

НОВЫЙ КОМПЛЕКТ ЛИНЗОВЫХ ОБЪЕКТИВОВ ДЛЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ МИКРОСКОПОВ, РАБОТАЮЩИХ В ДИАПАЗОНЕ 250–1000 нм

© 2011 г. Н. Б. Скobelева; М. Н. Сокольский, доктор техн. наук;
Л. Е. Левандовская, канд. техн. наук

ОАО “ЛОМО”, Санкт-Петербург

E-mail: snb812@mail.ru

Рассматриваются новые объективы, предназначенные для комплектации люминесцентных микроскопов, работающих в области спектра 250–1000 нм. Выполнена оценка качества изображения, создаваемого объективами нового комплекта.

Ключевые слова: микрообъективы, люминесцентная микроскопия.

Коды OCIS: 180.2520

Поступила в редакцию 04.05.2010

В криминалистических, медико-биологических и материаловедческих исследованиях широко используются методы исследования в свете стоксовской и антистоксовской люминесценции, при возбуждении как флуоресцентного, так и фосфоресцентного свечения всего микрообъекта или его участка. Для количественной оценки спектров люминесценции используются микроспектрофотометрические методы, которые применимы и для исследования селективных свойств микрообъектов в проходящем и отраженном свете в широкой области спектра от УФ до средней ИК областей. На ОАО “ЛОМО” для решения указанных задач многие годы выпускались модели люминесцентных микроскопов и микроспектрофотометров, которые обычно строились на базе люминесцентного микроскопа. Из современных моделей можно назвать люминесцентные микроскопы “Люмам РПО-11” и “МЛП”, а также микроспектрофотометр “МСФУ-К”. Для микроскопов этого типа

требуются микрообъективы, работающие в широком спектральном диапазоне с высоким коэффициентом пропускания и хорошей коррекцией aberrаций по всей области спектра, которая шире по сравнению с обычными микрообъективами, рассчитанными для видимого диапазона – от 400 до 700 нм.

Два года назад на ОАО “ЛОМО” был разработан и изготовлен комплект безиммерсионных объективов отраженного света для микроспектрофотометра, работающего в области спектра 250–1000 нм, в котором в качестве источников света использованы ксеноновая лампа, имеющая сплошной спектр излучения, и лазерный диод, излучающий на длине волн 960 нм.

На рис. 1 представлены новые микрообъективы, работающие в диапазоне 250–1000 нм, для люминесцентных микроскопов, изготовленные на ЛОМО. В табл. 1 приведены их основные технические характеристики. Объективы имеют стандартизованные характеристики уве-

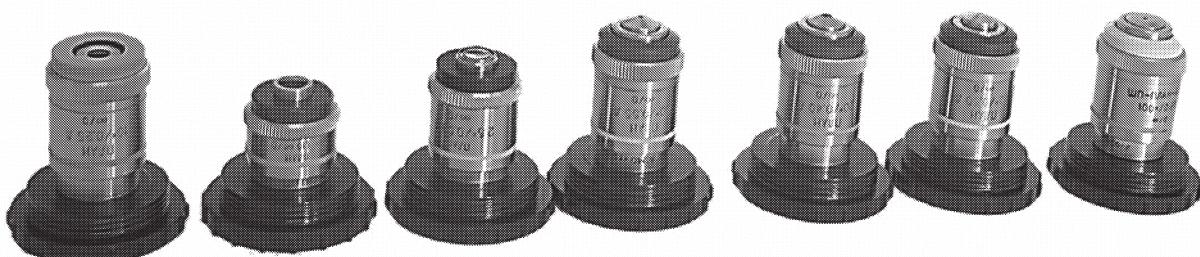


Рис. 1. Комплект безиммерсионных объективов, работающих в диапазоне длин волн 250–1000 нм.

