

doi:10.3788/gzxb20184701.0109002

基于参考透镜法的数字全息显微相位畸变校正技术

曾雅楠¹, 雷海², 刘源¹, 胡晓东², 朱芮³, 苏康艳¹

(1 天津农学院 工程技术学院, 天津 300000)

(2 天津大学 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300000)

(3 天津津航计算技术研究所, 天津 300000)

摘 要:建立了数值与物理方法结合的参考透镜法,对离轴数字全息显微系统进行畸变相位校正.对离轴全息图进行频谱分析,通过频谱滤波、移位的数值方法对一次相位畸变进行校正.在参考光路中引入参考透镜,根据频谱中心能量判别参考透镜的轴向最佳位置,利用物理方法对多次相位畸变进行校正.在相位校正理论分析的基础上,结合实验用参考透镜法验证其有效性和准确性.微台阶表面形貌测量结果表明,参考透镜法能够准确校正相位畸变,通过校正的相位可以获取 44 nm 标准微台阶形貌数据,测量标准差能够达到 0.8 nm,且测量结果与轮廓仪测量结果一致.表明参考透镜法能够有效、准确地校正离轴数字全息显微系统的畸变相位.

关键词:数字全息;全息显微;相位;畸变;形貌

中图分类号:TP394.1; TH691.9

文献标识码:A

文章编号:1004-4213(2018)01-0109002-7

Compensation of the Phase Aberrations in Digital Holographic Microscopy Based on Reference Lens Method

ZENG Ya-nan¹, LEI Hai², LIU Yuan¹, HU Xiao-dong², ZHU Rui³, SU Kang-yan¹

(1 College of Engineering and Technology, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300000, China)

(2 State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instruments,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

(3 Tianjin Jinhang Institute of Computing Technology, Tianjin 300000, China)

Abstract: In order to correct phase aberrations in the digital holographic microscopy measurement system, a numerical method combined with physical method, namely reference lens method is applied in off-axis digital holographic microscopy system. Firstly, the frequency spectrum of digital hologram is analyzed. By filtering and displacing a part of spectrum, the first-order phase aberration is corrected. Then, the reference lens is introduced in reference path. The axial best position of reference lens is discriminated according to the spectrum center energy. By using this physical method, high-order phase aberration is corrected. Based on the analysis of the phase correction theory, the validity and accuracy of the reference lens method is verified by the combined experiment. The experimental results show that the method of reference lens can accurately correct phase aberration. The standard deviation can reach 0.8 nm. And the measured results agree with measurement results of mechanical profiler, showing that reference lens method can effectively and accurately correct phase aberration of off-axis digital holographic microscopy system.

Key words: Digital holography; Holographic microscopy; Phase; Aberration; Profile

OCIS Codes: 090.1995; 090.2890; 090.1970; 120.2880

基金项目:国家自然科学基金(Nos.51375340,51775381)资助

第一作者:曾雅楠(1988—),女,讲师,博士,主要研究方向为光学微纳检测技术. Email: ynzeng@tju.edu.cn

通讯作者:胡晓东(1974—),男,教授,博士,主要研究方向为微纳检测技术. Email: xdhu@tju.edu.cn

收稿日期:2017-06-13; **录用日期:**2017-08-14

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

0 引言

随着制造业、生命科学和医学领域对微结构、活体细胞等动态、定量测量需求的增多,普通的光学相衬显微镜和干涉显微镜等方法已经不能满足.数字全息显微成像技术相比于普通电子显微镜和传统光学显微镜,可以在非介入、不接触、不伤害样本的情况下,可靠地对微结构或者生物细胞的表面形貌、厚度、折射率等参数进行三维定量测量,并通过与图像处理、计算机等技术的结合,能很好地实现实时的成像和参数分析^[1-3].

然而对于离轴数字全息显微系统,由于光路中存在透镜、物镜等光学元件,且离轴系统参考光与物光之间有一定空间角度,这些因素均对成像产生光学像差^[4],导致最终获取的定量相位信息存在畸变.因此,相位畸变校在数字全息显微成像中必不可少.

