

BIOLAR

**Поляризационно-
интерференционный
микроскоп**

Polskie Zakłady Opusczne, WKC Warszawa 1976

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Введение	5
Раздел I	7
1. Принцип действия поляризационно-интерференционного микроскопа с одной двупреломляющей призмой	7
2. Принцип действия поляризационно-интерференционного микроскопа с двумя двупреломляющими призмами	19
Раздел 2. Описание конструкции специальных элементов поляризационно-интерференционного микроскопа	22
Раздел 3. Приготовление микроскопа к работе	29
1. Установка освещения	31
2. Дифференциальный метод — конденсор со щелевой диафрагмой	35
3. Метод однородного поля с большим раздвоением изображения	38
4. Метод полос	39
5. Дифференциальный метод — конденсор с компенсаторами	40
6. Применение поляризационно-интерференционных объективов	41
Раздел 4. Калибровка двупреломляющих призм	42
1. Определение межполосного расстояния	42
2. Определение постоянной p'	43
3. Определение величины раздвоения изображения	44
Раздел 5. Измерение разности оптического пути	45
1. Измерение в поле полос — двупреломляющая призма № 2	45
2. Измерение в однородном цвете с большим раздвоением изображения — двупреломляющая призма № 3	50
3. Измерение в однородном дифференциальном поле — двупреломляющая призма № 1	54
Раздел 6. Измерение коэффициента преломления и толщины	55
1. Оценка величины коэффициента преломления по отношению к среде	55
2. Оценка микронеровности поверхности	57

	Стр.
3. Измерение коэффициента преломления и толщины с применением. Метода интерференционных полос и однородного цвета с большим раздвоением изображения (призмы № 2 и № 3)	58
4. Измерение коэффициента преломления по методу дифференциальной интерференции (призма № 1)	59
5. Измерение коэффициента преломления методом дифференциальной интерференции с полем интерференционных полос (призма № 2)	63
Раздел 7. Измерение двупреломления	65
1. Измерение в поле интерференционных полос (призма № 2)	65
2. Измерение в однородном поле (призма № 1 и 3)	69
Раздел 8. Измерение светопропускания	70
Раздел 9. Определение сухих веществ клеток	73
Раздел 10. Укомплектование	85
Таблицы	91
Литература	96

ВВЕДЕНИЕ

При помощи обыкновенного биологического микроскопа можно наблюдать только такие объекты, которые по отношению к окружающей их среде, поглощают свет в разной степени и, следовательно, отличаются некоторой естественной контрастностью. Такие предметы часто называются амплитудными, так как они вызывают изменение амплитуды проходящего через них света. Однако, в природе существуют такие микрообъекты и структуры, которые не проявляют никаких разниц в поглощении света и отличаются от окружающей их среды только коэффициентом преломления или толщиной.

Такие объекты обыкновенно называются фазовыми, так как они вызывают только изменение фазы проходящей световой волны. В обыкновенном микроскопе, в проходящем свете, они совершенно невидимы или почти невидимы, потому что человеческий глаз реагирует только на изменения силы света, т.е. на изменение амплитуды световой волны (как известно сила света пропорциональна квадрату амплитуды).

Чтобы можно было наблюдать фазовые объекты при помощи обыкновенного биологического микроскопа, необходимо их окрасить. Окрашивание препаратов является однако затруднительным и влечет за собой различные нежелательные явления. В частности, нельзя окрашивать живые клетки и ткани, так как окрашивание обыкновенно связано с их умерщвлением.

В связи с этим, возможность исследования совершенно прозрачных и не поглощающих света живых микроорганизмов, при помощи обыкновенного микроскопа, является в значительной степени ограниченной.

В настоящее время для наблюдения фазовых объектов применяются, почти без исключения, фазово-контрастные микроскопы. Слабой стороной этих микроскопов (кроме некоторых дефектов как то „гало“, небольшая контрастность тесно уложенных и примыкающих структур, а также плохое воспроизведение растянутых предметов со сравнительно большими поперечными размерами) является то, что в основном они служат для качественных и описательных исследований. Введение метода фазового контраста позволяет быстро оценить, является ли коэффициент преломления данного ис-

следуемого объекта большим или меньшим по отношению к коэффициенту окружающей среды, и даже делает возможным, в некоторых случаях, точное определение величины этого коэффициента (путем подбора соответственной иммерсионной жидкости).

Но на этом в сущности и оканчивается возможность количественных исследований этого метода (не считая возможности измерений линейных и планиметрических величин). Значительно больше возможностей в отношении количественных исследований представляет интерференционная микроскопия в целом, а в частности поляризационно-интерференционный микроскоп BIOLAR PI или поляризационно-интерференционное устройство UPI с биологическим микроскопом BIOLAR.

Этот микроскоп служит для наблюдения всяких микрообъектов, как фазовых (прозрачных), так и амплитудных (поглощающих свет), а также для измерения разности оптического пути (фазового сдвига), градиента разности оптического пути толщины, коэффициента преломления, двойного лучепреломления, угла касания, вида микроповерхности, концентрации веществ, содержания сухих веществ в клетках, светопропускаемости, а также и других физических величин.

Микроскоп позволяет производить качественные и количественные исследования с применением следующих интерференционных методов: метода полос, метода дифференциального и однородного поля с большим раздвоением изображения.

Поляризационно-интерференционный микроскоп находит применение прежде всего в биологических и медицинских науках (особенно в цитологии, гистологии, морфологии, биохимии, микробиологии), а также в физикохимии, кристаллографии, минералогии; в текстильной промышленности, в технике тонких слоев и пленок, а также в иных областях науки и техники.

Раздел I

1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА С ОДНОЙ ДВУПРЕЛОМЛЯЮЩЕЙ ПРИЗМОЙ

Схема оптической системы и общий принцип действия поляризационно-интерференционного микроскопа представлены на рис. 1. Основной частью, отличающей этот микроскоп от обыкновенного биологического микроскопа, является поляризационно-интерференционная система, состоящая из двупреломляющей призмы W_1 , поляризатора P , анализатора A и щелевой диафрагмы D или соответствующего кварцевого компенсатора. Двупреломляющая призма W_1 является призмой специального вида типа Волластона. Она помещена за объективом O_b и может перемещаться как в параллельном так и в перпендикулярном направлениях по отношению к оси тубуса микроскопа. Действие этой призмы заключается в раздвоении падающего на неё светового пучка на два пучка: обыкновенный и необыкновенный, а также в создании соответственного фазового сдвига между этими пучками. Угловое раздвоение ε лучей тем больше, чем больше преломляющий угол φ двупреломляющей призмы.

Задачей поляризатора P и анализатора A является линейная поляризация света. Это обыкновенные поляризационные фильтры (поляроиды). Их можно поворачивать вокруг оси, параллельной направлению прохождения света в микроскопе. Поляризатор P находится в освещающей части микроскопа под конденсором, а анализатор A между двупреломляющей призмой и окуляром.

Система, состоящая из поляризатора P и анализатора A , а также помещенной между ними двупреломляющей призмой W_1 , создает в проходящем свете систему прямолинейных интерференционных полос, причем интенсивность этих полос будет максимальной, если плоскости поляризации поляризатора P и анализатора A установлены по отношению к себе перпендикулярно или параллельно и составляют угол 45° с преломляющей гранью двупреломляющей призмы W_1 (грань, находящаяся при угле φ , перпендикулярная к плоскости рис. 1).

Эти полосы находятся внутри призмы W_1 или на некотором расстоянии ниже её, т.е. там, где находятся точки C разветвлений све-

товых лучей. Расстояние h между полосами постоянное вдоль всей длины призмы и выражено формулой.

$$h = \frac{\lambda}{\varepsilon} \quad (1)$$

где λ — длина световой волны.

Щелевая диафрагма D находится в фокусе конденсора K , причем щель S установлена параллельно преломляющей грани двупреломляющей призмы W_1 . Щель S вместе с конденсором K составляет коллиматор, из которого выходят параллельные пучки когерентного света, поддающегося интерференции в плоскости изображения микроскопа.

Интерференционные полосы в этой плоскости появляются только при соответственно суженной щели S , тогда как интерференционные полосы в выходном зрачке объектива O_b , оговоренные выше, появляются при любой ширине щели.

Пусть исследуемый фазовый объект B (рис. 1) имеет форму, например, узкой полоски с толщиной t . Этот объект изотропный, совершенно прозрачный, а его коэффициент преломления n отличается от коэффициента преломления n_1 окружающей среды (пусть например $n > n_1$). Тогда плоская световая волна Σ_p , выходящая из конденсора K , предварительно линейно споларизованная поляризатором P , подвергается, в пространстве занимаемом объектом B , запаздыванию по фазе, принимая форму волны Σ . Эта волна попадает в объектив O_b и затем раздваивается двупреломляющей призмой W_1 на волны: обыкновенную и необыкновенную, взаимно споларизованные в перпендикулярных плоскостях. Из этих волн анализатор A пропускает только те составляющие, которые являются параллельными его собственному направлению световых колебаний.

Следовательно, после прохода световых лучей через анализатор A получаем две волны: обыкновенную Σ'_o и необыкновенную Σ'_e , линейно споларизованные в параллельных по отношению к себе плоскостях. Эти волны могут взаимно интерферировать и в результате их суперпозиции в плоскости изображения микроскопа появляется, в общем, интерференциальное изображение в виде прямолинейных интерференционных полос, искаженных в противоположных направлениях в месте появления обыкновенного B'_o и необыкновенного B'_e изображений объекта B (рис. 2).

