

通信作者: *yaobl@opt.ac.cn

2 DHM 成像的基本原理

大部分 DHM 装置使用的是基于马赫-曾德尔 (Mach-Zehnder) 或迈克尔孙 (Michelson) 干涉结构的

双光路离轴干涉结构。根据观测目标的特性不同, DHM 装置又分为透射式和反射式两大类, 其结构分别如图 1(a) 和 1(b) 所示。下面以透射式 DHM 为例介绍 DHM 的基本原理。



BE: beam expander collimator; M_1 - M_3 : mirrors; BS_1 - BS_2 : beam splitters; MO: microscopic objective; TL: tube lens

图 1 常用的 DHM 结构示意图。(a) 透射式 DHM; (b) 反射式 DHM

Fig. 1 Structure diagrams of commonly used DHMs. (a) Transmission DHM; (b) reflection DHM

光源发出的光束经过扩束准直器 (BE) 扩展为合适大小的平行平面光波后, 被分光棱镜 (BS_1) 分为两束。其中一束光保持不变作为参考光 R , 另一束光在照明样品后成为物光 O 。物光经过由显微物镜 (MO) 和筒镜 (TL) 组成的显微成像系统后照射到探测器靶面; 参考光经过分光棱镜 (BS_2) 反射后也照射到探测器靶面, 与物光发生干涉。通过调节反射镜 (M_2) 的角度可以改变物光和参考光光轴之间的夹角, 得到离轴干涉全息图, 其强度分布可以表示为

$$I = |R|^2 + |O|^2 + 2|R||O| \cos \varphi, \quad (1)$$

式中, φ 为物光和参考光之间的相位差。为了简便, 这

里和后面省略坐标 (x, y) 。使用傅里叶变换 (FT) 法对记录的干涉图进行再现^[34]。经过快速傅里叶变换、频谱滤波和傅里叶逆变换 (IFT) 后, 最终可以再现物光的复振幅分布 O_2 和相位分布 φ :

$$\begin{cases} O_2 = \mathcal{F}^{-1}[\mathcal{F}(I) \cdot W] \\ \varphi = \arctan \left[\frac{\text{Im}(O_2)}{\text{Re}(O_2)} \right], \end{cases} \quad (2)$$

式中: \mathcal{F} 和 \mathcal{F}^{-1} 分别表示快速傅里叶变换和快速傅里叶逆变换; W 为频谱滤波窗口; Im 表示取虚部; Re 表示取实部。整个再现流程如图 2 所示。

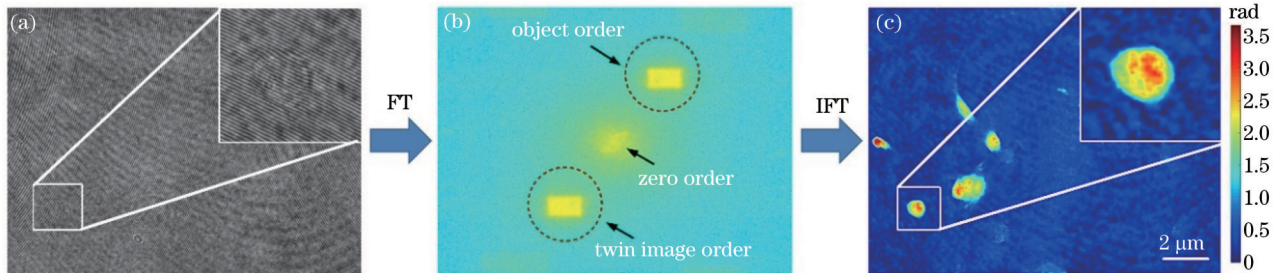


图 2 DHM 再现流程。(a) 记录的离轴干涉图; (b) 干涉图的频谱及频谱滤波; (c) 再现的相位分布

Fig. 2 Flow chart of reconstruction of DHM. (a) Recorded off-axis hologram; (b) frequency spectrum of hologram and spectrum filtering; (c) reconstructed phase map

3 高精度 DHM 成像

3.1 基于物参共路同步相移的高稳定 DHM

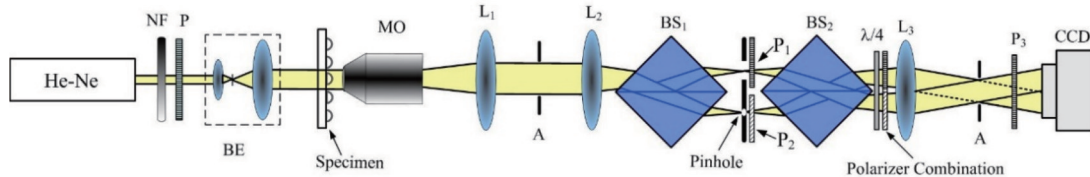
如前所述, 由于大部分的 DHM 装置中物光和参考光各自独立传播, 因此对环境的扰动十分敏感。常用的提高装置稳定性的方法是加入反馈系统^[35], 但反

馈系统不仅价格昂贵, 而且增加了装置的结构复杂性。此外, 常用 DHM 使用离轴干涉以消除零级像和共轭像并实现实时观测, 但离轴记录只能利用探测器 1/4 的空间带宽积, 影响成像精度。而同轴数字全息记录虽然可以完全利用探测器的空间带宽积, 但必须要借助相移等才能消除干扰像, 而相移记录往往需要在时

间上连续操作,耗时长且容易引入误差,难以对运动物体或动态过程进行观测。

结合点衍射技术和同步相移技术,本文设计了如图 3 所示的物参共路同步相移 DHM 装置^[33]。激光器(HNL210LB, Thorlabs, USA)发出的光束依次经过连续可调衰减器(NF)和偏振片(P)后,被扩束准直器(BE)扩束准直成平行光。样品放在显微物镜(MO, 40×, NA=0.65)的前焦面上,放大的实像出现在物镜和准直透镜(L₁, f₁=200 mm)组成的显微成像系统的后焦面上。在该平面上放置一光阑(A)用于限制成像区域的视场(使得成像区域的面积为 CCD 感光面积的一半,从而使 CCD 可以同时接收两幅相移干涉图样)。在透镜 L₂(f₂=200 mm)和 L₃(f₃=200 mm)组成的 4f 系统中,焦平面的两侧对称放置着两个分别倾斜 45° 的非偏振分光棱镜(BS₁和 BS₂)。在透镜 L₂的会聚作用下,入射光束被 BS₁分成两束。它们的频谱出现在透镜 L₂的焦平面上,并且两个频谱中心之间的距离为 d。d 与入射位置到分光棱镜中间分光层的距离有关。在透镜 L₂的焦平面上,用直径为 15 μm 的针孔

滤波器对其中一束光的频谱进行滤波。滤波后的频谱作为参考光频谱(经透镜 L₃傅里叶逆变换后变成平面参考光),另一频谱作为物光频谱。偏振方向为水平和竖直的偏振片 P₁和 P₂分别放置在物光和参考光频谱之上,使得物光和参考光变成正交线偏振光。物光和参考光对称地入射到 BS₂上,当 BS₂的分光层平行于光轴方向时,入射的物光和参考光分别被分成两束,且两者相互重合、传播方向相同。当 BS₂分光层与光轴存在一定夹角 θ 时,在被分开的两光束中,物光和参考光具有一个夹角 θ。在透镜 L₃之前放置了一个主轴方向与水平方向成 45° 的 1/4 波片,同时将透振方向互成 45° 的偏振片组合分别置于两束光传播路径之上。根据偏振相移的原理,最终可以在 CCD (DFK31BU03, The Imaging Source, Germany, 1024×768@ 4.65 μm×4.65 μm)靶面上得到两幅相位相差 π/2 的全息图。干涉图样的对比度可以通过旋转偏振片 P 来调节。由于两干涉图样最后的偏振方向不同,两幅干涉图样之间的相对强度可以通过旋转偏振片 P₃来调节。



