

# Simulation und experimentelle Prüfung fokusinvarianter optischer Systeme bei teilkohärenter Abbildung und Phasenkontrast in der Mikroskopie

T. Hellmuth, S. Rathgeb

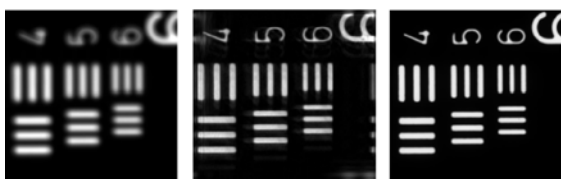
Fachhochschule Aalen

[mailto: thomas.hellmuth@fh-aalen.de](mailto:thomas.hellmuth@fh-aalen.de)

In der Mikroskopie werden kubische Phasenplatten eingesetzt, um die Schärfentiefe durch inverse Filterung um bis zu einem Faktor 10 zu verbessern. Dieser Ansatz setzt jedoch eine inkohärente Abbildung voraus. Es wurde deshalb sowohl durch Simulation als auch durch Experiment untersucht, wie der Kohärenzgrad bei teilkohärenter Beleuchtung und bei Phasenkontrast die Abbildungseigenschaften bei inverser Filterung beeinflussen.

## 1 Problemstellung

Bringt man in die Austrittspupille eines Mikroskopobjektivs eine kubische Phasenplatte mit der Flächenfunktion  $f(x,y) = \alpha(x^3+y^3)$  so ändert sich die Punktbildfunktion und damit die OTF bei Defokussierung kaum [1]. Dabei beschreibt der Parameter  $\alpha$  die „Stärke“ der Phasenplatte. Filtert man das mit Phasenplatte gewonnene Bild eines 3D-Objekts mit der fouriertransformierten PSF, so erhält man ein Bild mit sehr hoher Schärfentiefe. Abb 1 (links) zeigt das um  $2\mu\text{m}$  defokussierte Bild eines USAF-Testmusters (Gruppe 6) aufgenommen mit Zeiss Plan-Apochromat 63/1.4 Öl. Nimmt man unter gleichen Bedingungen das Bild mit Phasenmaske  $\alpha = 1.9\text{e-}4 \text{ mm}^{-2}$  auf und filtert invers, so erhält man das Bild in Abb. 1 (Mitte). Zum Vergleich zeigt Abb. 1 (rechts) das fokussierte Bild.



**Abb.1** defokussiert (links), invers gefiltert (Mitte), fokussiert (rechts)

Bei dem beschriebenen Verfahren geht man jedoch von einer inkohärenten Abbildung aus. Gegenstand dieses Artikels ist daher die Untersuchung des Einflusses des Kohärenzgrads der Beleuchtung auf die Qualität des rückgefalteten Bildes. Insbesondere wird die inverse Filterung von Phasenkontrastbildern aufgenommen mit Phasenplatte als Spezialfall einer teilkohärenten Abbildung untersucht.

## 2 Methode und Ergebnisse

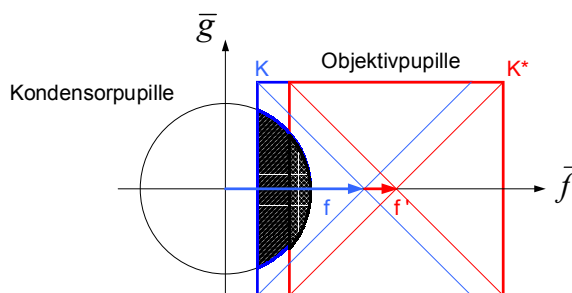
Zunächst wird das Mikroskopbild mit Hilfe der optischen Designdaten und der Flächenparameter der Phasenplatte simuliert. Zur Anwendung kommt das im Rahmen des Projekts entstandene Simulationsprogramm PHYOS. Dabei wird die Objektfunktion eines Kantenmusters nach Fourier transformiert. Mit diesem Objektspektrum  $\tilde{F}_{obj}$  und der bilinearen Transferfunktion  $\tilde{T}$  wird das Bildspektrum  $\tilde{J}_{image}$  berechnet ([2]):

$$\tilde{J}_{image}(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} \tilde{T}(f, f') \tilde{F}_{obj}(f' + f) \tilde{F}_{obj}^*(f') df'$$

mit

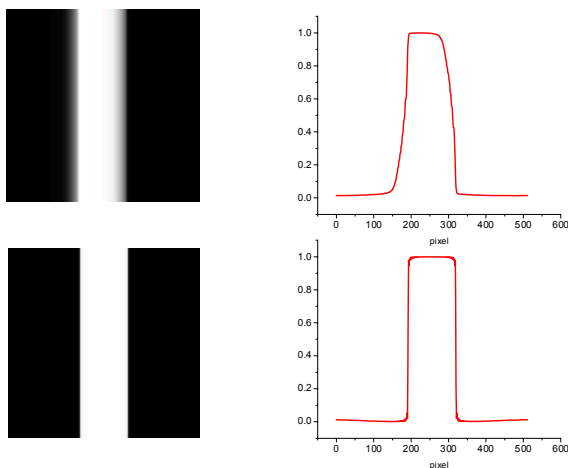
$$\tilde{T}(f, f') = \iint_{-\infty}^{+\infty} \tilde{J}_{cond}(\bar{f}, \bar{g}) \tilde{K}(\bar{f} + f' + f, \bar{g}) \tilde{K}^*(\bar{f} + f', \bar{g}) d\bar{f} d\bar{g}$$

Dabei ist  $\tilde{J}_{cond}$  die Pupillenfunktion des Kondensors,  $\tilde{K}$  bzw.  $\tilde{K}^*$  die des Objektivs (mit Phasenplatte). Abb. 2 zeigt die Pupillen. Wie im Experiment ist in der Simulation die Phasenplatte mit einer quadratischen Blende versehen.



