

Оптимизация параметров светового микроскопа с целью повышения разрешающей способности и эффективности использования светового потока.

Зверев В.А. д.т.н.; Виноградова О.А. к.т.н; Фролов Д.Н. к.т.н.

Представлены результаты анализа эффективности использования светового потока, формируемого осветительной системой микроскопа в его визуальном канале. Определены требования к параметрам оптической системы микроскопа, при выполнении которых теоретически возможно значительно повысить эффективность использования светового потока. Исследована взаимосвязь разрешающей способности глаза, диаметров световых пучков лучей в микроскопе и контраста наблюдаемого предмета. Представлены результаты исследования (методом компьютерного моделирования) зависимости степени когерентности световых пучков лучей и предельного разрешения образованного ими изображения, как основы для оптимального согласования параметров осветительной оптической системы с параметрами наблюдательной оптической системы микроскопа. Представлены рекомендации и результаты оптимизации параметров оптической системы микроскопа.

Введение

В современной оптической науке особое место отводится созданию микроскопов, служащих для изучения особо мелких объектов и структур.

К настоящему времени принципиальная оптическая система светового микроскопа не претерпела качественных изменений. Его структурная схема определяется характером исследуемого объекта, оптическими свойствами и теми параметрами, информацию о которых требуется получить. Основными элементами оптической системы микроскопа остаются осветительная система, объектив в качестве проекционной увеличительной системы и окуляр [1].

Осветительные устройства современных микроскопов для достижения требуемой равномерности освещения в пределах требуемых размеров предмета, кроме источника излучения, включают коллектор и конденсор. Известно, что осветительная система микроскопа наполняется избыточным световым потоком, поступление которого в наблюдательную оптическую систему микроскопа ограничивается соответствующим изменением отверстий в полевой и апертурной диафрагмах.

Объективы для микроскопов представлены огромной номенклатурой, что обусловлено противоречивыми требованиями, пользователей к величине наблюдаемого поля и к разрешающей способности применяемых ими микроскопов. При большом поперечном увеличении изображения объектив микроскопа обладает высокой числовой апертурой и малым линейным полем, а при малом поперечном увеличении – малой числовой апертурой и большим линейным полем.

Окуляр, фактически, используется как лупа для рассматривания изображения, образованного объективом.

Анализ эффективности использования светового потока, в микроскопе

Информативность наблюдения с помощью микроскопа определяется не только параметрами оптики наблюдательного канала, но и параметрами оптики осветительного устройства. Таким образом, актуальность исследования параметров осветительных систем микроскопа, уточнения требований к ним и поиска путей устранения необходимости в избыточном световом потоке вполне очевидна.

Световой поток, направляемый системой источника излучения с коллектором в осветительное устройство микроскопа, равен:

$$d\Phi_s = L_0 \pi^2 y_s^2 n_s^2 \sin^2 \sigma_s.$$

Коэффициент пропускания оптики микроскопа будем считать равным единице. Световой поток, проходящий через оптику наблюдательной ветви микроскопа, равен $d\Phi_p = L_0 \pi^2 J_p^2$, где J_p – инвариант Лагранжа-Гельмгольца:

$$J_p = y_p n_p \sin \sigma_p = y'_p n'_p \sin \sigma'_p.$$

При этом для каждого микрообъектива: $V_{об} J_p = V_{об} y_p n_p \sin \sigma_p = y'_p n'_p \sin \sigma'_p$.

Пусть окулярное линейное поле $2y_{ок} = 2y'_p = const$. Тогда, если зависимость $V_{об} = V_{об}(n_p \sin \sigma_p)$ нелинейна, то инвариант $J_p \neq const$, то есть для i -го и j -го объектива из комплекта объективов конкретного микроскопа световой поток $d\Phi_{pi} \neq d\Phi_{pj}$.

Для ряда комплектов ахроматических, планахроматических и планapoхроматических объективов кривые зависимости $V_{об} = V_{об}(n_p \sin \sigma_p)$ достаточно линейны. Однако, ни одна их них не проходит через начало координат.

