

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

NUMERICKÉ PŘEOSTŘOVÁNÍ V DIGITÁLNÍM HOLOGRAFICKÉM MIKROSKOPU S ČÁSTEČNĚ KOHERENTNÍM OSVĚTLENÍM

NUMERICAL REFOCUSING IN A DIGITAL HOLOGRAPHIC MICROSCOPE WITH A
PARTIALLY COHERENT ILLUMINATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

MICHALA HENZLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. RADIM CHMELÍK, Ph.D.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá problematikou numerického přeostrňování v holografickém mikroskopu s částečně prostorově koherentním osvětlením. Numerické přeostrňování je výpočet komplexní amplitudy obrazové vlny v rovinách jiných, než je obrazová rovina. Výpočet oblasti, ve které je možné numericky přeostrňovat, je založen na použití Rayleighova-Sommerfeldova difrakčního integrálu a Fresnelovy aproximace kulové vlny. Popis stavu koherence vlny a šíření částečně koherentního světla vychází ze statistických metod teorie optické koherence. V této práci je vypočtena tloušťka vrstvy, ve které lze numerické přeostrňování provádět. Tato tloušťka závisí na parametrech mikroskopu - na velikosti zdroje a parametrech použitých objektivů. Výsledek je aplikován na mikroskop z laboratoře ÚFI FSI VUT.

Summary

The bachelor thesis deals with issue of numerical refocusing in holographic microscope with partially space coherent light. The numerical refocusing is a computation of the complex amplitude of an image wave in planes differing from the image plane. The calculation of the region where the numerical refocusing is usable is based on application of Rayleigh-Sommerfeld diffraction integral and the Fresnel approximation of a spherical wave. The description of coherence state and propagation of partially coherent light follows from statistical methods in optical coherence theory. In this thesis the thickness of field is calculated where the numerical refocusing is usable. The thickness depends on microscope parameters - the size of the light source and parameters of lenses in microscope. The result is applied to the microscope in the laboratory IPE FME BUT.

Klíčová slova

digitální holografický mikroskop, numerické přeostrňování, skalární teorie difrakce, teorie optické koherence

Keywords

digital holographic microscope, numerical refocusing, scalar diffraction theory, optical coherence theory

HENZLOVÁ, M. *Numerické přeostrňování v digitálním holografickém mikroskopu s částečně koherentním osvětlením*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 25 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně s použitím výhradně citovaných pramenů.

V Brně 23. května 2008

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce doc. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D. za odborné vedení a přínosné konzultace. Dále bych ráda poděkovala Ing. Haně Janečkové za poskytnutá data týkající se mikroskopu a za konzultace při výpočtech.

Obsah

Úvod	3
1 Transmisní holografický mikroskop s částečně koherentním osvětlením	5
2 Rekonstrukce koherentní vlny	7
2.1 Vlnová funkce	7
2.2 Impulsová odezva volného prostoru	7
2.3 Úhlové spektrum vlnové funkce a její rekonstrukce v jiné rovině	8
2.4 Amplitudová propustnost	9
3 Částečně koherentní světlo	11
3.1 Vzájemná intenzita	11
3.2 Výpočet vzájemné intenzity	12
3.3 Vzájemná intenzita pro koherentní světlo	12
4 Výpočet pro digitální holografický mikroskop	13
4.1 Koherence sekundárního zdroje	13
4.2 Koherentní světlo	14
4.3 Částečně koherentní světlo	17
4.4 Podmínka pro možnost rekonstrukce obrazu	19
4.5 Odhad tloušťky vrstvy pro konkrétní parametry mikroskopu	20
Závěr	23
Literatura	25

Úvod

Holografická mikroskopie umožňuje pozorování objemových vzorků v reálném čase. Při použití koherentního osvětlení lze z jediného interferenčního obrazce rekonstruovat oblast celého trojrozměrného vzorku. Výpočet komplexní amplitudy, která odpovídá zaostření mikroskopu i do jiných rovin mimo předmětovou, se nazývá numerické přeastřování. Při použití částečně koherentního osvětlení je možnost numerického přeastřování omezena jen do rovin blízkých předmětové. V této práci budeme určovat tloušťku oblasti, ve které lze numerické přeastřování aplikovat u mikroskopu z laboratoře ÚFI FME VUT. Tento problém je pro jiný mikroskop řešen v článku [2].

Při výpočtu budeme vycházet ze skalární teorie difrakce a z teorie optické koherence. Pomocí Rayleighova-Sommerfeldova difrakčního integrálu a Fresnelovy aproximace kulové vlny budeme počítat šíření komplexní amplitudy. Statistických metod teorie optické koherence použijeme pro určení koherenčního stavu vlny po průchodu vzorkem. Budeme se zabývat prostorovou koherencí.

V kapitole 1 je popsán transmisní holografický mikroskop z laboratoře ÚFI FSI VUT, pro jehož parametry budeme výpočet provádět. V kapitole 2 se zabýváme šířením koherentní vlny volným prostorem, průchodem vlny čočkou a vzorkem. V kapitole 3 jsou popsány veličiny popisující stav koherence a šíření částečně koherentního světla. V kapitole 4 je výpočet pro uspořádání daného mikroskopu. Ten obsahuje výpočet šíření komplexní amplitudy soustavou a výpočet koherenčního stavu vlny. Dále je zde z podmínky dostatečné koherence určena tloušťka vrstvy, ve které lze numericky přeastřovat.

