

文章编号: 1001-3806(2010)01-0081-04

## 位相板的制作及其在相衬法实验中的应用

黄妙娜, 黄佐华\*, 蔡文鑫, 雷水玉

(华南师范大学 物理与电信工程学院, 广州 510631)

**摘要:** 为了制作用于相衬法实验的  $\pi/2$  相板, 采用全息干版, 通过控制其曝光时间及冲洗过程, 使乳胶膜的厚度或折射率发生改变, 从而调节位相的变化; 采用双点光源干涉位相测量方法, 检测并筛选出符合要求的相板, 得到相板位相的 2 维分布图; 将筛选出的有一定吸收的  $\pi/2$  相板作为相衬法实验的位相滤波器并置于透镜频谱面上, 在像平面上所成的位相物体的像达到了预期的效果。结果表明, 用全息干版制作相板的实验方案及工艺是可行的, 且相板的位相与吸收率可以任意设计。这为设计、制作和检测相板提供了一种简单、廉价和快捷的实验方法及工艺流程。

**关键词:** 信息光学; 相位板; 全息干版曝光; 相衬法实验; 位相检测

**中图分类号:** O438 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1001-3806.2010.01.023

### Manufacturing method of a phase plate and its application in phase-contrast experiments

HUANG Miao-na, HUANG Zuo-hua, CAI Wen-xin, LEI Shui-yu

(School of Physics and Telecom Engineering, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** For the purpose of producing a phase plate for phase-contrast experiments, firstly, controlling the exposure time and washing process of a holographic plate, the thickness or refractive index of the film was changed so as to adjust the phase change. Secondly, with the help of two-point light sources interference phase measurement, the required phase plate was detected and screened and its two-dimension phase distribution was obtained. Finally, a  $\pi/2$  phase plate with a certain absorptivity was selected as a phase filter located in the spectrum surface of the lens in the experiment, and the predicated image was obtained on the image plane. The results in the phase detection and the phase-contrast experiments show that it is feasible to produce a phase plate with a holographic plate, and the phase and absorptivity of the phase plate can be designed at will. This is a simple, cheap and fast process to design, manufacture and measure a phase plate.

**Key words:** information optics; phase plate; holographic plate exposure; phase-contrast experiment; phase detection

### 引言

相衬显微镜及光学相衬法在生物医学样品成像及观察中有广泛的应用, 其成像质量的好坏主要受  $\pi/2$  相板性能的影响。目前,  $\pi/2$  相板的制作主要是通过镀膜或光刻等方法实现的, 如在玻璃表面镀介质膜或金属膜<sup>[1-2]</sup>, 但加工过程比较复杂, 位相变化不易控制。本文中采用天津 I 型全息干版, 通过控制其曝光时间和冲洗过程, 使干版感光层厚度及折射率发生变化, 实现对干版吸收率及位相的控制, 制作一系列点阵小圆形相板。采用双点光源干涉位相测量方法, 检测并筛选出符合要求的  $\pi/2$  相板, 这可为设计、制作和检测相板提供一种简单、廉价和快捷的实验方案及工艺流程。

程。

### 1 用全息干版制作相板

#### 1.1 相衬法实验对相板的要求

由相衬原理可知, 如直透光相对于衍射光有  $\pi/2$  位相突变, 像平面上的光强分布为<sup>[3-4]</sup>:

$$I(x, y) \approx 1 \pm 2\varphi(x, y) \quad (1)$$

式中,  $I(x, y)$  为像光强分布,  $2\varphi(x, y)$  为物体的位相大小分布。可知像光强的分布与物体的位相分布成线性关系。其反衬度为  $\gamma \approx \varphi$ 。若使相板有一定吸收, 吸收率为  $N$ , 而直透光强度降低至原值的  $1/N$ , 则像的强度为:

$$I(x, y) = (1/\sqrt{N} - \varphi)^2 \approx (1 - 2\varphi\sqrt{N})/N \quad (2)$$

像的反衬度为  $\gamma \approx \varphi\sqrt{N}$ 。若相板的位相相对于  $\pi/2$  偏移一微小量  $\delta$ , 则像的强度为:

$$I(x, y) = 1 + 2\varphi\cos\delta \quad (3)$$

像反衬度为  $\gamma \approx \varphi\cos\delta$ , 综合上述分析可知: 相板有一定吸收及位相存在偏离(相对于  $\pi/2$ ), 不影响像强度

作者简介: 黄妙娜(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事位相物体测量技术和图像处理的研究。