При этом зависимость $V_{об} = V_{об}(n_p \sin \sigma_p)$ можно аппроксимировать уравнением вида: $V_{об} = kn_p \sin \sigma_p - a$. Обозначив $\sin \sigma_p = \sin \sigma_{p0}$ при $V_{об}=0$, получаем $a = kn_p \sin \sigma_{p0}$. Положив $\sin \sigma_p = \sin \sigma_{p \max}$, при $V_{об \max} = V_{об}(\sin \sigma_{p \max})$ получаем

$$V_{об} = \frac{\sin \sigma_p - \sin \sigma_{p0}}{\sin \sigma_{p \max} - \sin \sigma_{p0}} V_{об \max}.$$

В результате получаем, что

$$J_p = n_p y_p \sin \sigma_p = n_p \frac{y_p'}{V_{об}} \sin \sigma_p = n_p y_p' \frac{\sin \sigma_{p \max} - \sin \sigma_{p0}}{\sin \sigma_p - \sin \sigma_{p0}} \frac{\sin \sigma_p}{V_{об \max}}.$$

$$\text{При } \sin \sigma_p = \sin \sigma_{p \max} : J = J_m = n_p y_p' \frac{\sin \sigma_{p \max}}{V_{об \max}}.$$

$$\text{Пусть } \Delta J = J_m - J. \text{ Тогда } \frac{\Delta J}{J_m} = \frac{\sin \sigma_{p0}}{\sin \sigma_{p \max}} \frac{\sin \sigma_p - \sin \sigma_{p \max}}{\sin \sigma_p - \sin \sigma_{p0}}.$$

Оптические параметры осветительного устройства должны быть таковы, чтобы формируемый им световой поток был равен

$$d\Phi_s = L_0 \pi^2 y_{p \max}^2 n_p^2 \sin^2 \sigma_{p \max},$$

где $n_p \sin \sigma_{p \max}$ – наибольшая числовая апертура объектива в комплекте;

$y_{p \max}$ – радиус наибольшего линейного поля объектива в комплекте.

Это выражение можно переписать в таком виде: $d\Phi_s = L_0 \pi^2 J_{\max}^2$, где

$J_{\max} = y_{p \max} \cdot n_p \sin \sigma_{p \max}$. Тогда каждый объектив комплекта будет использовать лишь часть светового потока, равную:

$$\eta = \left(\frac{J_i}{J_{\max}} \right)^2, \text{ где } J_i = y_{pi} n_{pi} \sin \sigma_{pi}.$$

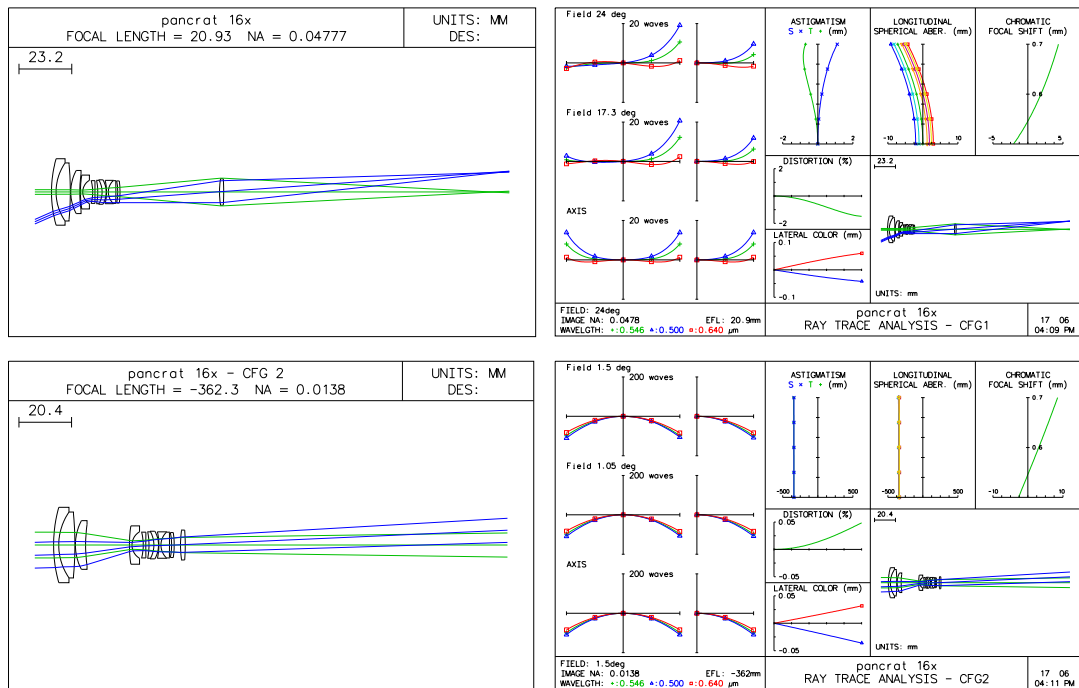
Для примера приведём значения эффективности η использования светового потока для каждого из объективов, комплектующих микроскоп МикМед-2 со штатным апланатическим конденсором. Значения приведены в таблице:

Объектив	4x0,12	10x0,30	25x0,50	40x0,65	100x1,25 ми
	ОХ-4-1	ОХ-10-1	ОХ-25-1	ОХ-40-2	ОХ-100-1
η	0,16	0,16	0,071	0,047	0,028

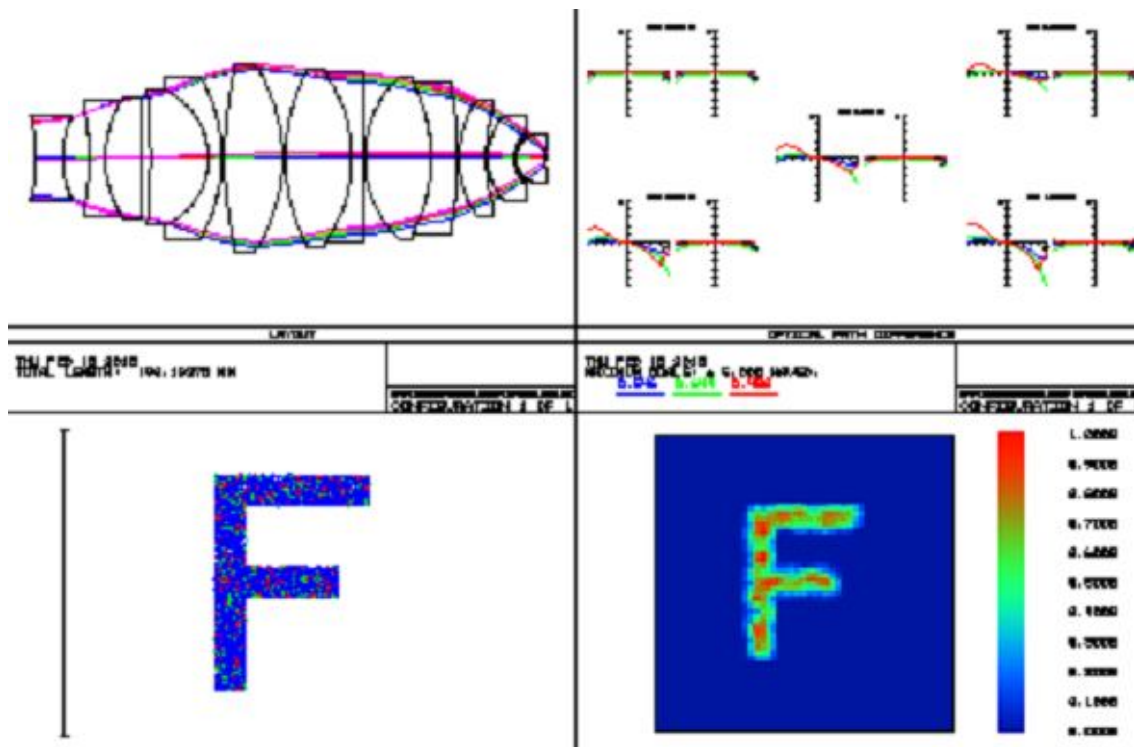
Из анализа величин, приведенных в таблице, следует, что эффективность использования светового потока в этом микроскопе весьма низка. Схожие результаты получены и для других моделей микроскопов.

Эффективность использования светового потока, создаваемого системой источника излучения с коллектором, можно существенно повысить, если применить в схеме осветительного устройства оптическую систему переменного увеличения. В качестве примера нами произведён оптический расчёт панкратического осветительного устройства

с коэффициентом трансфокации $M=15x$; его характеристики представлены на следующем рисунке ниже.