目前相位畸变校正方法主要包括数值方法和物理方法两种.数值方法模拟产生畸变的参数,利用图像处理技术进行畸变的校正.T. Colomb 等根据被测物没有测量对象的平坦区域的畸变特点,经过多次曲线、曲面拟合,获取畸变信息进行校正^[5].A. Khmaladze 等针对透镜主要像差中的场曲模型,建立牛顿环模型,补偿畸变相位^[6-7].E. Cuche 等利用 Zernike 模型对畸变的相位进行分析,并计算 Zernike 参数校正相位畸变^[8-9].物理方法多从光路的取图方式以及光学元件的设计方法等角度对畸变相位进行校正.P. Ferraro 等人利用双曝光方法^[10-12],分别记录有样本和无样本时的全息图,使两图相位相减,补偿畸变.Qu Weijuan, Yu Yingjie 等利用单方分光棱镜对由补偿了显微物镜引起的相位畸变^[13].Emilio Sánchez-Ortiga, Pietro Ferraro 等利用纯光学的方法对物镜进行补偿,收到了很好的效果^[14].对于生物细胞这种特殊样本,有报道表明对频谱进行部分提取作为相位校正的依据^[15],但这种方法仅针对细胞这种透明且平滑的样本有效.

虽然以上方法在相位畸变方面取得一定进展,但数值方法是模拟算法,不能准确消除相位畸变,物理方法虽然记录畸变相位但需两次曝光,对系统的稳定性要求较高,且不利于实时记录.

本文采用数值与物理结合的方法,即参考透镜法,利用全息图的频谱信息,数值校正一次相位畸变,并在参考光路中引入参考透镜,调整透镜的位置,在物理层面用透镜补偿光路中元件带来的像差,校正多次相位畸变.最后通过对标准纳米台阶的表面形貌测量实验对参考透镜法进行验证与评价.

1 相位畸变校正原理

物光 O 和平面参考光 R 在全息平面发生干涉,其光场分布为

$$I_H(x, y) = I_r + I_o + R^* O + RO^* \quad (1)$$

式中 I_r 和 I_o 分别表示物光和参考光强度,后两项为干涉项; R^* 和 O^* 分别为参考光和物光的共轭项.

在数字全息显微术中,畸变产生的原因是多样的,其一是显微光路中显微物镜以及透镜等光学元件,导致物光波已存在光学像差的畸变;其二对于全息图得到的 $O^* R(x, y)$ 项需要与模拟的参考光波前复共轭 $R^*(x, y)$ 相乘再进行衍射重构计算才能准确恢复物光波前,而参考光波的模拟往往不能和实际测量中的参考光波完全吻合,这样得到的重构相位也存在畸变.因此,基于以上两个原因,相位畸变主要由一次相位畸变和多次相位畸变构成,具体表现为一个具有不规则大曲率半径函数的曲面,本节对相位畸变的构成进行数学分析,并对畸变进行校正.

1.1 一次相位畸变校正

一次相位畸变产生的原因是物光和参考光有一定的离轴的角度造成的,实虚像的频谱在频谱图中偏离了中心,导致在用单位振幅的正入射参考波模拟参考光重现时重构相位为一个斜面.对于一次相位畸变校正,需要去除参考光载频对重构相位引发的相位畸变.平移的关键参数确定方法为,实像频谱中心位置为起始位置(实像频谱中心即为实像频谱中能力最集中的点,即实像频谱区域亮度最大的点),频谱图的中心为终点位置,利用理想圆形窗函数对频谱图进行滤波得到实像频谱,将实像频谱进行从起始位置至终点位置的平移,实现去载频的过程,完成一次相位畸变校正.

无论实验时所用参考波为球面波还是平面波,参考波的波前函数必然含有一个与离轴角度相关的一次相位因子.设记录面上的参考光一次相位部分的光场分布为

$$R(x, y) = A_R \exp[-jk(x \sin \alpha + y \sin \beta)] \quad (2)$$

式中, A_R 为振幅, α 和 β 分别为参考光传播方向与 x 面和 y 面所成角度.

