

doi:10.3788/gzxb20144310.1011005

# 高精度数字全息显微衍射层析成像

马利红, 苏玲珑, 王辉, 金洪震

(浙江师范大学 信息光学研究所 浙江省光信息检测与显示技术研究重点实验室, 浙江 金华 321004)

**摘 要:**采用样品转动结构的光学衍射层析技术存在“苹果核频谱缺失”的问题,为此,本文提出傅里叶衍射映射正约束迭代算法以恢复缺失频谱,实现高精度折射率层析成像.首先基于光学衍射层析成像原理,采用带有样品转动装置的数字全息显微成像系统记录下 $360^\circ$ 视角内各个角度的显微全息图,计算得到每个角度的复振幅像分布;然后运用傅里叶衍射映射和正约束迭代相结合的衍射层析成像算法,计算得到样品内部折射率的三维分布.实验结果表明,该方法能有效地恢复缺失频谱,高精度地测量微小样品内部的折射率三维分布.

**关键词:** 信息光学;光学衍射层析;数字全息显微;层析成像;三维折射率成像;傅里叶映射;正约束迭代  
**中图分类号:** TB87.1;O438.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4213(2014)10-1011005-5

## High-resolution Digital Holographic Microtomography for Three-dimensional Refractive Index Imaging

MA Li-hong, SU Ling-long, WANG Hui, JIN Hong-zhen

(Key Laboratory of Optical Information Detecting and Display Technology, Institute of Information Optics, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China)

**Abstract:** In optical diffraction tomography with specimen rotation, the set of captured frequencies exhibits a missing space called missing apple core, an algorithm, in which Fourier mapping algorithm was combined with iterative constraint algorithm, was proposed to acquire the missing frequencies and reconstruct a high-resolution refractive index map. First, based on the theory of digital holographic microtomography with sample rotation, the experiment system was set up and the digital holograms were acquired at regularly-spaced angular positions within  $360^\circ$  viewing angle. Then, the complex field images were calculated from the holograms. Last, the high-resolution three-dimensional refractive index map was reconstructed by the proposed algorithm. The experimental results demonstrate that the algorithm is feasible and effective for acquiring the missing apple core frequencies and achieving the high-resolution three-dimensional refractive index distribution.

**Key words:** Information optics; Optical diffraction tomography; Digital holographic microscopy; Tomographic image reconstruction; Three-dimensional refractive index imaging; Fourier mapping algorithm; Iterative constraint algorithm

**OCIS Codes:** 110.4500;090.1995;110.6955;100.6950

## 0 引言

光学衍射层析是获取微小样品内部折射率三维分布的一种有效手段<sup>[1-10]</sup>.它的基本原理是利用各种干涉术获取样品各个角度的散射场分布,并通过衍射层析算法重建折射率三维分布.数字全息显微层析术<sup>[5,11-14]</sup>

将数字全息显微术和衍射层析术相结合,是近几年发展起来的新型衍射层析术.利用数字全息显微术<sup>[15-19]</sup>获取样品散射场分布的优势在于:它只需一帧全息图即可获得一个角度的物光场分布,可以大大减少获取时间和降低对系统稳定性的要求;同时,数字全息显微术具有数字重聚焦能力<sup>[18,20]</sup>,容易校正聚焦误差.

**基金项目:**国家自然科学基金(Nos.61205012,11374267)和浙江省自然科学基金(No.LQ12F05002)资助

**第一作者:**马利红(1979-),女,副教授,博士,主要研究方向为数字全息显微术和相位成像. Email: zjnumlh@zjnu.cn

**收稿日期:**2014-03-11; **录用日期:**2014-05-09

<http://www.photon.ac.cn>

和其它光学衍射层析术一样,数字全息显微衍射层析术获取不同角度物光场分布的方法主要有两种,一种是改变照明光倾斜方向而样品保持固定<sup>[5,11]</sup>;另一种是转动样品而照明光方向保持不变<sup>[11-14]</sup>.前者装置能保持样品固定不动,适用于生物细胞等活体样品,但是记录视角受显微物镜数值孔径限制,从而产生“锥形频谱缺失”问题<sup>[4,6,14]</sup>.文献[4,6,14]提出的迭代算法有效地解决了重建问题,但重建分辨率各向异性.后者装置简单,能记录360°视角的物光场分布,适用于光纤等固体样品,重建分辨率各向同性,但这种装置同样存在“苹果核频谱缺失”的问题<sup>[21-22]</sup>.文献[21]提出了采用两个正交转动的设想,文献[22]提出了将样品转动和照明光方向改变相结合的方法,以解决样品转动装置中频谱缺失的问题,但是这两种方法都增加了装置的复杂度并增大了数据量.

