

界面折射率不一致对显微成像穿透深度的限制*

高万荣¹ 胡茂海¹ 杨晓春¹ 张仙玲¹ 谢仁龙¹ 沈为民²

(1 南京理工大学电光学院, 南京 210094)
(2 苏州大学现代光学技术研究所, 苏州 215006)

摘 要 在运用共焦显微术及低相干显微成像术等进行光学断层成像时, 要将光束聚焦到样品内部以便实现光学断层成像, 然而由于生物组织等的折射率与盖玻璃以及浸液不同, 因而会引入很大的球差, 从而使入射电磁波发生畸变. 分析了由于多层折射率不一致而引入的球差的大小, 并运用所得的公式计算了折射率不一致对光在样品中穿透深度及焦面附近光场分布的影响.

关键词 折射率; 显微成像; 穿透深度

中图分类号 TH74 **文献标识码** A

0 引言

共焦显微术与多光子显微成像术等先进显微成像技术的理论与产品开发方面的巨大进展, 使得生物医学工作者非侵入式地研究生物组织内部结构和功能成为可能. 因为这些新的成像技术非侵入式地对样品内部实现光学断层成像, 并进而借助于计算机合成被研究样品的三维图象^[1~8]. 我们知道, 不可能设计一个对物空间所有点都成完善象的光学系统. 因此, 在传统的显微镜的设计中, 使其满足正弦条件, 以便它可以在一对固定的共轭面之间成高质量的图象. 这样, 为了对位于一定深度的物体进行成像, 就必须将其移到所设计的物面上. 否则, 将引入球差, 因为破坏了赫希尔条件. 同样, 由于在共焦显微术与多光子显微成像术中, 也采用普通的显微物镜, 当对位于样品表面下的生物结构成断层图象时, 样品必定位于显微物镜的设计物面以外, 而生物组织的折射率与外部介质如空气、浸液及盖玻璃等也不同, 因而会引入球差等. 由此可见, 为了能最有效地利用这种成像技术, 即为了正确的解释所获得的图象与生物组织的结构和功能之间的关系, 以及为了评价和优化所设计的系统, 就有必要分析由于界面折射率不一致对显微成像穿透深度以及焦点区域光分布的影响等.

Sheppard 等研究了由于界面折射率不一致对共焦显微成像质量的影响^[1], Smithpeter 等则运用信噪比及信号背景比分析的方法研究了共焦显微成像的穿透深度极限^[2]. 本文提出一种分析由于界面折射率不一致而产生的对显微成像深度的影响的方法, 并将所得的结果与用信号背景比所得的结果进行了比较. 利用所得的结果, 还可以分析界面折射率不一致对焦面附近光场分布的影响等.

1 基本理论

如图 1 所示为显微成像时光束会聚的简图. 一束平行光入射到物镜上. 由物镜出射的光束经过浸液介质(小数值孔径时为空气)及盖玻璃后会聚到生物组织等的样品内一点. 由于生物组织内部组织折射率不均匀而后向散射的光, 或者由样品中激发出来的荧光再经过物镜会聚后供目镜观察或者用光电倍增管等探测器在像面上探测. 显然, 为了获得高质量的显微图像, 显微物镜在样品中的聚焦点必须有足够好的能量分布, 如衍射斑必须足够小, 以便只探测来自一个极小区域的信号. 然而, 生物组织的折射率为 $n_3 = 1.38 \sim 1.41$, 盖玻璃的折射率 $n_2 = 1.516$, 空气的折射率为 $n_1 = 1$ 等. 对于大数值孔径的高倍显微镜, 一般用阿贝型油浸物镜来实现, 常用的浸液是杉林油, 其折射率 $n_1 = 1.515$. 这种折射率的不一致会使由物镜出射的光束发出畸变. 因此为了获得高质量的图像, 有必要对这畸变的大小进行计算, 从而分析其对光束穿透深度等的影响.