NF: continuously adjustable attenuator; L₁-L₃: lenses (focal lengths are f₁=175 mm and f₂=f₃=100 mm); P, P₁-P₃: polarizers; λ/4: quarter-wave plate; BS₁-BS₂: beam splitters; A: aperture

图 3 物参共路同步相移 DHM 实验装置^[36]

Fig. 3 Experimental setup of common-path simultaneous phase-shifting DHM^[36]

为了验证方法的有效性,选取石英玻璃上刻蚀的方块状相位台阶作为测试样品。该相位台阶的制作材料为石英玻璃,折射率 n=1.45704,尺寸大小为 70 μm×20 μm,台阶厚度为 620 nm,对应的相位为

$\varphi = 2\pi(n-1)h/\lambda = 2.814 \text{ rad} = 0.448 \times 2\pi \text{ rad}$ 。通过单次曝光得到的同步相移干涉图样如图 4(a)所示。利用 FT 法再现得到的台阶相位分布如图 4(b)所示。样品相位的测量结果与实际值相符合。

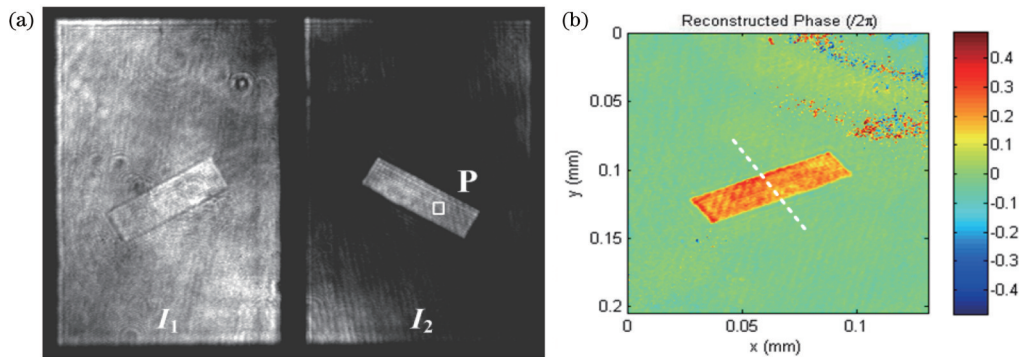


图 4 物参共路同步相移 DHM 对相位台阶的测量结果^[36]。(a) 单次记录的同步相移干涉图样(I₁和 I₂具有 π/2 相移量);(b) 再现相位台阶的相位分布

Fig. 4 Measurement results of phase-step with common-path simultaneous phase-shifting DHM^[36]. (a) Single-shot recorded simultaneous phase-shifting hologram (phase shift between I₁ and I₂ is π/2); (b) reconstructed phase map of phase-step

为了进一步研究该光路的稳定性,本文进行了 35 min 的空载测量(未加样品),每隔 1 min 记录一次。然后,对这 35 幅同步相移干涉图样分别进行相位再现,从而确定装置对应的相位分布随时间的波动情况。首先,跟踪了视场内某一点(点 P)的相位变化,图 5 中正方形标记的数据线表示该点在 35 min 内光程差(OPD)的波动情况。统计结果表明,该点在 35 min 内光程差变化的标准差为 4.2 nm,大约是传统的双光路干涉定量相位显微的光程差变化的标准差(9.2 nm)的 1/2。另外,为了研究装置整体相位分布随时间的变化情况,计算了相邻两次全场测量 OPD 之间差值的均方根(RMS)值,如图 5 中三角形标记的数据线所示。该 RMS 值一般被用来表征装置稳定性和可重复测量能力,图 5 中三角形标记的数据对应的 RMS 值随时间变化近似为一条直线,其平均值为 3 nm,说明该装置具有优良的稳定性。

3.2 基于结构光照明的超分辨相位成像

传统 DHM 采用平行光照明,其空间分辨率受到物镜数值孔径的限制,不能完全满足生物医学对细胞超精细结构观测的需求。国内外众多学者对如何提高 DHM 的空间分辨率进行了大量的探索^[37-40]。为了提高对透明样品的成像分辨率,本文将结构照明和 DHM 相结合,提出了基于结构光照明的超分辨 DHM,其装置结构如图 6 所示^[41]。

从 He-Ne 激光器发出的激光($\lambda=632.8\text{ nm}$)经由透镜 L_1 和 L_2 组成的望远镜系统扩束准直成平行光,然后通过偏振片 P_1 变为水平线偏振光,经过非偏振分光棱镜正入射到一个反射式纯相位空间光调制器(SLM)上。在 SLM (PLUTO-2-VIS-096, HOLOEYE

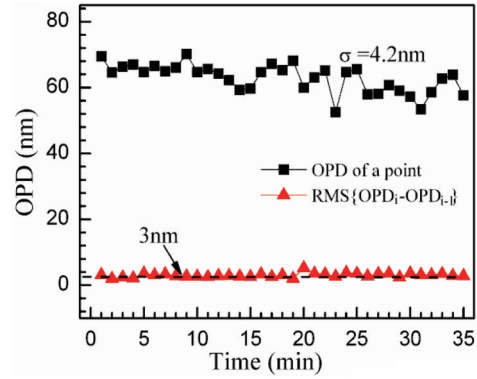
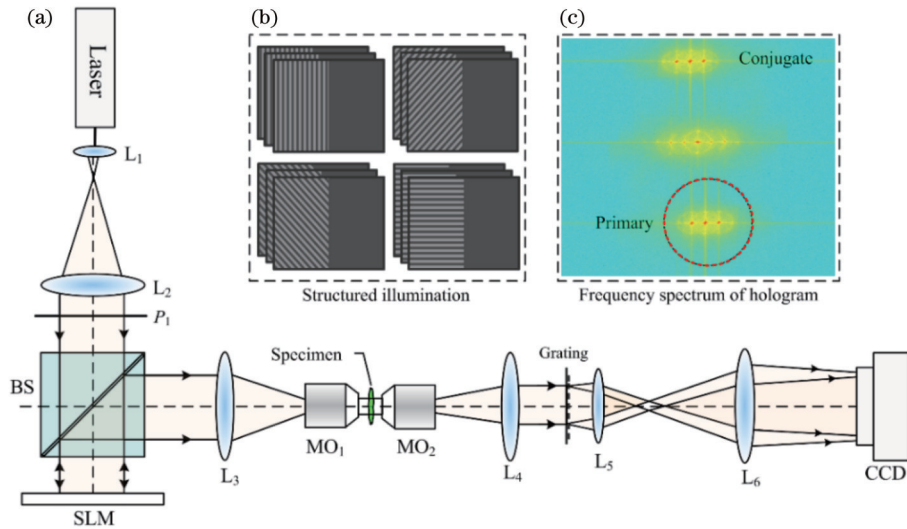


图 5 物参共路同步相移 DHM 装置的稳定性测试结果^[36]
Fig. 5 Stability test results for common-path simultaneous phase-shifting DHM^[36]