Kapitola 1

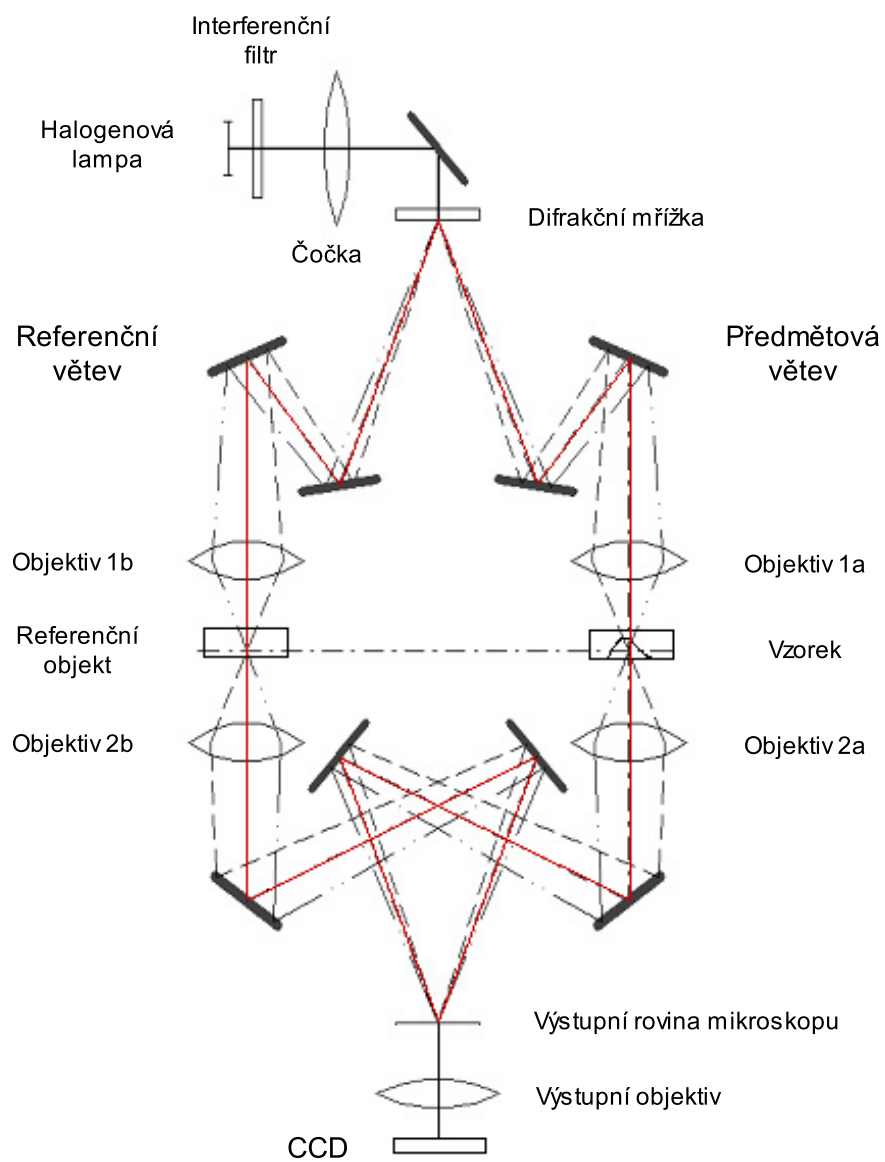
Transmisní holografický mikroskop s částečně koherentním osvětlením

Holografický mikroskop obsahuje dvě opticky ekvivalentní větve, předmětovou a referenční. Ve výstupní rovině spolu vlny z těchto větví interferují. Pomocí holografického mikroskopu jsme díky tomu schopni zaznamenat amplitudu a fázi obrazové vlny. Informace o fázi a amplitudě v předmětové rovině nám umožňuje rekonstruovat vlnu v jiných rovinách. K tomu, abychom mohli tuto rekonstrukci provést, potřebujeme, aby vlna, která osvětluje vzorek, byla dostatečně koherentní.

V mikroskopu je použito částečně koherentní osvětlení. Interferovat tak budou jen paprsky rozptýlené v úzké oblasti předmětové roviny. Interference paprsků rozptýlených v jiných částech vzorku bude omezena. Omezí se také interference vícenásobně rozptýlených paprsků.

Osvětlovací soustava mikroskopu je navržena na principu Köhlerova osvětlení. Jako zdroj světla je použita halogenová lampa. Ta je zdrojem bílého světla. Za ní je umístěn interferenční filtr s maximální propustností na vlnové délce $\lambda = 650 \text{ nm}$, pološířka maxima propustnosti je $\Delta\lambda = 10 \text{ nm}$. Svazek je rozdělen na dva pomocí děliče, jímž je difrakční mřížka se 70 vrypů na mm. Prostorová frekvence mřížky je taková, aby úhel, pod kterým paprsky difraktují a interferují, byl malý a stejný. Pro každou vlnovou délku platí, že paprsky interferují pod stejným úhlem jako difraktují. Pro všechny vlnové délky tak vzniknou interferenční proužky se stejnou prostorovou frekvencí. Jedná se tedy o achromatický systém a lze použít bílé (nekoherentní) světlo. Není nutné použít spojovací prvek, interferenční obrazec vznikne ve výstupní rovině mikroskopu.

Schéma mikroskopu je zobrazeno na obrázku 1.0.1. Zdroj je čočkou zobrazen do ohniskové roviny kondenzorů – objektivů 1a, 1b. Každý bod zdroje tak vytvoří rovinou vlnu, která prochází vzorkem. Vzorek je umístěn v obrazové rovině kondenzoru. Tato rovina je zároveň předmětovou rovinou objektivu 2a. Ten zobrazí předmět do výstupní roviny mikroskopu. V této rovině paprsky obou větví interferují. Protože se jedná o nekoherentní zdroj, interferují zde paprsky, které odpovídají jednotlivým bodovým zdrojům. Referenční větev se od předmětové liší tím, že se v předmětové rovině nachází místo vzorku referenční objekt. Jedná se o předmět, který se co nejvíce shoduje se vzorkem. Potom lze z dráhových rozdílů mezi paprsky z referenční a předmětové větve určit odchylky tloušťky a indexu lomu vzorku od referenčního předmětu.



Obrázek 1.0.1: Schéma digitálního holografického mikroskopu.

Kapitola 2

Rekonstrukce koherentní vlny

2.1 Vlnová funkce

Světlo je elektromagnetické vlnění. Pro jeho popis lze tedy použít vektory elektrické a magnetické intenzity. V homogenním, izotropním, neabsorbujícím a nedisperzním prostředí neobsahujícím zdroje vlnění musí složky těchto intenzit vyhovovat vlnové rovnici

$$\nabla^2 u(\vec{r}, t) = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 u(\vec{r}, t)}{\partial t^2}, \quad (2.1.1)$$

kde c značí rychlost světla v daném prostředí, $\nabla^2 = \Delta$ je Laplaceův operátor, pro který v kartézských souřadnicích platí

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}. \quad (2.1.2)$$

Veličina $u(\vec{r}, t)$ se obecně nazývá vlnová funkce. Vlnová funkce popisující světelnou vlnu (např. v [6]) bývá ve skalární teorii označována jako rozruch (disturbance).

V celé práci budeme používat komplexní notaci, tedy veličina $u(\vec{r}, t)$ bude komplexní funkcí, přičemž fyzikální význam bude mít pouze její reálná část.