记录面的光场强度分布由式(1)得出,其中 O^*R 项为实像项.记录面记录的 O^*R 项为

$$R(x,y)O^*(x,y) = \exp[-jk(x\sin\alpha + y\sin\beta)] \times \iint_{\Sigma} O(x_0,y_0) \cdot \exp\left[-jk\frac{(x-x_0)^2 + (y-y_0)^2}{2d}\right] dx_0 dy_0 \quad (3)$$

因此导致相位一次畸变的因子为

$$\phi_{\text{disl}} = \exp\left[-j2\pi\left(\frac{\sin\alpha}{\lambda}x_r + \frac{\sin\beta}{\lambda}y_r\right)\right] \quad (4)$$

式(3)中, $\frac{\sin\alpha}{\lambda}$ 和 $\frac{\sin\beta}{\lambda}$ 即为参考光对物光在 x 轴和 y 轴方向的载频.去除这个载频分量,即可校正一次相位畸变.校正后的 RO^* 项 RO^*_{COR} 为

$$O^*R_{\text{COR}} = \text{FFT}^{-1}[\text{FFT}(O^*R)S(f_x, f_y)] \quad (5)$$

$S(f_x, f_y)$ 为平移函数,使 RO^* 的频谱平移至频谱图的中心.

1.2 多次相位畸变校正

相位畸变中除却离轴导致的一次相位畸变,剩余曲面畸变本文称其多次相位畸变.

如果参考光为平面波,多次畸变主要由物波经过显微物镜及光路中的光学元件后形成的像差导致.如果参考光为球面波,经过显微物镜的物波也是球面波,除去上述像差,两个球面波可能会因球心位置不同,球面波到达记录面的曲率半径不同导致的多次相位畸变.参考透镜法主要适用于参考光与物光均为球面波的情况.其中思想为,若物光与参考光形成的球面波除去样本本身的相位以及离轴因素外,两球面波波面中心和曲率半径均相同,则可消除这种多次畸变,最后只再现样本的相位.图1为参考透镜法校正畸变的示意图,参考透镜法调节图中透镜 Lens_2 的轴向以及面内位置,以期与显微物镜 MO 所产生的球面波二次及多次因子进行相互抵消,只保留样本相位信息.图1中, BS 为分光棱镜; M 为反射镜, MO 为显微物镜, $\text{Lens}_1, \text{Lens}_2$ 为透镜.

图2为透镜 Lens_2 位于图1中1,2,3位置时记录面的波面示意图.图2中 R_1, R_2, R_3 为参考光分别以 C_1, C_2, C_3 为中心时的曲率半径, R 为物光曲率半径,可以通过调整实验装置进行改变.

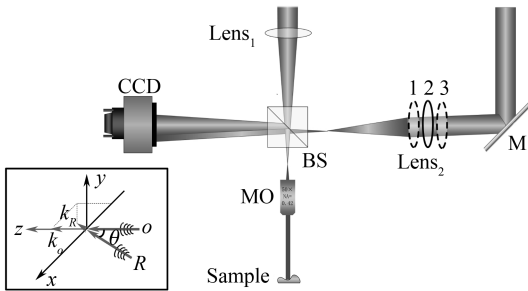


图1 参考透镜法

Fig.1 Diagram of reference lens method

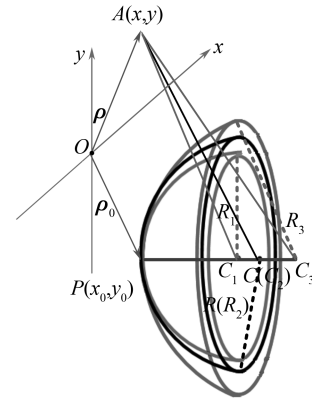


图2 透镜 Lens_2 位于图1中1,2,3位置时的波面示意图

Fig.2 Wavefronts of Lens_2 with the 1, 2, 3 position in Fig.1

在图2中, ρ 是从 CCD 矩阵中心 $O(x,y)$ 到任意一点的矢量, ρ_0 是从 CCD 矩阵中心到 CCD 矩阵曲率中心投影 P 的矢量.在实际装置中,每束波都有波前曲率,其相位因素可写为 $\phi = k \cdot \text{OPL}$,表示为 A 与 O 之间的相位差, OPL 为光程差

$$\text{OPL} = \sqrt{R^2 + |\rho - \rho_0|^2} - \sqrt{R^2 + |\rho_0|^2} = \sqrt{R^2 + (x-x_0)^2 + (y-y_0)^2} - \sqrt{R^2 + x^2 + y^2} \quad (6)$$