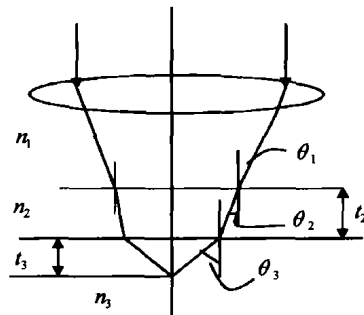


图 1 显微成像光束会聚简图
Fig. 1 Diagram showing light focused by a microscopic objective lens into tri-level media separated by planar interfaces

设光线在盖玻璃上的入射角和折射角为 θ_1 和 θ_2 , 在样品表面上的折射角为 θ_3 , 则由盖玻璃引入的相位误差可以表示为^[1]

$$\phi_1 = kt_2(n_2 \cos \theta_2 - n_1 \cos \theta_1) \quad (1)$$

在样品表面上折射时引入的相位误差为

$$\phi_2 = kt_3(n_3 \cos \theta_3 - n_2 \cos \theta_2) \quad (2)$$

* 苏州大学现代光学技术省重点实验室开放课题(项目号: KJS01002)和南京理工大学青年基金(Njust200302)资助
Tel: 025-84315084 Email: gaowangrong@yahoo.com
收稿日期: 2004-04-23

式中 $k=2\pi/\lambda$ 为波数, λ 为照明波长, t_2 为盖玻璃的厚度, t_3 为光在样品中的聚焦深度, n_1 、 n_2 及 n_3 分别是浸液, 盖玻璃及生物组织的折射率. 我们采用 Sheppard 等^[1]的方法, 将波前像差展开为 $\sin(\theta/2)$ 的幂级数. 利用折射定律得

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (3)$$

$$n_2 \sin \theta_2 = n_3 \sin \theta_3 \quad (4)$$

因此得

$$n_1 \sin \theta_1 = n_3 \sin \theta_3 \quad (5)$$

$$\cos \theta_1 = 1 - 2s^2 \quad (6)$$

$$\cos \theta_2 = \left[1 - \frac{4n_1^2}{n_2^2} s^2 (1 - s^2) \right]^{1/2} \quad (7)$$

$$\cos \theta_3 = \left[1 - \frac{4n_1^2}{n_3^2} s^2 (1 - s^2) \right]^{1/2} \quad (8)$$

式中 $s = \sin(\theta_1/2)$. 利用式(5)~(8), 将波前像差 ϕ_1 与 ϕ_2 展开为 s 的幂级数

$$\phi_1 = kt_2(n_2 - n_1) \left(1 + \frac{2n_1^2}{n_2} s^2 + 2(n_2 + n_1) \frac{n_1^2}{n_2^2} s^4 + \dots \right) \quad (9)$$

$$\phi_2 = kt_3(n_3 - n_2) \left(1 + \frac{2n_1^2}{n_2 n_3} s^2 + \frac{n_1^2(n_2^2 + n^2 n_3 n_3^2) - n_2^2 n_3^2}{n_3^3 n_3^2} \right) + \dots \quad (10)$$

式中 s^2 项表示由于折射率不一致而引入的离焦, s^4 项即表示初级球差等.

因此, 总的球差系数为

$$W_{40} = 2kt_2(n_2^2 - n_1^2) \frac{n_1^2}{n_2} + kt_3(n_3 - n_2) \times \left(\frac{n_1^2(n_2^2 + n^2 n_3 + n_3^2) - n_2^2 n_3^2}{n_3^3 n_3^2} \right) \sin^4(\theta/2) \quad (11)$$

如果折射率之差 Δn 较小, 即如果

$$\Delta n_1 = n_2 - n_1 \quad (12)$$

$$\Delta n_2 = n_3 - n_2 \quad (13)$$

较小, 则我们忽略掉 Δn 的二次方以上的项, 从而得到

$$W_{40} = 2kt_2(n_1 + n_2) \frac{n_1^2}{n_2} \Delta n_1 + kt_3 \frac{n^2 + n^3}{n_2^2 n_3^2} \Delta n_2 \quad (14)$$

为了获得高质量的成像质量, 最大相位差必须小于 $\pi/2$, 因此得到

$$\phi_{\max} = \left[2kt_2(n_1 + n_2) \frac{n_1^2}{n_2} \Delta n_1 + kt_3 \frac{n^2 + n^3}{n_2^2 n_3^2} \Delta n_2 \right] \leq \frac{\pi}{2} \quad (15)$$

