



Digitale Holografie zur dreidimensionalen Beobachtung in mikro-opto-fluidischen Systemen

Kontakt Nail Sabitov Tel.: (0 36 77) 69 1411 Fax: (0 36 77) 69 1281 E-mail: nail.sabitov@tu-ilmenau.de
 Thomas Meinecke Tel.: (0 36 77) 69 4322 Fax: (0 36 77) 69 1281 E-mail: thomas.meinecke@tu-ilmenau.de
 Stefan Sinzinger Tel.: (0 36 77) 69 2490 Fax: (0 36 77) 69 1281 E-mail: stefan.sinzinger@tu-ilmenau.de

Digitale holografische Messtechnik kann zur Gewinnung dreidimensionaler Bildinformation eingesetzt werden. Dieses Potenzial zur Abbildung mit erweiterter Tiefenschärfe ist insbesondere in mikroskopischen Abbildungssystemen z.B. für lab-on-a-chip Anwendungen von großer Bedeutung. Dabei interessiert insbesondere die räumliche Zell- oder Partikelverteilung innerhalb des Fluidkanals. In Kombination mit optischen Systemen zur Partikelmanipulation kann eine gezielte Steuerung des Partikelflusses mit gleichzeitiger Überwachung realisiert werden. Wir präsentieren grundlegende experimentelle Ergebnisse zur digitalen Holografie und vergleichen unterschiedliche Aufbauelemente und Rekonstruktionsalgorithmen. Verschiedene Konzepte zur Integration holografisch-optischer Abbildungssysteme in optischen Pinzettensystemen wurden untersucht.

Motivation

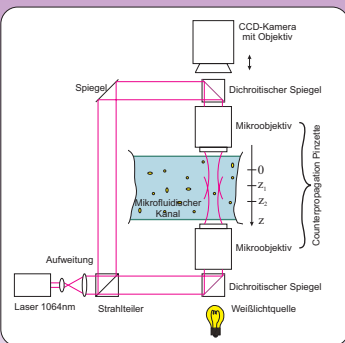


Bild 1: Herkömmliche Anordnung mit Weißlichtquelle

In einem mikrofluidischen Kanal werden transparente Partikel durch eine optische Counterpropagation Pinzette eingefangen und verschoben. Zur Überwachung der Teilchenmanipulationen wird der Kanal mit Weißlicht beleuchtet und durch ein Objektiv auf den Kamerasensor abgebildet. Die Schärfentiefe dieses optischen Beobachtungssystems ist zu gering (ca. 20µm) und erlaubt keine Betrachtung in der gesamten Kanaltiefe ohne mechanische Nachstellungen. Der Einsatz einer kohärenten Laserlichtquelle anstelle der Weißlichtbeleuchtung ermöglicht die Aufnahme eines Hologramms, aus dem durch die numerische Rekonstruktion der Objektwellen die Bildinformationen über einen erweiterten Tiefenschärfenbereich gewonnen werden. Dieses digitalholografische System lässt sich ohne Funktionsbeeinträchtigungen der Counterpropagation Pinzette integrieren.

Varianten der digitalholografischen Aufbauten

Die aus einem Hologramm rekonstruierte Objektwellen besteht aus einer 0. Beugungsordnung (verursacht durch die Beleuchtung, liefert keine Information!) sowie zwei Beugungsbildern (reell und virtuell), die sich störend überlagern können. Zur Trennung dieser Anteile existieren zwei mögliche holografische Aufbauelemente:

off-axis

Durch die Interferenz der Objektwellen mit einer schräg einfallenden ebenen Referenzwellen ergibt sich eine Modulation des Hologramms. Durch eine nachfolgende Spektralanalyse lassen sich die 0. Beugungsordnung sowie Zwillingbild wirksam unterdrücken [1].

in-line

Der Referenzpfad entfällt. Es interferieren die im Objekt gebeugte Objektwellen sowie der nicht gebeugte Anteil der Beleuchtung (Referenzwellen). Ein Amplitudenfilter (Dot) in der Fourier-Ebene unterdrückt die 0. Beugungsordnung, die im aufgenommenen Hologramm nicht mehr enthalten ist (Dunkelfeld) [2].

Eine Optik (umgekehrtes Fernrohr) vor dem CCD Sensor bildet die im Mikrofluidkanal kollimierte Objektwellen vergrößert in die Hologrammebene ab.