光程差既可为正也可为负,取决于物光的离轴角度.由于 $R \gg \rho, \rho_0 \rightarrow 0$,则相位差为

$$\phi = kd = \frac{2\pi}{\lambda} (\sqrt{R^2 + \rho^2} - R) = kR \left(\sqrt{1 + \frac{\rho^2}{R^2}} - 1 \right) = \frac{2\pi R}{\lambda} \left(1 + \frac{\rho^2}{2R^2} - 1 \right) = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{x^2 + y^2}{2R} \quad (7)$$

综上分析,物光与参考光的相位差可算出,则物光与参考光的相位之差为

$$\psi = \frac{2\pi x^2 + y^2}{\lambda} \frac{1}{2R} - \frac{2\pi x^2 + y^2}{\lambda} \frac{1}{2R_r} = \frac{2\pi}{\lambda} \frac{(R - R_r)(x^2 + y^2)}{2RR_r} \quad (8)$$

式中, R_r 表示参考光的曲率半径, 可以如图 2 表示为 R_1, R_2, R_3 . 式(8)为一个牛顿环的已知表达式. 因此, 当 R_r 等于 R 时, 就不再存在误差. 但如果它们不等, 则在全息图中会出现牛顿环.

在实时实验中, 参考透镜 $Lens_2$ 的移动将会以特定规律改变重构相位分布, 当透镜位置从 3 到 1 的过程中, 物体的相位图从凸面逐渐变为凹面. 因此, 参考透镜一定有一个精确的位置 2 能使得相位图成为一个平面. 其实验所需关键参数需结合重构算法算得的相位图进行判断. 观察重构后的相位图, 假设其为凹面曲面, 则使参考透镜沿光轴移动, 若凹面曲率半径增大, 继续沿此方向移动参考透镜; 若在开始移动后凹面曲率半径变小, 则向反方向移动参考透镜; 直到相位图非样本区域为平面, 即消除多次相位畸变. 应用参考透镜法, 相对于传统数值模拟方法, 调整方法需手动操作结合对重构图像的观察, 因此调整更为灵活、直观, 且不需要二次记录, 使测量具有实时性. 参考透镜法校正相位畸变的流程见图 3.