Интерференционное изображение, появляющееся в плоскости изображения микроскопа, можно интерпретировать как суперпозицию плоской волны Σ_p и волны Σ' , которая в пространстве одного изображения исследуемого объекта является опережающей по фазе, а в пространстве второго изображения — запаздывающей по фазе. Можно это себе представить таким образом, как будто мы посред-

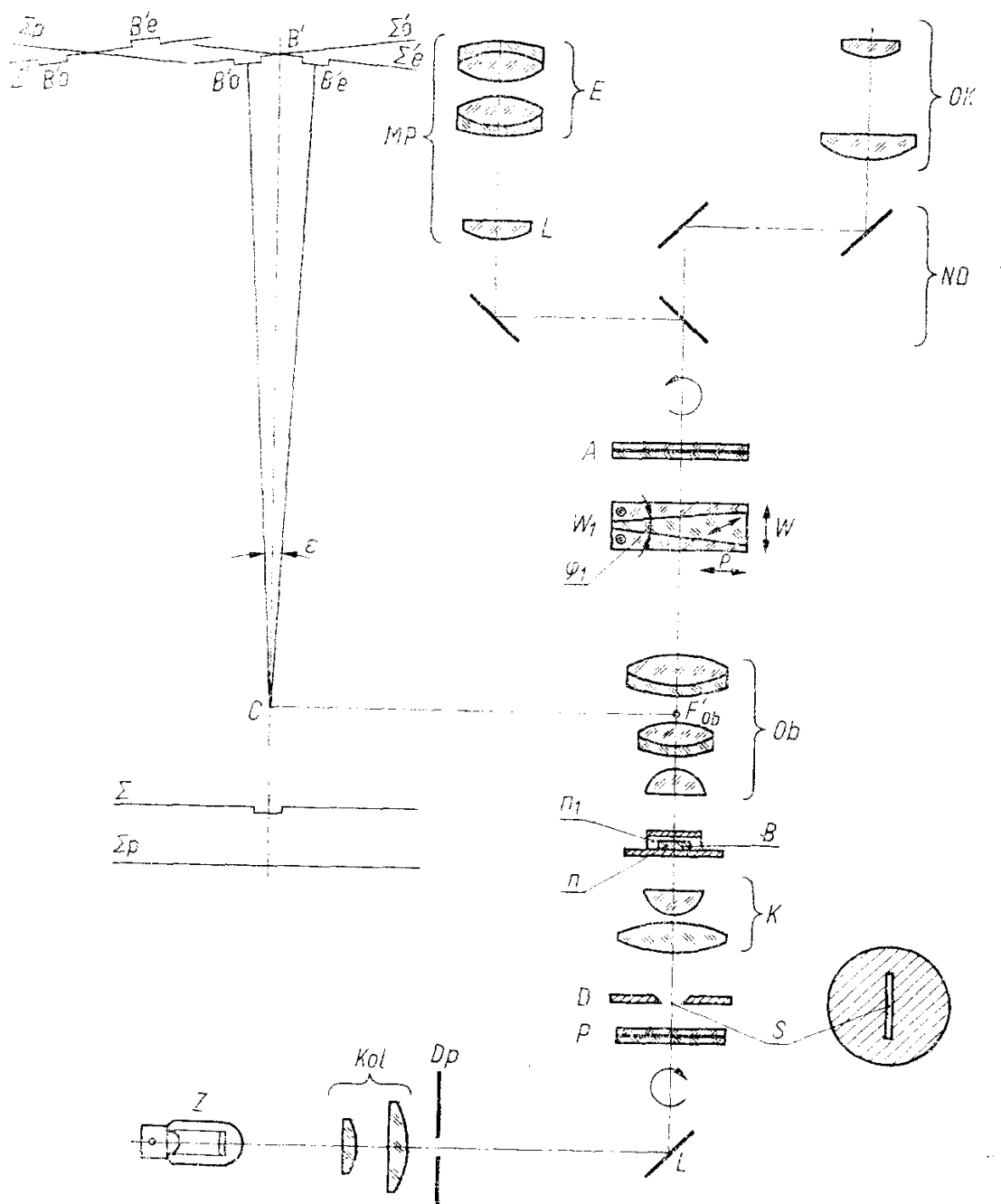


Рис. 1. Схема оптической системы поляризационно-интерференционного микроскопа с одной двупреломляющей призмой
 Z — источник света, Kol — коллектор, Dp — диафрагма поля, P — поляризатор, D — щелевая диафрагма, S — щель, K — конденсор, B — препарат, Ob — объектив, W_1 — двупреломляющая призма, A — анализатор, ND — бинокулярная насадка, Ok — окуляр, MP — вспомогательный микроскоп, E — окуляр, L — объектив (пояснение остальных обозначений находится в тексте).

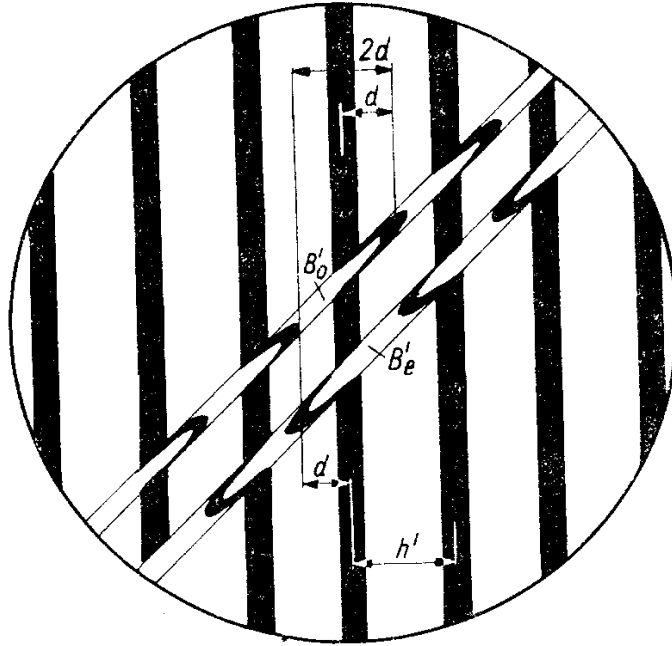


Рис. 2. Изображение узкой полосы в интерференционном поле полос B'_o — обыкновенное изображение, B'_e — необыкновенное изображение, h' — межполосное расстояние, d — отклонение интерференционных полос

ством обыкновенного интерферометра наблюдаем два предмета с оптической толщиной, соответственно, $t(n_1 - n)$ и $-t(n_1 - n)$, раздвинутые по отношению к себе на расстояние

$$r = \frac{l \cdot \varepsilon}{G} \quad (2)$$

где l является расстоянием между точкой расхождения световых лучей и плоскостью изображения микроскопа ($l = CB'$), ε — угол расхождения, выраженный в радианах, G — увеличение объектива микроскопа. Получаемое таким образом интерференционное изображение аналогично общеизвестным интерференционным фигурам равной толщины, появляющимся на воздушном клине, с той только разницей, что в этом случае получаем два раздвинутых изображения одного и того же объекта, причем отклонение интерференционных полос в этих изображениях выступает в противоположных направлениях.

Во многих случаях исследований такая ситуация очень выгодна, потому что, измеряя двойное отклонение полос $2d$ (рис. 2), получаем большую точность измерения разности оптического пути. При применении монохроматического света получается интерференционное изображение в виде перемещающихся темных и светлых полос.

При скрещенных поляризаторе P и анализаторе A , темные полосы появляются в тех местах, где разность оптического пути меж-

ду интерференционными волнами Σ'_o и Σ'_e равна нулю или равна полной кратности длины волны λ примененного света; при параллельных же поляризаторе и анализаторе темные полосы пробегают в тех местах, где разность оптического пути между этими волнами равна нечетной кратности $\frac{\lambda}{2}$. В случае применения белого света, интерференционные полосы окрашены, за исключением нулевой полосы при скрещенных поляризаторе и анализаторе, причем по мере возрастания порядка интерференции они становятся все менее интенсивными и в конце концов исчезают (рис. 45).

Представленный выше метод, который в дальнейшем будет называться **методом интерференционных полос**, особенно годится к исследованиям об особенных объектах, а также небольших отдельных объектов, которых изображения могут быть раздвоены по крайней мере в 50%.

При этом, удлиненные предметы как-то: волокна, тонкие пояски или грани советуется устанавливать более или менее под углом в 45° к направлению интерференционных полос (рис. 2).

Измеряя расстояние между полосами h' и смещение полос d , а также зная коэффициент преломления n_1 окружающей среды, можно определить коэффициент преломления n , исследуемого объекта, если известна его толщина t , или же толщина t , если известен коэффициент преломления n . Применяя две иммерсионные жидкости с известными коэффициентами преломления n_1 и n_2 можно одновременно определить t и n . Это положение более точно оговорено в дальнейшем в разделе 6.

Интерференционное изображение полос в плоскости изображения микроскопа получается только тогда, когда плоскость локализации интерференционных полос двупреломляющей призмы W_1 не совпадает с фокусом F'_{ob} объектива O_b микроскопа. Если двупреломляющую призму будем приближать к объективу O_b , то интерференционные полосы все более и более расширяются в плоскости изображения микроскопа, переходя в широкие полосы, и наконец, получается однородное поле. Такие условия появляются тогда, когда точка раздела световых лучей точно совпадает с фокусом F'_{ob} объектива. В таком случае, фронтальные поверхности волны Σ'_o и Σ'_e не пересекаются и не наклонны по отношению к себе, как это имеет место в случае прежде описанного метода интерференционных полос, но являются взаимно параллельными (рис. 3). Разность оптического

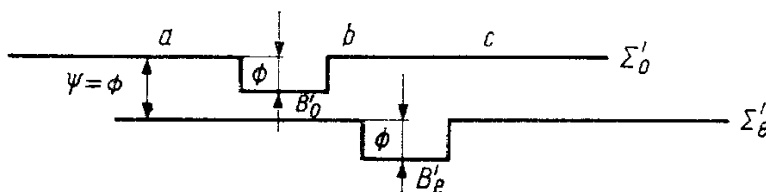


Рис. 3

пути ψ за пределами пространства, где появляются раздвоенные изображения B'_o и B'_e объекта B , не изменяется теперь непрерывно, но является постоянной величиной. В результате, фон поля зрения микроскопа представлен в виде однородного цвета, а наблюдаемый объект в виде изменения этого цвета в месте появления раздвоенных изображений B'_o и B'_e или изменения яркости при условии применения монохроматического света. Яркость поля зрения зависит при этом от разности оптического пути ψ между волнами Σ'_o и Σ'_e . При скрещенных поляризаторе и анализаторе, фон поля зрения будет максимально темным, если разница оптического пути ψ равна нулю или полной кратности длины волны λ примененного света. Наоборот, для разности оптического пути ψ равной нечетной кратности $\lambda/2$ поле зрения будет максимально светлым. Для промежуточных значений яркость поля будет соответственно изменяться. При параллельно установленным поляризаторе и анализаторе ситуация меняется: минимальное затемнение поля зрения получаем для $\psi = m\lambda$ ($m=0; 1; 2\dots$), а максимальное для $\psi = m\frac{\lambda}{2}$ ($m=1; 3; 5$).