Другим способом повышения эффективности использования светового потока является применение конденсора для освещения площадки предмета максимального радиуса и в пределах максимальной числовой апертуры для всего комплекта объективов. В качестве примера нами произведён оптический расчёт план апохроматического конденсора с линейным полем 2мм и числовой апертурой 0.90; его характеристики представлены на следующем рисунке ниже.



Анализ влияния особенностей освещения объекта в микроскопе на его изображение

Диаметр когерентно освещаемой зоны выходного зрачка определяется формулой:

$$d'_{\text{ког}} \approx 0,26a' \frac{r'_g}{\rho'},$$

где a' – радиус выходного зрачка, ρ' – радиус изображения источника излучения, а r'_g – радиус первого темного кольца в дифракционной картине изображения точки. При $d'_{\text{ког}} \ll a'$ имеем некогерентное освещение выходного зрачка; в других случаях освещение будет частично когерентным.

При освещении предмета по методу Кёлера и при критическом освещении комплексная степень когерентности света, освещающего два близко расположенных отверстия в $P_1(X_1, Y_1)$ и $P_2(X_2, Y_2)$ в плоскости предмета, определяется формулой:

$$\mu(P_1, P_2) = \frac{2J_1(u_{12})}{u_{12}}, \quad u_{12} = \frac{2\pi}{\lambda_o} \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2} n'_s \sin \sigma'_s,$$

где $n'_s \sin \sigma'_s$ – задняя числовая апертура конденсора.

Пусть $P(X, Y)$ – точка в плоскости предмета вблизи точек P_1 и P_2 . Интенсивность света в изображении точки P_1 в точке $P'(X', Y')$ равна:

$$I_1(P') = \left(\frac{2J_1(v'_1)}{v'_1} \right)^2, \quad v'_1 = \frac{2\pi}{\lambda_o} \sqrt{(X' - X_1)^2 + (Y' - Y_1)^2} n'_o \sin \sigma'_o,$$

где $n'_o \sin \sigma'_o$ – задняя числовая апертура микрообъектива.

В соответствии с инвариантом Лагранжа-Гельмгольца:

$$v'_1 = v_1 = \frac{2\pi}{\lambda_o} \sqrt{(X - X_1)^2 + (Y - Y_1)^2} n_o \sin \sigma_o,$$

где $n_o \sin \sigma_o$ – передняя числовая апертура микрообъектива.

$$\text{При этом } I_1(P') = \left(\frac{2J_1(v_1)}{v_1} \right)^2 \text{ и, соответственно,}$$

$$I_2(P') = \left(\frac{2J_1(v_2)}{v_2} \right)^2, \quad v_2 = \frac{2\pi}{\lambda_o} \sqrt{(X - X_2)^2 + (Y - Y_2)^2} n_o \sin \sigma_o.$$

В общем случае, интенсивность $I(P')$ в плоскости изображения, образованного объективом микроскопа, определяется суперпозицией двух частично когерентных пучков световых лучей:

$$I(P') = \left(\frac{2J_1(v_1)}{v_1} \right)^2 + \left(\frac{2J_1(v_2)}{v_2} \right)^2 + 2 \left(\frac{2J_1(mv_{12})}{mv_{12}} \right) \left(\frac{2J_1(v_1)}{v_1} \right) \left(\frac{2J_1(v_2)}{v_2} \right),$$

$$\text{где } m = \frac{n'_s \sin \sigma'_s}{n_o \sin \sigma_o}, \quad v_{12} = \frac{u_{12}}{m} = \frac{2\pi}{\lambda_o} \sqrt{(X_2 - X_1)^2 + (Y_2 - Y_1)^2} n_o \sin \sigma_o.$$

$$\text{Пусть } J_1(mv_{12})=0 \text{ при } mv_{12} \neq 0. \text{ Тогда } I(P') = \left(\frac{2J_1(v_1)}{v_1} \right)^2 + \left(\frac{2J_1(v_2)}{v_2} \right)^2. \text{ Таким образом,}$$

при $m=1$ и $(P_1 P_2) = \frac{1,22 \bar{\lambda}_0}{2n_o \sin \sigma_o}$ распределение интенсивности такое же, как и при

некогерентном освещении точек P_1 и P_2 .

$$\text{При } m=0: \quad I(P') = \left[\frac{2J_1(v_1)}{v_1} + \frac{2J_1(v_2)}{v_2} \right]^2. \text{ При этом при любом расстоянии между}$$

точками распределение интенсивности остается таким же, как и в случае полностью когерентного света.

