

文章编号 1004-924X(2024)23-3416-08

共路剪切数字全息自参考聚焦显微成像

黄琳琳, 刘丙才*, 王红军, 张雪灵, 张 萍, 张瑞轩, 田爱玲
(西安工业大学 陕西省薄膜技术与光学检测重点实验室, 陕西 西安 710021)

摘要:提出了一种基于共路剪切的数字全息自参考聚焦显微成像方法。该方法利用偏振光栅的分光特性,设置了双偏振光栅的剪切装置,并实现了对携带样品信息的物光复制。通过调节双偏振光栅之间的距离,灵活控制相机上显微像和全息干涉像之间的距离,实现了显微像和全息干涉像的同时记录。在显微像和全息干涉像同时记录的基础上,记录多幅离焦-聚焦-离焦图像,再利用 Brenner 梯度法对相机记录的多幅离焦-聚焦-离焦图像中的显微成像区域进行聚焦评价,找出最佳聚焦图像,完成自参考聚焦。同时,采用角谱法对最佳聚焦图像中的干涉区域进行相位重建。最后,以相位分辨率板作为实验样品来验证所提方法的可行性。实验结果表明:相位分辨率板的高度为 $0.336\ \mu\text{m}$,平均绝对误差为 $0.023\ \mu\text{m}$,所提方法具有准确性高、稳定性好以及结构紧凑等优点。

关键词:数字全息;显微成像;自参考聚焦;共路剪切

中图分类号:O438.1 **文献标识码:**A **doi:**10.37188/OPE.20243223.3416

Self-reference focusing imaging for common-path shearing digital holographic microscopy

HUANG Linlin, LIU Bingcai*, WANG Hongjun, ZHANG Xueling,
ZHANG Ping, ZHANG Ruixuan, TIAN Ailing

(Shaanxi Province Key Laboratory of Thin films Technology and Optical Test,
Xi'an Technological University, Xi'an 710021, China)

* Corresponding author, E-mail: liubingcai@xatu.edu.cn

Abstract: This paper presents a self-reference focusing digital holographic microscopy method based on common-path shearing. The method employs a dual-polarization grating shearing device that utilizes the polarization grating's spectral properties to replicate the object wave carrying sample information. By adjusting the distance between the dual-polarization gratings, the spacing between the micrograph and the holographic interference image on the camera can be flexibly controlled, enabling simultaneous recording of both. Through recording multiple images from defocus to focus to defocus, the Brenner gradient method is applied to determine the optimal focus, achieving self-reference focusing. The ASM is then used to reconstruct the interference region's phase at the best focus. Experimental verification, using a phase resolution plate, demonstrated a measured phase height of $0.336\ \mu\text{m}$ with an average absolute error of $0.023\ \mu\text{m}$.

收稿日期:2024-06-07;修订日期:2024-07-24.

基金项目:陕西省科技厅资助项目(No. 2023-YBGY-136);陕西省教育厅资助项目(No. 23JY034)

The proposed method features high accuracy, stability, and a compact design.

Key words: digital holography; microscopic imaging; self-reference focusing; common-path shearing

1 引言

数字全息显微成像^[1]是近年来数字全息研究领域的一个热点,是数字全息技术和显微成像技术的结合,能够实现非接触、高分辨率、三维的显微成像,为生物医学^[2]、材料科学^[3]和工业检测^[4]等领域提供了全新的研究工具和方法。在数字全息显微成像中,物体的聚焦成像直接影响相位重建结果的准确性。因此,为了获得准确的相位信息,成像系统要能实现手动调焦或自动聚焦^[5]。手动调焦方式依赖于人眼进行距离测量和手动步进来实现清晰对焦,这种方式的可靠性、准确性以及效率都相对较低。与之相比,自动聚焦过程依赖于数字全息技术的数字化特性,利用计算机模拟从物光平面到全息记录平面的衍射全过程,并进行数值重建^[6]。通过评价重建图像的聚焦效果,可以确定最佳的聚焦位置。重建图像越清晰,重建位置越接近最佳的焦平面位置。