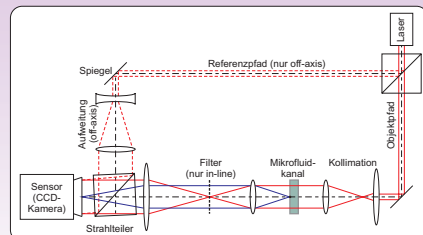


Bild 2: Holografische Versuchsanordnung

Spektralanalyse des Hologramms

Interferenz an der Hologrammebene

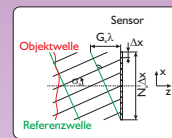


Bild 3: Beschreibung der Objekt- und Referenzwellen

Objektwellen: $O = O(x, y)$
 Referenzwellen: $R = A_0 \exp(i2\pi(\beta_x x + \beta_y y))$
 mit $\tan \alpha_x = \frac{G_x \lambda}{N_x \Delta x} = \lambda G_x A_x v_x = \lambda \beta_x$
 $\tan \alpha_y = \frac{G_y \lambda}{N_y \Delta y} = \lambda G_y A_y v_y = \lambda \beta_y$

$$I_{\text{obj}} = |O + R|^2 = (O + R) \cdot (O^* + R^*) = |O|^2 + |R|^2 + O^* R + O R^*$$

Spektralanalyse: Fouriertransformation und Filterung

$$\mathcal{F}\{I_{\text{obj}}\} = \mathcal{F}\{|O(x, y)|^2\} + \mathcal{F}\{|R(x, y)|^2\} + A_0 \mathcal{F}\{O^*(x, y)\} \delta(-\beta_x, -\beta_y) + A_0^* \mathcal{F}\{O(x, y)\} \delta(\beta_x, \beta_y)$$

Spektrum der 0. Beugungsordnung, I. Beugungsordnung und -I. Beugungsordnung

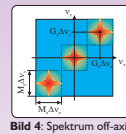


Bild 4: Spektrum off-axis

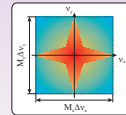


Bild 5: Spektrum in-line

off-axis

Das Hologrammspektrum besteht aus einem zentrierten sowie zwei um die spatiale Frequenz der Referenzwellen verschobenen Spektren der Objektwellen (Bild 4). Durch die Filterung werden die 0. Beugungsordnung, das Spektrum des Zwillingbildes sowie störende Anteile (Rauschen, Speckle) unterdrückt. Nach der Rücktransformation wird der lineare Phasenterm, der von der Interferenz mit der Referenzwellen herührt, eliminiert. Es liegen die Amplituden- wie auch die Phaseninformation der Objektwellen vor.

in-line

Wegen $\sigma_x = 0$ steht der gesamte Frequenzraum des Hologramms nur für das Objektspektrum zur Verfügung (Bild 5).

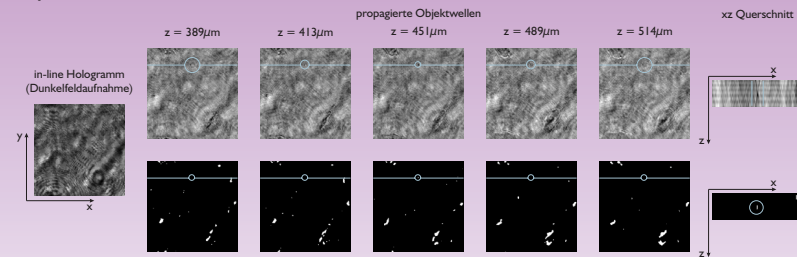
Das mit dem Sensor registrierbare Winkelspektrum bestimmt die Dimensionierung des Aufbaus. Die Numerische Apertur des optischen Abbildungssystems sollte mindestens so groß wie der maximale erfassbare Beugungswinkel des Sensors sein. Die ermittelte Objektwellen ist Ausgangspunkt für die Rekonstruktion benachbarter Ebenen [3].

