

SIMULACE METODY FÁZOVÉHO KONTRASTU V MATLABU

A.Mikš, J.Novák

Katedra fyziky, FSv ČVUT, Praha

Je uvedena teorie metody fázového kontrastu, která našla široké uplatnění zejména v oblasti světelné mikroskopii. Uvedené vztahy umožňují hlubší pochopení principu této metody a jsou z nich patrné výhody a nevýhody metody. Je ukázáno, že komerčně nabízená zařízení pro metodu fázového kontrastu nejsou zdaleka optimální pro širokou třídu pozorovaných objektů. Je provedena počítačová simulace metody fázového kontrastu v Matlabu, která umožňuje nalezení optimálních parametrů zařízení pro realizaci metody fázového kontrastu v mikroskopii.

1. Úvod

Když v roce 1934 publikoval Frits Zernike své první práce [1], [2] o metodě fázového kontrastu netušil, že se tato metoda později stane nejrozšířenější pozorovací metodou ve světelné mikroskopii. Za objev metody fázového kontrastu obdržel Zernike v roce 1953 Nobelovu cenu. V současné době nabízí řada firem ke svým mikroskopům zařízení pro fázový kontrast, která se svým technickým provedením značně liší a pozorujeme-li tentýž fázový předmět metodou fázového kontrastu na mikroskopech různých firem, nebude výsledný obraz vždy stejný. Abychom si uvědomili proč tomu tak je, všimneme si v tomto článku, alespoň ve stručnosti, mechanismu tvorby obrazu v mikroskopu a to se zaměřením na metodu fázového kontrastu.

2. Teorie zobrazení v mikroskopu

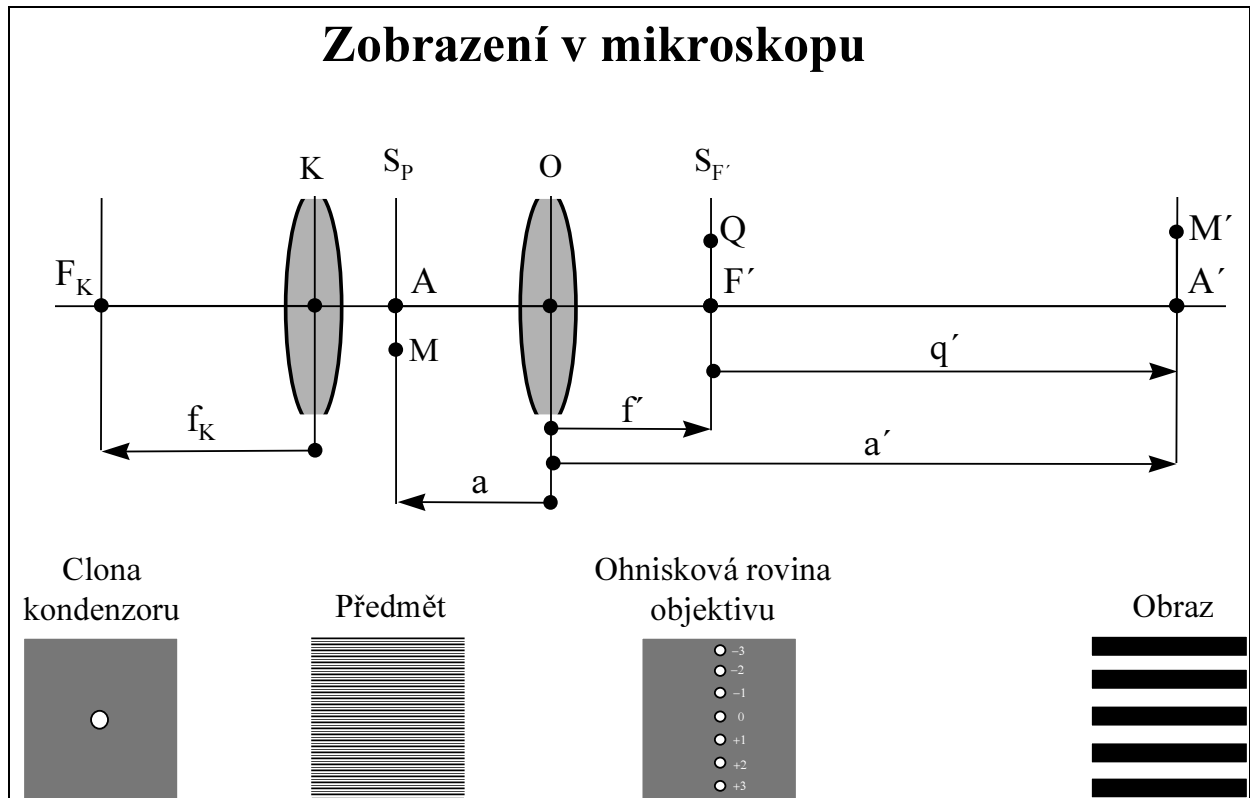
Uvažujme situaci znázorněnou na **obr.1**. Předpokládejme, že předmět P nacházející se v předmětové rovině S_P je osvětlen pomocí kondenzoru K koherentním světelným zdrojem zobrazeným do roviny clony kondenzoru, která se nachází v předmětové ohniskové rovině kondenzoru K majícího ohniskovou vzdálenost f_K' . Na struktuře předmětu nastává difrakce světla [7] a v obrazové ohniskové rovině $S_{F'}$ objektivu O, majícího ohniskovou vzdálenost f' , můžeme pozorovat difrakční obrazce odpovídající různým difrakčním řádům, jak je patrné z **obr.1**. Vidíme zde řadu obrazů clony kondenzoru K odpovídajících různým difrakčním řádům. Geometrická velikost těchto obrazů je dána příčným zvětšením [7] mezi rovinou clony kondenzoru a ohniskovou rovinou objektivu. Jak je z **obr.1** patrné, je toto zvětšení dáno vztahem $m_{KO} = f'/f_K$. Každý bod v obrazové ohniskové rovině $S_{F'}$ můžeme potom považovat za zdroj sekundárního vlnění, jehož amplituda je úměrná amplitudě v tomto bodě. Vlnění vycházející z těchto sekundárních zdrojů potom navzájem interferují a vytvářejí obraz P' předmětu P. Abychom získali věrný obraz předmětu, je nutné, aby se tvorby obrazu zúčastnily všechny difrakční řády. Tuto podmínku však v důsledku konečné numerické apertury objektivu nelze splnit. Tato teorie zobrazení mikroskopu pochází od Abbeho a její matematické formulaci se budeme věnovat v následující části. Necht' $M(x,y)$ je libovolný bod předmětové roviny, potom můžeme předmět popsat funkcí