Photonics AG, Germany)上依次加载如图 6(b)中所示的 4 个方向(互成 45° 夹角)的结构光,并且每个方向下的结构光依次进行三步相移(相移量分别为 $2\pi/3$)。利用 SLM 产生结构照明,不但可以实现不同结构照明的快速切换,而且避免了传统机械切换带来的运动误差。结构照明光经望远镜系统(L_3 - MO_1)缩束后成像到样品表面。位于物镜 MO_2 ($10\times$, $NA=0.25$)物平面的上半部分样品被该调制光照明后形成物光,下半部分的调制光保持不变成为参考光。物光和参考光由物镜 MO_2 和透镜 L_4 组成的成像系统收集。经过二维光栅的衍射和透镜 L_5 和 L_6 组成的望远镜系统放大成像后,物光和参考光发生干涉。记录的全息图如图 7(a)所示,其频谱分布如图 6(c)所示。利用结构照明,可以将原本无法收集的样品的高频信息包含在低频的叠栅条纹中被物镜收集,然后通过特定的算法可



SLM: spatial light modulator; L_1 - L_2 : telescope system for expanding beam; L_3 - MO_1 : telescope system for projecting pattern on object; MO_2 - L_4 and L_5 - L_6 : telescope systems

图 6 基于结构光照明的 DHM 光路^[41]。(a) 光路图; (b) SLM 上加载的四组结构光; (c) 结构光照明下的全息图频谱
Fig. 6 Schematic of DHM setup with structured illumination^[41]. (a) Optical setup; (b) four groups of fringe patterns loaded in SLM; (c) frequency spectrum of generated hologram with structured illumination

以解码出样品的高频信息,实现成像分辨率的提升。图 7(b)是结构光照明下再现的粒子团样品的相位分布,对比图 7(c)中平行光照明下的再现结果可以清楚地看出,结构光照明下的成像分辨率明显提高。由定

量分析可知,当结构照明条纹的空间频率与显微成像物镜的最高空间频率相同时,结构光照明 DHM 的分辨率是平行光照明 DHM 的两倍。

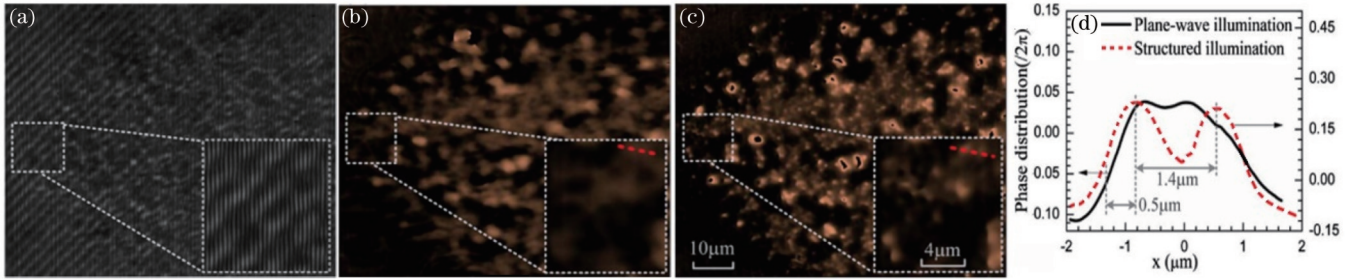


图 7 基于结构光照明的 DHM 实验结果^[41]。(a) 记录的离轴全息图;(b) 平行光照明下的相位再现结果;(c) 结构光照明下的相位再现结果;(d) 沿着(b)和(c)中绘制的两条线的相位分布

Fig. 7 Experimental results of DHM with structured illumination^[41]. (a) Recorded off-axis hologram; (b) reconstructed phase image using plane wave illumination; (c) reconstructed phase image using structured illumination; (d) phase distributions along two lines drawn in (b) and (c)

3.3 基于双波长照明的 DHM 的无包裹三维形貌再现

根据式(2)可知,由反正切运算直接计算得到的相位值分布在 $[-\pi, \pi)$ 之间。当样品引起的相位变化不超过 2π 时,可以直接计算得到目标的真实相位分布。但当样品引起的相位变化超过 2π 时,再现相位的数值被限制在 $[-\pi, \pi)$ 之间,会呈现出阶跃式的包裹分布,无法反映样品的真实信息。为了能够得到样品的真实相位,必须使用一定的方法将阶跃式的包裹相位还原为连续的相位或形貌分布。迄今为止,各种相位解包裹方法加起来已经超过几十种。它们基本上可以分为算法解包裹和多波长照明法两大类^[42]。前者虽然是解决相位包裹问题的常用方法,但解包裹计算往往涉及到大量的运算,耗时长,不能用于台阶状等纵宽比较大的样品的相位解包裹,且容易受到噪声的影响。而双波长照明则能够通过两个波长合成较长的“等效波长”来解决相位包裹问题,直接得到样品的形貌分布,其数

学表达式^[43]为

$$h = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_2 \lambda_1} \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{2\pi} = \Lambda_{12} \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{2\pi}, \quad (3)$$

式中: h 是被测样品的光学厚度; λ_1 和 λ_2 分别表示两束照明光的波长; φ_1 和 φ_2 分别表示波长 λ_1 和 λ_2 下的再现包裹相位; $\Lambda_{12} = \lambda_1 \lambda_2 / |\lambda_1 - \lambda_2|$ 为等效波长。该方法的优势在于通过两个包裹相位图的相减即可得到样品的形貌分布,不需要进行额外的复杂计算,再现速度快,最适用于实时观测的需要。但不足之处在于需要依次记录不同波长下的干涉图,并计算不同波长下的包裹相位分布,过程耗时较长。

为了解决上述问题,本文提出了一种基于单次曝光双波长数字全息相位无包裹恢复方法。利用彩色 CCD 贝尔滤光片的波长选择特性,可以从单次曝光记录的同轴彩色全息图 I 中分离出两幅单一波长的同轴全息图 I_1 和 I_2 ^[44]。

$$\begin{bmatrix} I_1 \\ I_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} a_{1r}^2 + a_{1g}^2 + a_{1b}^2 & a_{1r}a_{2r} + a_{1g}a_{2g} + a_{1b}a_{2b} \\ a_{1r}a_{2r} + a_{1g}a_{2g} + a_{1b}a_{2b} & a_{2r}^2 + a_{2g}^2 + a_{2b}^2 \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} a_{1r}I_R + a_{1g}I_G + a_{1b}I_B \\ a_{2r}I_R + a_{2g}I_G + a_{2b}I_B \end{bmatrix}, \quad (4)$$

式中: I_R 、 I_G 、 I_B 分别对应双波长全息图 I 中的红绿蓝(RGB)三个颜色分量; (a_{1r}, a_{1g}, a_{1b}) 和 (a_{2r}, a_{2g}, a_{2b}) 分别为 λ_1 和 λ_2 单一波长照明下贝尔滤光片对 RGB 颜色的透过系数,可以通过实验测出。根据式(4)可得

$$\begin{cases} O_1 \cos \varphi_1 = \frac{I_1 - B_1}{2R_1} \\ O_1 \sin \varphi_1 = \frac{I_2 - aI_1 \cos \varphi - aB_1(1 - \cos \varphi)}{2aR_1 \sin \varphi} \end{cases}, \quad (5)$$

式中: a 为 I_1 和 I_2 之间的比例系数,可以通过分别使用单一波长照明记录从实验中测量得到; $\varphi = \varphi_1 - \varphi_2$,为

同一样品在不同波长照明下的相位分布差; $B_i = |O_i|^2 + |R_i|^2$ ($i=1, 2$),为全息图中的背景强度,可以通过空间平均法直接从全息图中计算得到。由式(5)可得

$$\varphi = \cos^{-1} \left(\frac{-V \pm \sqrt{V^2 - 4UW}}{2U} \right), \quad (6)$$