2.2 Impulsová odezva volného prostoru

Známe-li vlnovou funkci v rovině $z = 0$, můžeme pomocí Rayleighova-Sommerfeldova difrakčního integrálu (viz např. [6], str.108) určit vlnovou funkci v rovině $z > 0$. Tento difrakční integrál má tvar

$$u(P) = \frac{ik}{2\pi} \iint_S u(M) \left[\frac{\exp(ik s_M)}{s_M} \right] \left(1 + \frac{i}{k s_M} \right) \left(\frac{\vec{s}_M}{s_M} \right) \cdot \vec{n} \, dS, \quad (2.2.1)$$

kde $\vec{n}$ je normálový vektor k rovině $z = 0$, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ je vlnové číslo, $\vec{s}_M = \overrightarrow{PM}$, bod P leží v rovině $z > 0$, bod M v rovině $z = 0$. Označíme-li souřadnice bodu M v rovině $z = 0$ jako ξ a η a vlnovou funkci $u(x, y, 0) = u_0(\xi, \eta)$, bude platit $\vec{s}_M = (\xi - x)\vec{i} + (\eta - y)\vec{j} + z\vec{k}$,

$$\frac{\vec{s}_M}{s_M} \cdot \vec{n} = \frac{-z}{\sqrt{(x - \xi)^2 + (y - \eta)^2 + z^2}}. \quad (2.2.2)$$

Integrál (2.2.1) můžeme přepsat na

$$u(x, y, z) = -\frac{ikz}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} u_0(\xi, \eta) \frac{\exp\left(ik\sqrt{(x-\xi)^2 + (y-\eta)^2 + z^2}\right)}{(x-\xi)^2 + (y-\eta)^2 + z^2} \times \\ \times \left[1 + \frac{i}{k\sqrt{(x-\xi)^2 + (y-\eta)^2 + z^2}}\right] d\xi d\eta . \quad (2.2.3)$$

Tento výraz odpovídá konvoluci

$$u(x, y, z) = u_0(x, y) * h_z(x, y) , \quad (2.2.4)$$

kde funkce

$$h_z(x, y) = -\frac{ikz}{2\pi} \frac{\exp\left(ik\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}\right)}{x^2 + y^2 + z^2} \left[1 + \frac{i}{k\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}}\right] \quad (2.2.5)$$

se nazývá impulsová odezva.

Platí-li $k\sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \gg 1$ a položíme-li $\frac{z}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} \doteq 1$, můžeme při použití Fresnelovy aproximace kulové vlny (viz [6], str.21) impulsovou odezvu $h_z(x, y)$ aproximovat Fresnelovým propagátorem $\mathcal{P}_z(x, y)$

$$h_z(x, y) \approx \mathcal{P}_z(x, y) = -\frac{ik}{2\pi} \frac{\exp(ikz)}{z} \exp\left[\frac{ik}{2z}(x^2 + y^2)\right] . \quad (2.2.6)$$

Vlnovou funkci v rovině z tedy můžeme při splnění daných podmínek vyjádřit konvolucí

$$u(x, y, z) = u_0(x, y) * \mathcal{P}_z(x, y) . \quad (2.2.7)$$

2.3 Úhlové spektrum vlnové funkce a její rekonstrukce v jiné rovině

Lze ukázat ([6], str. 117–118), že známe-li vlnovou funkci v rovině $z = 0$, můžeme určit vlnovou funkci v rovině $z = \text{konst.} \geq 0$ jako zpětnou dvojrozměrnou Fourierovu transformaci

$$u(x, y, z) = \iint_{-\infty}^{\infty} U_0(k_x, k_y) \exp\left[i\left(xk_x + yk_y + z\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}\right)\right] dk_x dk_y , \quad (2.3.1)$$

kde

$$U_z(k_x, k_y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} u(x, y, z) \exp[-i(k_x x + k_y y)] dx dy . \quad (2.3.2)$$

Ve výpočtech budeme této skutečnosti využívat v místech, kde není zaručeno splnění podmínek uvedených na konci předchozí podkapitoly.

2.4 Amplitudová propustnost

Difraktující strukturu, umístěnou v rovině $z = 0$, kterou prochází vlna, lze popsat funkcí nazvanou amplitudová propustnost. Je definovaná (např. v [3]) jako podíl amplitudy $u_t(x, y, z)$ prošlé strukturou a amplitudy vstupující $u_i(x, y, z)$, obě v rovině $z = 0$. Tedy

$$t(x, y) = \frac{u_t(x, y, 0)}{u_i(x, y, 0)} . \quad (2.4.1)$$

Z toho vyplývá

$$u_t(x, y, 0) = u_i(x, y, 0) t(x, y) . \quad (2.4.2)$$

Amplitudová propustnost tenké čočky t_l je v paraxiální aproximaci (odvozeno např. v [3], str.96–99)

$$t_l(x, y) = \exp(ikn\Delta) \exp\left[-\frac{ik}{2f}(x^2 + y^2)\right] , \quad (2.4.3)$$

kde Δ je tloušťka čočky a n je index lomu čočky.

Kapitola 3

Částečně koherentní světlo

V předchozí kapitole jsme se zabývali monochromatickým světlem pocházejícím z bodového zdroje. Takové světlo lze charakterizovat komplexní amplitudou. V mikroskopu je použit nekoherentní plošný zdroj. Světlo, které prochází optickou soustavou, pochází od velmi mnoha takových elementárních bodových zdrojů. Světlo je potom složeno z amplitud odpovídajících jednotlivým bodovým zdrojům. Ty jsou na sobě nezávislé, jsou mezi nimi různé fázové rozdíly, které fluktuují. Amplitudu takového světla nejsme schopni určit.

Není-li světlo přesně monochromatické, amplituda není předem daná. Nemůžeme v takovém případě mluvit o vlnové funkci, hovoříme o náhodné funkci $u(\vec{r}, t)$. K popisu světla je nutné použít statistických metod. Pomocí veličin, daných statistickými středními hodnotami náhodné funkce, můžeme světlo klasifikovat jako koherentní, částečně koherentní, nebo nekoherentní.

Prostorové a časové fluktuace náhodné funkce $u(\vec{r}, t)$ charakterizuje funkce vzájemné koherence (viz [1], str. 564)

$$\Gamma_{12}(\tau) = \langle u^*(\vec{r}_1, t) u(\vec{r}_2, t + \tau) \rangle, \quad (3.0.1)$$

která je časovou střední hodnotou součinu funkce $u(\vec{r}_1, t + \tau)$ a funkce $u^*(\vec{r}_2, t)$, komplexně sdružené k funkci $u(\vec{r}_2, t)$.

Pro popis stavu koherence světla se používá funkce zvaná stupeň koherence

$$\gamma_{12}(\tau) = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{\Gamma_{11}(0)}\sqrt{\Gamma_{22}(0)}} = \frac{\Gamma_{12}(\tau)}{\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}}, \quad (3.0.2)$$

kde $I_1 = \Gamma_{11}(0) = \langle u(\vec{r}_1, t) u^*(\vec{r}_1, t) \rangle$ a $I_2 = \Gamma_{22}(0) = \langle u(\vec{r}_2, t) u^*(\vec{r}_2, t) \rangle$ jsou intenzity. Stupeň koherence je normovaná vzájemná koherenční funkce.