$$P(M) = T(M) \exp[i\varphi(M)], \quad (1)$$

kde $T(M)$ je amplitudová propustnost předmětu a $\varphi(M)$ je jeho fáze. Pro amplitudu v libovolném bodě $Q(x_F, y_F)$ obrazové ohniskové roviny $S_{F'}$ potom platí

$$U(Q) = C_1 \int_{S_P} P(M) \exp \left[-\frac{ik}{f'} (Q.M) \right] dM, \quad (2)$$

kde značí: $k = 2\pi/\lambda$,
 λ - vlnovou délka světla,
 f' - ohniskovou vzdálenost objektivu O,
 $C_1 = 1/i\lambda f'$.



Obr.1

Integraci zde provádíme přes předmětovou rovinu S_P . Pro zkrácení zápisu jsme použili symboliku

$$Q.M = x.x_F + y.y_F \quad \text{a} \quad dM = dx dy ,$$

kterou budeme i v dalším používat.

Amplituda v bodě M' obrazové roviny je potom dána následujícím vztahem

$$U(M') = C_2 \int_{S_F'} U(Q) \exp \left[-\frac{ik}{q'} (Q.M') \right] dQ , \quad (3)$$

kde $C_2 = \frac{\exp(i\alpha)}{i\lambda q'}$ a α je reálné číslo.

Integraci provádíme přes obrazovou ohniskovou rovinu $S_{F'}$ objektivu O. Označíme-li m jako příčné zvětšení objektivu O, potom platí ($m = -q'/f'$) [7]

$$M' = m.M = (-q'/f').M . \quad (4)$$

Dosadíme-li nyní vztah (4) do vztahu (3), dostáváme

$$U(M') = C_2 \int_{S_{F'}} U(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ .$$

Vzhledem k finitnosti funkcí $P(M)$ a $U(Q)$, můžeme integrační meze rozšířit do nekonečna a vztahy pro amplitudu $U(Q)$ v ohniskové rovině $S_{F'}$ objektivu O a pro amplitudu $U(M')$ v obrazové rovině objektivu O psát ve tvaru

$$U(Q) = C_1 \int_{-\infty}^{+\infty} P(M) \exp\left[-\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dM , \quad (5)$$

$$U(M') = C_2 \int_{-\infty}^{+\infty} U(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ . \quad (6)$$

Ze vztahu (5) užitím zpětné Fourierovy transformace dostáváme

$$P(M) = C_3 \int_{-\infty}^{+\infty} U(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ , \quad (7)$$

kde $C_3 = \frac{1}{C_1(\lambda f')^2}$. Porovnáním se vztahem (6) vidíme, že platí

$$U(M') = C.P(M) , \quad (8)$$

kde $C = C_1 C_2 (\lambda f')^2 = (1/m)\exp(i\alpha)$.

Ze vztahu (8) je patrné, že obraz $U(M')$ je zcela podobný předmětu $P(M)$.