Таблица 1. Технические характеристики новых микрообъективов

Код объектива	Линейное увеличение и числовая апертура	Рабочее расстояние, мм	Линейное поле в пространстве предметов с окуляром 10^x , мм	Расчетное значение разрешающей способности для $\lambda = 550$ нм, мкм
ШП-ОПА-100Б-0	100×0,95	0,58	0,2	0,25
ОПХ-63 ЛБ-0*	63×0,55	1,1	0,3	0,50
ОПХ-40 ЛБ-0*	40×0,55	11,7	0,5	0,50
ОПХ-20 ЛБ-0*	20×0,4	0,8	1	0,68
ОПХ-10 ЛБ-0*	10×0,25	11,5	2	1,1
ОПХ-5 ЛБ-0*	5×0,1	15	4	2,75
ОПХ-2,5 ЛБ-0	2,5×0,03	22,5	8	9,0

личения и высоты ($H = 45$ мм), рассчитаны на работу с тубусом “бесконечность” и тубусной линзой, заднее фокусное расстояние которой равно $f' = 160$ мм.

В спектральной области от 250 нм до 420 нм происходит возбуждение стоксовской люминесценции, а наблюдение происходит в спектральном диапазоне от 365 нм до 700 нм, что и определило область ахроматизации микрообъективов.

Объективы работают и в режиме антистоксовской люминесценции при возбуждении люминесценции на длине волны 960 нм и выходе люминесценции в видимом диапазоне.

Регистрация спектров отражения и спектров люминесценции происходит с помощью микроспектрофотометрической насадки с фотоприемником ФЭУR928 (фирма “Hamamatsu”) в спектральном диапазоне от 250 нм до 980 нм. Для визуального наблюдения изображение выводится с помощью бинокулярной насадки в глаз наблюдателя и на экран монитора телевизионного компьютеризированного канала, содержащего цветную телекамеру с ПЗС-матрицей.

Спектральный диапазон пропускания оптической системы (250–1000 нм) вызвал необходимость при расчете объективов использовать только два оптических материала, которые пропускают эту область спектра – кварцевое стекло и флюорит. Кроме этого, климатические условия эксплуатации и хранения микроспектрофотометра потребовали, чтобы в микрообъективах отсутствовали склеенные поверхности. Оба указанных фактора, а также необходимость уменьшенного коэффициента засветки поля

изображения для всех объективов комплекта определили сложность их расчета.

Использование в качестве приемника излучения ПЗС-матрицы форматом 1/1,8 дюйма и необходимость иметь одинаковые поля в пространстве предметов в визуальном (поле зрения в пространстве изображений 20 мм) и телевизионном каналах обусловили aberrационную коррекцию типа “план”.

Коэффициент засветки в объективах отраженного света должен иметь значение $K_{\text{засв.}} \leq 0,4\%$. Во многом эта величина зависит от материала исследуемого объекта. В любом случае коэффициент засветки – величина контролируемая на стадии расчета для объективов отраженного света.

Принципиальные основы построения объективов для видимой и УФ-областей спектра рассмотрены в работе [1].

Объективы, работающие в УФ-области спектра, которые выпускались на ЛОМО как ахроматические объективы серии ОК (ОК-120, ОК-10-3, ОК-50, ОК-58) и рассчитанные на длину тубуса 160 мм, имеют малые поля в пространстве изображений ($2y' = 12$ мм). В конструкции использовались $2y'$ склеенные линзовье компоненты.

Новый комплект исправлен во всем видимом диапазоне при максимально возможных апертурах, поле зрения увеличено до $2y' = 20$ мм. Материалом фронтальной линзы каждого из объективов являлось кварцевое стекло, так как флюорит – мягкий материал и при эксплуатации сильно подвержен внешним воздействиям. При использовании флюорита сложнее обеспечить требуемые допуски.

Расчет исходной оптической системы этих объективов был основан на теории aberrаций третьего порядка [2], а окончательная система получалась в результате ее оптимизации с использованием программ *OPAL* и *ZEMAX*.