目前,自动聚焦过程中的聚焦评价方法大多是基于空域信息类和频域信息类。当图像聚焦时,物体边缘更清晰,高频分量更多;反之,离焦图像物体边缘更模糊,高频分量更少。空域类方法有灰度方差法^[7]、拉普拉斯算法^[8]、Brenner梯度法^[9]和熵函数法^[10]等,都是通过计算高频分量来判断图像是否聚焦;频域类方法将图像变换到频域内计算高频分量进行评价,如傅里叶变换法^[11]和小波变换法^[12]。除了空域类和频域类方法,深度学习也被广泛应用于自动聚焦领域。Ren等^[13]提出基于卷积神经网络(Convolutional Neural Network, CNN)的自动聚焦方法,通过设计一个CNN模型,将自动聚焦过程视为一个回归问题,从而直接预测出最佳的聚焦位置。近年来,Dong等^[14]提出一种计算光波场之间相关系数的自动聚焦算法,应用在双波长数字全息测量中。Ren等^[15]提出一种基于结构张量的数字全息自动聚焦算法,该方法利用 Schatten 矩阵范数代替矢量范数,显著提高了计算速度。Winnik等^[16]提出一种通过利用抛物线插值的黄金选择搜索

方法,解决了单变量优化问题,该方法成功地应用于 3 种不同的自动对焦情况,并实现了高达 136 倍的加速。Kwon 等^[17]提出了一种利用傅里叶运算和角谱法的相位检测自动聚焦法(PDAF),在高透射率的样品中也能实现快速准确的聚焦。在数字全息聚焦成像中,自动聚焦算法有着高精度、高效性、减少人工干预等优点,但是在使用自聚焦算法时,全息图中干涉条纹的密度、清晰度、失真情况,以及可能出现的重叠和非线性效应等,都会影响数值重建精度,从而影响聚焦位置判断。

针对以上问题,本文提出了一种无需考虑全息图条纹噪声影响的数字全息聚焦成像方法。该方法基于共路剪切数字全息显微系统,利用双偏振光栅的分光特性,同时记录显微图和全息图;再利用 Brenner 梯度法对显微图完成自参考聚焦,使用角谱法完成了聚焦图像干涉区域的相位重建。

2 原理

2.1 基于共路剪切的自参考聚焦数字全息显微成像

图 1 为基于共路剪切的自参考聚焦数字全息显微系统原理。He-Ne 激光器($\lambda = 632.8 \text{ nm}$)发出的光通过偏振片 P1,进入由显微物镜 MO1 ($40\times$, $\text{NA}=0.60$)和焦距为 150 mm 的透镜 L1 组成的扩束准直系统;准直后,光束经光阑 AS 进行光束尺寸调节后照射待测样品 Sample,通过待测样品后由显微物镜 MO2 ($20\times$, $\text{NA}=0.40$)对待测样品进行放大处理;经管镜 L2 后,由双偏振光栅 PG 组成的剪切装置对带有相位信息的物光进行横向剪切,形成光束复制;再通过调节偏振片 P2 实现自参考干涉成像,由 CMOS 相机记录。在 CMOS 成像靶面上有两个样品像,其中一个样品是全息干涉成像,另一个是样品非干涉显微成像。

双偏振光栅设置原理如图 2 所示,偏振光栅(Polarization Grating, PG)是一种基于入射光的

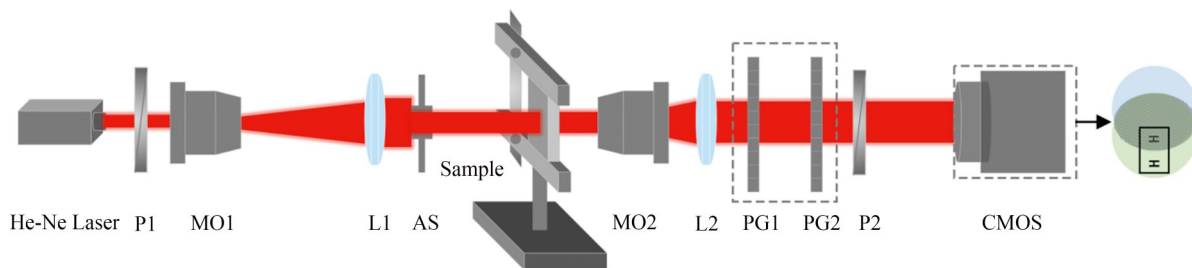


图1 基于共路剪切的自参考聚焦数字全息显微系统原理

Fig. 1 Schematic diagram of self-reference focusing digital holographic microscopic system based on common-path shearing

偏振态实现选择性分光的衍射光学元件,其衍射角度取决于光栅线数^[18]。通过控制入射光的偏振态,偏振光栅能够调控+1级和-1级之间的能量分布。当入射光束偏振态不同时,偏振光栅呈现不同的衍射特性。