式中: $U = 4aR_1^2(B_1 - R_1^2)$; $V = 2a(I_2 - aB_1)(B_1 - I_1)$; $W = (I_2 - aB_1)^2 + (I_1 - B_1)^2 a^2 - U$ 。结合式(3)和式(6),可以直接计算出样品的光学厚度 h 。然而式(6)有多个解,为了找出正确的解,引入判断函数:

$$\Delta E = \left| I_1 - \left[B_1 + 2\sqrt{R_1^2(B_1 - R_1^2)} \cos \frac{2\pi h}{\lambda_1} \right] \right| + \left| I_2 - a \left[B_1 + 2\sqrt{R_1^2(B_1 - R_1^2)} \cos \frac{2\pi h}{\lambda_2} \right] \right|, \quad (7)$$

有且只有正确的解才能使得该判断函数的数值最小。

为了验证上述方法的可行性,本文使用搭建的物参共路双波长同轴 DHM 装置^[45]对周期为 15 μm、占空比为 2:1、刻蚀深度为 1.50 μm 的相位光栅进行观测。装置的照明波长分别为红光 λ₁=632.8 nm 和蓝光 λ₂=

476 nm。直接记录得到的双色同轴全息图如图 8(a)所示,根据式(4)分离得到的单色红光和单色蓝光全息图分别如图 8(b)和 8(c)所示。利用所提方法直接再现得到的光栅形貌分布如图 8(d)所示,与传统离轴 DHM 的测量结果对比如图 8(e)所示。实验结果表明,所提方法只需单幅双波长全息图就可再现被测目标的光学厚度分布,无需相移或者其他操作,而且使用同轴记录,充分利用相机的空间带宽积,实现了高精度的定量相位成像。

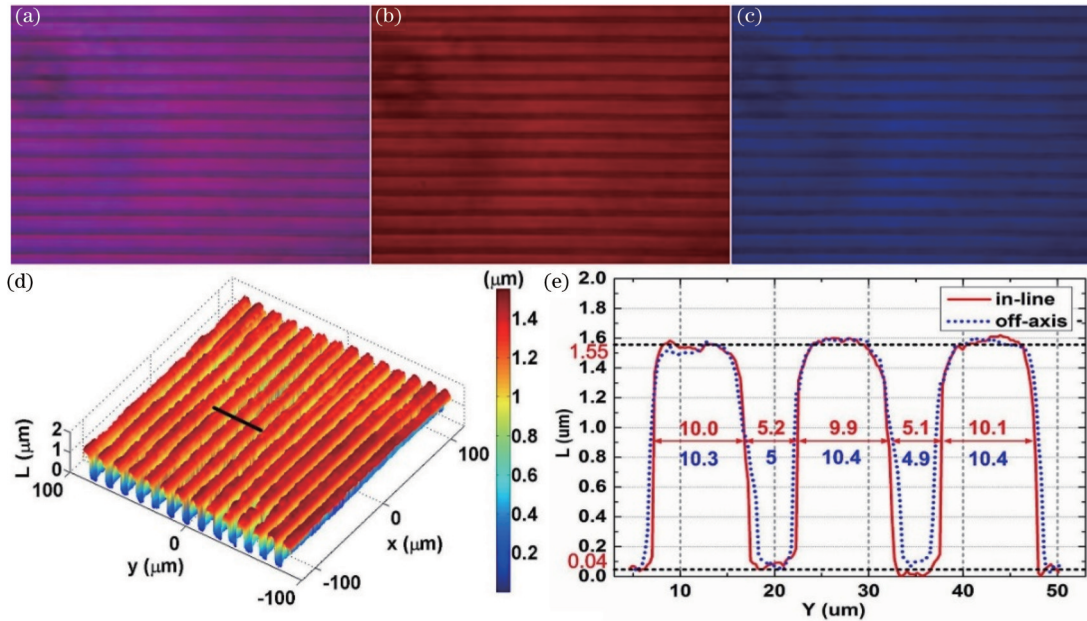


图 8 基于双波长照明的 DHM 的光栅形貌测量结果^[45]。(a) 记录的双色全息图;(b)、(c) 从图(a)中分离得到的红光和蓝光全息图;(d) 再现的光栅形貌分布;(e) 同轴与离轴全息测量结果的对比

Fig. 8 Experimental results of grating topography of DHM with dual-wavelength illumination^[45]. (a) Recorded dual-wavelength in-line hologram; (b), (c) red and blue light holograms extracted from (a); (d) reconstructed topography of grating; (e) comparison of in-line and off-axis holographic measurement results

3.4 基于低相干 LED 照明的高信噪比定量相位成像

目前大部分的 DHM 使用激光作为照明光源,全息图不可避免地受到激光相干噪声的干扰,影响相位测量精度。为了解决这个问题,人们提出了采用低相干 LED 光源作为照明光源的 DHM 技术。LED 光源相对于激光具有宽光谱的特点,是一种部分相干光源,相干长度短,可以有效消除相干噪声。但是,由于 LED 光源的相干长度通常是在数十微米量级,在离轴干涉记录时只能在部分视场中得到有限数量的干涉条纹,且条纹的对比度从中间向边缘逐渐降低,因此成像视场范围受到限制^[46]。

为了实现高质量的全视场定量相位成像,本文提出了一种基于 LED 照明的全视场 DHM 成像方法,确保全息图整个视场中都具有均匀且最优的条纹对比度^[47]。装置结构如图 9 所示,利用偏振片 P₁~P₃ 的组合将物光和参考光分别调制为水平偏振和竖直偏振。在出射的同轴传播的物光和参考光路上放置一个衍射

光栅 G,将物光和参考光衍射成不同方向的多束光,然后在透镜 L₄ 的后焦面上利用偏振滤波器使得 0 级只含物光,+1 级光中只含参考光。两者通过光栅衍射后,在透镜的后焦面上通过偏振滤波得到离轴的物光和参考光。由于 CCD 平面和光栅 G 共轭,根据费马原理,共轭面上每一点都是等光程的。因此,对于 CCD 平面上的每一点,物光和参考光到达时的光程差均为零,在整个记录平面上可得到良好对比度的干涉条纹。利用傅里叶变换法即可从记录的单幅离轴干涉图中高质量再现被测目标的相位分布,实现实时观测。

为了验证低相干光照明 DHM 的效果,利用上述装置对在硅片上加工的宽度为 8 μm、深度为 50 nm 的相位台阶进行观测。图 10(a)所示为记录的一幅像面全息图,图 10(b)所示为其频谱分布,图 10(c)所示为最终再现得到的台阶形貌分布。为了比较成像效果,将 LED 光源换成 He-Ne 激光,采用相同的实验装置对同一样品进行观测。图 10(d)~(e)分别为 He-Ne 激光

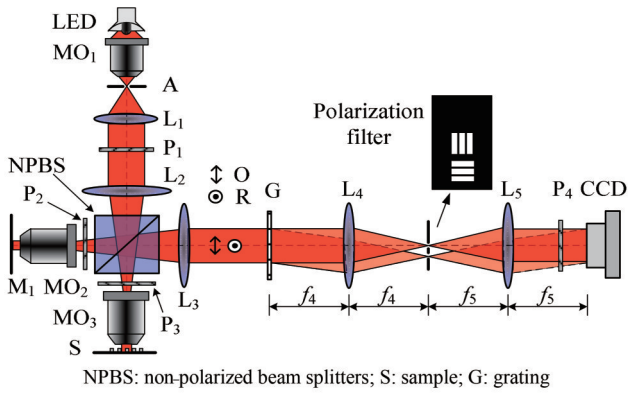


图 9 基于 LED 照明的 DHM 示意图^[47]
Fig. 9 Schematic of DHM with LED illumination^[47]