При разработке объективов с планахроматическим типом коррекции целесообразно использовать конструкцию исходной системы, представляющую собой синтез двух частей: фронтальной с уменьшенной кривизной и последующей, построенной по схеме обратного телеобъектива. Согласно этой методике aberrации последующей части рассчитываются так, чтобы они приблизительно были равны по абсолютной величине соответствующим aberrациям фронтальной части, но противоположны по знаку (продольные величины). Таким образом, должны выполняться условия:

$$\Delta S'_{\text{послед}} = -\Delta S'_{\text{фронт}}, \quad \eta'_{\text{послед}} = \eta'_{\text{фронт}}$$

$$(Z'_S - Z'_m)_{\text{послед}} = -(Z'_S - Z'_m)_{\text{фронт}}$$

$$S_{IV\text{послед}} = -S_{IV\text{фронт}}; \quad \Delta S'_{F'C'\text{послед}} = -\Delta S'_{F'C'\text{фронт}};$$

$$\Delta y'_{F'C'} / \Delta y'_e \text{послед} = \Delta y'_{F'C'} / \Delta y'_e \text{фронт},$$

где $\Delta S'$ – продольная сферическая aberrация; η' – величина, характеризующая отступление от закона синусов; $Z'_S - Z'_m$ – астигматизм; S_{IV} – коэффициент Пецаля, определяющий кривизну изображения; $\Delta S'_{F'C'}$, $\Delta y'_{F'C'} / \Delta y'_e$ – хроматическая разность положения и увеличения соответственно.

Для уменьшения кривизны изображения в объективах большого увеличения последующая часть построена по принципу синтеза двух элементов: компенсационной системы и мениска конечной толщины с вогнутыми поверхностями, обращенными к окуляру, свойства которых были исследованы в работе [3]. При конструировании слабых объективов применение такого добавочного мениска после компенсационной части позволяет исправить кривизну. Для более сильных объективов необходимо применение менисков с крутыми радиусами для снижения пецалевой суммы. В таких случаях мениск используется как фронтальная линза [4]. В объективах увеличения 20 \times , 40 \times , 63 \times и 100 \times (оптические схемы объективов приведены в табл. 2 и 3) вместо простой фронтальной линзы применяются два мениска, которые располагаются на конечном расстоянии друг от друга.

Наибольшую сложность вызвала коррекция хроматических aberrаций. Была исключена возможность такого коррекционного элемента

планахроматической коррекции объективов большого увеличения как склеенная фронтальная линза. В последующей части объектива нет возможности использовать склеенные компоненты, т. е. ввести радиус ахроматизации.

Использование теории aberrаций третьего порядка встретило серьезные трудности, обусловленные коррекционной нагрузкой на компоненты объектива, в связи с тем, что на конструкцию наложены определенные ограничения, о которых говорилось выше. Несмотря на все сложности удалось уменьшить хроматизм увеличения в этом комплекте объективов до 0,8%, а в системе объектив – тубусная линза исправить полностью. В табл. 2 приведены результаты расчета.

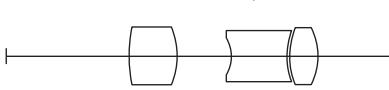
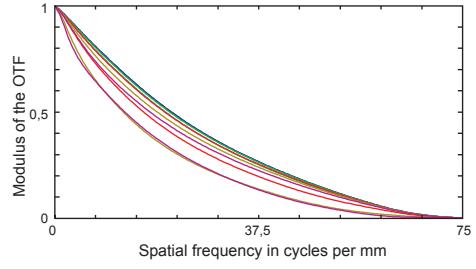
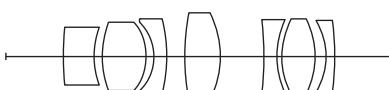
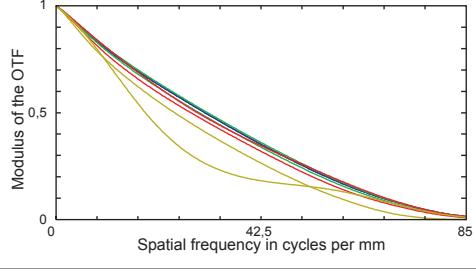
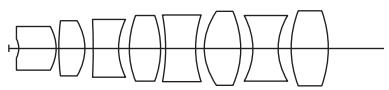
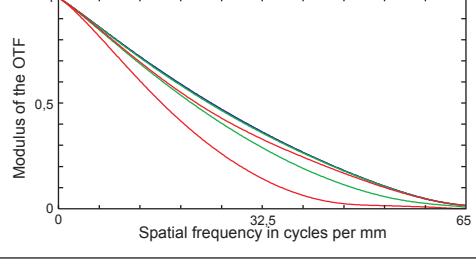
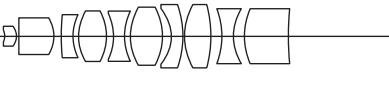
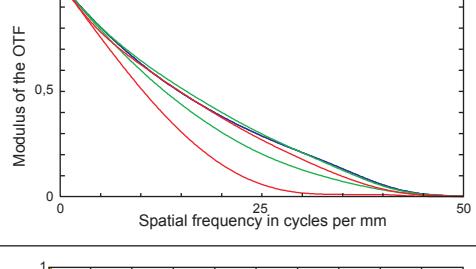
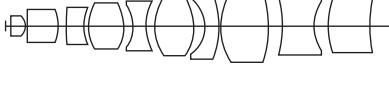
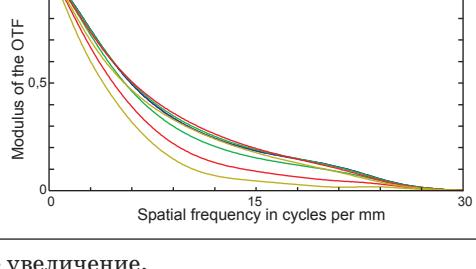
Основными критериями качества изображения при оптимизации оптической системы микрообъективов служили число Штреля, частотно-контрастная характеристика (ЧКХ) и функция концентрации энергии (ФКЭ). Число Штреля удобно использовать при оценке качества изображения визуального канала.