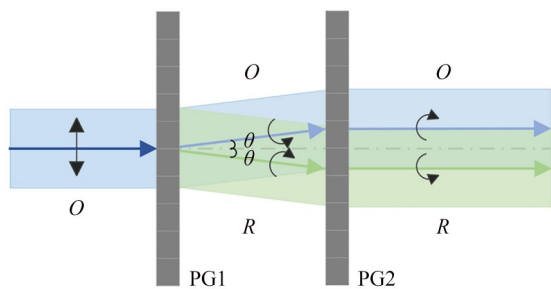


图2 双偏振光栅设置原理

Fig. 2 Schematic diagram of dual-polarization grating setup

单个 PG 的光束偏转角度基于光栅方程决定,即:

$$\sin \theta_m = \frac{m\lambda}{d} - \sin \theta_{in}, \quad (1)$$

式中: θ_m 为出射角, θ_{in} 是入射角, m 是衍射级次, d 是光栅周期, λ 是入射波长。

由图2可以看出,携带样品相位信息的物光 O 通过 PG1, PG1 将物光分成相互正交的+1级左旋圆偏振物光 O 和-1级右旋圆偏振参考光 R ,两束物参光再进入 PG2;当左旋和右旋圆偏振光入射 PG2 后,出射-1级右旋圆偏振光和+1级左旋圆偏振光。所以物光 O 和参考光 R 进入 PG2 时,左旋圆偏振物光 O 变成右旋圆偏振物光 O ,右旋圆偏振参考光 R 变成左旋圆偏振参考光 R ;最后,调节两光栅之间的距离来控制剪切量,从而实现物参光不同程度上的分离,再通过旋转

偏振片,物光 O 和参考光 R 干涉形成全息图。其光强分布可表示为:

$$I(x, y) = |O(x, y) + R(x, y)|^2 = |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + O(x, y)R^*(x, y) + O^*(x, y)R(x, y), \quad (2)$$

式中: $O^*(x, y)$ 表示 $O(x, y)$ 的共轭光, $R^*(x, y)$ 表示 $R(x, y)$ 的共轭光。

2.2 自参考聚焦技术

自参考干涉图如图3所示, R 为 O 的复制光束,经过双偏振光栅出射的两光束保持平行出射,通过对 R_1 区域内样品显微像进行聚焦评价,来确定 O_2 和 R_2 重叠的干涉区域内样品的聚焦成像位置。根据图1原理对样品进行测量,将样品非干涉显微像和样品全息干涉像同时记录在 CMOS 上(即 R_1 区域内非干涉图、 O_2 和 R_2 重叠区域内干涉图同时记录在 CMOS 上);连续记录多幅离焦-聚焦-离焦范围内的图像,对记录的多幅图像进行分区域处理。首先,利用 Brenner 梯度法对记录的多幅图像中左边区域的样品显微像进行聚焦评价;接着,通过左边区域的样品显微像的聚焦评价结果选择出最佳聚焦位置图像;最后,对最佳聚焦位置图像中的右边干涉区域进行相位重建。

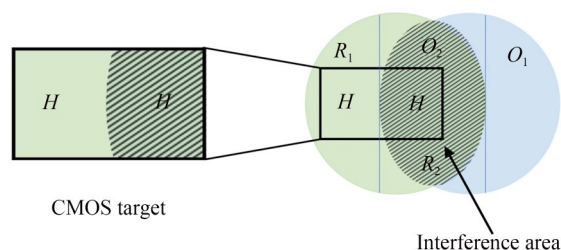


图3 自参考干涉图

Fig. 3 Self-reference interference pattern

Brenner 梯度法是一种常用于图像聚焦评价的方法,其原理是利用图像中像素灰度值的梯度信息来判断图像的聚焦程度,即:

$$BRE = \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N [I(i+2, j) - I(i, j)]^2, \quad (3)$$

其中: $I(i, j)$ 为图像在像素点 (i, j) 的灰度值, M, N 为图像像素两个方向维度上的数目。由于图像在最聚焦时,拥有最多细节成分,含有最多高频分量,相应像素灰度值梯度也较大,即在图像最聚焦时, Brenner 函数利用是否达到最大值来判断图像是否聚焦。