Předpokládejme nyní, že do ohniskové roviny objektivu O vložíme destičku, která nám ovlivní amplitudu a fázi vlnění v této rovině. Necht' $H(Q)$ je funkce propustnosti této destičky, platí

$$H(Q) = G(Q) \exp[i\psi(Q)] , \quad (9)$$

kde $G(Q)$ je amplitudová propustnost destičky a $\psi(Q)$ je její fázový posuv. Je-li $U(Q)$ amplituda v bezprostřední blízkosti před destičkou a ${}^+U(Q)$ amplituda bezprostředně za destičkou, potom platí

$${}^+U(Q) = U(Q).H(Q) . \quad (10)$$

Vztah (5) pro amplitudu $U(Q)$ v ohniskové rovině objektivu O pišme nyní ve tvaru

$$U(Q) = U_0(Q) + U_d(Q) , \quad (11)$$

kde

$$U_0(Q) = C_1 \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left[-\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dM , \quad (12)$$

$$U_d(Q) = C_1 \int_{-\infty}^{+\infty} [P(M) - 1] \exp\left[-\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dM . \quad (13)$$

Amplituda $U_0(Q)$ nám představuje "přímé světlo" , t.j. světlo neovlivněné předmětem, zatímco amplituda $U_d(Q)$ reprezentuje světlo difraktované na předmětu. Předpokládejme nyní, že destička vložená do ohniskové roviny objektivu O bude ovlivňovat je "přímé světlo", t.j. pouze amplitudu $U_0(Q)$, tedy podle (10) a (11) platí

$${}^+U(Q) = H(Q).U_0(Q) + U_d(Q) . \quad (14)$$

Pro amplitudu $U(M')$ v obrazové rovině objektivu O obdržíme podle vztahu (6) následující výraz

$$U(M') = U_0(M') + U_d(M') , \quad (15)$$

kde

$$U_0(M') = C_2 \int_{-\infty}^{+\infty} H(Q) U_0(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ , \quad (16)$$

$$U_d(M') = C_2 \int_{-\infty}^{+\infty} U_d(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ . \quad (17)$$

Ze vztahu (13) užitím zpětné Fourierovy transformace obdržíme

$$P(M) - 1 = C_3 \int_{-\infty}^{+\infty} U_d(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ \quad (18)$$

a tedy porovnáním se vztahem (17) dostáváme

$$U_d(M') = C [P(M) - 1] . \quad (19)$$

Volíme-li funkci $H(Q)$ tak, že platí

$$H = G \exp(i\psi) , \quad (20)$$

t.j. funkce H se nemění se změnou Q , potom máme

$$U_0(M') = H.C_2 \int_{-\infty}^{+\infty} U_0(Q) \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ. \quad (21)$$

Jak je známo, platí pro Diracovu funkci $\delta(Q)$ vztah

$$\delta(Q) = \int_{-\infty}^{+\infty} \exp[-2\pi i(Q.M)] dM.$$

Ze vztahu (12) potom dostáváme

$$U_0(Q) = C_1 \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left[-\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dM = C_1 \delta(Q/\lambda f'). \quad (22)$$

Dosazením (22) do (21) obdržíme

$$U_0(M') = C.H \int_{-\infty}^{+\infty} \delta(Q/\lambda f') \exp\left[\frac{ik}{f'}(Q.M)\right] dQ = C.H \quad (23)$$

Dosadíme-li nyní (23) a (19) do (15) dostáváme

$$U(M') = C [H + P(M) - 1] \quad (24)$$

Pro intenzitu v obrazové rovině objektivu O potom platí

$$I(M') = U(M') U^*(M') = |C|^2 [H + P(M) - 1][H + P(M) - 1]^*, \quad (25)$$

kde hvězdičkou značíme komplexně sdruženou amplitudu. Dosazením (1) a (20) do (25) dostáváme

$$I(M') = \frac{1}{m^2} \left\{ 1 + G^2 + T^2 - 2[G \cos \psi + T \cos \varphi - GT \cos(\psi - \varphi)] \right\}. \quad (26)$$

Vztah (26) nám udává intenzitu v obrazové rovině při zobrazení předmětu $P = T \exp(i\varphi)$ optickou soustavou, v jejíž obrazové ohniskové rovině je umístěna destička modulující pouze přímé světlo, přičemž modulační funkce je $H = G \exp(i\psi)$. Dále jsme při odvozování vztahu (26) uvažovali nekonečně rozlehlý předmět a nekonečně velkou výstupní pupilu objektivu. Vypočtěme si nyní kontrast obrazu fázového předmětu. Definujeme-li kontrast vztahem

$$K = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (27)$$

kde intenzita $I(\varphi, T, \psi, G)$ je dána vztahem (26) a I_0 je intenzita pozadí $I_0 = I(\varphi=0, T=1, \psi, G)$. Dosazením do (27) dostáváme

$$K = \frac{1 + T^2 - 2[T \cos \varphi + G \cos \psi - GT \cos(\psi - \varphi)]}{G^2}. \quad (28)$$

Vztah (28) nám umožňuje vypočítat kontrast obrazu v obecném případě. Hledejme nyní takovou hodnotu ψ , pro kterou bude kontrast K maximální. Nutná podmínka pro extrém má tvar

$$\frac{\partial K}{\partial \psi} = 0 . \quad (29)$$

Užitím vztahů (28) a (29) dostáváme

$$\sin \psi - T \sin(\psi - \varphi) = 0 , \quad (30)$$

Po úpravě nabude rovnice (30) tvar

$$\operatorname{tg} \psi = \frac{T \sin \varphi}{T \cos \varphi - 1} \quad (31)$$