\* 通讯联系人。E-mail: zuohuah@scnu.edu.cn

收稿日期: 2008-10-27; 收到修改稿日期: 2009-01-04

与位相的线性关系,仅引起像反衬度的改变。

## 1.2 相板制作过程

天津 I 型全息干版属于银盐干版,感光波长为 632.8nm,其主要由感光乳胶层和玻璃基底组成,乳胶层由卤化银微晶颗粒均匀分布于明胶层中构成。干版曝光后的卤化银经显影还原为黑色的银粒,未曝光的卤化银经定影后溶解而留下透明的明胶层,使乳胶层不同曝光部位的折射率及厚度发生改变,从而引起位相的变化,这是制作相板的主要依据。

相板制作大致过程为:组建干版曝光实验系统,设计制作点阵小圆孔掩模板,曝光,冲洗,干燥,除膜,检测,封装。干版曝光实验光路如图 1 所示。

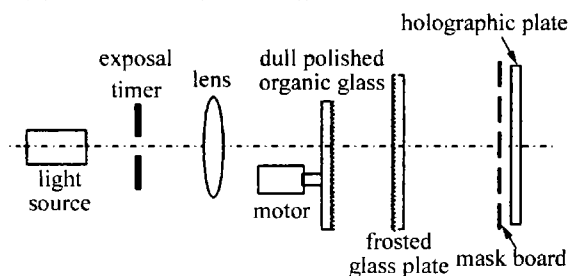


Fig. 1 Optical path of exposure of producing phase plate

由于 He-Ne 激光器发出的激光有明显的激光斑点,通过转动的磨砂有机玻璃,在掩模板处可获得一片均匀的光斑。通过干版曝光及冲洗就可得到一系点阵列小圆孔像(直径为 0.5mm~1mm),每个小圆孔像可以做成一块用于相衬法实验的相板。

曝光时间由曝光定时器控制,在冲洗条件固定的条件下,得到如图 2 所示的干版的透过率与曝光时间的关系曲线。干版的冲洗过程为:显影 1min,水洗停

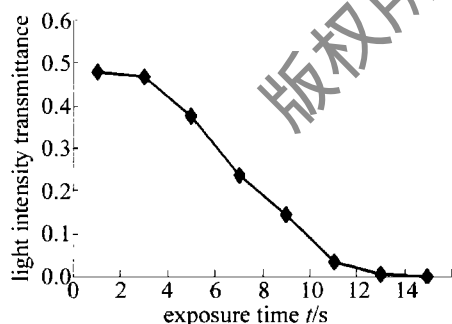


Fig. 2 Relation between light intensity transmittance and exposure time  
显 20s,定影 5min,水洗 3h,彻底清除余留残液及杂质。由图 2 可知,当曝光时间控制在 2s 与 10s 之间时,光强透过率与曝光时间有良好线性关系。

有点阵列小圆孔像的干版冲洗后,自然干燥,用刀片把未曝光的乳胶感光膜割掉,余下的为点阵小圆形相板,通过检测后,选择位相大小接近  $\pi/2$  或  $3\pi/2$  的小圆形相板,用玻璃刀切割成载玻片形状大小,并用一块干净载玻片紧贴乳胶面把相板封装起来,以避免相板受潮变质或磨损,影响使用效果。

## 2 相板的位相检测

相板的位相检测方法有很多,主要有外差法、时间相移法、空间相移法、载波条纹的空域处理方法、干涉显微镜测量法和载波条纹的频域处理方法等<sup>[5-6]</sup>。这些方法要么系统复杂,要么使用不方便。在本实验中,采用一种简单的双点光源干涉位相测量方法<sup>[7-8]</sup>。

### 2.1 双点源位相测量方法

双点光源干涉位相检测光路如图 3 所示,激光器

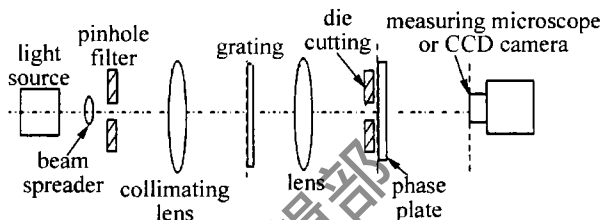


Fig. 3 Optical path of experimental system of phase plate measurement

发出的单色光经过小凸透镜及针孔滤波扩束后,由准直透镜形成平面光,光栅被平行单色光照射,在其焦平面上形成一排极大光点,在其焦平面上放置的光阑只让中间的 2 个极大光点通过,从而形成相干的双点光源,并在远处干涉区出现双光束干涉条纹,在干涉区放置 CCD 获取干涉条纹图像。