2.3 相位重建

由于角谱重建法相较菲涅尔重建法能够始终保持重建图像像元尺寸与传感器的像元尺寸相同,相较卷积法其运算速度更快且准确性更高。因此,本文采用角谱法对干涉区域进行相位重建,角谱理论可以很好地描述光波从物面到全息图记录面的频谱变化关系。依据角谱理论,像平面上的光波场在频域中频谱满足:

$$G(f_x, f_y) = G_0(f_x, f_y) G_B(f_x, f_y), \quad (4)$$

式中: (f_x, f_y) 是重建平面中点的频域坐标; $G_B(f_x, f_y)$ 是光波在自由空间的传递函数。

$$G_B(f_x, f_y) = \exp\left(j \frac{2\pi}{\lambda} z_i \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}\right), \quad (5)$$

式中 z_i 表示全息图平面到重建像平面的距离。

根据衍射理论,当再现光波 $C(x, y)$ 照射全息图时,会在紧贴全息图后表面得到光波场,进

行傅里叶变换得到:

$$G_0(f_x, f_y) = F\{C(x, y)I(x, y)\}. \quad (6)$$

再根据角谱理论,可得到像平面上再现光场的频谱,对频谱进行逆傅里叶变换可得到再现光波场的复振幅分布:

$$U(x_i, y_i) = F^{-1}\{F[C(x, y)I(x, y)]G_B(f_x, f_y)\}. \quad (7)$$

3 实 验

为了验证该方法的准确性,根据图 1 搭建实验装置如图 4 所示, He-Ne 激光器的中心波长为 632.8 nm; CMOS 相机 (IMAGING, DFK 33UX183) 的分辨率为 5 742 pixel $\times$ 3 638 pixel, 像素尺寸为 2.4 $\mu\text{m} \times$ 2.4 μm ; 偏振光栅 (LBTEK, PZGS-5-633) 的周期为 5 μm , 衍射效率大于 98%, 衍射角度为 7.27°。当直径为 10 mm 的光束入射到 PG1 后发生 ± 1 级衍射, 在距离 PG1 后 39 mm 处, ± 1 级光完全分离; 调节 PG2 在 PG1 后 0~39 mm 内的位置, 使在 CMOS 相机靶面上的 ± 1 级光从完全重合至逐渐分离, 满足自参考聚焦需求。

采用相位分辨率板 (USAF 1951 Resolution Target) 作为待测样品进行实验验证, 将显微物镜安装在芯明天压电扫描台 (P70. Z200S) 上, 芯明天压电扫描台的扫描范围为 0~200 μm , 满足相位分辨率板离焦-聚焦-离焦图像的采集。通过控制压

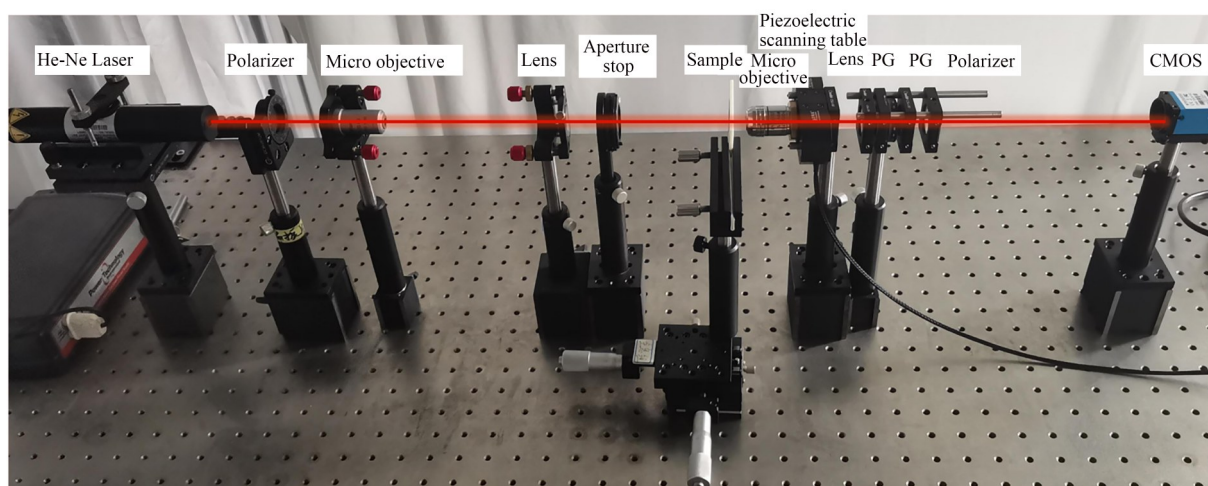


图 4 基于共路剪切的自参考聚焦数字全息显微系统实验装置

Fig. 4 Experimental setup of self-reference focusing digital holographic microscopic system based on common-path shearing