本文提出傅里叶衍射映射正约束迭代重建算法以解决样品转动衍射层析装置中记录频谱缺失问题.基于数字全息显微衍射层析成像原理,建立了一套带样品转动装置的数字全息显微成像系统,通过记录360°视角内各个角度的显微全息图计算得到相应的散射场复振幅分布.根据样品特性,运用傅里叶衍射映射和正约束迭代相结合的衍射层析成像算法,计算得到样品内部折射率的三维分布.

## 1 数字全息显微层析成像基本原理

数字全息显微层析术是基于光学衍射层析的基本原理,利用数字全息显微术获取不同角度的样品散射光场,重建得到样品内部的折射率分布函数.光学衍射层析的理论原型是Wolf的标量衍射层析理论.在标量假设下,光波场在非均匀介质中传播依然满足波动方程,即

$$\nabla^2 U(\mathbf{r}) + k_0^2 n(\mathbf{r})^2 U(\mathbf{r}) = 0 \quad (1)$$

式中, $k_0 = 2\pi/\lambda_0$ ,是波长为 $\lambda_0$ 的光波在自由空间传播的波数, $n(\mathbf{r})$ 是复折射率.任一点的总光场 $U(\mathbf{r})$ 可看作是入射场 $U^{(i)}(\mathbf{r})$ 和散射场 $U^{(s)}(\mathbf{r})$ 的叠加,即

$$U(\mathbf{r}) = U^{(i)}(\mathbf{r}) + U^{(s)}(\mathbf{r}) \quad (2)$$

从而得到散射场公式为

$$(\nabla^2 + k_0^2 n_m^2) U_s(\mathbf{r}) = F(\mathbf{r}) U(\mathbf{r}) \quad (3)$$

式中, $n_m$ 表示周围媒介折射率, $F(\mathbf{r})$ 为物体函数, $F(\mathbf{r}) = -k_0^2 n_m^2 \left( \frac{n(\mathbf{r})^2}{n_m^2} - 1 \right)$ .在满足一阶Born近似的弱散射情况下( $U^{(s)} \ll U^{(i)}$ ),即在入射场 $U^{(i)}$ 远远大于散射场 $U^{(s)}$ 的情况下,可以用入射场 $U^{(i)}$ 代替总场 $U$ ,得到散射场与物体函数的关系为

$$U^{(s)}(\mathbf{r}) \approx - \int F(\mathbf{r}') U^{(i)}(\mathbf{r}') G(\mathbf{r}-\mathbf{r}') d^3 \mathbf{r}' \quad (4)$$

对式(4)两边做傅里叶变换,就可以得到傅里叶衍

射投影定理的基本公式为

$$\hat{F}(K_x, K_y, K_z) = \frac{ik_z}{\pi} \hat{U}^{(s)}(k_x, k_y; z=0) \quad (5)$$

式中 $\hat{F}$ 是物体函数 $F$ 的三维傅里叶变换, $K_x, K_y, K_z$ 是物体的空间频率; $\hat{U}^{(s)}$ 是像平面( $z=0$ )弱散射场 $U^{(s)}$ 的二维傅里叶变换, $k_x, k_y$ 是对应于空间坐标 $x, y$ 的空间频率, $k_z = \sqrt{(n_m k_0)^2 - k_x^2 - k_y^2}$ .散射场空间频率和物函数频率的关系: $k_x = K_x + k_{x0}, k_y = K_y + k_{y0}$ ,其中 $k_{x0}, k_{y0}$ 为入射场频率.