Определим интенсивность в точке, расположенной посередине между точками P_1 и P_2 на расстоянии q . Пусть $(X - X_1)^2 + (Y - Y_1)^2 = q^2$. Тогда $(X_2 - X_1)^2 + (Y_2 - Y_1)^2 = (P_1 P_2)^2$, $(X_2 - X)^2 + (Y_2 - Y)^2 = (P_1 P_2 - q)^2$.

$$\text{Введем обозначения: } q \frac{\bar{\lambda}_0}{2n_o \sin \sigma_o} = \delta, \quad P_1 P_2 = \frac{\psi \bar{\lambda}_0}{2n_o \sin \sigma_o}.$$

При этом $v_1 = \pi\delta$, $v_2 = \pi(\psi - \delta)$, $v_{12} = \pi\psi$ и, соответственно,

$$I(P') = \left(\frac{2J_1(\pi\delta)}{\pi\delta} \right)^2 + \left(\frac{2J_1[\pi(\psi - \delta)]}{\pi(\psi - \delta)} \right)^2 + 2 \frac{2J_1(\pi\psi)}{\pi\psi} \cdot \frac{2J_1(\pi\delta)}{\pi\delta} \cdot \frac{2J_1[\pi(\psi - \delta)]}{\pi(\psi - \delta)}.$$

Положив $\delta = \frac{1}{2}\psi$, находим интенсивность в точке посередине между точками P_1 и P_2 :

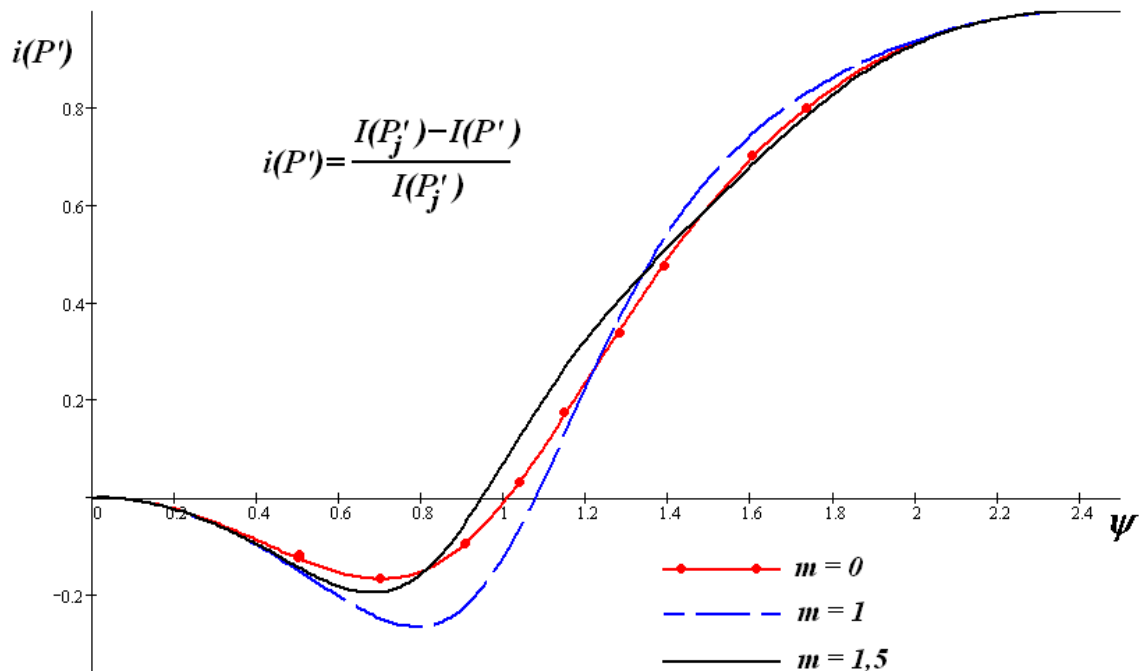
$$I(P') = 2 \left[\frac{2J_1\left(\frac{1}{2}\pi\psi\right)}{\frac{1}{2}\pi\psi} \right]^2 \left[1 + \frac{2J_1(\pi m\psi)}{\pi m\psi} \right].$$