电扫描台来控制显微物镜与相位分辨率板之间的距离,连续采集 11 幅间隔为 10 μm 的离焦-聚焦-离焦图像,其中一幅图像如图 5 所示。采集图像的左边区域为显微像,右边区域为全息干涉像。

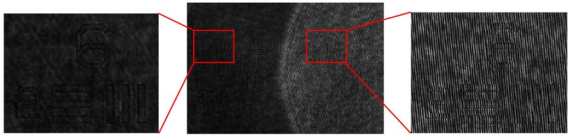
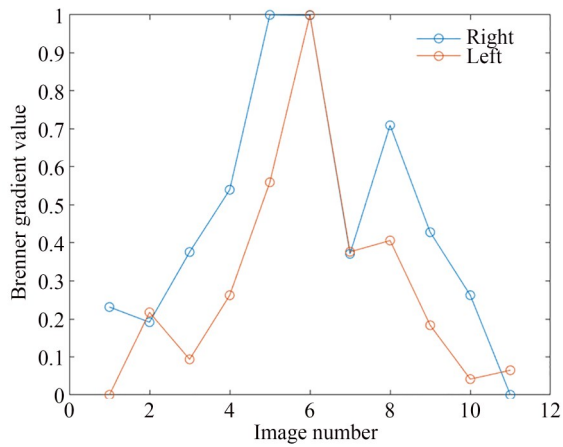


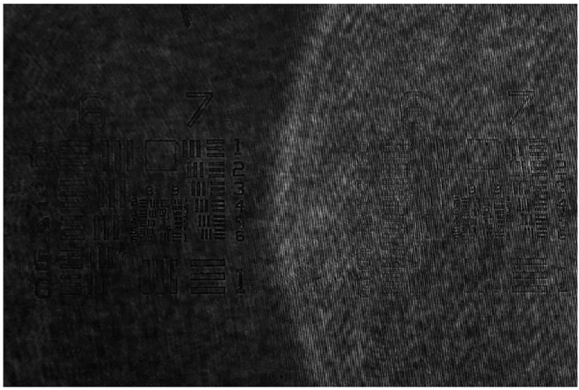
图 5 采集图像
Fig. 5 Acquired images



(a) 左右区域聚焦评价对比
(a) Comparison of the left and right area focus evaluation results

接着对 11 幅连续图像的左右区域进行分区域处理,利用 Brenner 梯度法分别对左右区域的相位分辨率板成像进行聚焦评价对比,聚焦评价结果如图 6 所示。由图 6(a)可以看出,左边区域聚焦评价有峰值且在第 6 幅中出现峰值,表明第 6 幅图像为最佳聚焦图像,如图 6(b)所示;右边区域的评价结果无单峰,且在第 5 幅和第 6 幅中均出现最大值,无法评价是否聚焦成像。