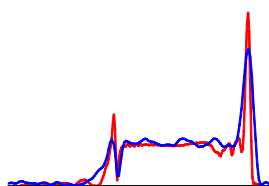
**Abb. 2** Pupillen für bilineare Transferfunktion

Aus dem Bildspektrum kann man durch inverse Fouriertransformation das Bild gewinnen. Abb. 3 oben zeigt das simulierte Bild mit Phasenplatte, wenn die Objektivapertur ausgeleuchtet ist.



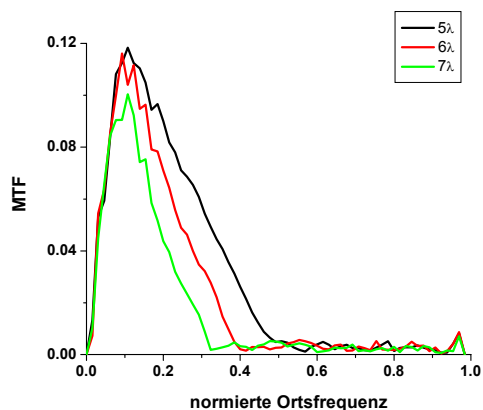
**Abb. 3** Kantenbild mit Phasenmaske (oben), ohne Phasenmaske (unten)

Filtert man das so gewonnene Bild invers, so erhält man das Bild, wie man es ohne Phasenmaske bekäme (Abb. 3 unten).



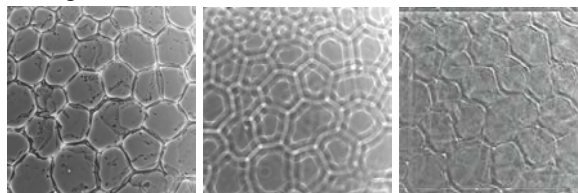
**Abb. 4** Intensitätsverteilung des invers gefilterten Kantenbildes bei Beleuchtung mit hohem Kohärenzgrad. Simulation (rot), Experiment (blau)

Ist der Durchmesser der Kondensorapertur jedoch nur ein zehntel der Objektivapertur, so erhält man für das rückgefaltete Bild die Intensitätsverteilung in Abb. 4 (rot simuliert, blau gemessen). Das Ergebnis zeigt, dass bei teilkohärenter Beleuchtung mit hohem Kohärenzgrad mit ausgeprägten Artefakten zu rechnen ist.



**Abb. 5** MTF Phasenkontrast mit Phasenplatte für drei verschiedene Defokussierungen

Spezialfall ist das Phasenkontrastverfahren nach Zernike. Mit Hilfe des Simulationsprogramms PHYOS wurde die Kontrastübertragung für Phasengitter mit verschiedenen Gitterkonstanten berechnet. Die berechnete Modulationsübertragungsfunktion für verschiedene Defokussierungen zeigt Abb. 5. Das Ergebnis zeigt, dass sich über 8 Schärfentiefebereiche der Kontrast nur wenig ändert. Durch die Phasenplatte wird jedoch die Auflösung um einen Faktor 2 reduziert.



**Abb. 6** Phasenkontrast. Links fokussiert. Mitte defokussiert. Rechts defokussiert mit Phasenplatte und invers gefiltert

Abb. 6 (links) zeigt das Phasenkontrastbild einer Zellstruktur. Das defokussierte Bild zeigt Abb. 6 (Mitte). Das rechte Bild zeigt das invers gefilterte defokussierte Bild, welches mit Phasenmaske aufgenommen wurde. Durch die inverse Filterung kann zwar im Vergleich zum konventionellen defokussierten Bild eine Kontrastverbesserung erzielt werden, die Objektivtreue ist jedoch eingeschränkt.

### 3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass die Qualität der rückgefalteten Bilder drastisch abnimmt, wenn der Kohärenzgrad der Beleuchtung zunimmt. Dies ist auch qualitativ zu erwarten, da die Phasenplatte durch die Kondensorapertur nicht mehr voll ausgeleuchtet wird. Sowohl Simulation als auch Experimente zeigen, dass bei Phasenkontrast die Schärfentiefe durch Verwendung einer Phasenplatte und durch entsprechende inverse Filterung die Schärfentiefe erhöht wird. Die Auflösung und Objektivtreue ist jedoch eingeschränkt.

### Literatur

- [1] E.R. Dowski, W.T. Cathey, Appl. Opt., 34, 859-1866, (1995)
- [2] M. Born, E. Wolf, „Principles of Optics“, Pergamon Press (1986)
- [3] T. Hellmuth, S. Rathgeb, „Simulation of focus invariant optical systems“ SPIE Proc. 5249, 62-70 (2004)

Projektförderung: Landesstiftung Baden-Württemberg