Vztah (31) nám tedy v obecném případě dovoluje určit optimální posuv ψ modulační fázové destičky zajišťující maximální kontrast obrazu pozorovaného předmětu. Vidíme, že optimálním řešením by byla fázová destička s proměnným fázovým posuvem, neboť **optimální fázový posuv destičky ψ závisí na fázovém posuvu předmětu φ a jeho amplitudové propustnosti T** . *Nelze tedy sestavit zařízení pro metodu fázového kontrastu, které by současně poskytovalo maximální kontrast pro všechny pozorované předměty.*

Uvažujme nyní zvláštní, v praxi se však velmi často vyskytující, případ kdy $T = 1$. Jedná se tedy o čistě fázový objekt. Vztah (28) se nám v tomto případě velmi zjednoduší a kontrast obrazu je pak vyjádřen vztahem

$$K = 2[1 - \cos \varphi - G \cos \psi + G \cos(\psi - \varphi)] / G^2 . \quad (32)$$

Ze vztahu (31) potom dostáváme

$$\operatorname{tg} \psi = \frac{\sin \varphi}{\cos \varphi - 1} = -\cot g(\varphi/2)$$

a tedy

$$\psi = \pi/2 + \varphi/2 , \quad (33)$$

nebo

$$\psi = -\pi/2 + \varphi/2 . \quad (34)$$

Vztahy (33) a (34) udávají hodnoty fázového posuvu zavedeného modulační fázovou destičkou, pro který bude kontrast obrazu fázového předmětu maximální. V praxi se většinou přepokládá, že fázový posuv předmětu je malý a pro fázový posuv fázové destičky potom ze vztahů (33) a (34) dostáváme

$$\psi = \pi/2 \quad \text{nebo} \quad \psi = -\pi/2 .$$

Pro malé hodnoty fázového posuvu φ předmětu, dostáváme pro kontrast obrazu tohoto předmětu z (32) následující vztah

$$K(\varphi, \psi, G) = (2\varphi \sin \psi) / G . \quad (35)$$

Dosadíme-li sem za ψ předcházející hodnoty, dostáváme

$$a \quad K(\varphi, \psi = \pi/2, G) = 2\varphi/G \quad (36)$$

$$K(\varphi, \psi = -\pi/2, G) = -2\varphi/G$$

Bývá zvykem označovat fázový kontrast s $\psi = \pi/2$ jako pozitivní fázový kontrast a fázový kontrast s $\psi = -\pi/2$ jako negativní fázový kontrast, protože v prvním případě je pro $\varphi > 0$ $K > 0$ a v druhém případě $K < 0$.

Abychom si učinili představu jak jemné detaily předmětu můžeme pomocí metody fázového kontrastu sledovat, napíšeme si vztah pro fázový posuv předmětu, platí

$$\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} (n_o - n_p) d \quad (37)$$

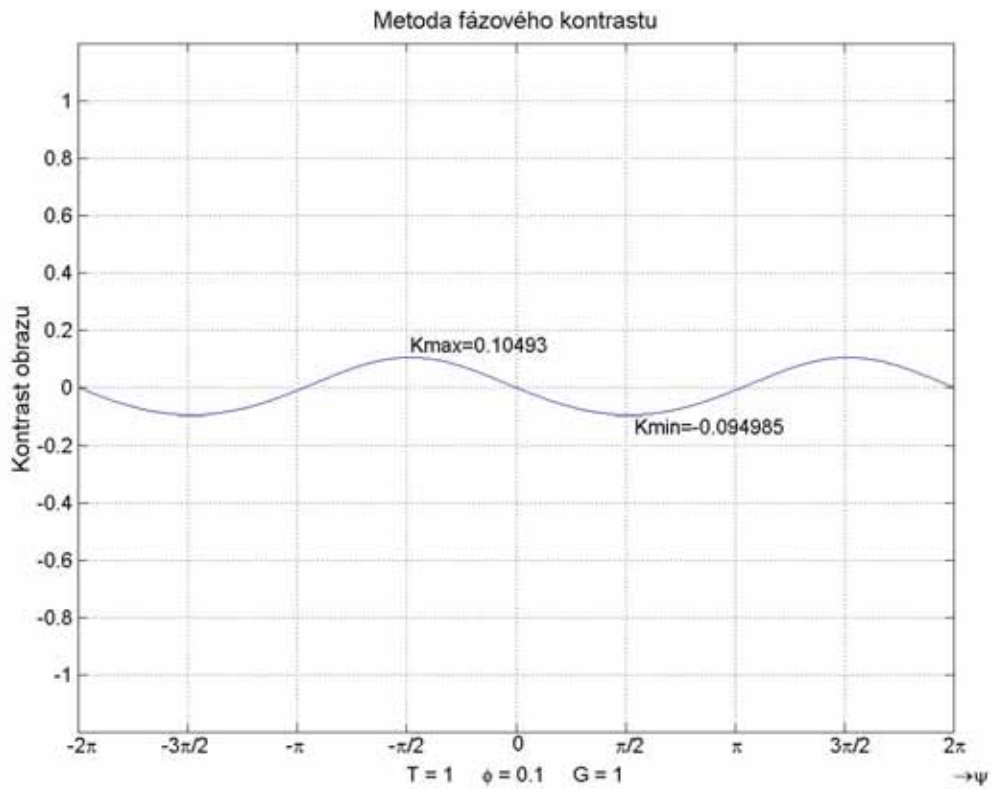
kde značí: λ - vlnovou délku světla,
 n_p - index lomu předmětu,
 n_o - index lomu prostředí, v kterém se předmět nachází,
 d - charakteristický rozměr předmětu (např. jeho tloušťka).