3.1 Vzájemná intenzita

Je-li světlo kvazimonochromatické, tj. platí-li, že centrální frekvence $\bar{\nu}$ je mnohem větší než spektrální šířka $\Delta\nu$, můžeme často koherenční stav popsat jednodušším způsobem. Lze ukázat (např. v [1], str. 569), že takový systém můžeme popsat funkcemi Γ_{12} , γ_{12} , které nezávisí na parametru τ . Funkce vzájemné koherence s $\tau = 0$ se nazývá vzájemná intenzita

$$J_{12} = \Gamma_{12}(0) = \langle u^*(\vec{r}_1, t) u(\vec{r}_2, t) \rangle. \quad (3.1.1)$$

Normovaná vzájemná intenzita je definovaná jako

$$j_{12} = \gamma_{12}(0) = \frac{\Gamma_{12}(0)}{\sqrt{\Gamma_{11}(0)}\sqrt{\Gamma_{22}(0)}} = \frac{J_{12}}{\sqrt{J_{11}}\sqrt{J_{22}}} = \frac{J_{12}}{\sqrt{I_1}\sqrt{I_2}}. \quad (3.1.2)$$

Hodnota normované vzájemné intenzity leží v intervalu $\langle 0, 1 \rangle$ a je mírou stupně prostorové koherence. Pro koherentní světlo $j_{12} = 1$.

Koherenci světla lze plně popsat funkcemi J_{12} a j_{12} pokud platí, že optické dráhové rozdíly jsou mnohem menší než koherenční délka $l_c = c\Delta\tau$. Říkáme, že světlo je kvazi-monochromatické.

3.2 Výpočet vzájemné intenzity

Lze ukázat ([1], str. 581), že vzájemnou intenzitu v bodech P_1 a P_2 odpovídající plošnému zdroji σ lze vypočítat jako integrál přes všechny body zdroje

$$J_{12} = \iint_{\sigma} u(S, P_1) u^*(S, P_2) dx_s dy_s , \quad (3.2.1)$$

kde $u(S, P_1)$, resp. $u(S, P_2)$, je komplexní amplituda vlny v bodě P_1 , resp. P_2 , odpovídající bodovému zdroji S umístěnému v rovině plošného zdroje. Souřadnice bodu S jsme označili (x_s, y_s) .

3.3 Vzájemná intenzita pro koherentní světlo

Pro koherentní světlo je fázový rozdíl vlny ve dvou bodech $\vec{r}_1, \vec{r}_2$ konstantní, časově nezávislý. Časová střední hodnota (3.1.1) tedy bude rovna součinu

$$J_{12} = \Gamma_{12}(0) = \langle u^*(\vec{r}_1, t) u(\vec{r}_2, t) \rangle = u^*(\vec{r}_1, t) u(\vec{r}_2, t) . \quad (3.3.1)$$

Tuto skutečnost lze ilustrovat i následujícím způsobem. Koherentní světlo získáme, budeme-li mít bodový zdroj. Potom integrál (3.2.1) přejde na součin

$$J_{12} = \iint_{\sigma} u(S, P_1) u^*(S, P_2) dx_s dy_s = \iint_{-\infty}^{\infty} \delta(x_s) \delta(y_s) u(S, P_1) u^*(S, P_2) dx_s dy_s ,$$

$$J_{12} = u(S, P_1) u^*(S, P_2) . \quad (3.3.2)$$

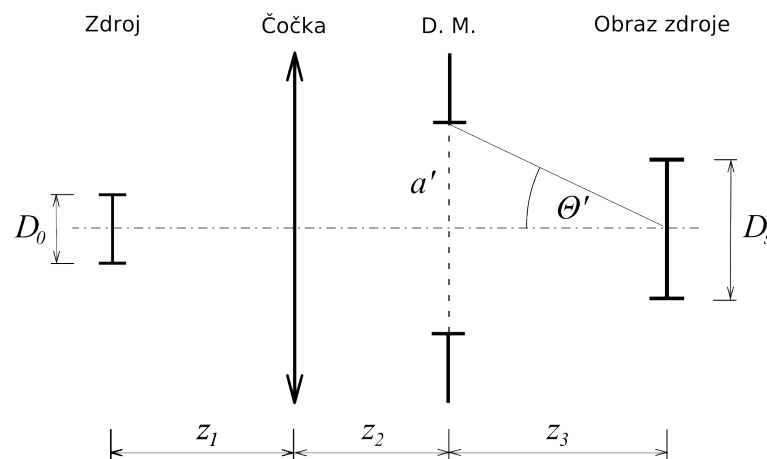
Kapitola 4

Výpočet pro digitální holografický mikroskop

Zdroj je zobrazen čočkou do zadní ohniskové roviny objektivů 1a a 1b, které mají funkci kondenzorů (obrázek ??). Situace je zjednodušeně znázorněna na obrázku 4.1.1. Tento obraz je sekundárním zdrojem světla. Ve výpočtu nahradíme kondenzor tenkou čočkou s ohniskovou vzdáleností f (obrázek 4.2.1). V částech 4.2 a 4.3 budeme pod termínem čočka rozumět kondenzor.

Ve výpočtu budeme předpokládat, že obraz zdroje je sekundárním zdrojem nekoherentního světla. Oprávněnost tohoto předpokladu budeme diskutovat v kapitole 4.1. Abychom určili stav koherence ve vzdálenosti d od předmětové roviny, vypočítáme nejprve v podkapitole 4.2 tvar vlny v této rovině, který odpovídá koherentnímu osvětlení bodovým monochromatickým zdrojem umístěným v zadní ohniskové rovině kondenzoru.

4.1 Koherence sekundárního zdroje



Obrázek 4.1.1: Zobrazení zdroje.