Для высококачественной системы необходимо выполнение условия $S \geq 0,8$ [5]. Практика показывает, что наблюдатель видит изображение плоским, если полихроматическое число Штреля в центре имеет значение $S_0 \geq 0,8$, и если убывает к краю, то на зоне $2y' = 0,707y'_{\max}$ имеет значение не менее $S_{0,707} \geq 0,6$. В телевизионном канале микроскопа обращалось внимание на ЧКХ и на выполнение условий теоремы Котельникова [6, 7].

Оценивать контраст рациональнее на пространственной частоте $v_k = 0,5v_{\text{пределная}}$, поскольку именно ЧКХ на средних частотах характеризует качество изображения: $T(v_k = 0,5v_{\text{пределная}}) \geq 0,8T_0(v_k = 0,5v_{\text{пределная}})$. Если выполнено это условие, то такая система практически не отличается от идеальной, где T – ЧКХ оптической системы, T_0 – безабберационная ЧКХ.

Д.С. Волосовым [8] сформулированы требования к телевизионным системам: совместное действие оптической системы и в нашем случае ПЗС-матрицы на граничной частоте должно обеспечивать значение ЧКХ 0,1: $T_0(v_k) = T(v_k) * T_{\text{o.c.}}(v_k) \geq 0,1$, где $T(v_k)$ – ЧКХ матрицы, $T_{\text{o.c.}}$ – ЧКХ оптической системы. Полагаем, что на частоте Найквиста $T(v_k) = 0,67$, тогда $T_{\text{пределная}}(v_k) = 0,15$. Это условия жесткие. Менее жесткие условия приведены в [9], где определены уровни видения объекта по его изображению от обнаружения до опознавания, что весьма ценно при определении видимого

Таблица 2. Оптические схемы микрообъективов, работающих в диапазоне 250–1000 нм, и основные характеристики их качества

Схемы оптики	Частотно-контрастные характеристики $T(\mu)$	Размер изобр. Y' , мм	Число Штреля полихр.
$V = 5 \quad AP = 0,1$ 		0 0,5 0,707 0,866 10	0,83 0,79 0,68 0,55 0,54
$V = 10 \quad AP = 0,25$  PATENT 2 338 229 G02 21/02		0 0,5 0,707 0,866 10	0,9 0,85 0,85 0,61 0,2
$V = 20 \quad AP = 0,4$  PATENT 2 338 230 G02 21/02		0 0,5 0,707 0,866 10	0,91 0,81 0,63 0,44 0,28
$V = 40 \quad AP = 0,55$  PATENT 2 338 230 G02 21/02		0 0,5 0,707 0,866 10	0,83 0,71 0,60 0,29 0,14
$V = 63 \quad AP = 0,5$  PATENT 2 338 230 G02 21/02		0 0,5 0,707 0,866 10	0,80 0,70 0,60 0,43 0,25

AP – числовая апертура, V – линейное увеличение.