照明下同一产品的像面全息图及重建得到的物体形貌分布。图 10(f)给出了沿图 10(c)和 10(e)中的虚线方向的高度截面分布。从以上对比图中可以看出,两种光源照明下再现的测量结果整体符合。为了定量说明两者的相位噪声,在重建的位相图中分别选择了一块平整的区域,并计算这个区域的标准偏差作为衡量指标。图 10(c)和 10(e)中的相位噪声分别是 2.9 nm 和 9.1 nm,说明 LED 照明时的相位噪声相比于 He-Ne 激光照明时的噪声下降了约 68%。这种基于 LED 照明的 DHM 装置具有低相位噪声和实时测量的优点,为微纳结构、微机电系统(MEMS)表面的测量提供了一种高精度的解决手段,可用于运动物体或动态过程的实时观测。

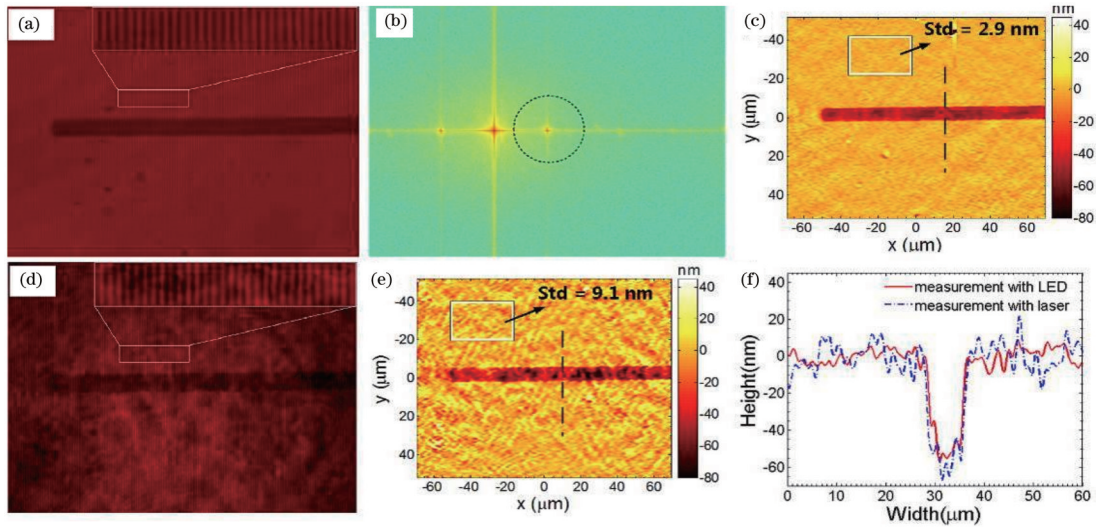


图 10 相位台阶样品实验结果对比^[47]。(a) LED 照明下记录的全息图(白色矩形框内区域被放大显示);(b)图(a)的空间频谱分布(圆虚线框表示频谱滤波范围);(c) LED 照明下再现的高度分布图;(d) He-Ne 激光照明下记录的全息图;(e) He-Ne 激光照明下再现的高度分布图;(f) 沿图(c)和(e)中虚线方向的高度截面分布

Fig. 10 Comparison of experimental results on phase-step sample^[47]. (a) Recorded hologram with LED illumination (area inside white rectangular box is enlarged displayed); (b) Spatial spectral distribution of (a) (circle dashed box represents spectral filtering range); (c) reconstructed height distribution with LED illumination; (d) recorded hologram with He-Ne laser illumination; (e) reconstructed height distribution reconstructed with He-Ne laser illumination; (f) height profiles at cross sections marked with dashed lines in (c) and (e)

3.5 基于结构光照明和双波长照明的自动调焦方法

传统的光学显微镜需要通过手动或电动调焦才能获得物体的清晰图像,往往不利于运动物体或动态过程的实时观测。在定量相位成像中,样品轻微的离焦会直接降低相位测量精度。DHM 可以获得被测样品的复振幅分布,通过计算机对再现出的物光复振幅进行衍射传播计算实现数字调焦,最后获得清晰的图像。如何自动探测全息图到物体像面的距离是实现自动调焦的关键。已有的许多自动调焦方法只适用于纯振幅样品或纯相位样品,尚不能应用于更一般的样品^[48]。

在之前工作的基础上,本文分别提出了基于结构

光照明的自动调焦方法^[41]和基于双波长照明的自动调焦方法^[49],以满足不同条件下对振幅型和相位型目标的长时间连续观测。基于结构光照明的自动调焦原理是:结构光照明可以看作沿不同方向传播的平面波(结构光的 0、±1 衍射光)的叠加。样品在结构光的照明下,形成三个独立的物光分别沿着结构光的 0、±1 级衍射光方向传播,它们的再现像只在像面上才会重合。方便起见,将在第 m 个方向结构光照明下的物光分记为 $O_{m,0}$ 、 $O_{m,+1}$ 和 $O_{m,-1}$,分别沿着结构光的 0、±1 衍射光方向传播。当这些物光分量之间差异最小时,此时对应的平面即为样品的像面。因此,可定义评价函数^[41]:

$$\text{Cri}(d) = \frac{\sum_{m=1}^4 \text{RMS}\{|O_{m,+1}| + |O_{m,-1}| - 2|O_{m,0}|\}}{M_O} + \frac{\sum_{m=1}^4 \text{RMS}\{\varphi_{m,+1} + \varphi_{m,-1} - 2\varphi_{m,0}\}}{M_\varphi}, \quad (8)$$

式中: $\text{RMS}\{\cdot\}$ 表示均方根运算; $\varphi_{m,+1}$ 、 $\varphi_{m,-1}$ 和 $\varphi_{m,0}$ 分别

是 $O_{m,+1}$ 、 $O_{m,-1}$ 和 $O_{m,0}$ 的相位分布。 M_O 和 M_φ 是加权因子, 可以由实验测量得到。由式(8)计算的评价函数曲线的最小值所对应的离焦距离即为样品的最佳聚焦距离。该自动调焦机制不依赖于被测样品本身的特性和其他先验知识, 使得该方法能同时适用于振幅型和相位型物体。

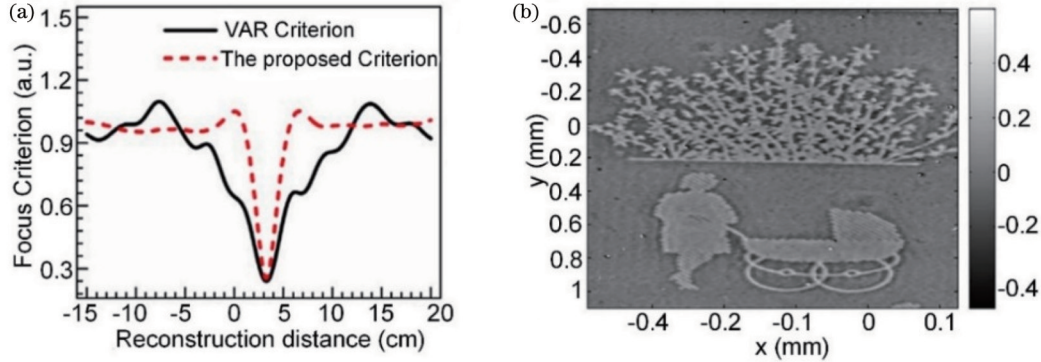


图 11 基于结构照明的 DHM 的自动调焦实验结果^[41]。(a) 基于 VAR 和所提方法的焦点标准; (b) 利用最佳聚焦距离 ($\Delta z = 3.2$ cm) 重建的相位图像

Fig. 11 Experimental results for autofocusing of DHM based on structured illumination^[41]. (a) Focus criterions by amplitude variation (VAR) and proposed method; (b) reconstructed phase image with optimal focusing distance ($\Delta z = 3.2$ cm)