使用角谱法对图 6(b)的右边区域进行相位重建,相位分辨率板的重建结果如图 7 所示。



(b) 第 6 幅图像
(b) Image 6

图 6 聚焦评价结果

Fig. 6 Focus evaluation results

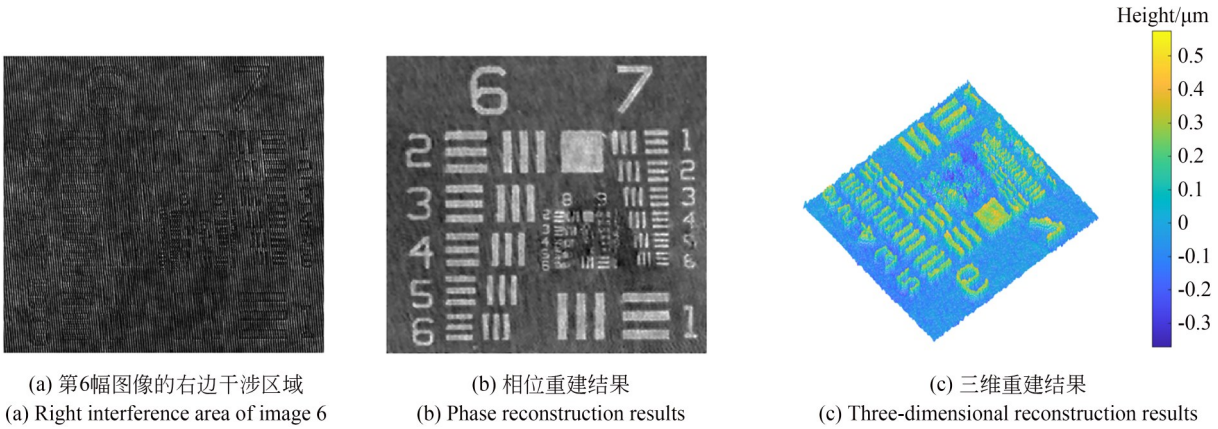


图 7 第 6 幅图像相位分辨率板重建结果

Fig. 7 Reconstruction results of phase resolution plate in Image 6

4 讨论

为了验证实验结果的准确性,对除第 6 幅以

外的图像进行相位重建,结果如图 8 所示。可以看出,图像左边区域的显微像聚焦程度越好,重建的相位分辨率板越清晰且边缘更锐利。

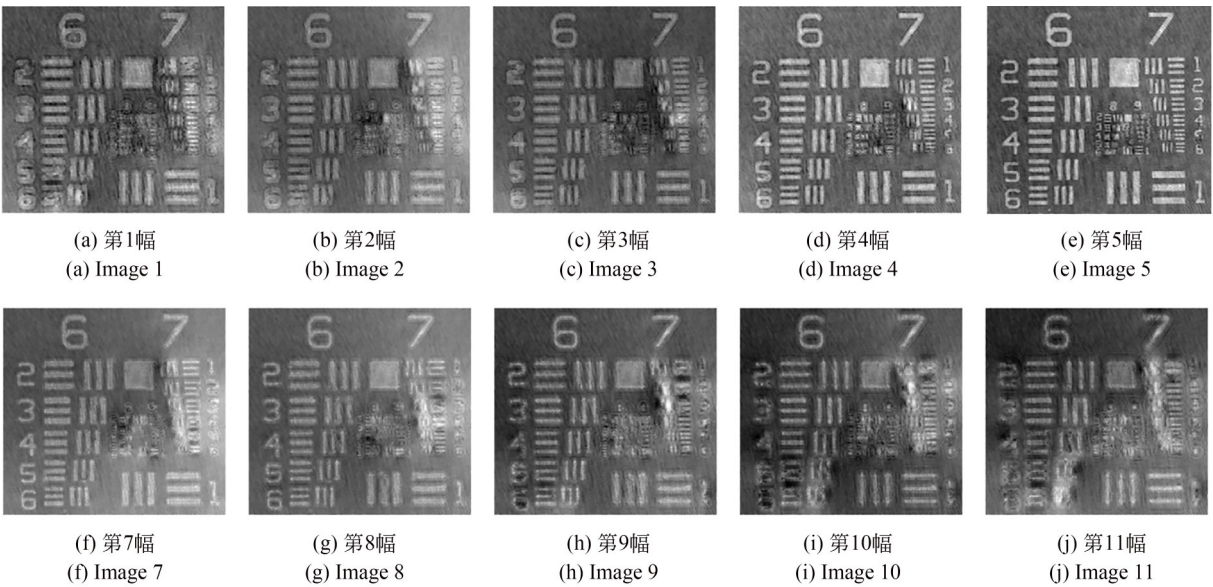


图 8 相位重建结果

Fig. 8 Phase reconstruction results

接着验证第 6 幅图像左边区域在最佳聚焦位置时,右边干涉区域的相位重建结果是否最佳,将第 5 幅、第 6 幅、第 7 幅的相位重建结果与白光干涉仪(ZYGO,NewView 8000)的测量结果进行对比分析。通过截面线选取,得到相位分辨率板 6-2 截面的相位高度如图 9 所示。