Vergleich der Verfahren

Die in-line Anordnung besitzt den Vorteil, dass kein Referenzpfad erforderlich ist. Wegen der Ausblendung der 0. Beugungsordnung steht der Sensor in seiner vollen Amplitudendynamik für die Auswertung der Objektwellen zur Verfügung (100facher Kontrast gegenüber off-axis). Ebenso kann seine volle spektrale Breite für die Objektwellen genutzt werden. Diese Bandbreite bestimmt die kleinste auflösbare Struktur, die beim in-line Verfahren 2 Pixel (Abstasttheorem), bei der off-axis Anordnung wegen der auf 33% reduzierten Bandbreite in mindestens einer Richtung (x,y) nur 6 Pixel groß ist.

Ergebnisse

Beispiel 1: Lokalisieren von Partikeln



Aus dem in-line Hologramm des Beispiels 1 können die Objektwellen der benachbarten Ebenen rekonstruiert werden. Somit wird die Tiefenschärfe auf über 500µm erweitert.

Reihe oben:

Ein markiertes Partikel verändert in jeder Ebene seine Erscheinungsform (Ringe - Punkt - Ringe). Es befindet sich in derjenigen z-Ebene, in der sein Durchmesser minimal ist.

Reihe unten:

Durch eine geeignete Filterung und Schwellwertbildung (Korrelation) lassen sich Partikelstrukturen besser erkennen, detektieren bzw. lokalisieren.

Dieses Verfahren funktioniert besonders gut bei kleinen Objekten, weil die relativen Änderungen zwischen den Ebenen bezüglich des Durchmessers des Partikels groß sind. Die kleinen Partikel benötigen eine große spektrale Bandbreite, die mit dem in-line Anordnung leicht erzielt werden kann.

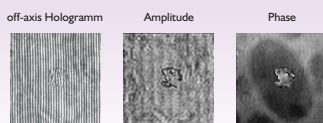
Die Beispiele 2 und 3 zeigen Rekonstruktionen der Objektwellen aus einem off-axis Hologramm. Nicht nur die Amplitude, insbesondere die örtlichen Phasenunterschiede, die die optische Weglängendifferenzen durch eine Probe beschreiben, sind messbar. Sie können durch Brechzahlchwankungen oder Wegunterschiede (bei konstanter Brechzahl) verursacht werden und erlauben eine bessere Beobachtung der Probe als die Auswertung der Amplitudenanstellung.

So wird im Beispiel 2 die variierende Dicke des Salzkorns erst durch die Phasendarstellung sichtbar (Brechzahl innerhalb des Kornes ist konstant). Deutlich erkennbar ist der Brechzahlunterschied, der durch die Auflösung des Salzkorns in der Seifenlösung verursacht wird.

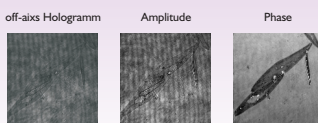
Im Beispiel 3 sind lokale Variationen der Brechzahl der Zellbestandteile der Kieselalge Ausschlag gebend.

Die Phasendarstellungen besitzen jedoch den Nachteil, dass sie nur einen Wertebereich modulo 2π zulassen. Eine Bereichserweiterung durch Entfaltung ist bei zweidimensionalen Strukturen im Allgemeinen nicht widerspruchsfrei möglich.

Beispiel 2: Salzkorn in Seifenlösung



Beispiel 3: Kieselalge (Pleurosigma angulatum)



Literaturhinweise

- [1] E. Cuche, P. Marquet, C. Depeursing: Spatial Filtering for Zero-Order and Twin-Image Elimination in Digital Off-Axis Holography. Applied Optics, Vol. 39, 2000, No. 23, 4070-4075
- [2] G. Pedrini, P. Föning, H. Fessler, H. J. Tiziani: In-Line Digital Holographic Interferometry. Appl. Opt. 37, 1998, No. 26, 6262-6269
- [3] M. Lieblich, T. Blu, M. Unser: Complex-Wave Retrieval from a Single Off-Axis Hologram. J. Opt. Soc. Am. A 21, 2004, No. 3, 367-377
- [4] B. Kemper, G. v. Bally: Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection. Applied Optics, Vol. 47, No. 4, 2008, A52-A59
- [5] T. Kreis: Handbook of holographic interferometry: optical and digital Methods. WILEY-VCH Weinheim, 2005
- [6] D. Carl: Charakterisierung von Methoden und Anwendungen der digitalholografischen Mikroskopie. Diss. Humboldt-Universität Berlin, 2005