При применении белого света, вместе с изменением разности оптического пути ψ , имеем дело в общем, не с изменениями яркости, но с изменением цвета. Интерференционные цвета для разных оптических путей ψ , как при скрещивающихся так и при параллельно установленных поляризаторе и анализаторе, приведены в таблице 1. Итак, например, для $\psi=0$, в случае скрещенных поляризатора и анализатора, получаем темный цвет, который затем, по мере возрастания ψ , переходит в серый цвет, белый цвет и в различные оттенки желтого и красного цветов. Для $\psi=565$ нм появляется т.н. чувствительный цвет первого интерференционного порядка. Это пурпурный цвет, характеризующийся тем, что быстро переходит в красный или фиолетовый цвет, если разность оптического пути ψ подвергнется незначительному изменению. Таким образом, получаем большой скачок цвета, при незначительном изменении разности оптического пути. В случае параллельной установки поляризатора и анализатора, чувствительный цвет первого порядка появляется для $\psi=230$ нм.

Значение разности оптического пути ψ , между интерферирующими волнами Σ'_o и Σ'_e зависит от того, в каком месте двупреломляющей призмы W_1 (рис. 1) проходит свет. Передвигая эту призму в направлении перпендикулярном к оси микроскопа (это направление на рис. 1 обозначено стрелкой p), можно главным образом изменять разность оптического пути ψ и тем самым, яркость или цвет фона поля зрения микроскопа и изображений наблюдаемых объектов.

Это дает возможность соответственного подбора условий наблюдения в цветовом интерференционном контрасте, а также делает воз-

возможным выполнение измерения разности оптического пути Φ , вызванной исследуемым объектом.

Чтобы это выяснилось более точно допустим, что наблюдение производится с белым светом и при установке двупреломляющей призмы на чувствительный цвет первого порядка (скрещенные поляризатор и анализатор). В таком случае фон поля зрения микроскопа (зона a , b , c на рис. 3) будет пурпурным. Зато, в тех местах поля зрения, где появляется обыкновенное B'_o и необыкновенное B'_e изображение рассматриваемого объекта B , цвет будет иной, потому что в B'_o разность оптического пути ψ между интерферирующими волнами Σ'_o и Σ'_e является меньшей, а в B'_e — большей на величину разности оптического пути Φ , вызванной исследуемым объектом B . Следовательно, при изображении B'_o разность оптического пути

$$\psi = (560 - \Phi) \text{ нм},$$

а при изображении B'_e

$$\psi = (560 + \Phi) \text{ нм}.$$

Пусть, например $\Phi = 100$ нм, тогда в B'_o разность оптического пути $\psi = 460$ нм, а в B'_e $\psi = 660$ нм. Как видно из таблицы интерференционных цветов изображение B'_o будет окрашено в оранжевый цвет, а изображение B'_e в голубой. Для $\psi = 0$ (при скрещенных поляроидах), т.е. при установке двупреломляющей призмы на темный цвет, оба изображения будут окрашены одинаково в лавандо-серый цвет. При установке двупреломляющей призмы на другой цвет фона поля зрения, раздвоенные изображения принимают конечно иной цвет. Следовательно, устанавливая двупреломляющую призму на разные цвета фона поля зрения и оценивая изменение цвета в раздвоенных изображениях исследуемого объекта можно затем определить разность оптического пути Φ этого объекта по отношению к окружающей среде.

Вышеописанный метод, хотя во многих случаях совершенно достаточный и может давать хорошие результаты, является однако в большой степени субъективным. Поэтому в поляризационно-интерференционном микроскопе применен более объективный метод измерения разности оптического пути, который в то же время прост в употреблении и гарантирует большую точность измерений. Он состоит в том, чтобы довести окраску обыкновенного изображения, или необыкновенного изображения, до исходной (эталонной) окраски фона поля зрения и одновременно измерять поперечное передвижение двупреломляющей призмы. Для этого лучше всего употреблять темный цвет нулевого порядка интерференции (при скрещенных поляризаторе и анализаторе). Более наглядно поясняет это рис. 4. величиной, которую мы желаем измерить, является разность оптического пути Φ вызванная наблюдаемым объектом. Допустим, что

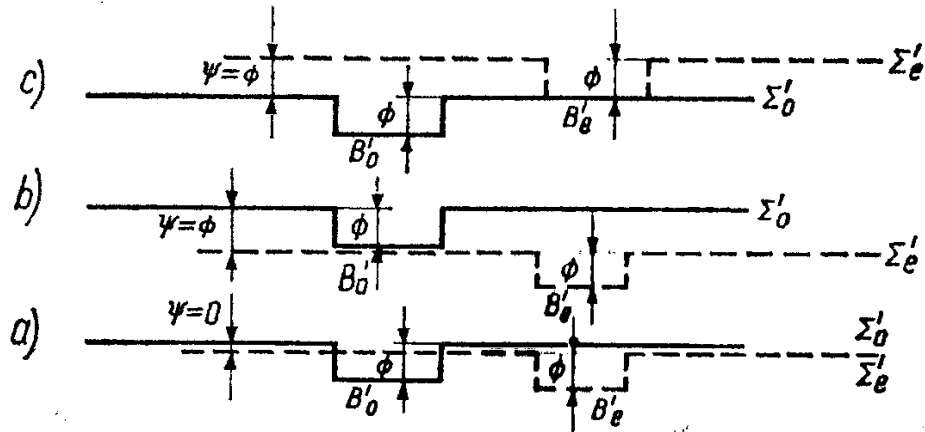


Рис. 4

двупреломляющая призма сначала установлена на темный фон поля зрения (рис. 4а). Пусть этой установке отвечает p_0 двупреломляющей призмы (это как бы нулевое положение). При перемещении двупреломляющей призмы в поперечном направлении по отношению к этому положению, в одном или другом направлении, поверхности волн раздвигаются, причем либо обыкновенная волна Σ'_o опережает по фазе необыкновенную волну Σ'_e , либо необыкновенная волна Σ'_e опережает по фазе обыкновенную волну Σ'_o . Когда разность оптического пути ψ между волнами Σ'_o и Σ'_e за пределами B'_o и B'_e делается равной разности оптического пути Φ , вызванной рассматриваемым объектом, то либо обыкновенно изображение B'_o (рис. 4б) либо необыкновенно изображение B'_e (рис. 4с) принимают темный цвет, т.е. такой цвет, какой прежде (рис. 4а) имел фон поля зрения. Пусть установке на максимальное затемнение одного или второго изображения отвечает положению p_1 двупреломляющей призмы. Тогда, разность оптического пути Φ будет равна:

$$\Phi = (p_1 - p_0) \psi_p \quad (3)$$

где ψ_p является разностью оптического пути между волной Σ'_o и Σ'_e , отвечающей единичному поперечному передвижению двупреломляющей призмы.

Можно легко убедиться в том, что

$$\psi_p = \frac{\lambda}{h} \quad (4)$$

Производя отсчет положения p_1 и p_2 призмы, при которых одно, а затем второе изображение исследуемого объекта принимают максимально темный цвет, определяем двойное значение Φ :

$$2\Phi = (p_2 - p_1) \psi_p \quad (5)$$

что увеличивает точность измерения.

В случае исследования объектов с изменяющейся толщиной или с изменяющимся коэффициентом преломления, разность оптического пути ψ в зонах раздвоенных изображений не является постоянной, а изменяется (рис. 5).

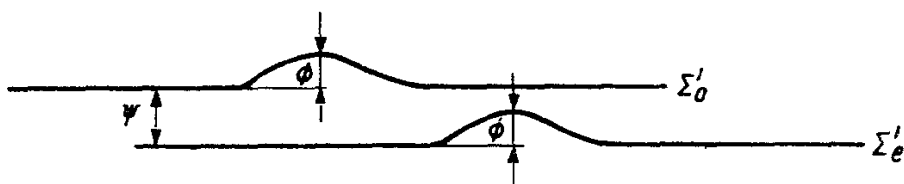


Рис. 5

В связи с этим будем соответственно изменяться также цвет или яркость отдельных мест изображения. По изменению цвета можно судить о изменении разности оптического пути в предмете, или наоборот, затемняя отдельные части изображения можно определить разность оптического пути в каждой точке исследуемого объекта.

До сих пор рассматривался только случай полного раздвоения обоих (обыкновенного и необыкновенного) изображений исследуемого объекта. Ситуация несколько меняется, когда изображения не разделены полностью и частично находят на себя. Разница заключается в том, что в зоне совпадения изображений отсутствует изменение цвета (или яркости фона поля зрения), если исследуемый предмет изотропный и оптически однородный. Поясняет это рис. 6.

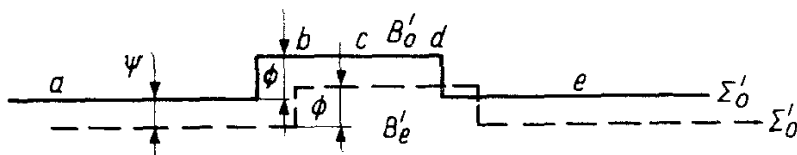


Рис. 6

Окраска фона поля зрения (зона a , e) и зоны c , где изображения B'_0 и B'_e находят на себя, такая же самая, потому что разность оптического пути ψ в этих пространствах одинакова.

Цвет изменяется только в пространствах b и d , где изображения раздвоены. Условия в этих пространствах такие же самые как в случае полного раздвоения и только здесь можно производить измерение разности оптического пути ψ , вызванной исследуемым объектом.

Представленный выше метод, который в дальнейшем будет называться **методом однородного цвета с большим раздвоением изображения**, особенно хорошо годится для исследования отдельных объектов (клеток, бактерий небольших микроорганизмов), тонких однородных слоев и пленок, мелких кристаллов и пр.

Особо интересный вариант метода однородного цвета в поляризационно-интерференционном микроскопе представляет собой т.н. **дифференциальный метод**, при котором поперечное раздвоение интерферирующих волн очень невелико, порядка разрешающей способности объектива микроскопа.