根据傅里叶衍射投影理论,沿着某一个方向用平面波照射弱散射物体得到的前向散射投影数据,经傅里叶变换就可得到物函数频域空间中相应球冠上(Ewald频域球)的采样值.记录的散射场投影数足够多,采样值填满Ewald频域球,就得到了 $\hat{F}(K_x, K_y, K_z)$ 分布,再由三维逆傅里叶变换得到物体的三维折射率分布 $n(\mathbf{r})$ .

在数字全息显微系统中,通过转动样品或改变照明光波倾斜方向,记录得到360°视角内各个角度的数字全息显微图,继而通过数值重建得到各个角度的散射光场复振幅像.但是,根据傅里叶衍射投影理论,弱散射物体被平面波照射得到的前向散射投影数据,经傅里叶变换得到的是物函数频域空间相应球冠上的采样值.因此,即使在采用样品转动的数字全息显微层析装置中,可以记录360°视角内各个角度的散射场分布,获取的频谱仍然存在“苹果核频谱缺失”的问题,如图1.

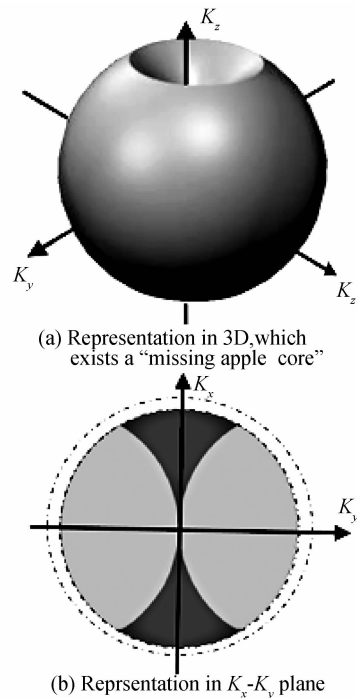


图1 采用样品转动的数字全息显微层析装置获取的频谱分布  
Fig. 1 Representation of captured frequencies in optical diffraction tomography with specimen rotation

## 2 傅里叶衍射映射正约束迭代重建算法

在透射式数字全息显微系统中,加入样品转动装置,通过样品转动可以获得  $360^\circ$  视角内各个角度的散射场分布. 根据傅里叶衍射映射理论,将  $360^\circ$  全视角内的散射场傅里叶频谱映射到 Ewald 频域球,但是并不能填满整个 Ewald 频域球,存在“苹果核频谱缺失”. 因此,在样品转动的数字全息显微层析实验装置中,求解样品的折射率三维分布也是一个“欠适定”问题. 为最小化缺失频谱产生的重建误差,本文提出了基于样品先验知识的傅里叶衍射映射正约束迭代算法.

首先采用傅里叶衍射映射算法,映射得到物体函数频谱分布. 对采集的数字全息显微图进行数值重建,假定得到的物光场复振幅像表示为  $U(x, y, \theta)$ , 其中  $\theta$  为采集角度.  $U(x, y, \theta)$  是测量得到的总光场分布. 为得到样品的散射场像,一个参考全息图(样品移除时)被记录,从参考全息图得到的复振幅分布  $U_{bg}(x, y, \theta=0)$ , 被作为入射场. 根据式(2), 散射场像为

$$U^{(s)}(x, y, \theta) = U(x, y, \theta) - U_{bg}(x, y) \quad (6)$$

应用傅里叶衍射投影定理,利用式(5),将散射场频谱分布映射到 Ewald 频域球. 通过傅里叶衍射映射得到物体函数频谱分布,并将缺失频谱部分置零.

然后采用正约束迭代的方法恢复缺失的频谱. 根据先验知识,在已知样品折射率  $n(r)$  大于周围媒介折射率  $n_m$  的情况下,由折射率函数计算公式  $f(r) = (n(r)/n_m)^2 - 1$  可知,在样品内部  $f(r) > 0$ , 在周围媒介中  $f(r) = 0$ . 由于将缺失部分频谱置零,则缺失部分频谱值小于正确值(已知被测样品折射率值大于周围媒介折射率值时),使直接傅里叶衍射映射重建的折射率函数  $f(r)$  出现负基准,因而使重建物体折射率值小于正确值. 正约束迭代算法可恢复缺失频谱<sup>[4,6,13]</sup>. 对傅里叶衍射映射得到的物体函数频谱分布进行三维逆傅里叶变换,取实部得到折射率函数  $f(r)$  的分布. 将  $f(r)$  中小于 0 的取值全部替换为 0, 再对替换后的物体函数  $F$  做三维傅里叶变换. 缺失的频谱区域将具有一定的频谱值;但是不为 0 的频谱值也发生了变化,将这些频谱值用原测量得到的频谱值替代,得到修正后的三维频谱. 对该修正的频谱做三维傅里叶逆变换,得到一次修正后的折射率分布,这时再对折射率函数进行正约束校正,将其中小于 0 的值全部替换为 0. 再对替换后的物函数做三维傅里叶变换,并对其频谱进行修正. 经过多次迭代后,可以使缺失频谱得到较好恢复,使重建的折射率函数接近真实值,得到高精度的折射率三维分布.