V mikroskopu použit je kruhový kvazimonochromatický nekoherentní zdroj. Lze ukázat ([1], str. 590 – 599), že obraz nekoherentního plošného zdroje lze považovat za efektivně nekoherentní, platí-li

$$\rho_s \gg r'_A, \quad (4.1.1)$$

kde ρ_s je poloměr geometrického obrazu zdroje a r'_A je poloměr prvního tmavého prstence Airyho disku, pro nějž platí dle [1] (str. 593)

$$r'_A = \frac{0,61\bar{\lambda}_0}{n' \sin \theta'} , \quad (4.1.2)$$

kde $\bar{\lambda}_0$ je centrální vlnová délka použitého světla a $n' \sin \theta'$ je numerická apertura čočky na straně obrazové roviny, n' je index lomu prostředí. V našem případě svazek nejvíce omezuje difrakční mřížka (D.M.). Mřížka má vnější tvar čtverce s velikostí strany $b = 3 \text{ mm}$. Předpokládejme tedy, že svazek je omezen kruhovou aperturou o poloměru $a' = 1,5 \text{ mm}$. Potom $n' \sin \theta' \approx n'a'/z_3$. Zvětšení čočky označme M , průměr zdroje D_0 . Průměr $D_s = 2\rho_s$ sekundárního zdroje je tedy určen $D_s = |M|D_0$. Nerovnost (4.1.1) můžeme přepsat

$$\frac{|M|D_0}{2} \gg \frac{0,61\bar{\lambda}_0 z_3}{n'a'} . \quad (4.1.3)$$

Vzdálenosti optických prvků v mikroskopu jsou následující: $z_1 = 116 \text{ mm}$, $z_3 = 150 \text{ mm}$. Ohnisková vzdálenost použité čočky je $f_0 = 77 \text{ mm}$, index lomu prostředí je $n' = 1$. Dosazením z Gaussovy zobrazovací rovnice

$$\frac{1}{z_1} + \frac{1}{z_2 + z_3} = \frac{1}{f_0} \quad (4.1.4)$$

do vztahu pro zvětšení M čočky dostaneme

$$M = -\frac{z_2 + z_3}{z_1} = -\frac{f_0}{z_1 - f_0} . \quad (4.1.5)$$

Po dosazení číselných hodnot je velikost zvětšení čočky $|M| \approx 2$. Průměr zdroje je $D_0 = 7 \text{ mm}$, poloměr sekundárního zdroje je tedy $\rho_s = 7 \text{ mm}$. Po dosazení parametrů optické soustavy do (4.1.2) je $r'_A = 4 \cdot 10^{-2} \text{ mm}$. Dosadíme do (4.1.1)

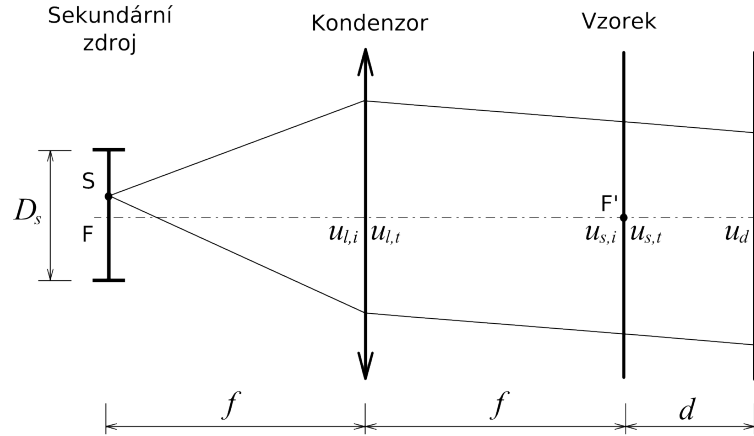
$$7 \text{ mm} \gg 4 \cdot 10^{-2} \text{ mm} . \quad (4.1.6)$$

Velikost r'_A je o dva řády větší, než velikost ρ_s . Podmínka (4.1.1) je tedy splněna. Sekundární kruhový zdroj v zadní ohniskové rovině kondenzoru tedy můžeme považovat za efektivně nekoherentní.

4.2 Koherentní světlo

Vlnová funkce je funkcí souřadnic x, y, z . Budeme počítat šíření vlny ve směru osy z , bude nás zajímat vždy tvar funkce v rovině kolmé na osu z ($z = \text{konst.}$). V dané rovině je amplituda funkcí souřadnic x, y . Rovinu, ve které je vlnová funkce počítána, označíme dolním indexem. Označení budou následující, $u_0(x, y)$ je amplituda v rovině zdroje, $u_{l,i}(x, y)$ těsně před tenkou čočkou (kondenzorem), $u_{l,t}(x, y)$ těsně za tenkou čočkou (kondenzorem), $u_{s,i}(x, y)$ těsně před vzorkem, $u_{s,t}(x, y)$ těsně za vzorkem a $u_d(x, y)$ je amplituda ve vzdálenosti d za vzorkem.

Budeme zkoumat šíření vlny vycházející z bodového zdroje umístěného v bodě $S(x_s, y_s)$ roviny zdroje. Takovému zdroji odpovídá tvar amplitudy $u_0(x, y) = \delta(x - x_s) \times \delta(y - y_s)$.



Obrázek 4.2.1: Schéma pro výpočet.

Těsně před čočkou, tedy ve vzdálenosti f od zdroje, lze vlnu popsat podle (2.2.7) jako konvoluci vlny $u_0(x, y)$ a Fresnelova propagátoru $\mathcal{P}_f(x, y)$

$$u_{l,i}(x, y) = u_0(x, y) * \mathcal{P}_f(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} u_0(\xi, \eta) \mathcal{P}_f(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta =$$

$$= \left(-\frac{ik}{2\pi} \right) \frac{\exp(ikf)}{f} \iint_{-\infty}^{\infty} \delta(\xi - x_s, \eta - y_s) \exp \left[\frac{ik}{2f} ((x - \xi)^2 + (y - \eta)^2) \right] d\xi d\eta .$$

Pro Diracovu distribuci platí $\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x - x_0) f(x) dx = f(x_0)$. Z této vlastnosti vyplývá

$$u_{l,i}(x, y) = \left(-\frac{ik}{2\pi} \right) \frac{\exp(ikf)}{f} \exp \left[\frac{ik}{2f} ((x - x_s)^2 + (y - y_s)^2) \right] . \quad (4.2.1)$$

Vlna projde tenkou čočkou, amplituda vlny těsně za čočkou bude mít podle (2.4.2) a (2.4.3) tvar

$$u_{l,t}(x, y) = u_{l,i}(x, y) t_l(x, y) , \quad (4.2.2)$$

kde $t_l(x, y)$ je funkce propustnosti tenké čočky. Tedy

$$u_{l,t}(x, y) = \left(-\frac{ik}{2\pi} \right) \frac{\exp(ik(f + n\Delta))}{f} \exp \left[\frac{ik}{2f} (x_s^2 + y_s^2) \right] \exp \left[-\frac{ik}{f} (x_s x + y_s y) \right] . \quad (4.2.3)$$