Пусть контраст изображения точек $i(P') = \frac{I(P'_j) - I(P')}{I(P'_j)}$, где $j=1, 2$. Тогда

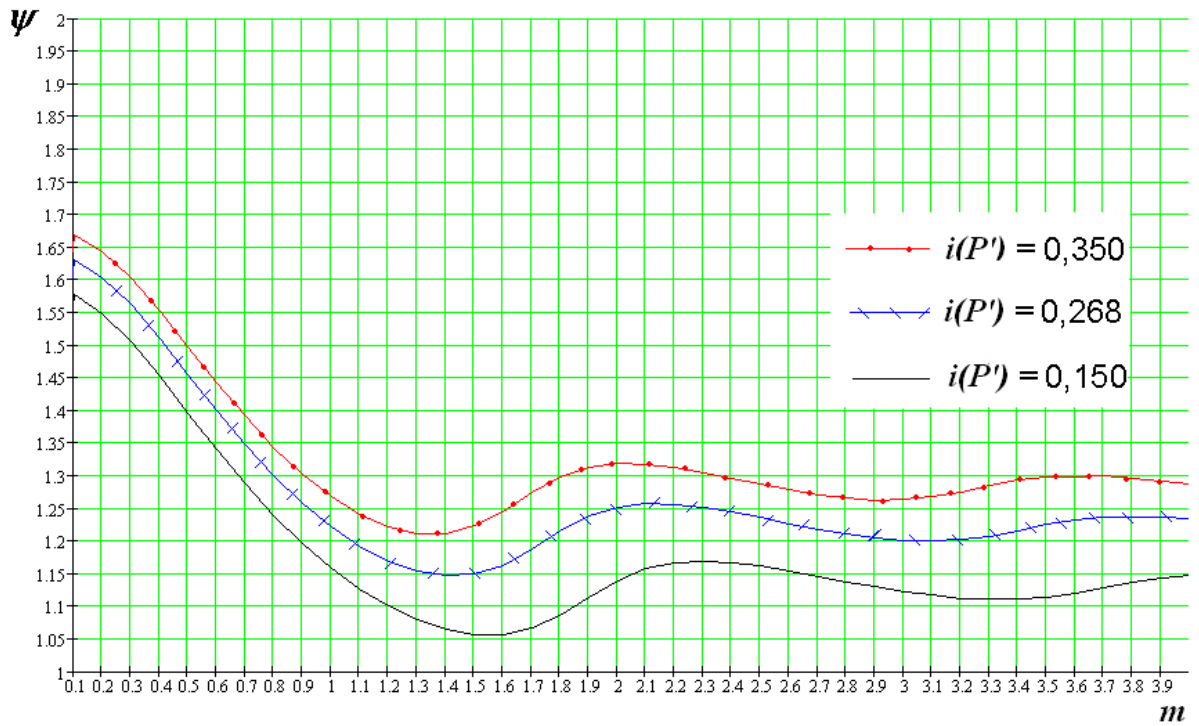
$$i(P') = 1 - \frac{2 \left[\frac{2J_1\left(\frac{1}{2}\pi\psi\right)}{\frac{1}{2}\pi\psi} \right]^2 \left[1 + \frac{2J_1(\pi m\psi)}{\pi m\psi} \right]}{1 + 2 \frac{2J_1(\pi m\psi)}{\pi m\psi} \cdot \frac{2J_1(\pi\psi)}{\pi\psi} + \left[\frac{2J_1(\pi\psi)}{\pi\psi} \right]^2}.$$

Легко убедиться, что при $m=1$ (некогерентное освещение) $i(P') = 0,268$ при $\psi=1,22$, а при $\psi=2,44$ $i(P') = 1$ при любых величинах m .

На следующем рисунке ниже представлена зависимость контраста $i(P')$ изображения двух одинаковых точек от величины коэффициента ψ для трех значений $m = 0; 1; 1,5$.