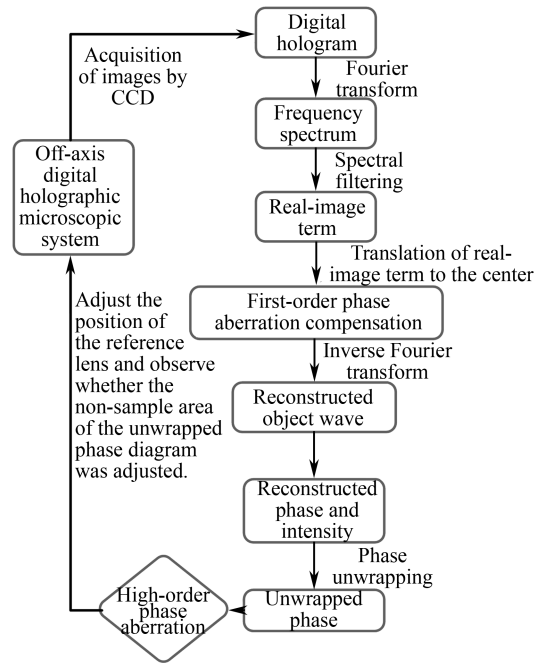


图 3 参考透镜法校正相位畸变的流程
Fig.3 The flow diagram of reference lens method

2 实验装置

单波长反射式数字全息显微系统光路设计如图 4, 为 Mach-Zehnder 反射式光路. 图中, Laser 为激光光源, NF 为中灰镜, BS_1, BS_2 为分光棱镜, M_1, M_2 为反射镜, BE_1, BE_2 为准直扩束器, MO 为显微物镜, $Lens_1, Lens_2$ 为透镜. 激光器 Laser (XPERAY, 波长选择为 690 nm) 发出的光经过中灰镜 NF 进行衰减后, 通过分光棱镜 BS_1 分成物光 O 和参考光 R 两束光. 物光束经过准直扩束器 BE_1 扩束. 透镜 $Lens_1$ 与显微物镜 MO (Mitutoyo, $50\times, NA=0.42$) 共同作用, 使物光 O 保持准直平行的状态照射到被测样本 Sample 上, 经过样本反射的反射光被显微物镜 MO 收集并形成球面波, 被光电传感器 CCD (PX-2M30-L, Imperx) 所接收. 参考光 R 经过反射镜 M_1 折转方向, 准直扩束器 BE_2 对其进行扩束. 反射镜 M_2 负责调节参考光 R 与物光 O 之间的离轴夹角, 在满足记录的条件, 尽可能地扩大载频, 有利于对全息图的实像信息进行提取. 参考光 R 经过透镜 $Lens_2$ 形成球面波, 与物光波 O 在 CCD 接收面发生干涉, 此干涉图被 CCD 记录, 即为数字全息图.

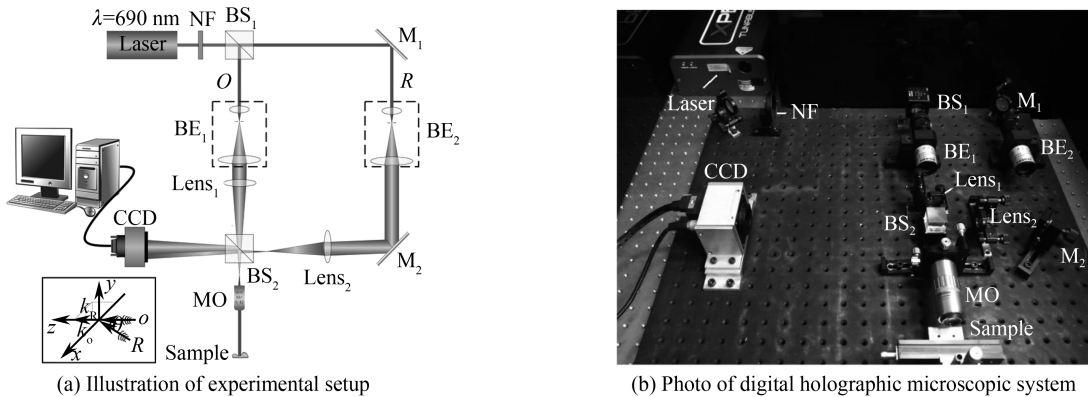


图 4 单波长反射式数字全息显微系统光路图和实物图
Fig.4 Experimental setup of digital holographic microscopic system

3 实验与讨论

3.1 实验结果

应用图 4 所示的实验系统对 VLSI 标准纳米台阶结构表面形貌进行检测.利用参考透镜法校正相位畸变,获取正确相位信息后计算表面形貌,并通过与机械探针轮廓仪(KLA-Tencor,P-16+/P-6)的高度轮廓线图对比,证明相位畸变校正的正确性.

图 5 为利用数字全息显微系统测得的 VLSI 标准台阶全息显微图.小框中为放大的干涉条纹.干涉条纹均为密集的条纹,载频较大,易于进行频谱分离.图 5 中标示了式(1)中的零级像,实像以及虚像的各项频谱位置.将频谱图中的实像频谱通过圆形窗函数进行带通滤波,并进行一次相位畸变的校正.

图 6(a)为滤波后的频谱图,圆形窗中心位于实像频谱能量最集中的点,即实像频谱部分最亮的点,半径的选取原则是尽量包括多的实像频谱但避免涉及到零级像的频谱,本次实验选取的半径为 100 个像素.由于离轴既使频谱易于分离,也使得相位有所畸变,因此根据相位畸变校正理论,将实像频谱中心平移到频谱图的中心.图 7 是一次相位畸变校正前与校正后的对比相位图.