Этот метод может быть пояснен самым лучшим образом на примере сравнительно просторного объекта, отличающегося мягким уменьшением разности оптического пути, например, капли жидкости, помещенной на предметном стекле микроскопа (рис. 7а). Если коэф-

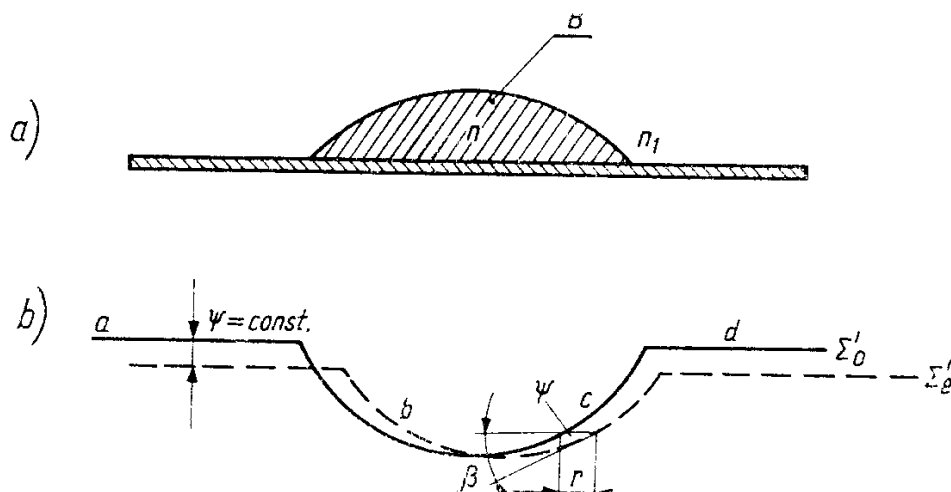


Рис. 7

фициент преломления n этого объекта больше коэффициента преломления n_1 окружающей среды, то фронтальные поверхности интерферирующих волн Σ'_o и Σ'_e принимают форму, представленную на рис. 7b. Как видно, разность оптического пути между волнами Σ'_o и Σ'_e является постоянной только за пределами изображения рассматриваемого объекта в пространстве a и d , где цвет однороден. В пространстве изображения разность оптического пути не является постоянной и изменяется непрерывным образом. Следовательно и окраска изображения непрерывно изменится. При симметричном изменении оптического пути в рассматриваемом объекте, отдельные цвета в его изображении изменяются симметрично по отношению к цвету фона, причем центральная часть изображения имеет такой же цвет как фон поля зрения.

Основной особенностью, отличающей этот метод от прежде описанных методов, является то, что разность оптического пути ψ в интерференционном изображении не выражает непосредственно разности оптического пути Φ в объекте, но только лишь падение этой разности в направлении раздвоения изображений. Для более точного представления необходимо применение математических формул.

С этой целью, в пространстве предмета B (рис. 8а) принимает систему перпендикулярных координат x, y , причем ось x направлена по направлению к раздвоению изображения (т.е. перпендикулярно к преломляющей грани двупреломляющей призмы W_1), ось y проходит через вершину H предмета B . Примем теперь во внимание произвольное место x_1 объекта B .

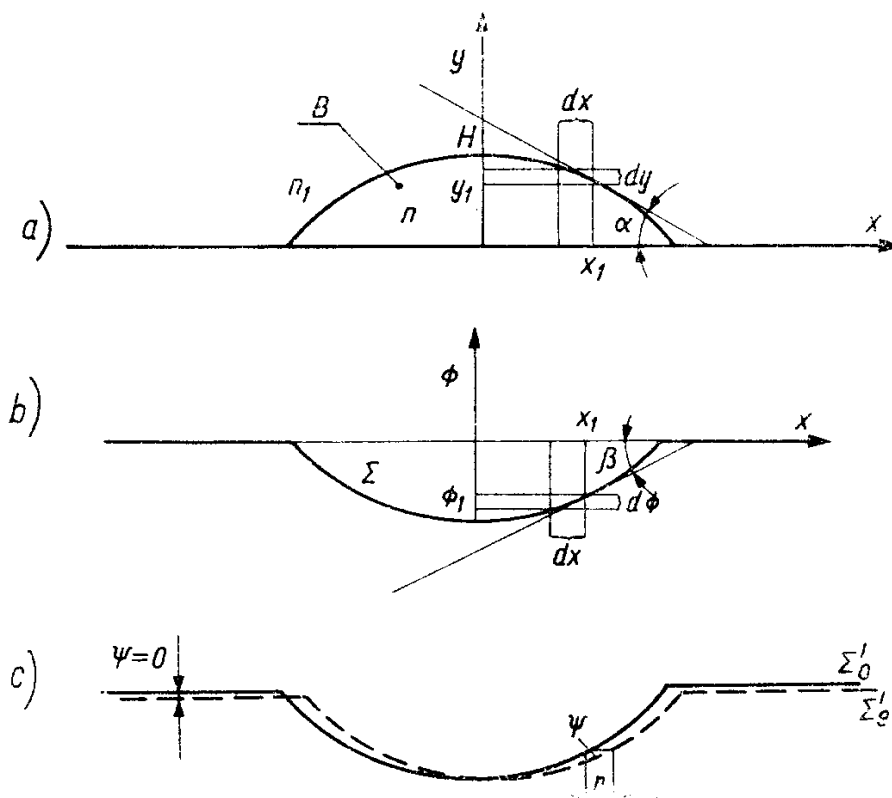


Рис. 8

Изменение оптического пути $d\Phi$ в объекте B при изменении координат x на dx составляет:

$$d\Phi = (n_1 - n)dy \quad (6)$$

Как видно из рис. 8а:

$$\frac{dy}{dx} = \operatorname{tg} \alpha \quad (7)$$

где α является углом между касательной в точке (x_1, y_1) и осью x .

Следовательно:

$$d\Phi = (n_1 - n) \operatorname{tg} \alpha \cdot dx \quad (8)$$

или

$$\frac{d\Phi}{dx} = (n_1 - n) \operatorname{tg} \alpha \quad (9)$$

С другой стороны

$$\frac{d\Phi}{dx} = \operatorname{tg} \beta \quad (10)$$

где β является углом между касательной к волновой поверхности в месте x_1 (после прохода света через объект (B) и осью x (рис. 8b).

Разность оптического пути ψ между раздвоенными волнами Σ'_o и Σ'_e в изображении рассматриваемого места предмета, как это видно на рис. 8с, равна:

$$\psi = r \cdot \operatorname{tg} \beta \quad (11)$$

где r является поперечным раздвижением интерферирующих волн Σ'_o и Σ'_e .

Соединяя формулы (10) и (11) получаем следующую зависимость:

$$\frac{d\Phi}{dx} = \frac{\psi}{r} \quad (12)$$

Как видно из вышеизложенного, разность оптического пути ψ в дифференциальном интерференционном изображении равна произведению градиента разности оптического пути $d\Phi/dx$ и раздвоения r . Приравнивая выражения (9), (10) и (11) получаем формулу, из которой может быть определен угол касания α :

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\psi}{r(n_1 - n)} \quad (13)$$

Следовательно, измеряя разность оптического пути ψ в произвольном пункте изображения, можно определить угол касания α в соответствующем пункте объекта, если известна разность коэффициентов преломления $n_1 - n$. Производя измерения разности оптического пути ψ в нескольких точках, можно определить профиль объекта вдоль произвольного сечения. Зная профиль объекта или угол α в каком-нибудь месте этого объекта, является возможным определить разность коэффициента преломления $n_1 - n$ или один из этих коэффициентов, если второй известен. Производя измерения в двух разных иммерсионных средах с известными коэффициентами преломления n_1 , n_2 можно одновременно определить угол α и коэффициент преломления n . В таком случае, мы имеем в своем распоряжении два уравнения типа формулы (13), из которых определяется коэффициент преломления n и $\operatorname{tg} \alpha$. Если одна поверхность рассматриваемого объекта будет плоской, а другая сферической, то кроме этого, можно определить радиус кривизны R этой поверхности, если

измерим угол α и расстояние x между вершиной сферы и точкой, в которой выполнено измерение разности оптического пути ψ :

$$R = x \frac{\sqrt{1 + \operatorname{tg}^2 \alpha}}{\operatorname{tg} \alpha} \quad (14)$$

В случае, если объект является шариком с известным радиусом кривизны R , то один из коэффициентов преломления n и n_1 может быть из формулы (13) и (14) определен, при условии, что известен второй.

Разность оптического пути ψ в изображении исследуемого объекта можно оценить на основании изменения цвета или точно измерить посредством прежде описанного метода затемнения данного места изображения, измеряя величину производимого при этом поперечного перемещения двупреломляющей призмы. Способ проведения измерения более обширно представлен в разделе 5.

Как видно из вышеизложенного, дифференциальный метод предоставляет значительно больше возможностей измерений, чем метод однородного цвета с большим раздвоением изображения. Но не только в этом заключается превосходство этого метода. Кроме многочисленных возможностей выполнения количественных измерений он предоставляет также чрезвычайно интересные возможности качественных исследований. Связано это с тем, что дифференциальное интерференционное изображение отличается большой пластичностью (пространственностью) и верностью воспроизведения, лишено вредных окаймлений („галло“) и иных нежелательных эффектов типичных для фазового контраста, и дает значительно больше информации о форме, структуре и виде разных объектов (как фазовых, так и амплитудных), чем фазовый контраст.

2. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА С ДВУМЯ ДВУПРЕЛОМЛЯЮЩИМИ ПРИЗМАМИ

(применение поляризационно-интерференционных объективов)

Сфера применения поляризационно-интерференционного микроскопа с одной двупреломляющей призмой в случае использования метода однородного цвета с большим раздвоением изображения (призма № 3) ограничивается исследованиями объектов, имеющих сравнительно небольшие поперечные размеры небольших биологических клеток и тонких волокон или таких удлиненных препаратов, которые отличаются крутыми краями и однородны в отношении разности оптического пути.

Значительно большее раздвоение изображения в интерференционном однородном поле получается при замене обыкновенных объективов, входящих в комплект микроскопа, объективами с большим

раздвоением изображения (поляризационно-интерференционные объективы).

Введение объективов с большим раздвоением изображения в систему микроскопа создает поляризационно-интерференционный микроскоп, которого схема представлена на рис. 9.

Призма W_1 (в интерференционной головке) и W_2 (в объективе) вместе со скрещенными или установленными параллельно поляроидами P и A и щелью S , помещенной в фокусе конденсатора K и установленной параллельно преломляющей грани призмы W_1 , представляют собой как бы двойной поляризационный интерферометр. Призма W_2 со сравнительно большим преломляющим углом находится непосредственно за последней линзой объектива Ob и может вращаться вокруг его оси, причем плоскость H_2 в которой помещаются интерференционные полосы этой призмы, совпадает с фокусом F' , объектива Ob . В то же время двупреломляющая призма W_1 имеющая значительно меньший преломляющий угол φ_1 находится в интерференционной головке.