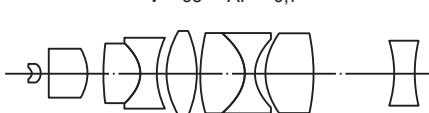
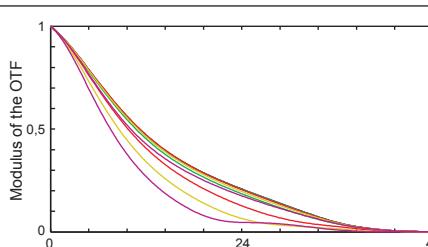
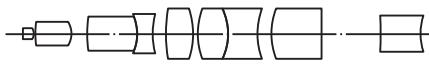
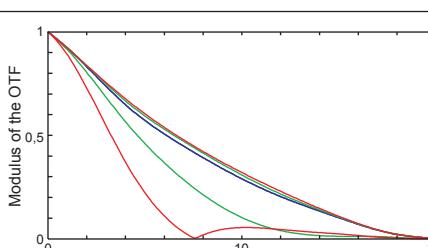
увеличения системы наблюдатель – экран монитора и оценке качества изображения на экране [10].

В канале спектромикрофотометрирования основным критерием качества изображения

служила функция концентрации энергии в центре поля зрения, где находится зонд, выделяющий участок фотометрирования.

На рис. 2 представлены графики ЧКХ для осевой точки (а – объектив 10^\times , б – объектив 20^\times ,

Таблица 3. Оптические схемы микрообъективов, работающих в диапазоне 250–1000 нм, построенных с использованием склеенных компонентов, и основные характеристики их качества

Схемы оптики	Частотно-контрастные характеристики $T(\mu)$	Размер изобр. Y' , мм	Число Штреля полихр.
$V = 63 \quad AP = 0,7$  PATENT 2 338 228 G02 21/02		0 5,0 7,07 8,66 10,0	0,86 0,70 0,60 0,35 0,15
$V = 100 \quad AP = 0,5$ 		0 5,0 7,07 8,66 10,0	0,90 0,70 0,65 0,55 0,45

AP – числовая апертура, V – линейное увеличение.

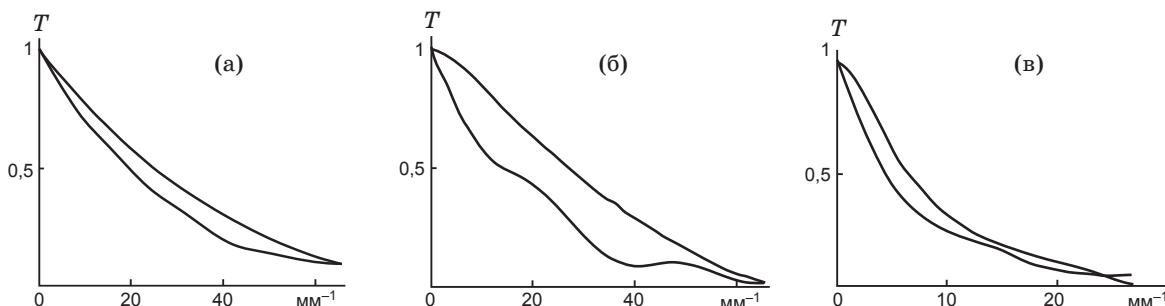


Рис. 2. Частотно-контрастные характеристики объективов нового комплекта: 10^x (а), 20^x (б) и 63^x (в), полученные путем расчета (верхняя кривая) и измерений (нижняя кривая).

в – объектив 63^x), полученные путем расчета (верхняя кривая) и измерением (нижняя кривая). Измерение велось по методу пограничной кривой [11]. Их совпадение достаточно хорошее. Такой контроль проводился для всего комплекта микрообъективов как для осевых, так и внеосевых точек поля зрения.