## 3 实验结果

实验系统原理如图 2 所示,光路的基本结构是马

赫曾德型透射式数字全息显微系统. He-Ne 激光器(波长为 632.8 nm)发出的激光,经分光棱镜( $BS_1$ )分束,一束准直成平面波照明样品作为物光波,另一束准直成平面波作为参考光波. 物光波和参考光波又经分光棱镜( $BS_2$ )合束,微调  $BS_2$ ,使物光波和参考光波形成微小夹角,在 CCD 感光面干涉形成离轴菲涅耳全息图. 实验中采用的 CCD 相机像素尺寸为  $3.45 \mu\text{m} \times 3.45 \mu\text{m}$ , 像素数为  $512 \times 512$ . 为把物光波频率压缩到 CCD 采样频率,采用显微物镜对被测样品进行放大成像. 系统中使用的显微物镜(MO)是  $25 \times / 0.4$  的商用显微物镜,实际光路的放大倍率为 25 倍. 被测的样品是聚苯乙烯微球,其直径为  $15 \mu\text{m}$ , 折射率为 1.48. 将聚苯乙烯微球置于充满甘油液体(甘油的折射率为 1.474 6)的微管中. 为消除玻璃微管和空气折射率之间大的折射率差产生的折射,将微管外周矩形区域也充满甘油. 玻璃微管产生的相位分布可以通过参考全息图消除. 将制备好的微管置于精密转动平台中心,转动微管实现样品转动(样品和微管保持相对静止). 并通过控制软件实现平台转动和 CCD 相机曝光的同步控制. 坐标系如图所示,样品绕  $x$  轴转动.

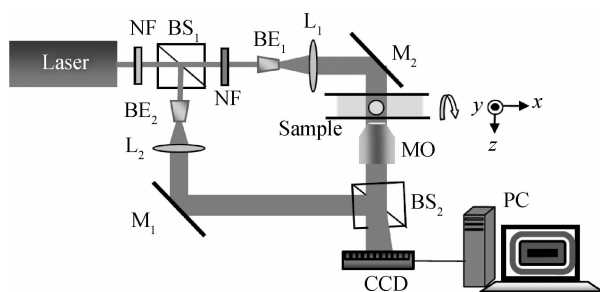


图 2 样品转动数字全息显微层析实验系统原理  
Fig. 2 Schematic of the experimental setup for digital holographic microtomography with sample rotation

记录  $360^\circ$  视角内各个角度的数字显微全息图,如图 3(a). 并记录一张移去样品的参考全息图. 对记录的全息图进行角谱法数值重建得到微球的复振幅分布,对包裹相位进行相位解包裹并减去参考相位图(参考全息图重建得到)后得到样品的相位像,如图 3(b). 结合振幅分布和相位分布得到样品的复振幅像. 对每个角度的全息图进行数值重建得到复振幅分布,由于转动误差,需要对每个角度的重建相位像进行重聚焦和居中处理,从而得到各个角度的复振幅像. 由于是平面波入射,将参考全息图重建得到的振幅分布作为入射场. 由式(6)得到散射场分布. 根据式(5),将散射场频谱映射到样品折射率频域球,图 3(c)是  $K_x - K_z$  平面的频谱分布,图 3(d)是  $K_x - K_y$  平面的频谱分布. 由图 3(c)和 3(d)可知,  $360^\circ$  视角的散射场频谱并不能填满整个 Ewald 频域球,存在“苹果核频谱缺失”的问题. 对该映射频谱做三维傅里叶逆变换,得到微球样品物体