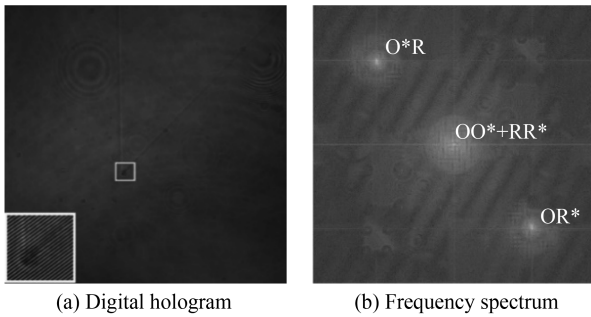


图 5 纳米台阶的数字全息显微图和频谱图
Fig.5 Digital microscopic hologram and frequency spectrum of nano-step

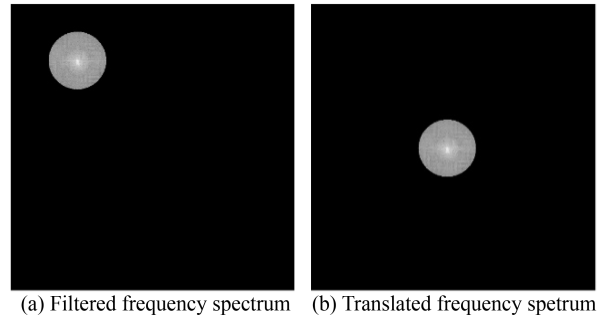
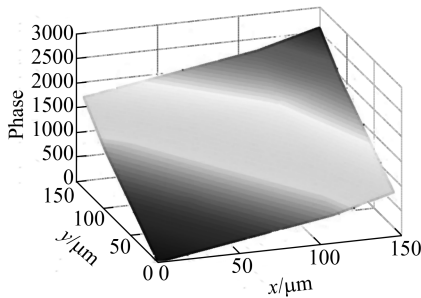
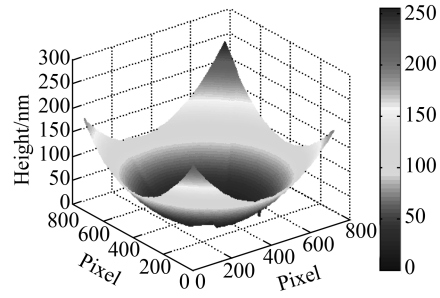


图 6 纳米台阶的滤波频谱图和滤波后移位中心的频谱图
Fig.6 Filtered frequency spectrum of nano-step before and after shifting



(a) Phase image before correction of first-order aberration



(b) Height image after correction of first-order aberration

图 7 一次相位畸变校正前与校正后的对比相位、高度图

Fig.7 Phase and height images before and after correcting first-order aberration

通过移动参考透镜,可以补偿参考光与物光之间的误差.当参考透镜在位置 1 或 3 时,所得到的图像如图 8(a)、(b)、(e)、(f)所示,其未调平立体图为凹或者凸的面,而当参考透镜位于位置 2 时,参考光与物光间误差得到校正,其所得图像为图 8(c)、(d)所示,未调平立体图显示为平面.图 8(g)表示的是利用参考面法校正二次及多次相位畸变后得到的标准纳米台阶高度图,通过与机械探针轮廓仪(KLA-Tencor,P-16+/P-6)的高度轮廓线图对比,表明像面全息显微术的测量结果是合理的.经过多次测量,计算得到标准纳米台阶高度为 43.2 ± 0.8 nm,轮廓仪的测量数据为 43.8 ± 0.4 nm,与参考透镜法数字全息显微技术测量结果一致.

3.2 讨论

实验结果数据的精度取决于实验中的所用光源稳定性、实验环境稳定性以及所用光学器件的加工精度等因素,本文用高度为纳米级的标准台阶的高度测量值与轮廓仪测量结果进行对比,结果一致,精度为纳米级别,得出结论,表明本文提出的参考透镜法能够校正相位畸变,此校正方法是有效的.