Amplitudu ve vzdálenosti f za čočkou, tedy v rovině vzorku, vypočítáme dosazením $u_{l,t}$ z (4.2.3) do rovnice (2.2.7) za u_0 . Tedy

$$u_{s,i}(x, y) = u_{l,t}(x, y) * \mathcal{P}_f(x, y) = \iint_{-\infty}^{\infty} u_{l,t}(\xi, \eta) \mathcal{P}_f(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta . \quad (4.2.4)$$

Označíme-li

$$C_0 = \left(-\frac{ik}{2\pi} \right)^2 \frac{\exp(ik(2f + n\Delta))}{f^2} , \quad (4.2.5)$$

můžeme psát

$$u_{s,i}(x, y) = C_0 \exp \left[\frac{ik}{2f} (x_s^2 + y_s^2) \right] \times \\ \times \iint_{-\infty}^{\infty} \exp \left[-\frac{ik}{f} (\xi x_s + \eta y_s) \right] \exp \left[\frac{ik}{2f} ((x - \xi)^2 + (y - \eta)^2) \right] d\xi d\eta .$$

Po úpravě dostaneme

$$u_{s,i}(x, y) = C_0 \exp \left[-\frac{ik}{f} (x_s x + y_s y) \right] \times \\ \times \iint_{-\infty}^{\infty} \exp \left[\frac{ik}{2f} ((x + x_s + \xi)^2 + (y + y_s + \eta)^2) \right] d\xi d\eta .$$

Protože x, y, x_s a y_s nabývají konečných hodnot, můžeme zavést substituci

$$s = \sqrt{\frac{k}{2f}} (x_s + x + \xi) , \quad t = \sqrt{\frac{k}{2f}} (y_s + y + \eta) . \quad (4.2.6)$$

Po zavedení této substituce dostaneme

$$u_{s,i}(x, y) = C_0 \exp \left[-\frac{ik}{f} (x_s x + y_s y) \right] \frac{2f}{k} \iint_{-\infty}^{\infty} \exp [i (s^2 + t^2)] ds dt . \quad (4.2.7)$$

Dvojný integrál z rovnice (4.2.7) lze převést na Fresnelovy integrály $\left(\int_0^{\infty} \frac{\sin q}{\sqrt{q}} dq = \int_0^{\infty} \frac{\cos q}{\sqrt{q}} dq = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \right)$ (viz např. [8], str. 483)

$$\iint_{-\infty}^{\infty} \exp [i (s^2 + t^2)] ds dt = \left(\int_0^{\infty} \frac{\cos q}{\sqrt{q}} dq + i \int_0^{\infty} \frac{\sin q}{\sqrt{q}} dq \right)^2 = \pi i . \quad (4.2.8)$$

Po dosazení (4.2.8) a (4.2.5) do (4.2.7)

$$u_{s,i}(x, y) = \left(-\frac{ik}{2\pi} \right) \frac{\exp (ik (2f + n\Delta))}{f} \exp \left[-\frac{ik}{f} (x_s x + y_s y) \right] . \quad (4.2.9)$$

Těsně za vzorkem bude mít vlna dle (2.4.2) tvar $u_{s,t}(x, y) = u_{s,i}(x, y) t_s(x, y)$, kde $t_s(x, y)$ je amplitudová propustnost vzorku.

$$u_{s,t}(x, y) = \left(-\frac{ik}{2\pi} \right) \frac{\exp (ik (2f + n\Delta))}{f} t_s(x, y) \exp \left[-\frac{ik}{f} (x_s x + y_s y) \right] . \quad (4.2.10)$$

Po dosazení do rovnice (2.3.2)

$$U_0(k_x, k_y) = \frac{1}{2\pi} \iint_{-\infty}^{\infty} u_{s,t}(x, y) \exp [-i (k_x x + k_y y)] dx dy . \quad (4.2.11)$$

Po dosazení z (4.2.10) můžeme psát

$$U_0(k_x, k_y) = -\frac{ik}{(2\pi)^2} \frac{\exp(ik(2f + n\Delta))}{f} \times \\ \times \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} t_s(x, y) \exp\left[-\frac{ik}{f}(x_s x + y_s y)\right] \exp[-i(k_x x + k_y y)] dx dy . \quad (4.2.12)$$

Konstantu před integrálem označme

$$C_1 = -\frac{ik}{(2\pi)^2} \frac{\exp(ik(2f + n\Delta))}{f} \quad (4.2.13)$$

Protože x_s a y_s nabývají konečných hodnot, můžeme označit $k_{x_1} = \frac{x_s k}{f} + k_x$, $k_{y_1} = \frac{y_s k}{f} + k_y$. Integrál z rovnice (4.2.12) pak získá tvar Fourierovy transformace amplitudové propustnosti objektu

$$U_0(k_{x_1}, k_{y_1}) = C_1 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} t_s(x, y) \exp[-i(k_{x_1} x + k_{y_1} y)] dx dy . \quad (4.2.14)$$

Fourierovou transformací amplitudové propustnosti vzorku je jeho rozptylová funkce. Tu označíme $T_s(k_x, k_y)$. Potom

$$U_0(k_{x_1}, k_{y_1}) = C_1 T_s(k_{x_1}, k_{y_1}) . \quad (4.2.15)$$

Vlnová funkce ve vzdálenosti d za vzorkem bude tedy

$$u_d(x, y) = C_1 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} T_s(k_{x_1}, k_{y_1}) \exp\left[i\left(xk_x + yk_y + z\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}\right)\right] dk_x dk_y . \quad (4.2.16)$$

Přepíšeme do souřadnic k_{x_1} a k_{y_1} . Potom (4.2.16) můžeme přepsat

$$u_d(x, y) = C_1 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} T(k_{x_1}, k_{y_1}) \exp\left[i\left(x\left(k_{x_1} - \frac{x_s k}{f}\right) + y\left(k_{y_1} - \frac{y_s k}{f}\right)\right)\right] \times \\ \times \exp\left[iz\sqrt{k^2 - \left(k_{x_1} - \frac{x_s k}{f}\right)^2 - \left(k_{y_1} - \frac{y_s k}{f}\right)^2}\right] dk_{x_1} dk_{y_1} . \quad (4.2.17)$$

Vlnová funkce (4.2.17) odpovídá koherentnímu osvětlení bodovým zdrojem umístěným v bodě (x_s, y_s) .

4.3 Částečně koherentní světlo

Stav koherence v rovině $z = \text{konst.}$ ve vzdálenosti d od vzorku zjistíme tak, že vypočítáme vzájemnou intenzitu dvou obecných bodů P_1, P_2 v této rovině. Tedy dle vztahu (3.2.1)

$$J_{12} = \iint_{\sigma} u_d(x_s, y_s; x_1, y_1) u_d^*(x_s, y_s; x_2, y_2) dx_s dy_s , \quad (4.3.1)$$

kde x_1, y_1 , resp. x_2, y_2 , jsou souřadnice bodu P_1 , resp. P_2 . Funkce $u_d(x_s, y_s, x_i, y_i) = u_d(S, P_i)$ závisí na poloze bodu zdroje S a bodu P_i v rovině výpočtu.