Jak je známo, lidské oko pohodlně rozliší předměty s kontrastem $K = 0,1$. Volíme-li vlnovou délku světla $\lambda = 546$ nm, potom ze vztahu (36) a (37) dostáváme pro dráhový rozdíl

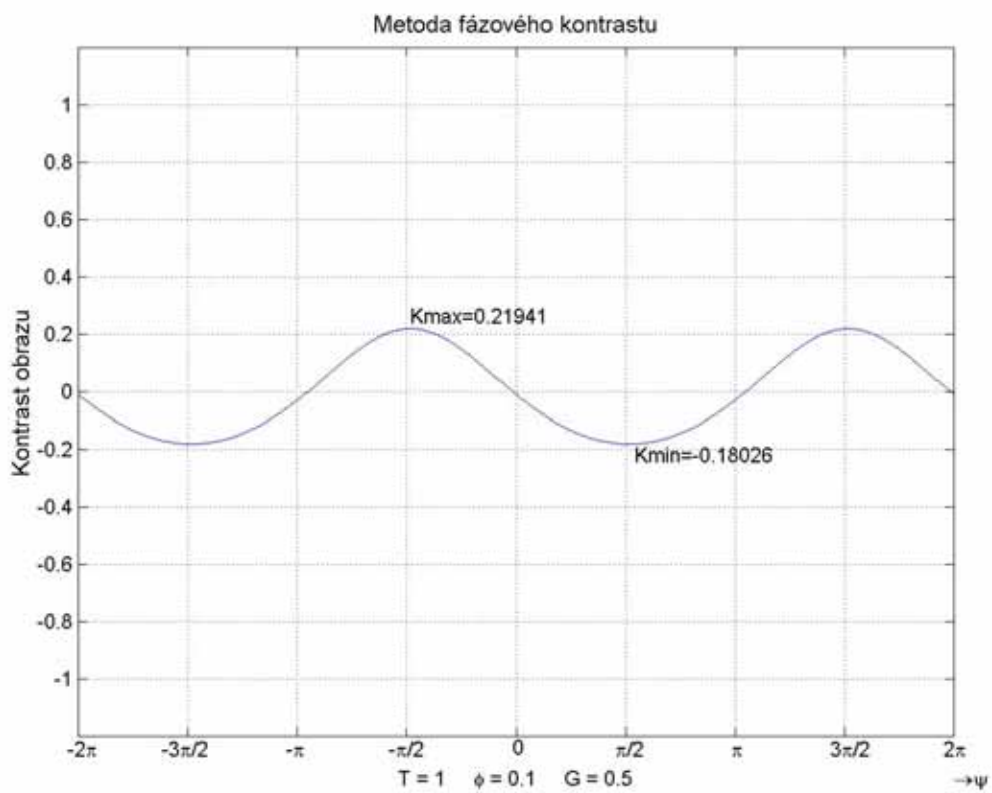
$$\delta = (n_o - n_p)d = \lambda \cdot G \cdot K / 4\pi = 4,3G \text{ nm} .$$

Pro čistě fázovou destičku je $G = 1$ a tedy rozlišíme detaily předmětu jejichž dráhový rozdíl $\delta = 4,3$ nm. Použijeme-li však destičku s absorpcí např. $G = 0,1$ rozlišíme detaily předmětu jejichž dráhový rozdíl $\delta = 0,43$ nm. Z tohoto jednoduchého příkladu vidíme, že citlivost metody fázového kontrastu je velmi vysoká, což přispělo k její velké popularitě.