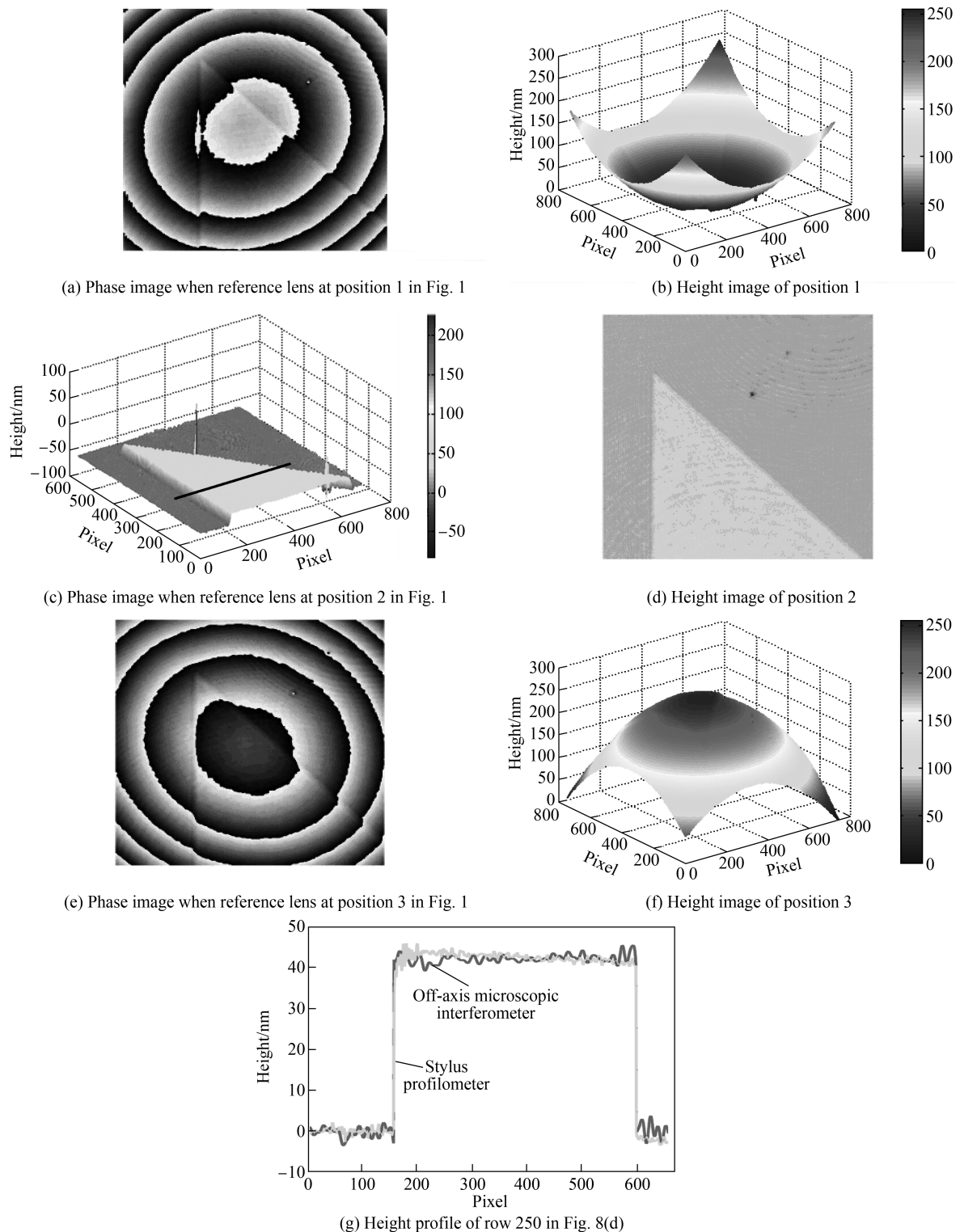


图 8 纳米台阶的相位图和高度图

Fig.8 Phase and height images of nano-step

在使用参考透镜这种校正方法时,不需要进行二次曝光,也不需要移动样品,校正过程需根据实时重构的相位调整参考透镜的位置实现相位畸变校正,所以在测量实时性上是有绝对保证的.实验测量结果的实时性取决于实验所用图像采集仪器以及重构算法的实现效率,应用本文所搭建的系统,可实现 33 帧/秒的图像测量效率.