由式(15)便可得出由于折射率不一致而对显微镜在样品中光学断层成像深度的限制, 即

$$t_3 \leq \frac{\left[\frac{1}{2} - \frac{4}{\lambda} t_2 (n_1 + n_2) \frac{n_1^2}{n_2} \Delta n_1 \right]}{\frac{2}{\lambda} \frac{n^2 + n^3}{n_2^2 n_3^2} \Delta n_2} \quad (16)$$

2 结果分析

上面分析了由于折射率不一致而引入的球差对

显微成像穿透深度的影响. Smithpeter 等^[3]则利用实验的方法研究了在探测典型的生物组织的内部结构时, 利用共焦显微成像技术所可能实现的最大探测深度. 他们发现, 当无量纲的探测小孔半径 v_p 定义为 $v_p = \pi d_p NA / \lambda$, 其中 d_p 探测小孔半径, NA 是探测器前的透镜的数值孔径, λ 是照明波长, 则当 v_p 增加到 8 时, 穿透深度主要受信号背景比限制, 并且与散射系数有关. 当 $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$ ($l_s = 100 \mu\text{m}$), 且样品内部结构之间的折射率差为 0.05 时, 最大穿透深度为 2OD. 式中 OD 为光学深度 (optical depth). OD 定义为 $LD = \mu_s \times \text{深度}$. 这里忽略了吸收系数的影响. 由此得在该条件下, 受信号背景比限制的穿透深度为 $t_3 = 200 \mu\text{m}$.

由式(16)可以看出, 当 $\Delta n_2 = 0$ 时, $t_3 \rightarrow \infty$. 对于 $n_1 = 1.41$, $n_2 = 1.36$, $n_3 = 1.41$, $t_2 = 0.17 \text{ mm}$, $\lambda = 785 \text{ nm}$, 由式(16)可得出的穿透深度 $t_3 = 1350 \mu\text{m}$. 当 $\mu_s = 100 \text{ cm}^{-1}$ ($l_s = 100 \mu\text{m}$), 则成像深度为 13.5OD. 显然, 这是可能实现的最大探测深度. 实际上, 由于生物组织内部的折射率分布并不均匀, 因而要发生多次散射, 从而降低了成像光线的强度. 实际上, 也正是由于生物组织内部折射率的不一致才是光学断层图像中对比度的主要原因. 当成像光线的强度降低到焦面外体积中所产生的背景信号的大小时, 便无法探测到, 因而不能实现成像, 从而实际成像深度小于理论允许的成像深度.

对各种软组织, 当波长为 630 nm 时, 其折射率为 1.38~1.41 (水的折射率为 1.33). 图 2 给出当 $n_1 = 1.33$, $n_2 = 1.516$ 时, 成像深度与生物组织折射率的关系.

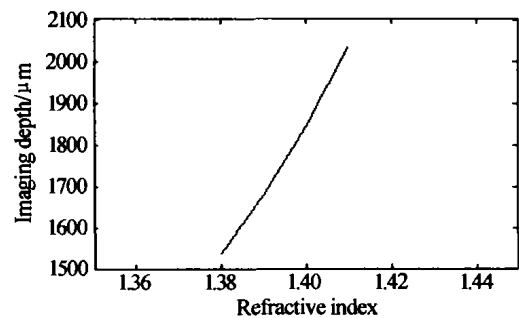


图 2 成像深度与生物组织折射率的关系

Fig. 2 The relationship between the maximum imaging depth and the tissue refractive index

一般地, 在标量衍射理论的近似下, 焦面区域的强度可以写为^[4]

$$I(u, v) = \int_0^{\alpha} A(\theta) P(\theta) J_0 \left(\frac{v \sin \theta}{\sin \alpha} \right) \cdot \exp \left(-\frac{1}{2} i u \frac{\sin^2(\theta/2)}{\sin^2(\alpha/2)} \right) \sin \theta d\theta \quad (17)$$