双点源干涉位相测量原理如图 4 所示。在图 4 中

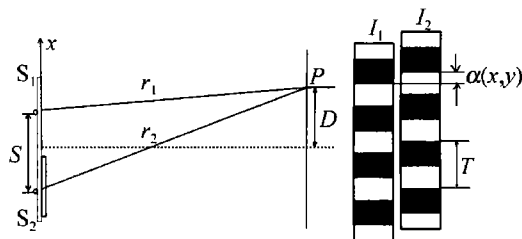


Fig. 4 Principle of phase detection

$S_1$  和  $S_2$  为点光源,被检测位相板位于  $S_1$  和  $S_2$  的平面内,它由玻璃基底和透明膜层组成(玻璃表面涂有透明膜层)。由杨氏干涉理论容易得到<sup>[9-10]</sup>:

$$D = \frac{\theta}{2\pi} T \quad (4)$$

式中, $D$ 是在 CCD 接收面上某条纹中心  $P$  点(条纹光强极大值)的位置, $\theta$ 为  $S_2$  与  $S_1$  在  $P$  点的位相差, $T$ 是干涉条纹间距即条纹周期。

当两个点光源都没通过位相物体(透明膜层)时,即两个点光源仅通过玻璃基底,记录下干涉条纹的位置  $D_0$ (对应于玻璃上一参考位置),这时  $S_2$  与  $S_1$  在  $P$  点的位相差为  $\theta_0$ ;当其中的一个点光源  $S_2$  通过位相物体(透明膜层)时,如图 4 所示,建立  $x-y$  坐标系(其中  $y$  轴垂直于纸面向上),被通过的点记为  $(x, y)$ ,此时干涉条纹发生移动,但结构不变,记下此时干涉条纹的位置  $D'(x, y)$ ,由(4)式有:

$$D_0 = \frac{\theta_0 T}{2\pi} \quad (5)$$

$$D'(x, y) = \frac{\theta'(x, y) T}{2\pi} \quad (6)$$

式中,  $\theta'(x, y)$  为  $S_2$  与  $S_1$  在  $P$  点的位相差, (6) 式减 (5) 式得:  $D'(x, y) - D_0 = \frac{\theta'(x, y) - \theta_0 T}{2\pi} T$  (7)

式中, 令  $\alpha(x, y) = D'(x, y) - D_0$  为各级条纹相对于参考位置条纹的移动量, 则  $\varphi(x, y) = \theta'(x, y) - \theta_0$  为由  $\alpha(x, y)$  条纹位移量反映的位相物体 (透明膜层) 在  $(x, y)$  点上的附加位相, 由 (7) 式, 有:

$$\alpha(x, y) = \frac{\varphi(x, y) T}{2\pi} \quad (8)$$

Table 1 Phase detection result of the phase plate of 5s exposal time

phase plate number	1	2	3	4	5	6
phase/ $\pi$	1.433	1.295	0.506	0.985	0.870	0.548
standard deviation	0.013	0.021	0.060	0.015	0.027	0.014

Table 2 Phase detection result of the phase plate of 7s exposal time

phase plate number	1	2	3	4	5	6	7
phase/ $\pi$	0.487	1.011	0.731	0.612	0.679	1.508	1.780
standard deviation	0.039	0.022	0.021	0.030	0.021	0.014	0.015

列相板位相检测结果。可见, 曝光 5s 的第 3 号相板位相接近  $\pi/2$ , 曝光 7s 的第 6 号相板位相接近  $3\pi/2$ , 它们都可以作为相衬实验的相板。实际上, 采用全息干版可以选择制作具有任意位相的相板。

从位相检测实验中挑选出的曝光时间为 5s 且相位为  $0.506\pi$  的相板, 测得该相板的光强透过率为 39.8%, 即反衬度是相同相位的无吸收相板的 1.585 倍。利用双点源干涉位相测量及扫描成像技术, 检测得到该小圆形相板及其周围附近区域的位相大小分布, 见图 5。这是对相板的一方块区域进行扫描得到的结果, 以点为单位, 每 2 个点之间的间距为  $12.5\mu\text{m}$ 。可知, 其中心部分位相在  $\pi/2$  有微小起伏, 但不影响相衬成像功能。