Вращательное движение призмы W_2 служит изменению величины раздвоения изображения, а именно, если эта призма установлена так, что её преломляющий угол φ_2 направлен также как преломляющий угол φ_1 призмы W_1 , то получается максимальное раздвоение τ изображения, являющееся суммой раздвоений τ_1 и τ_2 , даваемых каждой призмой в отдельности.

Напротив, если призма W_2 установлена так, что её преломляющий угол φ_2 направлен в противоположном направлении по отношению к преломляющему углу φ_1 призмы W_1 , то получаем результирующее раздвоение τ изображения равное разности раздвоений τ_2 и τ_1 .

В промежуточном положении, когда преломляющая грань призмы W_2 находится под углом 45° по отношению к преломляющей грани призмы W_1 , получаем результирующее раздвоение τ равное раздвоению τ_1 , которое дает только призма W_1 . Система в таком случае сводится к системе, представленной на рис. 1.

Таким образом, поворачивая призму W_2 вокруг оси объектива Ob получаем три разные величины раздвоений изображения: $\tau_2 + \tau_1$; τ ; $\tau_2 - \tau_1$.

Следовательно, в зависимости от ширины исследуемого предмета, можно быстро подбирать соответствующее раздвоение изображения без необходимости замены объектива или двупреломляющей призмы, как это имеет место при поляризационно-интерференционном микроскопе с одной только двупреломляющей призмой. Получаемые при этом максимальные значения раздвоений при объективах с разными увеличениями могут быть в несколько раз больше, что создает возможность проведения измерений разности оптического пути на растянутых объектах, широких биологических клетках и даже на биологических срезах.

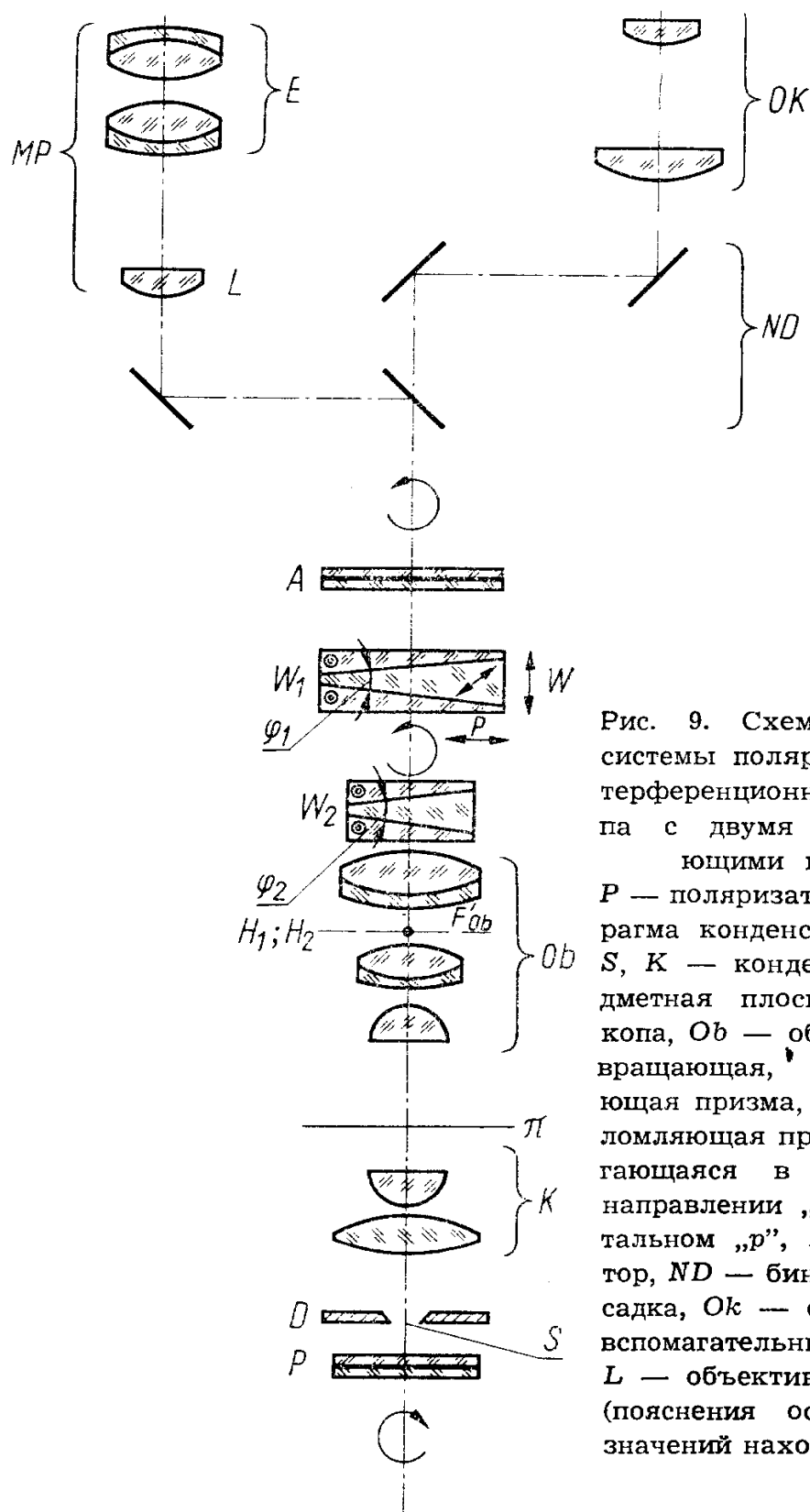


Рис. 9. Схема оптической системы поляризационно-интерференционного микроскопа с двумя двупреломляющими призмами
 P — поляризатор, D — диафрагма конденсора со щелью S , K — конденсор, Π — предметная плоскость микроскопа, Ob — объектив, W_2 — вращающаяся, двупреломляющая призма, W_1 — двупреломляющая призма, передвигающаяся в вертикальном направлении „ w ” и горизонтальном „ p ”, A — анализатор, ND — бинокулярная насадка, Ok — окуляр, MP — вспомогательный микроскоп, L — объектив, E — окуляр (пояснения остальных обозначений находятся в тексте)

В случае применения призмы с интерференционными полосами № 2 (W_1) и при противоположной установке призмы W_2 по отношению к ней (φ_1 направлен в противоположном направлении по отношению к φ_2), получаем поле с интерференционными полосами с дифференциальным раздвоением изображения. Эта возможность недопустима при системе с одной двупреломляющей призмой. Передвигая призму с интерференционными полосами № 2 в вертикальном направлении можно получить незначительные разницы раздвоений изображения, вызываемых одной и другой призмой, и тем самым, в зависимости от ширины исследуемого объекта и существующего в нем градиента разности оптического пути, можно подбирать оптимальные условия наблюдения и измерений.

Метод дифференциальной интерференции с полосатым полем особенно пригоден при измерении двойного лучепреломления волокна и двупреломляющих плёнок, в особенности плёнок, которые характеризуются мелкими местными неоднородностями.

Поворачивая призму W_2 на 180° так, чтобы направление её преломляющего угла φ_2 совпадало с направлением преломляющего угла призмы с интерференционными полосами № 2, получаем большое раздвоение изображения, позволяющее измерять разность оптического пути, как изотропных так и анизотропных объектов, а также определение их толщины, коэффициентов преломления и иных физических величин.

Имея в своем распоряжении комплект объективов с двупреломляющими призмами W_2 можно проводить микроскопические исследования, используя четыре интерференционных метода, а именно:

- метод однородного интерференционного цвета с большим (изменяющимся) раздвоением изображения (призмы № 3 и 1),
- метод дифференциальной интерференции в однородном интерференционном поле (призма № 1),
- метод интерференционных полос с большим (изменяющимся) раздвоением изображения (призма № 2).
- метод дифференциальной интерференции в полосатом поле (призма № 2).

Р а з д е л 2

ОПИСАНИЕ КОНСТРУКЦИИ СПЕЦИАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА

Характерными элементами микроскопа BIOLAR PI являются:

- а) интерференционная головка,
- б) конденсор со щелевой диафрагмой,

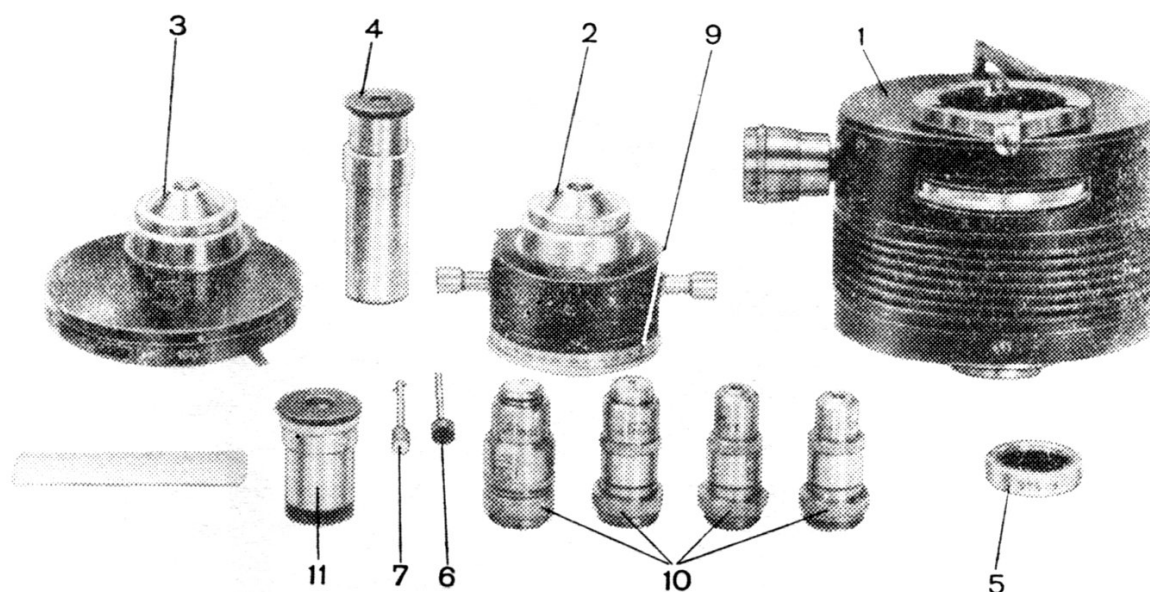


Рис. 10. Основные узлы поляризационно-интерференционного устройства

1 — интерференционная головка, 2 — конденсор со щелью, 3 — конденсор с компенсаторами, 4 — вспомогательный микроскоп, 5 — интерференционный светофильтр, 6 — ключик для регулирования компенсаторов, 7 — ключик для зажима конденсора с компенсаторами в держателе конденсора микроскопа, 9 — поляризатор в оправе, 10 — поляризационно-интерференционные объективы, 11 — измерительный окуляр 12×

- в) конденсор с компенсаторами,
- г) поляризатор в корпусе,
- д) вспомогательный микроскоп,
- е) интерференционные фильтры: $\lambda=546$ нм; $\lambda=590$ нм,
- ж) поляризационно-интерференционные объективы,
- з) измерительный окуляр 12х с окулярной микрометрической плиткой 10/100.