为了证明上述方法的可行性, 利用之前的结构光照明 DHM 装置(图 6)来进行实验验证。样品像面到 CCD 靶面之间的距离为 3.2 cm。再现过程中, 数字再现距离的变化 Δz 在 $-15 \sim 20$ cm 之间, 每次改变 0.2 cm。以刻蚀有图像的纯透明玻璃平板作为样品, 实验结果如图 11 所示。从测试结果可以看出, 所提方法与强度变化自动聚焦法 (VAR) 相比, 均在 $\Delta z = 3.2$ cm 处取得全局最小值, 利用该值可再现出清晰的相位图像, 验证了基于结构光照明自动聚焦的可行性。

双波长衍射差异自动调焦法的基本原理是: 当样品固定放置好之后, 样品像面到 CCD 记录靶面之间的距离不随照明光波的改变而变化。根据光场衍射的独立传播特性, 两束不同波长的照明光可以分别再现得到同一样品的两幅再现像。由于 λ_1 和 λ_2 波长不同且没有公因子, 两个再现像之间差值将随着再现距离的不同而发生变化。当再现像面与样品理想像面的位置重合时, 两个归一化的再现像之间的差值最小, 边缘最锐利。当再现像面远离理想像面时, 归一化再现像之间的差值将随着再现像面与理想样品像面之间距离的增大而增大。因此, 可以建立如下的自动聚焦判据^[49]:

$$\text{Cri}(\Delta z) = \frac{1}{MN} \sum_{x=1}^M \sum_{y=1}^N (u - \bar{u})^2, \quad (9)$$

式中: M 、 N 分别表示再现像面 x 、 y 方向上的像素数; $u = A_1/A_{10} - A_2/A_{20}$, A_1 和 A_2 分别为 λ_1 和 λ_2 再现像的振幅; A_{10} 和 A_{20} 为空载时的背景振幅; \bar{u} 表示 u 的平均值。当判据函数值 $\text{Cri}(\Delta z)$ 最小时, λ_1 和 λ_2 的再现像面即为样品像面。

为了证明上述方法的可行性, 利用之前的双波长

DHM 装置来进行实验验证。以相位台阶为样品, 样品像面到 CCD 靶面之间的距离为 15 cm。再现过程中, 数字再现距离的变化 Δz 在 $-30 \sim 50$ cm, 每次改变 2.5 cm。图 12(a)~(c) 分别为 $\Delta z = 0$ cm、 $\Delta z = 7.5$ cm 和 $\Delta z = 15$ cm 时的两波长再现像之差。从图中可以看出, 当再现像面远离样品像面时, 双波长再现像之间的像差边缘将出现明显的边缘衍射。随着再现像面向样品像面靠近, 该衍射效果逐渐变小。当 $\Delta z = 15$ cm 时, 衍射现象基本消失, $\text{Cri}(\Delta z)$ 最小, 此时的再现距离即为所求的聚焦距离, 与实际情况相符。图 12(d) 为 $\Delta z = 15$ cm 时的红光再现相位分布。

将双波长衍射差异自动调焦法和梯度引导自动调焦法 (GRA)、强度变化自动调焦法 VAR 进行对比, 三种自动调焦方法聚焦过程的评价函数曲线如图 12(e) 所示。结果表明, 三种自动调焦方法都可以找到最佳成像面 $\Delta z = 15$ cm 的位置, 聚焦结果基本一致, 证明了双波长衍射差异自动聚焦法的可行性。与其他自动调焦方法相比, 该方法判据简单, 通过再现像之间的差异变化即可方便地确定最佳成像面, 不需要繁琐的迭代计算过程, 处理速度相对较快。但需要注意的是, 上述方法要求装置具有良好的消色差特性, 且样品对两照明光波无吸收差异。

4 结 论

DHM 作为定量相位成像领域中具有重要影响力并得到广泛应用的代表性成果之一, 在生物医学、材料科学、工业检测、流场显示等研究领域发挥着越来越重要的作用。本文围绕高精度定量相位显微成像方法的

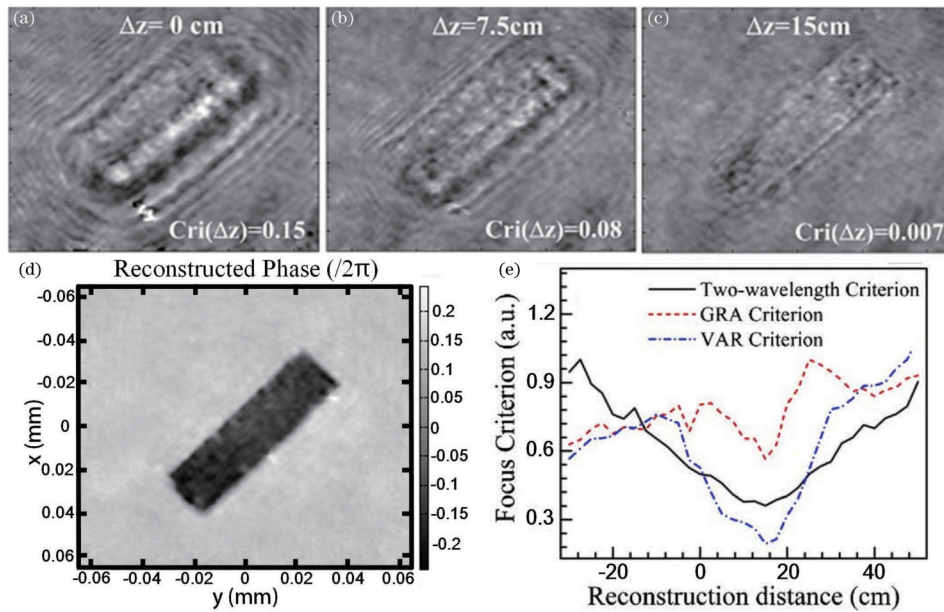


图 12 双波长衍射差法自动调焦实验结果^[49]。(a)~(c) 再现距离分别为 $\Delta z=0$ 、 $\Delta z=7.5$ cm 和 $\Delta z=15$ cm 时双波长再现像之间的差异；(d) $\Delta z=15$ cm 时的红光再现样品的相位分布；(e) 不同自动调焦方法之间的评价函数曲线对比

Fig. 12 Experimental results of autofocusing using dual-wavelength diffraction difference method^[49]. (a)~(c) Differences between dual-wavelength reconstructed images with $\Delta z=0$, 7.5, and 15 cm, respectively; (d) reconstructed phase distribution of specimen for red light with $\Delta z=15$ mm; (e) comparison of evaluation function curves between different autofocusing methods

理论和技术问题,在提高测量精度和稳定性、提高横向空间分辨率、扩大纵向无包裹测量范围、抑制相干噪声、实现图像自动调焦等方面开展了系统的研究。提出了物参共路同步相移 DHM 方法,为稳定的高精度实时相位测量奠定了基础,适用于工业在线检测等具有较大振动的观测场景中。结合结构光照明超分辨成像技术,将 DHM 的成像分辨率提升了一倍,可以用于对细胞器或纳米器件等超微目标的观测;提出了基于双波长照明的无包裹相位再现方法,将纵向无包裹相位测量范围提高一个量级,满足对较厚目标的观测需求。设计了基于 LED 照明的 DHM 成像系统,有效解决了激光照明相干噪声对相位测量精度有影响的问题,提升了方法的观测精度;提出了基于结构光照明和双波长照明的 DHM 自动调焦方法,可以实现对活体细胞等运动样品的长时间跟踪观测。期望上述研究成果能为构建高性能 DHM 提供有益的帮助。