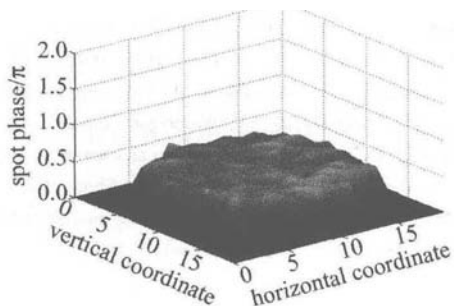


Fig. 5 Phase distribution of a  $\pi/2$  phase plate and its round region

### 3 相衬法实验结果及分析

把选定的  $\pi/2$  相板用于相衬实验, 成像结果如图

即: 
$$\varphi(x, y) = 2\pi \frac{\alpha(x, y)}{T} \quad (9)$$

可见, 通过一个点光源扫描位相物体各个点  $(x, y)$ , 测量对应点的干涉条纹的位移量  $\alpha(x, y)$ , 可计算出对应点的位相。若扫描整个位相物体可得到位相物体的位相分布  $\varphi(x, y)$ 。

#### 2.2 相板检测结果及分析

由于制作条件不完全一样, 如乳胶层厚度有起伏、光强分布不均匀以及显影液浓度不一致等, 常导致同一块掩模板制作出来的相板位相的离散性较大, 只能通过实际测量的方法, 筛选出位相接近  $\pi/2$  的相板。表 1 和表 2 是曝光时间分别为 5s 和 7s 时得到的一系

列相板位相检测结果。可见, 曝光 5s 的第 3 号相板位相接近  $\pi/2$ , 曝光 7s 的第 6 号相板位相接近  $3\pi/2$ , 它们都可以作为相衬实验的相板。实际上, 采用全息干版可以选择制作具有任意位相的相板。

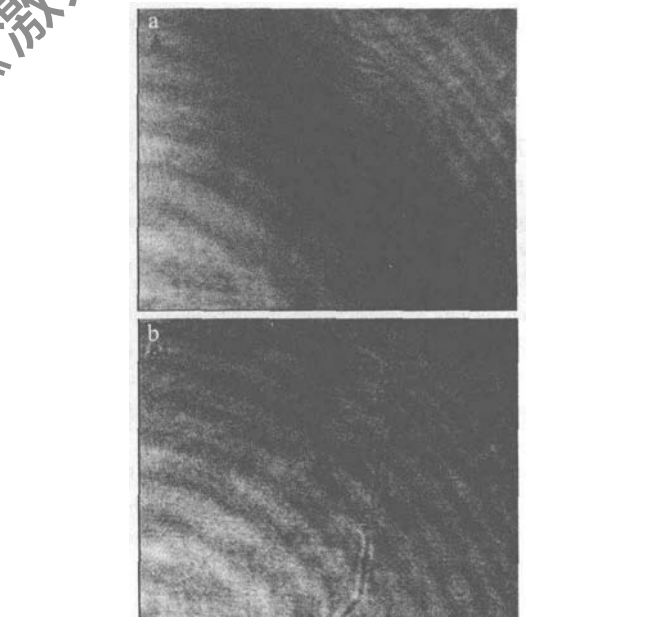


Fig. 6 Phase contrast experiment result of the ITO film

大约为 140nm 透明氧化铟锡 (indium tin oxide, ITO) 膜的玻片, 图 6a 为频谱面上未放置相板的实验结果, 图像未能分辨出 ITO 膜, 图 6b 为在频谱面上的 0 级频谱上放置  $\pi/2$  相板后得到的成像图, 由图像中可明显看到, 在图像的偏右方  $2/3$  处, 有一竖直方向稍微向右倾斜的明暗相间的条纹, 此处即为 ITO 膜与玻璃的分界线。

在玻片上用胶水写下的“光”字作为位相物体, 在

像面上拍摄得到的实验结果如图7所示,图7a是在频谱面上未放置任何相板的成像结果,未能看到位相物体。图7b是在频谱面上放置 $\pi/2$ 相板的成像结果,可见,位相物体“光”字清晰可见。

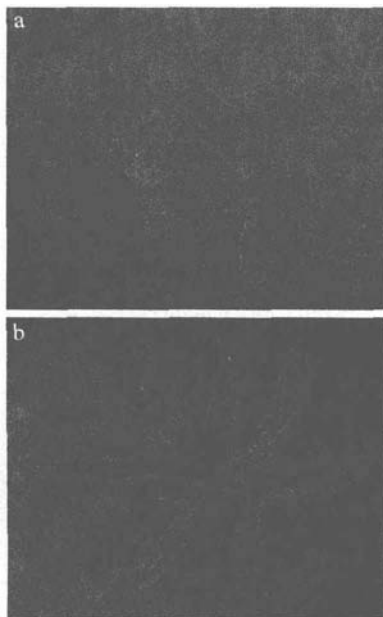


Fig.7 Phase contrast experiment result of the word of “光”(a chinese word, meaning “light”)