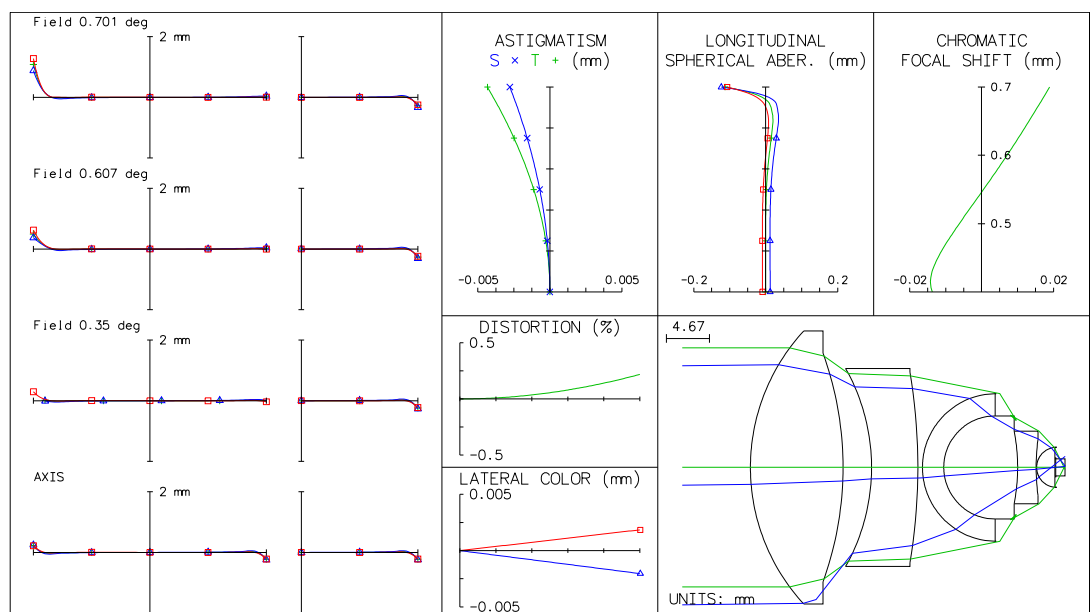


На следующем рисунке ниже представлена зависимость коэффициента ψ от величины отношения числовых апертур m для трех значений контраста $i(P') = 0,150; 0,268; 0,350$.



Отсюда следует, что максимальная разрешающая способность достигается при $m \approx 1,5$. При этом, при значениях величин m меньше $m \approx 1,0$ и больше $m \approx 1,8$ разрешающая способность микроскопа резко падает.

Нами произведён расчёт апланатического конденсора с числовой апертурой 1.58 йод-метиленовой иммерсии, использование которого позволяет значительно повысить разрешающую способность при исследовании на световом микроскопе; его характеристики представлены ниже на рисунке.



Разрешающая способность оптической системы микроскопа и полезное увеличение образованного ею изображения.

При формальном подходе получается, что видимое увеличение изображения можно сделать сколь угодно большим, например, путем выбора достаточно малых фокусных расстояний объектива и окуляра и больших значений оптической длины тубуса или фокусного расстояния тубусной линзы.

Это было бы так, если бы оптика микроскопа в сочетании с глазом наблюдателя обладала абсолютной разрешающей способностью. Разрешающая способность оптической системы, отображающей распределение яркости на предмете в распределение освещенности на изображении, определяется, прежде всего, радиусом центрального максимума в дифракционном изображении точки. Радиус дифракционного пятна в изображении точки, образованном микрообъективом, определяется известной формулой вида [2]:

$$r' = \frac{1.22\lambda}{2n' \sin \sigma'},$$

при этом $r' = V_{об} \cdot r$, где r – радиус изображения центрального максимума дифракционного пятна рассеяния в обратном ходе лучей (т.е. в плоскости предмета):

$$r = \frac{1.22\lambda}{2n \sin \sigma},$$

где $n \cdot \sin \sigma$ – числовая апертура микрообъектива.

Минимальное расстояние ρ между двумя разрешаемыми штрихами миры (тест-объекта) Фуко в плоскости предмета можно определить выражением вида:

$$\rho = \psi \frac{\lambda}{2n \sin \sigma}.$$

При $n' = 1$ диаметр выходного зрачка микроскопа

$$d' = 2f'_{ок} \sin \sigma' = 2f'_m n \sin \sigma.$$

Диаметр выходного зрачка микроскопа определяет диаметр входного зрачка глаза.