4 结论

参考透镜法结合数字方法和物理方法,对数字全息显微系统中的相位畸变进行校正,既保证测量的实时性,又能准确补偿畸变的相位.通过对标准纳米台阶表面形貌的测量,应用参考透镜法,并与轮廓仪的测量结果进行比较,测量结果一致,验证了参考透镜法是一种高效、可靠的数字全息显微系统相位畸变校正方法.本方法可应用于对微纳米尺度的结构、器件、生物细胞及组织等三维形貌观测、动态特性测量以及折射率、厚度等一些特性参数的测量中,从而实现对微结构的几何量、运动特性及力学特性以及生命科学、生物工程的现像与机理的探索中.

参考文献

- [1] BOSS D, KUEHN J, DEPEURSINGE C, *et al.* Exploring red blood cell membrane dynamics with digital holographic microscopy[C]. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II. Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II, 2010.
- [2] PACHE C, KÜHN J, WESTPHAL K, *et al.* Digital holographic microscopy real-time monitoring of cytoarchitectural alterations during simulated microgravity[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, **15**(2): 026021.
- [3] WANG Jun, YANG Rong, ZHENG Jiao, *et al.* Visualized measurement of the liquid phase diffusion by using digital holographic interferometry [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2016, **45**(4): 0412001.
王骏,杨蓉,郑娇,等. 基于数字全息干涉术的液相扩散过程可视化[J]. 光子学报, 2016, **45**(4): 0412001.
- [4] CUCHE E, BEVILACQUA F, DEPEURSINGE C. Digital holography for quantitative phase-contrast imaging.[J]. *Optics Letters*, 1999, **24**(5): 291-293.
- [5] CUCHE E, MARQUET P, DEPEURSINGE C. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of Fresnel off-axis holograms.[J]. *Applied Optics*, 1999, **38**(34): 6994.
- [6] KHMALADZE A, KIM M, LO C M. Phase imaging of cells by simultaneous dual-wavelength reflection digital holography[J]. *Optics Express*, 2008, **16**(15): 10900-10911.
- [7] RESTREPOMARTÍNEZ A, KHMALADZE A, BLANDÓN A, *et al.* Simultaneous dual-wavelength reflection digital holography applied to the study of the porous coal samples[J]. *Applied Optics*, 2008, **47**(17): 3203.
- [8] COLOMB T, MONTFORT F, KÜHN J, *et al.* Numerical parametric lens for shifting, magnification, and complete aberration compensation in digital holographic microscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2006, **23**(12): 3177-3190.
- [9] DEPEURSINGE C, CUCHE E, CHARRIÈRE F, *et al.* Automatic procedure for aberration compensation in digital holographic microscopy and applications to specimen shape compensation[J]. *Applied Optics*, 2006, **45**(5): 851-63.
- [10] FERRARO P, DE NICOLA S, FINIZIO A, *et al.* Compensation of the inherent wave front curvature in digital holographic coherent microscopy for quantitative phase-contrast imaging[J]. *Applied optics*, 2003, **42**(11): 1938-1946.
- [11] FERRARO P, MICCIO L, GRILLI S, *et al.* Quantitative phase microscopy of microstructures with extended measurement range and correction of chromatic aberrations by multiwavelength digital holography[J]. *Optics Express*, 2007, **15**(22): 14591-14600.
- [12] MICCIO L, ALFIERI D, GRILLI S, *et al.* Direct full compensation of the aberrations in quantitative phase microscopy of thin objects by a single digital hologram[J]. *Applied physics Letters*, 2007, **90**(4): 041104.
- [13] WEIJUAN Q, YINGJIE Y, CHOO C O, *et al.* Digital holographic microscopy with physical phase compensation[J]. *Optics Letters*, 2009, **34**(8): 1276-1278.
- [14] SÁNCHEZ-ORTIGA E, FERRARO P, MARTÍNEZ-CORRAL M, *et al.* Digital holographic microscopy with pure-optical spherical phase compensation[J]. *Journal of the Optical Society of America A*, 2011, **28**(7): 1410-1417.
- [15] COLOMB T, KÜHN J, CHARRIÈRE F, *et al.* Total aberrations compensation in digital holographic microscopy with a reference conjugated hologram.[J]. *Optics Express*, 2006, **14**(10): 4300-4306.