#### 4 结论

利用全息干版感光后的折射率及厚度的变化可制

作任意位相的相板。相板制作实验方案和工艺流程可行,双点源干涉位相检测方法可靠,有实用的价值,但要制作完全透明的位相板还有待进一步实验及研究。

#### 参 考 文 献

- [1] TANG F Y. The Zernike and phase-contrast microscope [J]. *Physics and Engineering*, 2004, 14(4): 45-47 (in Chinese).
- [2] LI Sh Q, CEN Zh Ch, CHEN X Y. Phase contrast experiment-observation and record of the phase objects [J]. *Physics Experiment*, 1983, 3(2): 54-56 (in Chinese).
- [3] ZHONG X H. *Modern optics elements* [M]. Beijing: Peking University Press, 2003: 314-323 (in Chinese).
- [4] ZHANG K M, ZHAO R Ch, LIANG R Sh. *Information optics* [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 1993: 72-340 (in Chinese).
- [5] WANG L P. *Optical holography and information processing experiment* [M]. Chongqing: Chongqing University Press, 1990: 150-151 (in Chinese).
- [6] WEI S T. *Holographic interferometry* [M]. Beijing: China Machine Press, 1984: 53-94 (in Chinese).
- [7] HUANG Z H, CHEN F Ch. A new method of scanning image for phase objects [J]. *Proc SPIE*, 2006, 6150: 1-5.
- [8] CHEN F Ch, HUANG Z H, LI R. Measurement of the period of straight interference fringes and its application in phase detection [J]. *Laser Technology*, 2008, 32(1): 105-108 (in Chinese).
- [9] ZHANG S H. *Wave and optics* [M]. Beijing: Tsinghua University Press, 2000: 119-123 (in Chinese).
- [10] LI Y L. The consistency of the dark stripe equation in thomas young's tow-slit experiment and the actual interference diagram [J]. *Journal of Xianyang Normal University*, 2005, 20(6): 21-22 (in Chinese).
- [9] WALLACE K L, SUCHARD J R, CURRY S C, *et al.* Diagnostic use of physicians' detection of urine fluorescence in a simulated ingestion of sodium fluorescein-containing antifreeze [J]. *Annals of Emergency Medicine*, 2001, 38(1): 49-54.
- [10] BAI Y, ZENG F Q. Tumor makers in urine and bladder cancer [J]. *Journal of Clinical Urology*, 2005, 20(4): 253-255 (in Chinese).
- [11] WU F Y, FU M G. A new method for detection of early carcinoma: fluorescence spectrophotometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2002, 21(1): 58-59 (in Chinese).
- [12] WANG W, LIU W K. Study on the characteristic intrinsic fluorescence spectra of urines from cancer patients [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2005, 24(4): 80-82 (in Chinese).
- [13] LUO R C, HUANG L, WANG Zh, *et al.* Study of lumiflavin fluorescence method for determination of riboflavin in urine [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2004, 26(5): 396-399 (in Chinese).
- [14] ZHANG Y D, WANG Sh Ch. Porphyrin and tumor [J]. *China Medical Engineering*, 2004, 12(3): 102-105 (in Chinese).
- [15] CHEN G Zh, HUANG X Zh. *Fluorescence analysis* [M]. Beijing: Science Press, 1995: 501 (in Chinese).

(上接第47页)

- [4] WU M, DING J H, WANG Ch J. Study on the polarization fluorescence spectra used for the liver disease diagnosis [J]. *Laser Technology*, 2005, 29(6): 579-581 (in Chinese).
- [5] ZHAO Zh M, XIN Y J, WANG L X, *et al.* Measurement and analysis of absorption spectrum of human blood [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(1): 138-140 (in Chinese).
- [6] VIRGINIA M V, REYNOLDS M S, PRICE J M. Use of ion-exchange resins for the determination of N1-methylnicotinamide in human urine [J]. *Analytical Biochemistry*, 1965, 10(2): 274-281.
- [7] STRICKLAND P T, KANG D, BOWMAN E D, *et al.* Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide as a major pyrene metabolite in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Carcinogenesis of Oxford Journal*, 1994, 15(3): 483-487.
- [8] WINTER M L, ELLIS M D, SNODGRASS W R. Urine fluorescence using a Wood's lamp to detect the antifreeze additive sodium fluorescein; a qualitative adjunctive test in suspected ethylene glycol ingestions [J]. *Annals of Emergency Medicine*, 1990, 19(6): 663-667.