参 考 文 献

- [1] Nguyen T L, Pradeep S, Judson-Torres R L, et al. Quantitative phase imaging: recent advances and expanding potential in biomedicine[J]. ACS Nano, 2022, 16(8): 11516-11544.
- [2] Schnars U, Jüptner W P O. Digital holography: digital hologram recording, numerical reconstruction, and related techniques[M]. New York: Springer, 2005.
- [3] Kemper B, Illy E. Digital holographic microscopy[J]. Photonics Views, 2020, 17(1): 32-35.
- [4] 戴思清, 豆嘉真, 张继巍, 等. 基于数字全息术的近场成像与应用[J]. 光学学报, 2020, 40(1): 0111008.
Dai S Q, Dou J Z, Zhang J W, et al. Digital holography based near-field imaging and its application[J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(1): 0111008.
- [5] Bai C, Peng T, Min J W, et al. Dual-wavelength in-line digital holography with untrained deep neural networks[J]. Photonics Research, 2021, 9(12): 2501-2510.
- [6] de Groot P J, Deck L L, Su R, et al. Contributions of holography to the advancement of interferometric measurements of surface topography[J]. Light: Advanced Manufacturing, 2022, 3(2): 258-277.
- [7] 高阳子, 王骏, 唐家斌, 等. 基于脉冲数字全息干涉术的云滴谱离散度研究[J]. 光学学报, 2022, 42(6): 0609001.
Gao Y Z, Wang J, Tang J B, et al. Dispersion of cloud droplet based on pulsed digital holographic interferometry[J]. Acta Optica Sinica, 2022, 42(6): 0609001.
- [8] 张美娟, 夏海廷, 宋庆和, 等. 多相机数字全息测量物体三维变形方法研究[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(16): 1609001.
Zhang M J, Xia H T, Song Q H, et al. 3D deformation measurement method of multi-camera digital holography[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(16): 1609001.
- [9] 刘雅坤, 肖文, 车蕾平, 等. 基于数字全息显微层析的癌细胞空泡化成像研究[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007209.
Liu Y K, Xiao W, Che L P, et al. Study on cavitation imaging of cancer cells based on digital holographic microscopy[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007209.
- [10] Kemper B, von Bally G. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection[J]. Applied Optics, 2007, 47(4): A52-A61.
- [11] Verpillat F, Joud F, Desbiolles P, et al. Dark-field digital holographic microscopy for 3D-tracking of gold nanoparticles[J]. Optics Express, 2011, 19(27): 26044-26055.
- [12] 王华英, 刘飞飞, 廖薇, 等. 优化的数字全息显微成像系统[J]. 物理学报, 2013, 62(5): 054208.
Wang H Y, Liu F F, Liao W, et al. Optimized digital micro-holographic imaging system[J]. Acta Physica Sinica, 2013, 62(5): 054208.
- [13] Balasubramani V, Kujawińska M, Allier C, et al. Roadmap on

- digital holography-based quantitative phase imaging[J]. *Journal of Imaging*, 2021, 7(12): 252.
- [14] Schnars U, Kreis T M, Jueptner W P O. Digital recording and numerical reconstruction of holograms: reduction of the spatial frequency spectrum[J]. *Optical Engineering*, 1996, 35(4): 977-982.
- [15] Liu L, Shan M G, Zhong Z, et al. Simultaneous dual-wavelength off-axis flipping digital holography[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(21): 4331-4334.
- [16] Anand A, Chhaniwal V, Javidi B. Tutorial: common path self-referencing digital holographic microscopy[J]. *APL Photonics*, 2018, 3(7): 071101.
- [17] Cuhe E, Bevilacqua F, Depeursinge C. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging[J]. *Optics Letters*, 1999, 24(5): 291-293.
- [18] 范琦, 赵建林, 向强, 等. 改善数字全息显微术分辨率的几种方法[J]. *光电子·激光*, 2005, 16(2): 226-230.
Fan Q, Zhao J L, Xiang Q, et al. Methods of improving resolution of digital holographic microscopy[J]. *Journal of Optoelectronics·Laser*, 2005, 16(2): 226-230.
- [19] Osten W, Faridian A, Gao P, et al. Recent advances in digital holography[J]. *Applied Optics*, 2014, 53(27): G44-G63.
- [20] 王永红, 陈维杰, 钟诗民, 等. 相位解包裹技术及应用研究进展[J]. *测控技术*, 2018, 37(12): 1-7, 16.
Wang Y H, Chen W J, Zhong S M, et al. Research progress in phase unwrapping technology and its applications[J]. *Measurement & Control Technology*, 2018, 37(12): 1-7, 16.
- [21] Guo X M, Li Y X, Qian J, et al. Unifying temporal phase unwrapping framework using deep learning[J]. *Optics Express*, 2023, 31(10): 16659-16675.
- [22] Turko N A, Eravuchira P J, Barnea I, et al. Simultaneous three-wavelength unwrapping using external digital holographic multiplexing module[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(9): 1943-1946.
- [23] Gass J, Dakoff A, Kim M K. Phase imaging without 2π ambiguity by multiwavelength digital holography[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(13): 1141-1143.
- [24] 王大勇, 王云新, 郭莎, 等. 基于多角度无透镜傅里叶变换数字全息的散斑噪声抑制成像研究[J]. *物理学报*, 2014, 63(15): 154205.
Wang D Y, Wang Y X, Guo S, et al. Research on speckle denoising by lensless Fourier transform holographic imaging with angular diversity[J]. *Acta Physica Sinica*, 2014, 63(15): 154205.
- [25] Doblas A, Sánchez-Ortiga E, Martínez-Corral M, et al. Study of spatial lateral resolution in off-axis digital holographic microscopy[J]. *Optics Communications*, 2015, 352: 63-69.
- [26] Bianco V, Memmolo P, Paturzo M, et al. Quasi noise-free digital holography[J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5(9): e16142.
- [27] 王阳, 张美玲, 王宇, 等. 部分相干光照明的数字全息显微技术及应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(18): 1811005.
Wang Y, Zhang M L, Wang Y, et al. Partially coherent illumination-based digital holographic microscopy and its applications[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(18): 1811005.
- [28] Gao P, Yuan C J. Resolution enhancement of digital holographic microscopy via synthetic aperture: a review[J]. *Light: Advanced Manufacturing*, 2022, 3(1): 105-120.
- [29] Yu L F, Cai L L. Iterative algorithm with a constraint condition for numerical reconstruction of a three-dimensional object from its hologram[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2001, 18(5): 1033-1045.
- [30] 刘长庚, 王大勇, 张亦卓, 等. 数字全息成像中基于导数的自动对焦算法[J]. *中国激光*, 2009, 36(11): 2989-2996.
Liu C G, Wang D Y, Zhang Y Z, et al. Derivatives-based autofocus algorithms for the digital holographic imaging[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2009, 36(11): 2989-2996.
- [31] Langehanenberg P, von Bally G, Kemper B. Autofocusing in digital holographic microscopy[J]. *3D Research*, 2011, 2: 4.
- [32] Wen Y F, Wang H Y, Anand A, et al. A fast autofocus method based on virtual differential optical path in digital holography: theory and applications[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2019, 121: 133-142.
- [33] Zhang Y Y, Huang Z Z, Jin S Z, et al. Autofocusing of in-line holography based on compressive sensing[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2021, 146: 106678.
- [34] Kreis T, Adams M, Jueptner W. Methods of digital holography: a comparison[J]. *Proceedings of SPIE*, 1997, 3098: 224-233.
- [35] Popescu G, Ikeda T, Goda K, et al. Optical measurement of cell membrane tension[J]. *Physical Review Letters*, 2006, 97(21): 218101.
- [36] Gao P, Yao B L, Min J W, et al. Parallel two-step phase-shifting point-diffraction interferometry for microscopy based on a pair of cube beam splitters[J]. *Optics Express*, 2011, 19(3): 1930-1935.
- [37] Liu C, Liu Z G, Bo F, et al. Super-resolution digital holographic imaging method[J]. *Applied Physics Letters*, 2002, 81(17): 3143-3145.
- [38] Lin Q W, Wang D Y, Wang Y X, et al. Super-resolution imaging in digital holography by using dynamic grating with a spatial light modulator[J]. *Optics and Lasers in Engineering*, 2015, 66: 279-284.
- [39] Bianco V, Wang Z, Cui Y, et al. Resolution gain in space-time digital holography by self-assembling of the object frequencies[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(17): 4248-4251.
- [40] Chang X Y, Bian L H, Gao Y H, et al. Plug-and-play pixel super-resolution phase retrieval for digital holography[J]. *Optics Letters*, 2022, 47(11): 2658-2661.
- [41] Gao P, Pedrini G, Osten W. Structured illumination for resolution enhancement and autofocus in digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(8): 1328-1330.
- [42] Ghiglia D C, Pritt M D. Two-dimensional phase unwrapping: theory, algorithms, and software[M]. New York: Wiley, 1998.
- [43] Khmaladze A, Matz R L, Zhang C, et al. Dual-wavelength linear regression phase unwrapping in three-dimensional microscopic images of cancer cells[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(6): 912-914.
- [44] Min J W, Yao B L, Gao P, et al. Dual-wavelength slightly off-axis digital holographic microscopy[J]. *Applied Optics*, 2012, 51(2): 191-196.
- [45] Min J W, Zhou M L, Yuan X, et al. Optical thickness measurement with single-shot dual-wavelength in-line digital holography[J]. *Optics Letters*, 2018, 43(18): 4469-4472.
- [46] Wang Z, Millet L, Mir M, et al. Spatial light interference microscopy (SLIM)[J]. *Optics Express*, 2011, 19(2): 1016-1026.
- [47] Guo R L, Yao B L, Gao P, et al. Off-axis digital holographic microscopy with LED illumination based on polarization filtering [J]. *Applied Optics*, 2013, 52(34): 8233-8238.
- [48] 王宇, 温凯, 张美玲, 等. 数字全息显微中自动调焦技术及其应用(封面文章)(特邀)[J]. *红外与激光工程*, 2021, 50(2): 20200530.
Wang Y, Wen K, Zhang M L, et al. Design method of infrared microscope optical system with lower aberration compensation (Cover paper) (Invited) [J]. *Infrared and Laser Engineering*, 2021, 50(2): 20200530.
- [49] Gao P, Yao B L, Rupp R, et al. Autofocusing based on wavelength dependence of diffraction in two-wavelength digital holographic microscopy[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(7): 1172-1174.