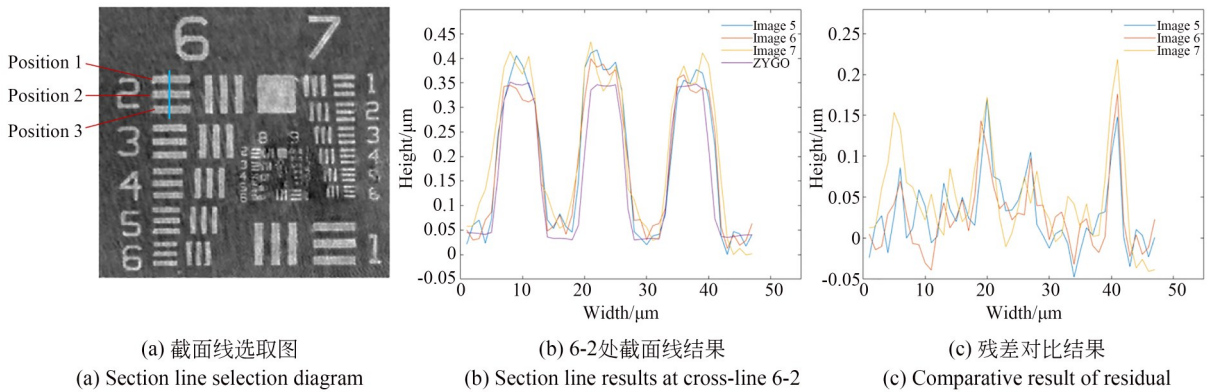


图 9 6-2 截面的相位高度

Fig. 9 Section phase height at cross-line 6-2

对图 9(a)中 6-2 的 3 个位置高度取平均值,结果如表 1 所示。测得第 5 幅、第 6 幅和第 7 幅 6-2 处的平均纵向高度分别为 0.355,0.336 和 0.368 μm ,与白光干涉仪的测量值 0.313 μm 相比,绝对误差分别为 0.042,0.023 和 0.055 μm ;相对误差分别为 13.42%,7.35% 和 17.57%。由表 1 可以看出,第 6 幅 6-2 处 3 个位置的高度比较接近;第 5 幅和第 7 幅 6-2 处的平均高度均高于第 6 幅的平均高度和白光干涉仪的测量高度且

3 个位置的高度差较大。

表 1 6-2 截面线相位高度结果

Tab. 1 Phase height results of section line at cross-line 6-2 (μm)

Image number	Position 1	Position 2	Position 3	Average height
5	0.383	0.347	0.336	0.355
6	0.315	0.358	0.336	0.336
7	0.366	0.381	0.356	0.368

进一步对实验结果进行分析,将第 5 幅、第 6 幅和第 7 幅的相位重建结果与白光干涉仪测得的结果进行残差对比,结果如图 9(c)所示。采用峰谷差值 (Peak-Valley, PV) 和均方根值 (Root-Mean-Square, RMS) 作为评价指标,残差分析结果如表 2 所示, PV 值分别为 0.220, 0.215 和 0.259 μm , RMS 值分别为 0.053, 0.051 和 0.075 μm 。结果表明:第 6 幅的 PV 值和 RMS 值均小于第 5 幅和第 7 幅,验证了基于共路剪切的自参考聚焦数字全息显微成像方法的准确性。

5 结 论

本文提出基于共路剪切的自参考聚焦数字全息显微成像技术,实现了数字全息自参考聚焦成

表 2 残差对比分析

Tab. 2 Comparative analysis of residual errors

Image number	PV/ μm	RMS/ μm
5	0.220	0.053
6	0.215	0.051
7	0.259	0.075

像。通过调节双偏振光栅之间的距离来控制物参光的分离程度,实现了显微图和全息图的同时记录。采用对显微像和全息干涉像的分区域处理方法,实现了自参考聚焦及相位重建。最后对相位分辨率板进行测量,测量高度为 0.336 μm ,绝对误差为 0.023 μm 。实验结果证明了该方法的可行性和准确性,为数字全息聚焦成像提供了新思路。

参考文献:

- [1] 邓丽军,黄星艳,曾吕明,等. 基于双色 LED 芯片的双波长像面数字全息显微术[J]. 光学学报, 2018, 38(1): 135-141.
DENG L J, HUANG X Y, ZENG L M, *et al.* Dual-wavelength image-plane digital holographic microscopy based on bi-color LED chips[J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(1): 135-141. (in Chinese)
- [2] 辛露,肖文,刘雅坤,等. 数字全息成像定量监测癌细胞凋亡过程形态变化(特邀)[J]. 光子学报, 2022, 51(10): 421-428.
XIN L, XIAO W, LIU Y K, *et al.* Quantitative monitoring of morphological change of cancer cells apoptosis by digital holographic microscopy(invited)[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2022, 51(10): 421-428. (in Chinese)
- [3] XIA P, RI S E, WANG Q H, *et al.* Nanometer-order thermal deformation measurement by a calibrated phase-shifting digital holography system[J]. *Optics Express*, 2018, 26(10): 12594-12604.
- [4] 陈竹,姜宏振,刘旭,等. 数字全息术用于光学元件表面缺陷形貌测量[J]. 光学精密工程, 2017, 25(3): 576-583.
CHEN ZH, JIANG H ZH, LIU X, *et al.* Measurement of surface defects of optical elements using digital holography[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2017, 25(3): 576-583. (in Chinese)
- [5] 周丽平,孙志峻,张泉. 显微视觉系统的自动聚焦及控制[J]. 光学精密工程, 2013, 21(3): 807-812.
ZHOU L P, SUN ZH J, ZHANG Q. Auto-focusing and control of micro-vision system[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2013, 21(3): 807-812. (in Chinese)
- [6] 王华英,王广俊,王大勇,等. 数字全息显微中的自动聚焦[J]. 光电子激光, 2010, 21(8): 1232-1236.
WANG H Y, WANG G J, WANG D Y, *et al.* Autofocus in digital holographic microscopy[J]. *Journal of Optoelectronics Laser*, 2010, 21(8): 1232-1236. (in Chinese)
- [7] LANGEHANENBERG P, KEMPER B, DIRKSEN D, *et al.* Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging[J]. *Applied Optics*, 2008, 47(19): D176-D182.
- [8] 袁涛,易定容,蒋威,等. 基于双模糊的显微图像聚焦评价方法[J]. 光学学报, 2023, 43(10): 1010001.
YUAN T, YI D R, JIANG W, *et al.* Double blur micro-images focusing evaluation method[J]. *Acta Optica Sinica*, 2023, 43(10): 1010001. (in Chinese)
- [9] 梁路瑶,赵晓云,赵金泉. 一种基于 U-NET 多景深图片目标物定位自动聚焦算法[J]. 强激光与粒子束, 2022, 34(12): 161-170.
LIANG L Y, ZHAO X Y, ZHAO J Q. An automatic focusing algorithm based on U-Net for target