По мере увеличения яркости фона происходит уменьшение диаметра зрачка. В общем случае эта зависимость определяется формулой:

$$d_z = 5 - 3th(0.4 \cdot \lg L),$$

где d_z – диаметр зрачка глаза, мм;

L – яркость фона, кд/м²;

th – гиперболический тангенс: $thx = \frac{e^x - e^{-x}}{e^x + e^{-x}}$.

Легко убедиться, что в предельных случаях при $L=0$: $d_z = 5 - 3 \cdot (-1) = 8 \text{ мм}$, а при $L=\infty$: $d_z = 5 - 3 \cdot 1 = 2 \text{ мм}$.

Исследования, выполненные А. Арньюльфом [3], показали, что реальная разрешающая способность безабберационного микроскопа при различных диаметрах выходного зрачка различна и для тест-объекта Фуко с контрастом, равном единице, для ряда значений диаметра выходного зрачка определяется соотношениями:

$$\begin{aligned} \text{при } d'=0.7 \text{ мм } \rho &= \frac{1.03\lambda}{2n \sin \sigma}, & \text{при } d'=2 \text{ мм } \rho &= \frac{2.5\lambda}{2n \sin \sigma}, \\ \text{при } d'=3 \text{ мм } \rho &= \frac{3.45\lambda}{2n \sin \sigma}, & \text{при } d'=4 \text{ мм } \rho &= \frac{5\lambda}{2n \sin \sigma}. \end{aligned}$$

Таким образом, при диаметре выходного зрачка прибора, значительно превосходящего 0.7 мм, зрачок глаза ограничивает разрешающую способность микроскопа. При $d' < 0.7$ мм разрешающая способность также становится меньше. Это определяется, в частности, т.н. энтоптическими явлениями, которые сильно ухудшают видение и действительно наблюдаются при больших увеличениях.

А. Арньюльфом эмпирически были получены графики, характеризующие разрешающую способность оптической системы микроскопа в сочетании с глазом для ряда значений контраста миры Фуко, равных 1, 0.5 и 0.06, определяемых соотношением

$$\gamma = \frac{I_1 - I_2}{I_1},$$

где I_1 – интенсивность света в светлых штрихах, а I_2 – в темных штрихах миры (тест-объекта) Фуко. Кривую $\psi = \psi(d')$ можно аппроксимировать приближенным выражением вида:

$$\psi = 1.03 + 1.4 \frac{(d' - 0.7)^2}{d'}.$$

Итак, вполне естественное стремление сделать видимое увеличение изображения сколь угодно большим ограничивается разрешающей способностью, определяемой размером выходного зрачка, равного

$$d' = 2 \frac{L}{\Gamma_m} n \sin \sigma,$$

при этом диаметр выходного зрачка d' не должен быть меньше 0.5 мм. Считается, с другой стороны, что нет нужды делать его больше 1 мм. [4]. Эти соображения хорошо соотносятся с известным положением, что (при $L=250$ мм) предельные значения полезного видимого увеличения изображения, образованного оптикой микроскопа, определяются соотношением

$$500A \leq \Gamma_m \leq 1000A, \quad \text{где } A = n \sin \sigma.$$

Заключение

Анализ светотехники микроскопа, осветительного устройства, проекционной системы микрообъектива и наблюдательной системы показал их тесную взаимосвязь,

необходимость оптимизации их параметров, что может обусловить принципиальную возможность повышения разрешающей способности, эффективности использования светового потока в микроскопе. Описанные выше изыскания и рекомендации могут быть положены в основу технических требований для проектирования нового поколения микроскопов со значительно улучшенными потребительскими характеристиками.

Литература:

1. Рагузин Р.М, Зверев В.А., Фролов Д.Н. Оптическая система современного микроскопа. ОЖ, том 69, № 9, 2002, стр. 11-15
2. Волосов Д.С., Цивкин М.В. Теория и расчет светооптических систем. М.: Искусство, 1960, 526 с.
3. Мартин Л. Техническая оптика. М.: Государственное издательство физико-математической литературы, 1960, 424 с.
4. Михель К. Основы теории микроскопа. М.: Гостехиздат, 1955, 276 с.