Research on High-Precision Quantitative Phase Microscopy Imaging Methods

Min Junwei¹, Gao Peng², Dan Dan¹, Zheng Juanjuan², Yu Xianghua¹, Yao Baoli^{1*}

¹State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710119, Shaanxi, China;

²School of Physics, Xidian University, Xi'an 710071, Shaanxi, China

Abstract

Significance Phase is one of the important attributes of light waves, and its distribution directly affects the spatial resolution of optical imaging and is related to the three-dimensional topography of objects or the refractive index distribution of transparent objects. However, the phase distribution of light waves cannot be directly detected. How to accurately obtain the phase distribution of light waves has become a hotspot in the field of optics. The invention of phase-contrast microscopy has opened the curtain of phase imaging, which has epoch-making significance. It successfully converts the phase distribution of light waves into intensity changes, solving the problem of difficult direct microscopic observation of transparent samples such as cells.

Nevertheless, the conversion between phase distribution and intensity change is not a linear relationship in phase contrast microscopy, resulting in phase information that cannot be observed quantitatively. By measuring the phase of light waves, the three-dimensional topography or refractive index distribution of transparent objects can be quantitatively obtained. The refractive index is one of the essential characteristic physical quantities that reflect the internal structure and state of the sample. Therefore, conducting quantitative phase microscopy methods has scientific significance. Quantitative phase imaging has important application value in industrial detection, biomedicine, special beam generation, adaptive optics imaging, and synthetic aperture telescopes.

The current quantitative phase microscopy imaging technology mainly obtains the quantitative distribution of phase through interference. Therefore, factors such as the stability of interference devices, limitations on optical diffraction, phase wrapping, coherent noise generated by laser illumination, and sample refocusing during dynamic observation affect the imaging resolution and accuracy of quantitative phase microscopy. Thus, systematic and in-depth research on improving measurement accuracy and stability, spatial resolution, expanding the longitudinal measurement range, suppressing coherent noise, and autofocusing of quantitative phase microscopy imaging has been carried out. A theoretical and technical system centered on high-precision quantitative phase microscopy imaging has been formed.

Progress A simultaneous phase shift digital holographic microscopy (DHM) with a common-path configuration has been proposed, which allows the object light and reference light to share the same optical path and components, solving the impact of environmental disturbances on phase imaging fundamentally (Fig. 3), simultaneously recording multiple phase-shift interferograms within one exposure and achieving real-time high-precision quantitative phase imaging. The optical path fluctuation of the system is only 3 nm within 35 min, and the real-time phase microscopy imaging accuracy reaches 4.2 nm, which is 2.2 times the accuracy of conventional off-axis interference quantitative phase microscopy imaging (Fig. 5). A super-resolution quantitative phase imaging method based on structural illumination has been proposed. Using the structured light illumination, the spatial resolution of quantitative phase microscopy can be doubled when the spatial frequency of the structural illumination stripe is the same as the highest spatial frequency of the microscopic objective, and super-resolution phase imaging is realized (Fig. 7). A slightly off-axis interference dual-wavelength illuminated digital holographic microscopy has been proposed to expand the longitudinal unwrapped phase measurement range from the wavelength to the micrometer level (Fig. 8), meeting the high-precision phase imaging requirements of thicker samples. Using a low-coherence LED as an illumination light source, the coherent noise in the common laser-illuminated DHM can be reduced by 68% (Fig. 10), and the signal-to-noise ratio (SNR) of images can be improved. The phase measurement accuracy is 2.9 nm, providing a high-precision solution for the measurement of micro/nano structures and micro electro mechanical system (MEMS) surfaces. Two autofocusing methods based on dual-wavelength illumination and dual beam off-axis illumination have been proposed to meet the autofocusing requirements of high-resolution quantitative phase microscopy imaging for long-term tracking and observation of samples under different conditions (Fig. 11). The former does not rely on the characteristics of the tested sample or other prior knowledge, making it suitable for both amplitude and phase objects. The latter has a simple criterion and can easily determine the optimal imaging surface by reproducing the differences and changes between images, without the need for tedious iterative calculation and with relatively fast

processing speed.

Conclusions and Prospects Digital holographic microscopy is one of the representative achievements with significant influence and widespread application in the field of quantitative phase imaging, playing an increasingly important role in biomedical, material science, industrial testing, flow field display research, and other fields. We focused on the theoretical and technical issues of high-precision quantitative phase imaging and conducted systematic research on improving measurement accuracy and stability, improving lateral spatial resolution, expanding longitudinal unwrapped measurement range, suppressing coherent noise, and achieving automatic image focusing. With the promotion and application of quantitative phase microscopy imaging technology in other fields such as biological research, high-precision quantitative phase topography microscopy imaging methods will be our future research direction. It is expected that quantitative phase microscopy imaging technology can play a greater role in industrial testing, materials science, and biomedical fields, becoming an indispensable tool for studying the micro world.

Key words quantitative phase microscopy imaging; common path for object light and reference light; structured illumination; phase unwrapping; autofocusing