Do této rovnice dosadíme z (4.2.17)

$$\begin{aligned}
J_{12} = & |C_1|^2 \iint_{\sigma} d^2 \vec{s} \int \int \int \int_{-\infty}^{\infty} d^2 \vec{k}_1 d^2 \vec{k}_2 \times \\
& \times \exp \left[i k d \sqrt{1 - \frac{(k_{x_1} f - x_s k)^2 + (k_{y_1} f - y_s k)^2}{(k f)^2}} \right] \times \\
& \times T_s(k_{x_1}, k_{y_1}) \exp \left[i \left(x_1 \left(k_{x_1} - \frac{x_s k}{f} \right) + y_1 \left(k_{y_1} - \frac{y_s k}{f} \right) \right) \right] \times \\
& \times \exp \left[-i k d \sqrt{1 - \frac{(k_{x_2} f - x_s k)^2 + (k_{y_2} f - y_s k)^2}{(k f)^2}} \right] \times \\
& \times T_s^*(k_{x_2}, k_{y_2}) \exp \left[-i \left(x_2 \left(k_{x_2} - \frac{x_s k}{f} \right) + y_2 \left(k_{y_2} - \frac{y_s k}{f} \right) \right) \right] . \quad (4.3.2)
\end{aligned}$$

kde $d^2 \vec{k}_1 = dk_{x_1} dk_{y_1}$, $d^2 \vec{k}_2 = dk_{x_2} dk_{y_2}$, $d^2 \vec{s} = dx_s dy_s$. Odmocniny v rovnici (4.3.2) převedeme na součet pomocí Taylorova rozvoje výrazu $\sqrt{1-x}$ se středem v $x_0 = 0$, kde $x = \frac{(k_{x_i} f - x_s k)^2 + (k_{y_i} f - y_s k)^2}{(k f)^2}$, $i = 1, 2$,

$$\sqrt{1-x} \approx 1 - \frac{1}{2}x - \frac{1}{8}x^2 + \dots \quad (4.3.3)$$

Protože $k^2 \gg k_x^2 + k_y^2$ a $\frac{x_s}{f}$, $\frac{y_s}{f}$ jsou velmi malá čísla, můžeme zanedbat členy vyšších řádů. Potom platí

$$\sqrt{1 - \frac{(k_{x_1} f - x_s k)^2 + (k_{y_1} f - y_s k)^2}{(k f)^2}} \approx 1 - \frac{1}{2} \frac{(k_{x_1} f - x_s k)^2 + (k_{y_1} f - y_s k)^2}{(k f)^2}. \quad (4.3.4)$$

Rozdíl odmocnin ve výrazu (4.3.2) tedy bude

$$\begin{aligned}
& \sqrt{1 - \frac{(k_{x_1} f - x_s k)^2 + (k_{y_1} f - y_s k)^2}{(k f)^2}} - \sqrt{1 - \frac{(k_{x_2} f - x_s k)^2 + (k_{y_2} f - y_s k)^2}{(k f)^2}} \approx \\
& \approx \frac{-(k_{x_1}^2 + k_{y_1}^2) + (k_{x_2}^2 + k_{y_2}^2)}{2k^2} + \frac{x_s(k_{x_1} - k_{x_2}) + y_s(k_{y_1} - k_{y_2})}{k f}. \quad (4.3.5)
\end{aligned}$$

Po dosazení (4.3.5) do (4.3.2) získáme

$$\begin{aligned}
J_{12} \approx & |C_1|^2 \iint_{\sigma} \exp \left[\frac{ik}{f} (x_s (x_2 - x_1) + y_s (y_2 - y_1)) \right] \times \\
& \times \int_{-\infty}^{\infty} T_s(k_{x_1}, k_{y_1}) \exp \left[-\frac{id}{2k} (k_{x_1}^2 + k_{y_1}^2) \right] \times \\
& \times \exp \left[i \left(k_{x_1} \left(x_1 + \frac{x_s d}{f} \right) + k_{y_1} \left(y_1 + \frac{y_s d}{f} \right) \right) \right] d^2 \vec{k}_1 \times \\
& \times \int_{-\infty}^{\infty} T_s^*(k_{x_2}, k_{y_2}) \exp \left[\frac{id}{2k} (k_{x_2}^2 + k_{y_2}^2) \right] \times \\
& \times \exp \left[-i \left(k_{x_2} \left(x_2 + \frac{x_s d}{f} \right) + k_{y_2} \left(y_2 + \frac{y_s d}{f} \right) \right) \right] d^2 \vec{k}_2 \times \\
& \times d^2 \vec{s} . \quad (4.3.6)
\end{aligned}$$

4.4 Podmínka pro možnost rekonstrukce obrazu

Použijeme podobnou úvahu jako je použita v článku [2]. Světlo se bude chovat jako koherentní, jestliže vzájemná intenzita (4.3.6) bude mít tvar součinu (3.3.2). Toho bude dosaženo, jestliže příspěvek ke změně fáze závislý na x_s (y_s) bude zanedbatelný. Vzájemná intenzita potom bude mít tvar součinu tří integrálů, kde druhý z nich odpovídá $u(S, P_1)$ a třetí $u^*(S, P_2)$. Podmínka je splněna, pokud platí relace

$$\frac{k_{x,max} x_{s,max} d}{f} \ll 2\pi, \quad \frac{k_{y,max} y_{s,max} d}{f} \ll 2\pi, \quad (4.4.1)$$

kde $k_{x,max}$ a $k_{y,max}$ jsou maximální prostorové frekvence, pro které je T_s nenulové, $x_{s,max}$, resp. $y_{s,max}$, je maximální vzdálenost bodu zdroje od optické osy.

Máme sekundární kruhový zdroj o průměru D_s , tedy $x_{s,max} = y_{s,max} = D_s/2$. Vlna je rekonstruována ze záznamu v obrazové rovině, proto jsou $k_{x,max}$ a $k_{y,max}$, nejvyšší prostorové frekvence přenesené zobrazovacím objektivem (objektiv 2a na obrázku 1.0.1). Nerovnost (4.4.1) můžeme dále upravit

$$d \ll 2\pi \frac{2f}{D_s k_{max}} . \quad (4.4.2)$$

kde k_{max} je maximální prostorová frekvence ve směru kolmém na osu z .