函数的三维分布,并由物体函数计算得到折射率分布.图 3(e)显示了微球内部  $xz$  平面上的折射率分布.图 3(f)是沿图 3(e)中心水平截线的折射率分布.图 3(g)是沿图 3(e)中心垂直截线的折射率分布.由图 3(e)和 3(f)可看出,重建得到的媒介折射率值和微球折射率值均小于实际值.经过计算得到,微球内部平均折射率约为 1.478 7 左右,与实际值 1.48 相比相差 0.001 3.由图 3(e)、3(f)和 3(g)可看出,水平部分的重建折射率分

布相对平滑但小于实际值,而与缺失频谱相对应的垂直部分重建折射率存在更大的噪声,在数值上也存在更大的偏差.图 4 是经过 100 次迭代后的实验结果.图 4(a)是  $K_x - K_z$  平面的频谱分布;图 4(b)是  $K_x - K_y$  平面的频谱分布;图 4(c)是重建的  $xz$  平面上的折射率分布;图 4(d)是沿图 4(c)中心水平截线的折射率分布;

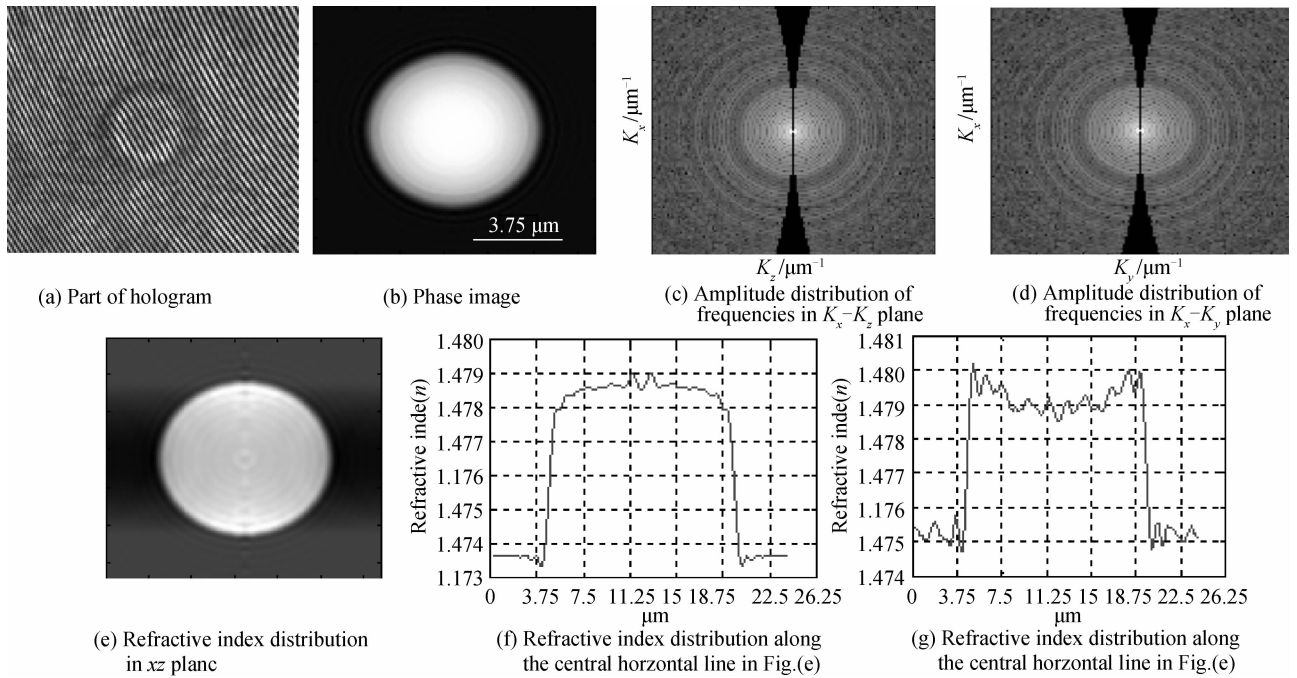


图 3 迭代前重建图像结果

Fig. 3 Reconstruction results of polystyrene head without constraint iteration

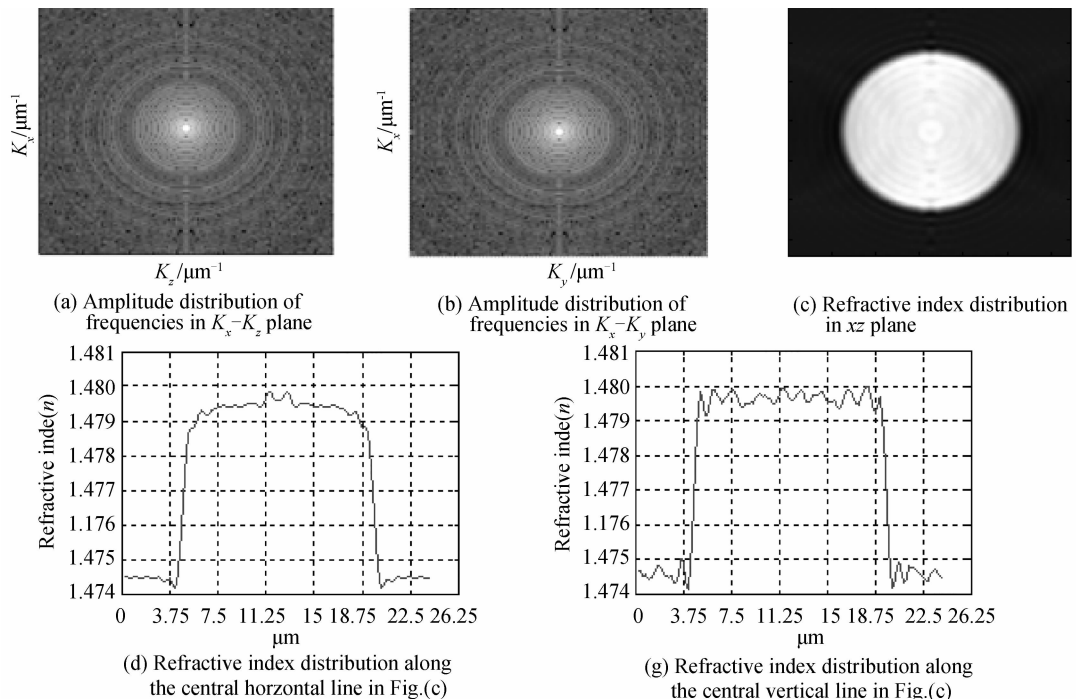