Интерференционная головка (рис. 11) закладывается между головкой микроскопа и бинокулярной насадкой (или монокулярной). В нижней части головки находится элемент с конусной поверхностью, который служит для её крепления в гнезде микроскопа. В верхней части помещается гнездо окулярной насадки с зажимным винтом.

В интерференционной головке находится три двупреломляющие призмы и анализатор.

Двупреломляющие призмы помещены на револьверном диске, который можно переключать поворотом рычага 13. На верхней плитке помещены цифры, являющиеся последовательными номерами двупреломляющих призм (1, 2, 3) и указатель „0”, отвечающий свободному пролету (призма выключена из хода лучей).

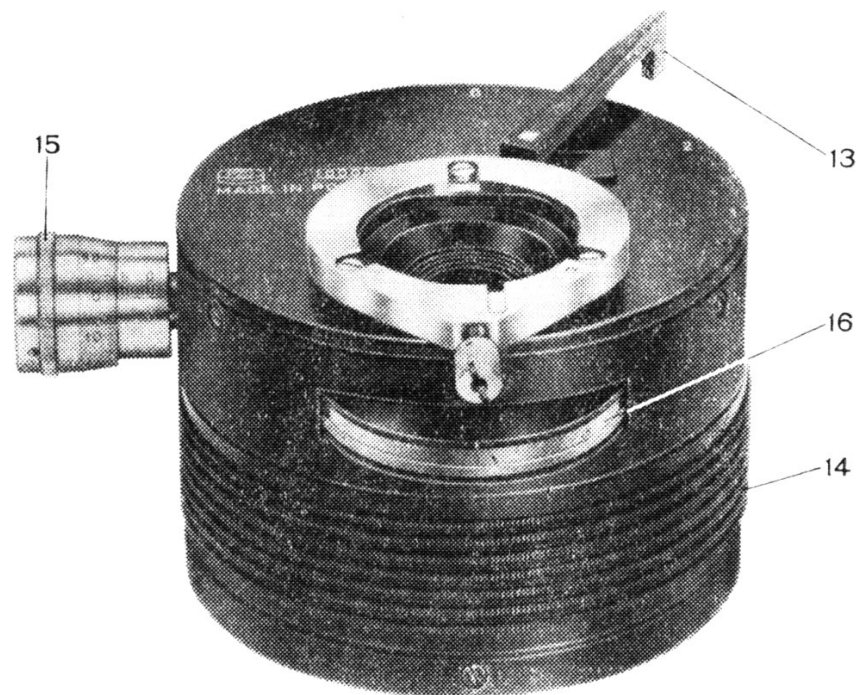


Рис. 11. Интерференционная головка

13 — рычаг переключения призм, 14 — накатанное кольцо для передвижения призм в направлении параллельном к оптической оси, 15 — вороток микрометрического винта для передвижения призм в направлении вертикальном к оптической оси, 16 — анализатор в оправе

Каждый из трёх вышеописанных интерференционных методов осуществляется при помощи отдельной призмы.

Призма № 1 служит для исследований в однородном интерференционном цвете по методу интерференции дифференциальной, призма № 2, — для исследований по методу интерференционных полос, а призма № 3 — для исследований по методу однородного интерференционного цвета с большим раздвоением изображения. Кроме возможности последовательного включения (рис. 11) в оптическую систему микроскопа, призмы могут передвигаться в двух направлениях: в направлении параллельном оптической оси микроскопа и в направлении перпендикулярном к ней.

Перемещение в параллельном направлении осуществляется поворотом накатанного кольца 14, которое находится на окружности головки; перемещение в перпендикулярном направлении — поворотом рукоятки микроскопа 15, помещенного с боку головки. На барабане микрометрического винта находится шкала с элементарным делением 0,01 мм, которая служит для измерения поперечного перемещения призмы.

Перемещение в направлении параллельном оптической оси (вертикальное) служит для получения однородного интерференционного поля (призма № 1 и 3) и изменения ширины интерференционных полос в поле зрения (призма № 2); перемещение в перпендикулярном направлении используется для изменения фаз между интерферирующими световыми волнами (обыкновенной и необыкновенной), а также для измерений разности оптического пути в исследуемом объекте.

Измерительный диапазон для дифференциальной призмы (№ 1) является односторонним, для остальных призм — двусторонним. Это обозначает, что дифференциальная призма (№ 1) от нулевого положения (наводка на темный фон поля зрения микроскопа) может перемещаться в значительной степени только в одном направлении в то время, как призма однородного цвета (№ 3), равно как и призма полос (№ 2), могут перемещаться в обоих направлениях (влево и вправо от нулевого положения).

Анализатор заключен в оправу 16, находящуюся в верхней части интерференционной головки. Оправа анализатора может поворачиваться на угол 360° , анализатор на угол 90° . На половине окружности оправы нанесена ступенчатая шкала: каждые 5° от $0-90^\circ$. По противоположной стороне шкалы находится точка, означающая выключение анализатора из хода лучей.

Для отсчета положения анализатора служит прорезь, выполненная на верхней плитке, защищающей анализатор.

Конденсор со щелевой диафрагмой (рис. 12). Это конденсор Аббе, который нормально применяется в микроскопах.

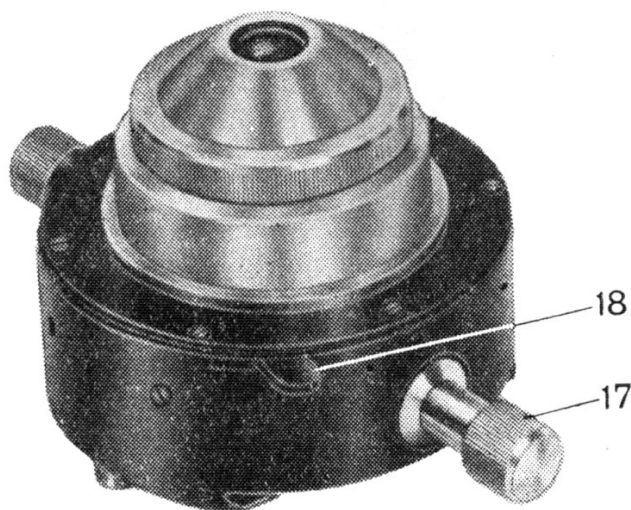


Рис. 12. Конденсор со щелью
17 — воротки для регулирования ширины щели, 18 — затенители для ограничения длины щели

С корпусом конденсора жестко соединен щелевой механизм. Щелевую диафрагму составляют две щеки, помещенные в соответствующих направляющих. Щеки передвигаются независимо одна от другой при помощи двух воротков 17, благодаря чему можно передвигать в сторону и децентрировать щель с целью получения косо-го освещения.

Максимальное раскрытие щек составляет около 15 мм, что дает возможность наблюдения в нормальном светлом поле при апертуре конденсора, увеличенной по отношению к той, которая существует при щелевом освещении.

Длина щели регулируется посредством двух симметрично расставленных затенителей 18. В нижней части корпуса щек находятся направляющие, на которых устанавливается поляризатор, зафиксированный собачкой в форме шарика.

Поляризатор (рис. 13), является поляризационным фильтром, вклеенным во вращающийся круг с угловой шкалой. Шкала нанесена каждые 5° в двух противоположных направлениях от 0 до 180° и снабжена двусторонним веньером 20 и 21, по которому угол поворота поляризатора можно отсчитывать с точностью до 1° .

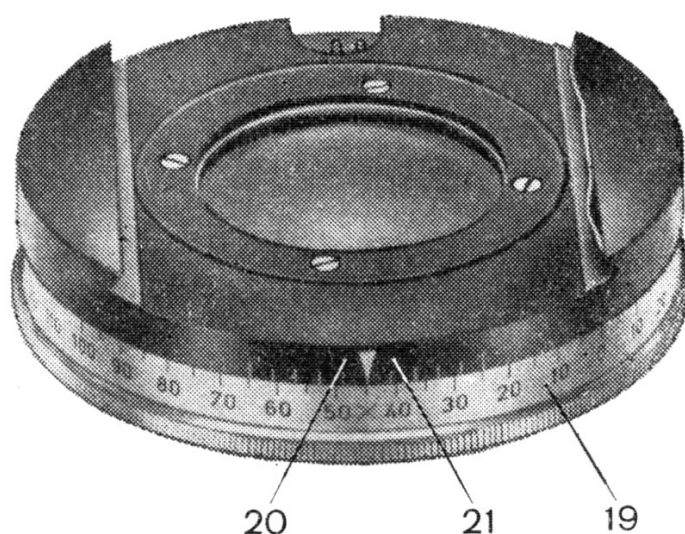


Рис. 13. Поляризатор
19 — угловая шкала поляризатора, 20 — левый нониус, 21 — правый нониус

На шкале добавочно находятся два знака „х” и „||” между числами 40—50 и 130—140. Они обозначают скрещенное положение „х” и параллельное положение „||” поляризатора по отношению к анализатору, установленному на значение „45”. Направление колебаний света в поляризаторе проходит вдоль диаметра круга 0— 180° .

Конденсор с компенсаторами (рис. 14). Этот конденсор отличается от предыдущего тем, что вместо щелевой диафрагмы он снабжен системой четырех кварцевых компенсаторов, расположенных в револьверном диске 22. Каждый из компенсаторов отвечает одному из объективов комплекта: 10х, 20х, 40х и 100х.