Na vzorek je zaostřen objektiv. Maximální prostorovou frekvenci ve směru kolmém na osu z určíme jako maximální souřadnici vlnového vektoru vlny, která prošla objektivem s největším sklonem vůči optické ose. Numerická apertura NA objektivu je definována v [1] (str. 200)

$$NA = n \sin \alpha, \quad (4.4.3)$$

kde n je index lomu prostředí, 2α je úhlová apertura objektivu. Maximální prostorová frekvence k_{max} bude odpovídat vlnovému vektoru svírajícímu úhel α s optickou osou. Paprsky, které svírají s optickou osou větší úhel, neprojdou objektivem. Hodnotu prostorové

frekvence k_{max} vypočteme jako

$$k_{max} = \frac{2\pi}{\bar{\lambda}_0} n \sin \alpha = \frac{2\pi \text{NA}}{\bar{\lambda}_0} , \quad (4.4.4)$$

kde $\bar{\lambda}_0$ je střední vlnová délka použitého světla ve vakuu. Podmínku (4.4.2) můžeme upravit

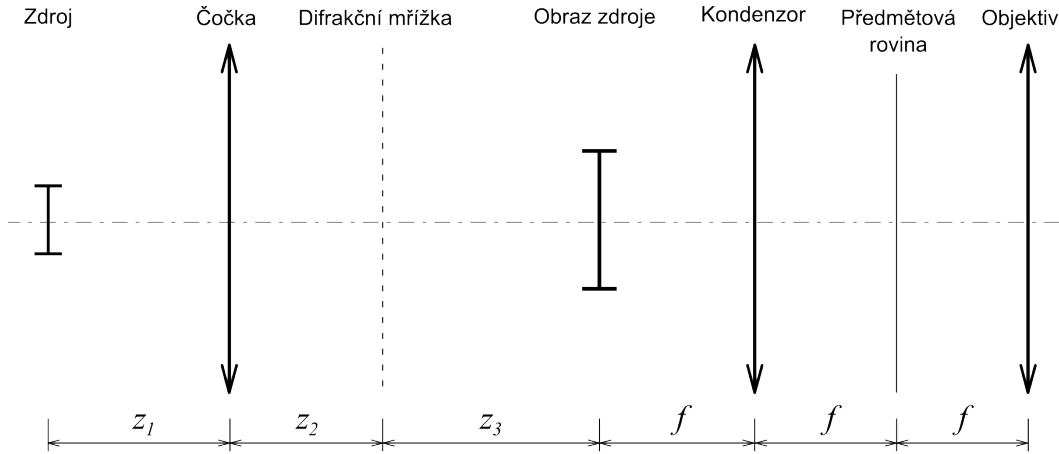
$$d \ll d_m = \frac{2f\lambda_{vac}}{D_s \text{NA}} . \quad (4.4.5)$$

Získali jsme tak podmínku, kterou musí tloušťka vrstvy splňovat. Numerické přestřování lze použít ve vzdálenosti výrazně menší než je d_m .

4.5 Odhad tloušťky vrstvy pro konkrétní parametry mikroskopu

Na obrázku 4.5.1 je zobrazeno schéma uspořádání optických prvků v mikroskopu. Zdroj o průměru D_0 je čočkou zobrazen do ohniskové roviny kondenzoru, kterým je v digitálním holografickém mikroskopu objektiv (2a na obrázku 1.0.1). Zvětšení čočky je M , průměr sekundárního zdroje D_s je určen vztahem $D_s = |M|D_0$. Po dosazení do (4.4.5)

$$d \ll d_m = \frac{2f\bar{\lambda}_0}{D_0|M|\text{NA}} . \quad (4.5.1)$$



Obrázek 4.5.1: Uspořádání optických prvků v mikroskopu.

Centrální vlnová délka použitého světla je $\bar{\lambda}_0 = 650 \text{ nm}$. V tabulce (4.1) jsou parametry jednotlivých objektivů použitých v mikroskopu, které jsou udávány výrobcem. V tabulce (4.2) jsou pro jednotlivé objektivy a velikosti použité clony zdroje vypočítány hodnoty d_m .

Tabulka 4.1: Parametry použitých objektivů udávané výrobcem.

zvětšení	NA	f/mm
10×	0,25	17,129
20×	0,40	8,9
40×	0,65	4,646
60×	0,85	2,969
100×	1,25	

Tabulka 4.2: Hodnoty d_m vypočítané z parametrů zobrazovací soustavy.

D_0/mm	$d_m/\mu\text{m}$			
	10×	20×	40×	60×
10	4,5	1,5	0,47	0,23
7	6,4	2,1	0,67	0,33
5	9,0	2,9	0,94	0,46
1	45	15	4,7	2,3
0,1	450	150	47	23

Čím menší budeme mít zdroj, tím bude světlo koherentnější. Z tabulky je zřejmé, že největší oblast pro numerické přestřování získáme při použití clonky s průměrem $D_0 = 0,1 \text{ mm}$ a objektivu se zvětšením 10×

Závěr

Cílem práce bylo odhadnout tloušťku vrstvy, ve které je možno používat numerické přeostřování digitálního holografického mikroskopu s částečně koherentním osvětlením. Ve výpočtu jsem vycházela ze skalární teorie difrakce a teorie optické koherence, pomocí kterých jsem počítala průchod vlny optickou soustavou. Z podmínky dostatečné koherence světla v celém objemu vrstvy jsem odhadla její tloušťku. Ta je závislá na parametrech mikroskopu. Pro dané parametry digitálního holografického mikroskopu v laboratoři ÚFI jsem určila podmínku pro maximální velikost tloušťky vrstvy.

Literatura

- [1] Born M., Wolf E.: *Principles of Optics*, 7th Ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge 1999.
- [2] Dubois F., Joannes L., Legros J.-C.: Improved three-dimensional imaging with a digital holography microscope with source of partial spatial coherence, *Appl. Opt.* 38, 34 (1999), 7085.
- [3] Goodman J. W.: *Introduction to Fourier Optics*, McGraw Hill, New York 1996.
- [4] Chmelík R.: *Trojrozměrné zobrazení v mikroskopii*. Ústav fyzikálního inženýrství FSI VUT, Brno 2003, 14.
- [5] Komrska J.: *Fourierovské metody v teorii difrakce a ve strukturní analýze*, CERM, Brno 2007.
- [6] Komrska J.: *Vlnová optika, část Difrakce světla.*, CERM, Brno 2004.
- [7] Saleh B. A. E: Teich M. C.: *Základy fotoniky*, svazek 2, matfyzpress, 1994.
- [8] Rektorys K.: *Přehled užití matematiky*, SNTL, Praha 1968.