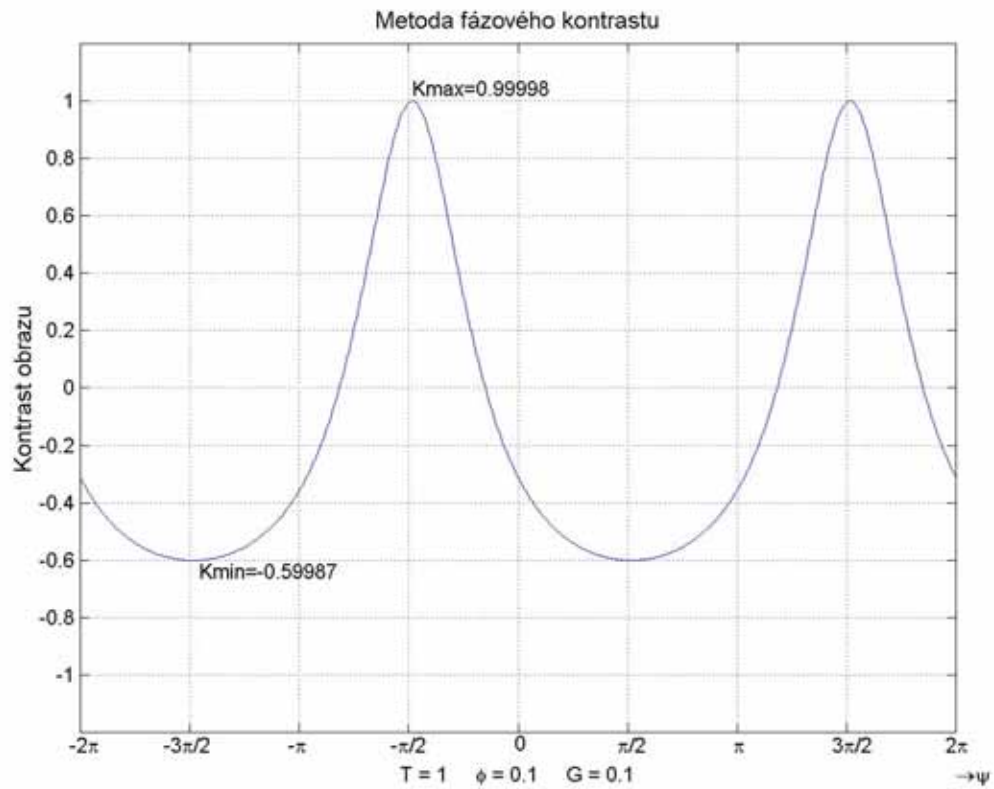
Ukážeme si nyní na několika příkladech vliv fáze φ předmětu a absorpce G fázové destičky na kontrastu K obrazu v závislosti na hodnotě fázového posuvu ψ fázové destičky. Ve všech těchto příkladech uvažujme čistě fázový předmět a tedy jeho amplitudová propustnost $T = 1$. Kontrast obrazu zde definujeme vztahem $K_N = (I_0 - I) / (I_0 + I)$. Takto definovaný kontrast má tu vlastnost, že platí $K_N \leq 1$.



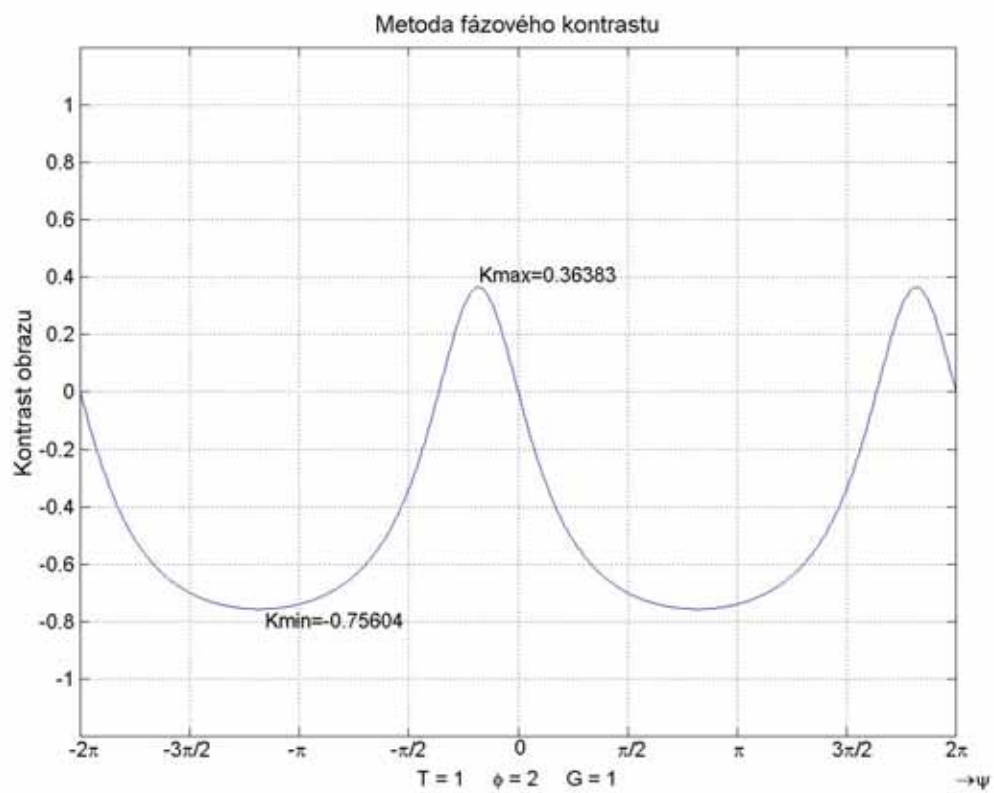
Obr.2 Graf závislosti $K(\varphi, \psi, G)$ pro $\varphi = 0,1$ a $G = 1$