图 4 经过 100 次迭代后的重建结果

Fig. 4 Reconstruction results of polystyrene head with 100 constraint iterations

图 4(e)是沿图 4(c)中心垂直截线的折射率分布. 经过计算得到,微球内部平均折射率约为 1.479 4,与实际值 1.48 仅相差 0.000 6,比迭代前误差减小 50%以上. 比较图 3(c)(d)和图 4(a)(b),可知缺失频谱得到有效恢复. 比较图 4(e)和 3(g),重建的折射率分布在垂直方向得到很大的改善,迭代后重建值明显接近真实值,这也说明缺失频谱得到了正确的恢复. 比较图 4(d)和 3(f),水平方向折射率分布发生了整体增大,折射率值更接近真实值,这也是因为缺失部分频谱值得到有效恢复. 实验结果表明,提出的算法能使缺失频谱得到很好恢复,使重建的折射率值更接近真实值,得到高精度的折射率三维分布.

## 4 结论

数字全息显微衍射层析是一种很有前途的无标记三维成像技术. 本文构建了带样品转动装置的数字全息显微衍射层析系统,将已知折射率值的聚苯乙烯微球作为被测样品,转动样品获取了 360°视场的散射场分布. 重建结果表明,提出的将傅里叶衍射映射和正约束迭代相结合的算法能有效地恢复缺失频谱,从而得到高精度的折射率三维分布. 这对利用样品转动结构的光学衍射层析术具有重要意义.