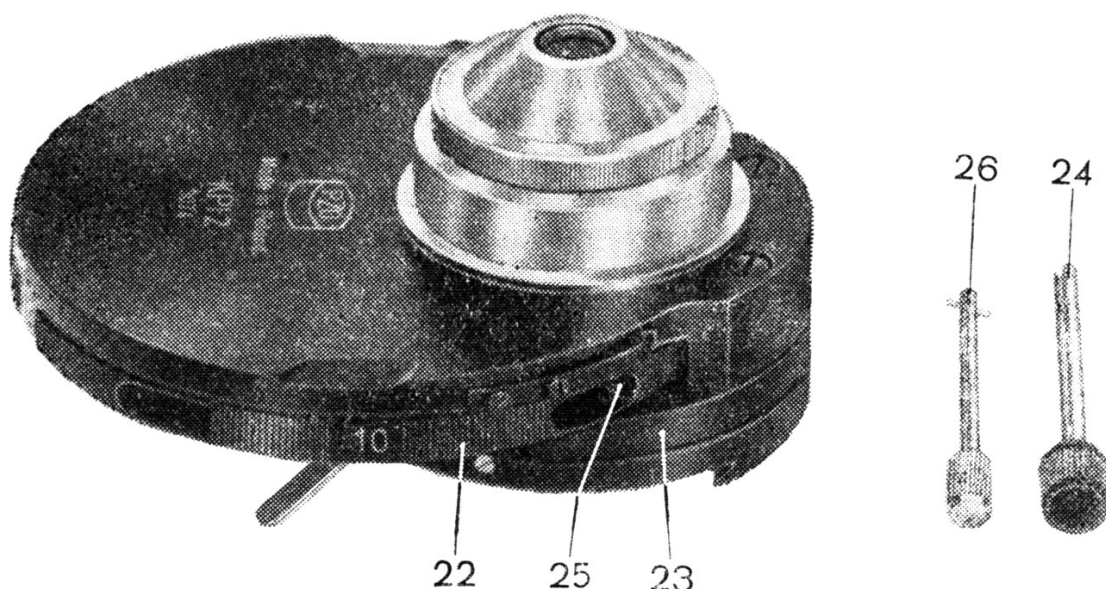


Рис. 14. Конденсор с компенсаторами

22 — револьверный диск, 23 — ирисовая диафрагма, 24 — ключик для регулирования установки компенсаторов, 25 — отверстие для ключика, 26 — ключи для зажима конденсора в конденсородержателе микроскопа

На корпусе вращающегося диска находятся числа 10, 20, 40 и 100, а на неподвижном корпусе — указатель. Наводку соответствующего числа на этот указатель фиксирует защелка. Например, число 20 обозначает, что включен компенсатор для объектива 20х.

Каждый компенсатор имеет возможность поворота в пределах $\pm 10^\circ$, осуществляемого поворачиванием соответствующего регулировочного винта, соответствующего данному конденсатору. Для поворачивания винтов употребляется ключик 24, который накладывается на регулировочный винт через отверстие 25 (в положениях, определенных защелкой).

Кроме компенсаторов в револьверном диске находится ещё одно свободное окно (обозначение „0” на окружности диска), предназначенное для наблюдений в нормальном светлом поле или в спольяризованном свете.

Ключик 26, входящий в комплект конденсора, служит для затягивания зажимного винта при закреплении конденсора в гнезде конденсорного держателя.

Поляризатор (рис. 13) соединен с конденсором, имеющим компенсаторы, таким же образом как с конденсором, снабженным целевой диафрагмой.

Вспомогательный микроскоп (рис. 15) служит для наблюдения выходного зрачка объектива и регуляции микроскопа с поляризационно-интерференционным устройством. Он применяется в общеизвестных фазово-контрастных устройствах.

Окуляр 30 может перемещаться в объективной втулке 28. Нарезки на нижней части окулярной втулки служат для возможного элиминирования зазоров между втулками, отгибая барашек так, чтобы не наступало самодействующее изменение положения втулки.

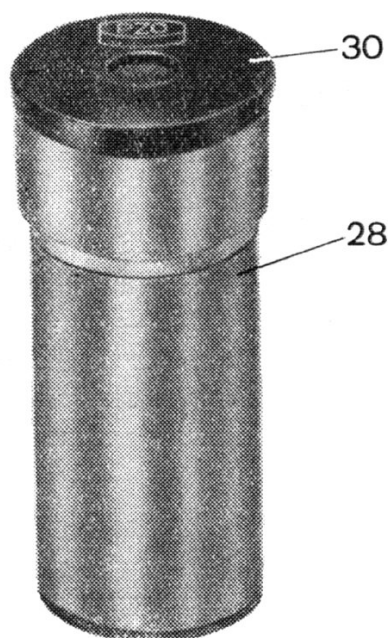


Рис. 15. Вспомогательный микроскоп
28 — объектив, 30 — окуляр

Интерференционные фильтры (рис. 10) служат для исследований в монохроматическом свете. В нормальный комплект устройства входят два фильтра: зеленый FI 546 и желтый FI 590. Максимальная пропускная способность для первого из них находится в пределах зеленой линии ртути ($\lambda=546$ нм), а для второго в пределах желтой линии натрия ($\lambda=589$ нм). Полуширина полосы пропускания фильтров составляет ок. 1 нм, пропускная способность — более 35%.

Поляризационно-интерференционные объективы

В отношении оптической системы поляризационно-интерференционный объектив, называемый также объективом с большим раздвоением изображения, отличается от микроскопного ахроматического объектива тем, что имеет вмонтированную двупреломляющую призму. Эту призму можно поворачивать с оптической системой объектива на угол 360° по отношению к накатанной оправе, которая вкручивается в гнездо объективного револьвера.

В состав комплекта входят объективы с увеличениями: $10\times$, $20\times$, $40\times$ и $100\times$. Они применяются только со щелевым конденсором. Двупреломляющие призмы этих объективов дают следующие значения n_2 раздвоений изображения (по отношению к предметной плоскости):

для объектива $10\times$ — 40 нм

для объектива $20\times$ — 20 нм

для объектива $40\times$ — 12 нм

для объектива $100\times$ — 5 нм

Поляризационно-интерференционные объективы обозначены красным пояском и буквами „PI”.

Измерительный окуляр 12х (рис. 10) служит определению межплоскостного расстояния h для полосной призмы (№ 2).

Раздел 3

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОСКОПА К РАБОТЕ

Точное отрегулирование поляризационно-интерференционного микроскопа является необходимым условием для достижения правильного изображения и получения точных результатов измерения.

Следовательно, приготовление микроскопа для исследований и измерений при применении отдельных методов должно быть выполнено тщательно и без упрощений, в соответствии с приведенными ниже указаниями.

Правильной и наиболее удобной установкой микроскопа является установка, представленная на рис. 16.

Первой манипуляцией является соединение интерференционной головки со штативом микроскопа при помощи зажима 8. Анализатор 16 (рис. 11) должен быть направлен в сторону наблюдателя. Штифт, выступающий из нижней плиты интерференционной головки, должен попасть в приготовленную для него канавку в оправе зажима, делая таким образом поворот интерференционной головки невозможным. Следующей операцией является помещение окулярной насадки 31

в гнезде интерференционной головки и её фиксация зажимным винтом 32.

Конденсор со щелевой диафрагмой 2 помещают в гнезде держателя конденсора 33 (рис. 17) таким образом, чтобы шариковая защелка, находящаяся в нижней части щелевого механизма, была обращена в направлении штатива микроскопа. Конденсор фиксируется в держателе посредством зажимного винта 34 (рис. 17).

Конденсор с компенсаторами 3 (рис. 18) крепится таким же образом, как конденсор со щелевой диафрагмой с той разницей, что следует применять специальный ключик 7 (рис. 18) для того, чтобы сделать возможным зажатие винта 34 (рис. 17).

Очень важна симметрическая установка конденсора по отношению к держателю.

Конденсор с компенсаторами применяется только вместе с дифференциальной призмой (№ 1) и служит только для качественных исследований, при которых очень важно иметь большую апертуру и большое количество света.

Для количественных исследований и измерений следует применять исключительно конденсор со щелевой диафрагмой, потому что конденсор с компенсаторами благодаря большой апертуре вводить в результаты измерений так называемую „апертурную погрешность”.

1. УСТАНОВКА ОСВЕЩЕНИЯ

1.1. После закрепления интерференционной головки и конденсора со щелевой диафрагмой (или конденсора с компенсаторами), следует вкрутить объективы в гнезда объективного револьвера, вставить осветитель 35 (рис. 16) в гнездо, находящееся в основании микроскопа, и вставить соответствующие окуляры в тубусы бинокулярной насадки.

Осветительную лампу подсоединяют через трансформатор к сети с напряжением 220 в переменного тока.

Первой операцией, которую следует выполнить в так приготовленном микроскопе, гарантирующей оптимальные условия наблюдений и измерений, является установка освещения по Келеру.

Во время проведения этой операции, отдельные элементы микроскопа должны быть установлены следующим образом:

- а) рычаг переключения призм 13 — в положение „0”;
- б) анализатор 16 отключен, т.е. установлен в положении, в котором напротив указателя в виде прореза находится точка;
- в) поляризатор 9 отключен от конденсора;
- г) щеки щелевой диафрагмы максимально раздвинуты (что достигается поворотом воротков 17, согласно с направлением стрелок часов — до отказа, или диск конденсора с компенсаторами установлен в положение „0”;