Obr.3 Graf závislosti $K(\varphi, \psi, G)$ pro $\varphi = 0,1$ a $G = 0,5$



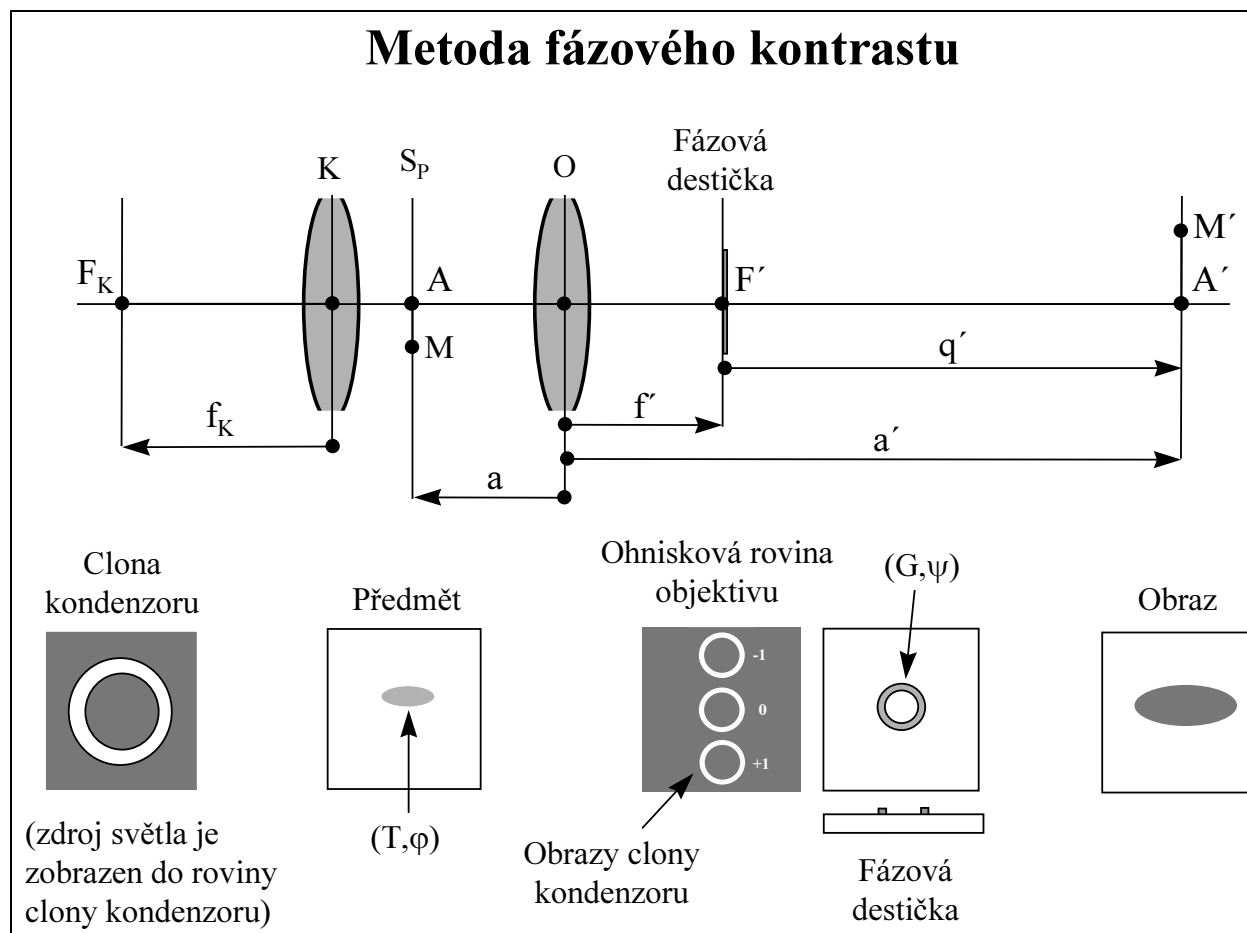
Obr.4 Graf závislosti $K(\phi, \psi, G)$ pro $\phi = 0,1$ a $G = 0,1$



Obr.5 Graf závislosti $K(\phi, \psi, G)$ pro $\phi = 2$ a $G = 1$

3. Praktická realizace metody fázového kontrastu v mikroskopech

Z technického hlediska existuje řada způsobů jak vyrobit *modulační destičku*, která by měla potřebný fázový posuv a amplitudovou propustnost, tak aby došlo k požadovanému ovlivnění přímého světla a optimálnímu kontrastu obrazu. Všimneme si zde jen nejužívanějších způsobů realizace metody fázového kontrastu.