- location in multiple depth-of-field scene [J]. *High Power Laser and Particle Beams*, 2022, 34(12): 161-170. (in Chinese)
- [10] 翟永平, 周东翔, 刘云辉, 等. 聚焦函数性能评价指标设计及最优函数选取[J]. 光学学报, 2011, 31(4): 242-252.
- ZHAI Y P, ZHOU D X, LIU Y H, *et al.* Design of evaluation index for auto-focusing function and optimal function selection[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 31(4): 242-252. (in Chinese)
- [11] LYU M, YUAN C J, LI D Y, *et al.* Fast autofocusing in digital holography using the magnitude differential [J]. *Applied Optics*, 2017, 56(13): 152-157.
- [12] 王义文, 刘献礼, 谢晖. 基于小波变换的显微图像清晰度评价函数及 3-D 自动调焦技术[J]. 光学精密工程, 2006, 14(6): 1063-1069.
- WANG Y W, LIU X L, XIE H. A wavelet-based focus measure and 3-D autofocusing for microscope images[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2006, 14(6): 1063-1069. (in Chinese)
- [13] REN Z B, XU Z M, LAM E Y. Learning-based nonparametric autofocusing for digital holography [J]. *Optica*, 2018, 5(4): 337.
- [14] DONG J, JIA S H, JIANG C. Correlation-coefficient based auto-focusing algorithm for focus detection in shape measurement using two-source digital holographic interferometry [J]. *Measurement Science and Technology*, 2018, 29(8): 085012.
- [15] REN Z B, LAM E Y, ZHAO J L. Acceleration of autofocusing with improved edge extraction using structure tensor and Schatten norm[J]. *Optics Express*, 2020, 28(10): 14712-14728.
- [16] WINNIK J, SUSKI D, ZDAŃKOWSKI P, *et al.* Versatile optimization-based speed-up method for autofocusing in digital holographic microscopy [J]. *Optics Express*, 2021, 29(21): 33297-33311.
- [17] KWON I H, LEE J, NA H K, *et al.* Numerical phase-detection autofocusing method for digital holography reconstruction processing [J]. *Applied Physics Letters*, 2024, 124(9): 093701.
- [18] 刘壮, 王启东, 王超, 等. 正交级联液晶偏振光栅角度偏转模型[J]. 光子学报, 2021, 50(11): 269-278.
- LIU ZH, WANG Q D, WANG CH, *et al.* Deflection angular model of orthogonal cascade liquid crystal polarization gratings[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2021, 50(11): 269-278. (in Chinese)

作者简介:



黄琳琳(1999—),女,陕西咸阳人,硕士研究生,2021年于西安工业大学获得学士学位,主要从事数字全息测量及光学精密检测方面的研究。E-mail: huanglinlin_n@163.com

通讯作者:



刘丙才(1981—),男,山东济宁人,副教授,2005年、2008年于西安工业大学分别获得学士和硕士学位,2015年于西安交通大学获得博士学位,主要从事光学测量、数字全息和光学图像处理等方面的研究。E-mail: liubingcai@xatu.edu.cn