### 参考文献

- [1] WOLF E. Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data [J]. *Optics Communication*, 1969, **1**(4):153-156.
- [2] DÄNDLIKER R, WEISS K. Reconstruction of the three-dimensional refractive index from scattered waves [J]. *Optics Communication*, 1970, **1**(7):323-328.
- [3] LAUER V. New approach to optical diffraction tomography yielding a vector equation of diffraction tomography and a novel tomographic microscope [J]. *Journal of Microscopy*, 2002, **205**(2):165-176.
- [4] CHOI W. Tomographic phase microscopy and its biological application [J]. *3D Research*, 2012, **3**(4):1-11.
- [5] GORSKI W, OSTEN W. Tomographic imaging of photonic crystal fibers [J]. *Optics Letter*, 2007, **32**(14):1977-1979.
- [6] SUNG Y J. Optical diffraction tomography for high resolution live cell imaging [J]. *Optics Express*, 2009, **17**(5):266-277.
- [7] DEBAILLEUL M, GEORGES V, SIMON B, et al. High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples [J]. *Optics Letter*, 2009, **34**(1):79-81.
- [8] MAIRE G, RUAN Y, ZHANG T, et al. High-resolution tomographic diffractive microscopy in reflection configuration [J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2013, **30**(10):2133-2139.
- [9] KIM K, KIM K S, PARK H, et al. Real-time visualization of 3-D dynamic microscopic objects using optical diffraction

- tomography [J]. *Optics Express*, 2013, **21**(26):32269-32278.
- [10] ZHOU Wen-jing, XU Qiang-sheng, YU Ying-jie. Analysis of tomography reconstruction based on three projections [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(7):1257-1262.  
周文静;徐强胜;于瀛洁. 基于三投影方向的层析重建分析 [J]. *光子学报*, 2010, **39**(7):1257-1262.
- [11] CHARRIERE F, ANCA M, FRÉDÉRIC M, et al. Cell refractive index tomography by digital holographic microscopy [J]. *Optics Letter*, 2006, **31**(2):178-180.
- [12] DEBAILLEUL M, SIMON B, GEORGES V, et al. Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples [J]. *Measurement Science & Technology*, 2008, **19**(7):074009-1-8.
- [13] FANG-YEN C, CHOI W, SUNG Y, et al. Video-rate tomographic phase microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, **16**(1):011005-1-5.
- [14] SU J W, HSU W C, CHOU C Y, et al. Digital holographic microtomography for high-resolution refractive index mapping of live cells [J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, **6**(5):416-424.
- [15] MA Li-hong, WANG Hui, JIN Hong-zhen, et al. Experimental study on quantitative phase imaging by digital holographic microscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2012, **39**(3):0309002-1-7.  
马利红,王辉,金洪震,等. 数字全息显微定量相位成像的实验研究 [J]. *中国激光*, 2012, **39**(3):0309002-1-7.
- [16] MA Li-hong, LI Yong, WANG Hui, et al. Fast algorithm for reliability-guided phase unwrapping in digital holographic microscopy [J]. *Applied Optics*, 2012, **51**(36):8800-8807.
- [17] MA Li-hong, WANG Hui, LI Yong, et al. Effect of system parameters on the reconstructed image quality in digital holographic microscopy [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2011, **40**(2):300-307.  
马利红,王辉,李勇,等. 数字全息显微系统结构参量对再现像质的影响 [J]. *光子学报*, 2011, **40**(2):300-307.
- [18] LANGEHANENBERG P, IVANOVA L, BERNHARDT I. Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, **14**(1):014018-1-7.
- [19] DENG Li-jun, WANG Hui, MA Li-hong. Digital holographic technique with large viewing angle based on image filter [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(12):2168-2173.  
邓丽军;王辉;马利红. 基于滤波成像的大视角数字全息技术 [J]. *光子学报*, 2011, **39**(12):2168-2173.
- [20] JEON Y, HONG C K. Rotation error correction by numerical focus adjustment in tomographic phase microscopy [J]. *Optical Engineering*, 2009, **48**(10):105801-1-6.
- [21] HAEBERLÉ O, BELKEBIR K, GIOVANINNI H, et al. Tomographic diffractive microscopy: basics, techniques and perspectives [J]. *Journal of Modern Optics*, 2010, **57**(9):686-699.
- [22] VERTU S, FLÜGGE J, DELAUNAY J, et al. Improved and isotropic resolution in tomographic diffractive microscopy combining sample and illumination rotation [J]. *Central European Journal of Physics*, 2011, **9**(4):969-974.