式中光学坐标 u , v 与距离焦点的轴向距离 z 及距离光轴的径向距离 r 的关系为

$$\left. \begin{aligned} u &= 4kz \sin^2(\alpha/2) \\ v &= kr \sin \theta \end{aligned} \right\} \quad (18)$$

函数 $A(\theta)$ 表示入射到焦点区域的角光谱的强度, 对于消球差光学系统, 有^[1]

$$A(\theta) = \cos^{1/2} \theta \quad (19)$$

函数 $P(\theta)$ 表示波前像差, 因此

$$P(\theta) = e^{i\phi} \quad (20)$$

利用式(15)和式(17)可以计算界面折射率不一致时焦点区域的光波分布情况。

3 结论

共焦显微术与多光子显微成像术等先进显微成像技术的最大优点是可以非侵入式地实现对样品内部实现光学断层成像。然而, 由于生物样品的折射率与盖玻璃及周围介质等的差异, 使位于样品中焦面区域的光场分布发生变化, 限制了成像深度。本文先分析了由于多层折射率不一致而引入的球差的大小, 并运用所得的公式计算了折射率不一致对光在样品中穿透深度及焦面附近光场分布的影响。所得的结果对于共焦显微术与多光子显微成像术等的实际应用具有重要的意义。

参考文献

- 1 Sheppard C J R, Cogswell C J. Effects of aberrating layers and tube length on confocal imaging properties.

Optik, 1991, **87**(1):34~38

- 2 Schmitt J M, Kniittel A, Yadlowsky M. Confocal microscopy in turbid media. *J Opt Soc Am A*, 1994, **11**(8):2226~2235
- 3 Smithpeter C L, Dunn A K, Welch A J, et al. Penetration depth limits of in vivo confocal reflectance imaging. *Applied Optics*, 1998, **37**(13):2749~2754
- 4 Sheppard C J R, Matthews H J. Imaging in high aperture optical systems. *J Opt Soc Am A*, 1987, **4**(4):1354~1360
- 5 Sacconi L, Froner E, Antolini R, et al. Multiphoton multifocal microscopy exploiting a diffractive optical element. *Optics Letters*, 2003, **28**(20):1918~1920
- 6 Jelda Jayne Miranda, Caesar Saloma. Four-dimensional microscopy of defects in untegrated circuits. *Applied Optics*, 2003, **42**(32):6520~6524
- 7 Podoleanu A G, Dobre G M, Cucu R G, et al. Sequential optical coherence tomography and confocal imaging. *Optics Letters*, 2004, **29**(4):364~367
- 8 高万荣, 陶纯堪, 杨晓春. 共焦扫描显微成像的光学断层平面分辨率与信噪比之间的关系. *光子学报*, 2002, **31**(6):730~735

Gao W R, Tao C K, Yang X C. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(6):730~735

Limit Penetration Depth of Microscopic Imaging Caused by Focusing Light Into the Bulk Specimen Through Planar Interfaces Between Materials of Mismatched Refractive Index

Gao Wanrong¹, Maohai Hu¹, Yang Xiaochun¹, Zhang Xianling¹, Xie Renlong¹, Shen Weimin²

¹ Department of Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094

² Institute of Modern Optical Technology, Suzhou University, Suzhou 215006

Received date: 2004-04-30

Abstract Applications of confocal scanning microscopy and low coherence tomography in the biological and material sciences for optical-sectioning imaging require focusing light into the bulk specimen. However, the differences of refractive indices among biological tissues, the cover slip and immersion medium cause the strong spherical aberration and make the electromagnetic distribution in the focal region distorted. The spherical aberrations caused by focusing the light deeply into the specimen through multi-layer medium with different refractive index are analyzed. The results are used to calculate the limit penetration depth of microscopic imaging caused by focusing light into the bulk specimen through planar interfaces between materials of mismatched refractive index. The effect of spherical aberration on electromagnetic distribution in the focal region is also discussed.

Keywords Mismatched refractive; Microscopy; Penetration depth



Gao Wanrong was born in 1961. He received his Ph. D. degree from Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, Academia Sinica in 1996. He has been in Massachusetts Institute of Technology for one year and did the two-photon project. Now he is a professor of Optical Engineering, Nanjing University of Science and Technology. His current interest is in the area of bioimaging.