Obr.6

Jak již bylo dříve řečeno, měla by modulační destička ovlivňovat jen přímé světlo a neovlivňovat světlo prošlé pozorovaným objektem (předmětem). Toto však nelze prakticky zajistit a vždy určitá část světla od předmětu bude ovlivněna modulační destičkou. Lze ukázat, že k minimálnímu ovlivnění dojde v případě, že na modulační destičce vytvoříme vhodnou vrstvu ve tvaru *mezikruží* s potřebným fázovým posuvem a amplitudovou propustností. Clona v kondenzoru pak bude mít také tvar *mezikruží*. Poměr velikostí *mezikruží* na modulační destičce a v kondenzoru bude dán poměrem ohniskových vzdáleností objektivu a kondenzoru. Schéma uspořádání je znázorněno na **obr.6**. Vrstva na modulační destičce je nejčastěji tvořena *dielektrikem*, zajišťujícím požadovaný fázový posuv, na němž je nanášena *kovová vrstva* k dosažení potřebné amplitudové propustnosti. Vzhledem k tomu, že index lomu dielektrika závisí na vlnové délce světla, docházelo by při použití bílého světla k tomu, že by se fázový posuv vrstvy měnil a došlo by ke ztrátě kontrastu. Musí se proto používat světlo jen v určité úzké spektrální oblasti. Z toho důvodu se do kondenzoru umísťuje “*monochromatický*” *filtr*, nejčastěji žlutozelený, odpovídající vlnové délce 546 nm a s velmi malou pološířkou. V řadě případů je fázová vrstva nanášena přímo na nějaké ploše čočky uvnitř objektivu. Za tím účelem jsou objektivy určené pro fázový kontrast speciálně

navrhovány tak, aby jejich obrazové ohnisko leželo na nějaké ploše čočky, z kterých je objektiv složen. V roce 1953 navrhl A.Wilksa vytvořit fázovou vrstvu ze *sazí* a toho se jako první chopila firma C.Reichert z Vídně a prodávala tento fázový kontrast pod názvem *anoprální fázový kontrast*. Dodnes tento fázový kontrast prodává několik firem.

Na tomto místě je třeba se zmínit o tom, že fázová vrstva zajistí sice dobrý kontrast obrazu fázového předmětu, ale obraz má okraje lemované závojem (tzv. "halo") což působí rušivě. Tmavší obraz je vždy lemován světlým závojem a světlý obraz tmavým závojem. V případě klasické fázové vrstvy vytvořené z dielektrika a kovu je toto lemování patrnější než v případě sazové vrstvy používané v anoprálním fázovém kontrastu.

Mikroskopové objektivy je možno také opatřit dvěma fázovými vrstvami z nichž jedna dává pozitivní fázový kontrast a druhá negativní fázový kontrast. Kondenzor je pak opatřen clonou s dvěma mezikružemi z nichž jedno je pro pozitivní a druhé pro negativní fázový kontrast [3]. S dalšími možnostmi realizace fázového kontrastu je možno se seznámit v [4], [5] a [6].

4. Závěr

Byla uvedena teorie zobrazení mikroskopem a s její pomocí popsána metoda fázového kontrastu. Byl odvozen obecný vztah pro kontrast obrazu předmětu zobrazeného mikroskopovým objektivem. Bylo ukázáno, že pro dosažení optimálního kontrastu obrazu fázového předmětu je nutno do obrazové ohniskové roviny mikroskopového objektivu zařadit modulační destičku, která v obecném případě ovlivňuje amplitudu a fázi přímého, t.j. předmětem neovlivněného, světla. Vzhledem k tomu, že fázový posuv zavedený modulační destičkou závisí v obecném případě na fázovém posuvu předmětu, není možno v obecném případě sestavit zařízení pro metodu fázového kontrastu, které by poskytovalo maximální kontrast pro všechny zobrazované předměty. Obsahuje-li tedy pozorovaný předmět části s různým fázovým posuvem, budou tyto zobrazeny s různým kontrastem. Při praktické realizaci metody fázového kontrastu je tedy nutno volit určitý kompromis spočívající v tom, že modulační destička bude mít takovou amplitudovou propustnost G a takový fázový posuv ψ , které umožní dosáhnout optimálního kontrastu pro nejčastěji pozorované objekty.

Práce byla vypracována v rámci grantu GAČR 202/02/0314.

Literatura

- [1] Zernike F.: Physica 1 (1934), 689-704.
- [2] Zernike F.: Monthly roy. Astronom. Soc. 94 (1934), 377.
- [3] Pluta M.: Pom. Aut. Kon. (1964), 1, 33.
- [4] Francon M.: Le microscope a contraste de phase et le microscope interférentiel. CNRS, Paris 1954.
- [5] Pluta M.: Mikroskopia fazovo-kontrastova i interferencyjna. PWN, Warszawa 1965.
- [6] Beyer H.: Theorie und praxis des phasenkontrast-verfahren. Akad. Verl. Leipzig 1965.
- [7] Mikš A.: Aplikovaná optika 10, Vydavatelství ČVUT, Praha 2000.

Doc.RNDr.Antonín Mikš,CSc, Katedra fyziky, Stavební fakulta ČVUT, Thákurova 7,
166 29 Praha 6 - Dejvice.
Tel: 224354948, Fax: 233333226, E-mail: miks@fsv.cvut.cz

Ing.Jiří Novák,PhD, Katedra fyziky, Stavební fakulta ČVUT, Thákurova 7,
166 29 Praha 6 - Dejvice.
Tel: 224354435, Fax: 233333226, E-mail: novakji@fsv.cvut.cz