Расчет оптических схем объективов увеличения 5^x–63^x строился на основании использования в конструкции объективов только одиночных линз (причины этого рассматривались выше). Параллельно просматривались варианты построения оптических схем с использованием склеенных компонентов. Анализ расчетов показал, что оптические схемы объективов, построенные с использованием склеенных компо-

нентов, имеют более высокие значения числовых апертур, чем схемы из одиночных линз.

Особый интерес при расчете комплекта объективов, работающих в диапазоне 250–1000 нм (для люминесцентных микроскопов), представляют объективы большого увеличения. Для объектива 63^x удалось разработать конструкцию из одиночных линз с максимально возможной апертурой $A = 0,5$ (выходная апертура $A' = 0,008$), что является большим достижением в расчете подобных систем (табл. 2). Максимальная апертура для объектива этого же увеличения 63^x, построенного по схеме с использованием склеенных компонентов, равна $A = 0,7$.

Оптическая схема объектива 100^x рассчитана с использованием в конструкции склеенных

компонентов. Его числовая апертура $A = 0,5$. В настоящее время ведется работа по увеличению апертуры этого объектива. Результаты расчета объективов, работающих в диапазоне 250–1000 нм в конструкциях которых использовались склеенные компоненты, приведены в табл. 3.

В отечественном приборостроении в настоящий момент не существует микрообъективов такого класса для широкой области спектра (250–1000 нм), где исправлен хроматизм увеличения в видимом диапазоне при максимально возможных увеличенных апертурах и одновременно увеличенном до 20 мм поле зрения, при уменьшенном коэффициенте засветки до значения 0,4%. По типу достигнутой коррекции представленный комплект объективов можно отнести к планахроматам. Все объективы, рассчитанные для данного комплекта, обладают новизной и запатентованы [12–15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Л.Н., Грибанова С.В., Кравец-Кравчевская М.М., Федорова О.Н. Объективы микроскопа для видимой и УФ областей спектра // Труды ГОИ. Разработка и испытание оптических систем. 1981. Т. 49. В. 183. С. 61–67.
2. Панов В.А., Андреев Л.Н. Оптика микроскопов. Л.: Машиностроение, 1976. 430 с.
3. Иванова Т.А., Кирилловский В.К. Проектирование и контроль оптики микроскопов. Л.: Машиностроение, 1984. 232 с.
4. Скворцов Г.Е., Панов В.А., Поляков Н.И., Федин Л.Ф. Микроскопы. Л.: Машиностроение, 1969. 512 с.
5. Борн М., Вольф Э. Основы оптики. М.: Наука, 1970. 856 с.
6. Гудмен Дж. Введение в Фурье-оптику. М.: Мир, 1972. 364 с.
7. Волкова М.А., Натаровский С.Н., Скobelева Н.Б. Выбор линейного увеличения адаптера телеканала микроскопа // Оптический журнал. 2005. Т. 72. № 11. С. 58–62.
8. Волосов Д.С. Фотографическая оптика. М.: Искусство, 1978. 543с.
9. Ллойд Дж. Системы тепловидения. М.: Мир, 1978. 397 с.
10. Натаровский С.Н. Методы проектирования современных оптических систем: учебное пособие. ИТМО, 2008. 176 с.
11. Волкова М.А., Литвинович А.А., Мельников К.А., Натаровский С.Н. Контроль качества изображения в микроскопе // Оптический журнал. 2009. Т. 76. № 10. С. 23–28.
12. Скobelева Н.Б., Демченко Н.П., Левандовская Л.Е., Сокольский М.Н. Патент на изобретение № 2328762. Россия // БИ № 19. 2006.
13. Скobelева Н.Б., Демченко Н.П., Левандовская Л.Е., Сокольский М.Н. Патент на изобретение № 2338228. Россия // БИ № 31. 2006.
14. Левандовская Л.Е., Сокольский М.Н., Скobelева Н.Б., Демченко Н.П. Патент на изобретение № 2338230. Россия // БИ № 31. 2006.
15. Левандовская Л.Е., Сокольский М.Н., Скobelева Н.Б., Демченко Н.П. Патент на изобретение № 2338229. Россия // БИ № 31. 2006.