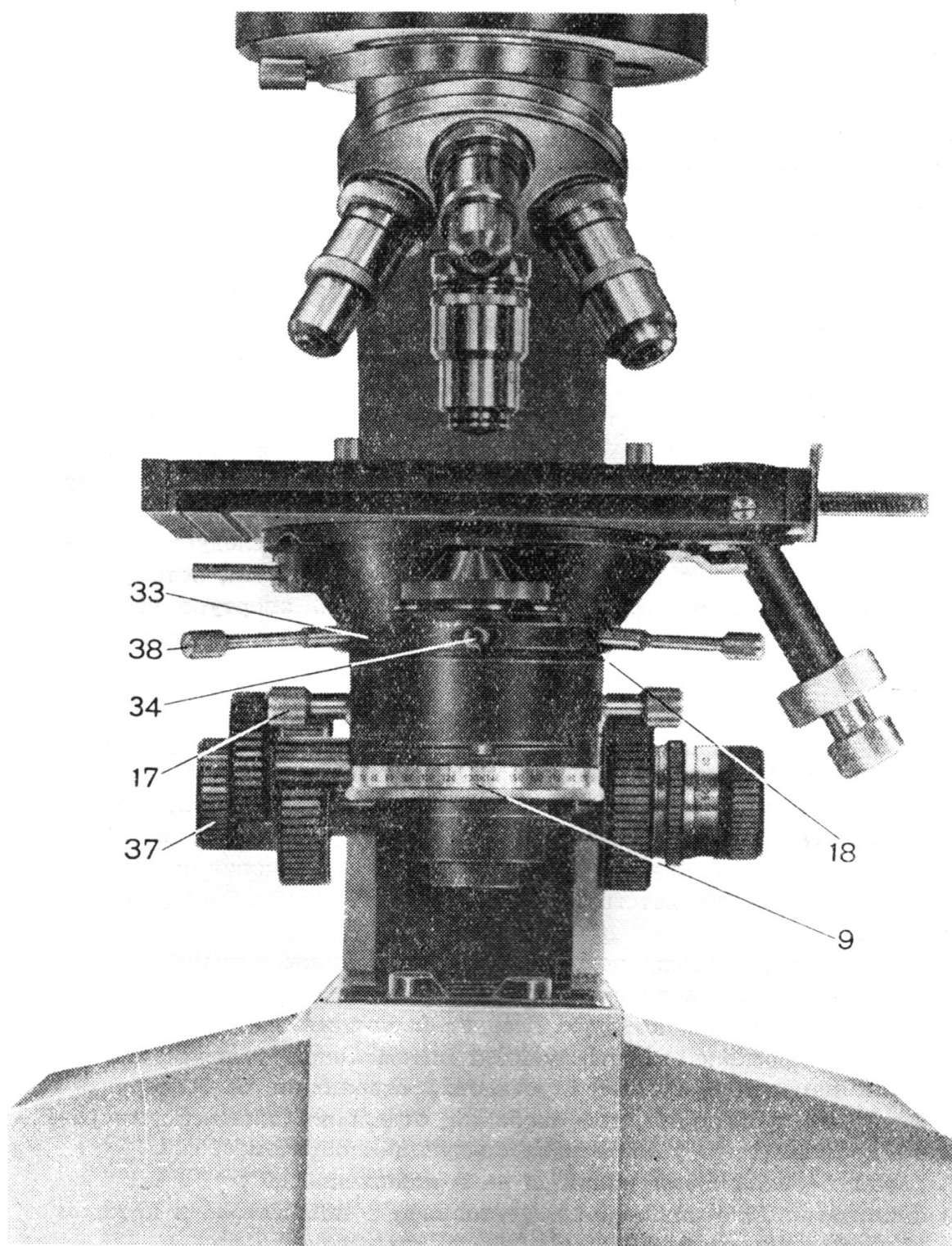


Рис. 17. Вид нижней части микроскопа со вставленным конденсором и щелевой диафрагмой

9 — поляризатор, 17 — воротки для регулирования ширины щели, 18 — затенители для ограничения длины щели, 33 — держатель подъемника конденсора, 34 — зажимной винт конденсора, 37 — вороток перемещения конденсора, 38 — регулировочные винты конденсора

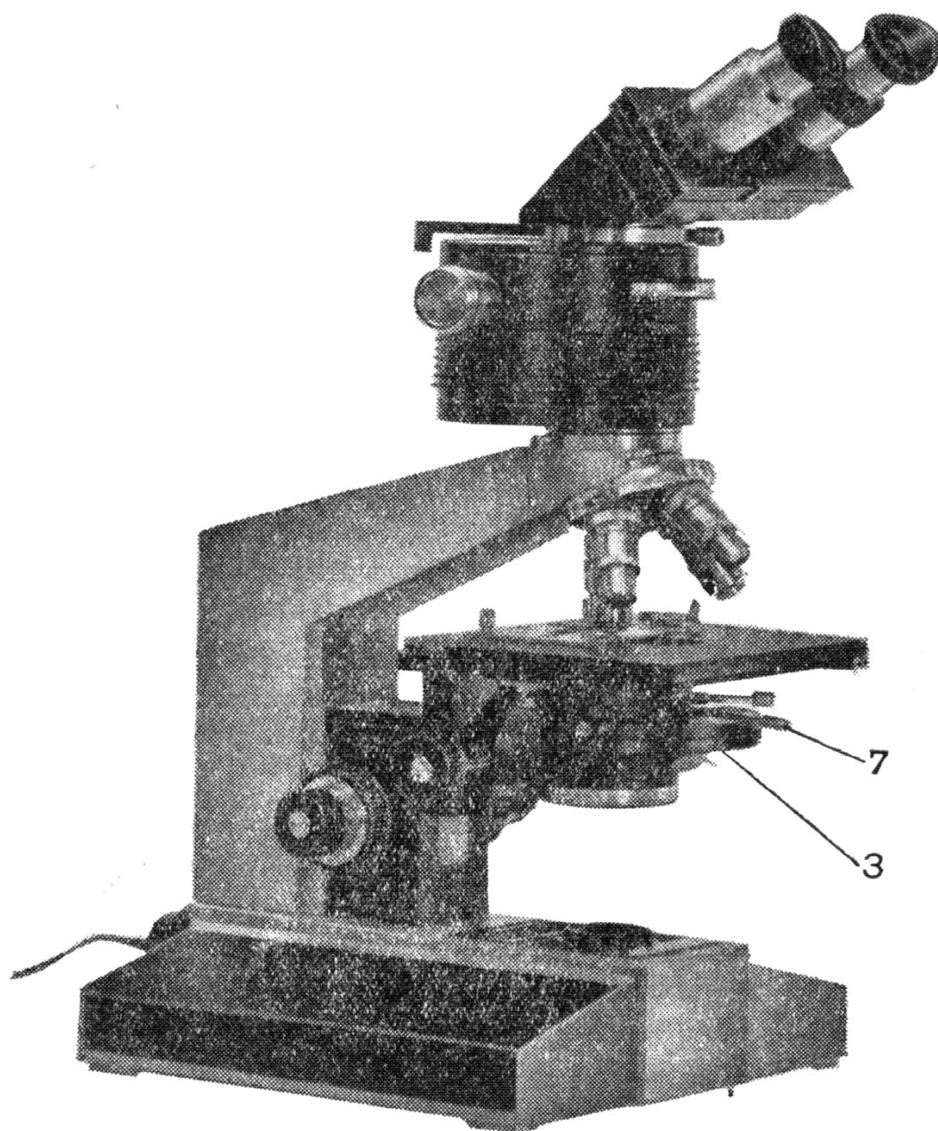


Рис. 18. Поляризационно-интерференционный микроскоп
BIOLAR PI

(конденсор с компенсаторами)

3 — конденсор с компенсаторами, 7 — ключик для зажима
в держателе конденсора с компенсаторами

д) затенители 18 максимально раздвинуты перемещением рычагов:
переднего вправо, заднего — влево;

е) конденсор установлен в верхнем положении

1.2. Освещение по Келеру наиболее удобно наладить, применяя объектив $10\times$ или $20\times$.

Последовательность процедуры следующая:

- а) поместить препарат на столике микроскопа, включить освещение и оперируя сначала вращением рукоятки, грубой, а потом точной фокусировки достичь резко видимого изображения препарата,
- б) поворотом кольца 36 (влево до отказа) максимально уменьшить диафрагму поля, а затем передвинуть, поворачивая рукоятку 37 (рис. 17), конденсор в положение, в котором в поле зрения видно изображение кромок диафрагмы поля; в случае, если изображение в поле зрения расположено нецентрально, следует ввести его на середину поля, поворачивая регулировочные винты 38;
- в) расширить диафрагму поля так, чтобы её края открыли полностью поле зрения, дальнейшее её открытие не рекомендуется в связи с возможностью появления неблагоприятных отблесков и падением контрастности изображения;
- г) в место одного из окуляров поместить вспомогательный микроскоп 4 (рис. 16);
- д) смотря через вспомогательный микроскоп, перемещать окуляр 30 до тех пор, пока не получится резкое изображение выходного зрачка объектива (световой кружок, резко выступающий в поле зрения микроскопа);
- е) передвинуть осветитель 35 с лампой в гнезде основания в положение, в котором в поле зрения вспомогательного микроскопа резко выступает изображение нити накала осветительной лампы;
- ж) колебательным движением патрона 27 лампы установить изображение нити накала центрально в поле зрения вспомогательного микроскопа;
- з) поворачивая рукоятки 17 конденсора со щелевой диафрагмой (рис. 17), установить щеки симметрично по отношению к центру зрачка на расстоянии около 3 до 5 мм, определяемом в кажущемся поле зрения;
- и) замонтировать поляризатор, вдвигая его на направляющие конденсора;
- й) в случае использования конденсора с компенсаторами, вместо операций, описанных в п-ктах: д, е, ж, з — следует, наблюдая снизу плоскость ирисовой диафрагмы конденсора, передвинуть осветительную лампу в гнезде основания таким образом, чтобы получить центральное и резко выступающее изображение нити накала в плоскости ирисовой диафрагмы.

После выполнения вышеописанных операций, можно приступить к самой регуляции, которая выполняется также в зависимости от выбранного метода наблюдения и измерений.

2. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕТОД — КОНДЕНСОР СО ЩЕЛЕВОЙ ДИАФРАГМОЙ

2.1. Установить рычаг 13 (рис. 11) в положение „1”.

2.2. Передвинуть препарат (движениями столика) таким образом, чтобы объектив находился за пределами исследуемого препарата, там где нет больших оптических неоднородностей.

2.3. Анализатор 16 установить на значение шкалы „45”, а поляризатор на значение „45” или „135” (обозначенное „х”). Смотри во вспомогательный микроскоп 4 (рис. 16) и расширяя немного щель путем поворачивания рукоятки 17 (рис. 17), в выходном зрачке объектива видим широкие интерференционные полосы с темной полосой нулевого порядка и цветными полосами первого, второго и последующих интерференционных порядков.

Система интерференционных полос с темной нулевой полосой создается при скрещенных поляроидах (анализатор 16 установлен на „45”, поляризатор 9 на „х”), система со светлой нулевой полосой — при поляроидах, установленных параллельно (анализатор на „45”, поляризатор на „||”).

Только при этих положениях поляризатора 9 достигается максимальная интенсивность полос в зрачке объектива и тем самым оптимальный контраст изображения наблюдаемого объекта.

Выбор одной или другой системы интерференционных полос зависит от рода наблюдаемого препарата и конкретных исследовательских заданий пользователя. В нормальных условиях, рекомендуется применять систему полос с темной нулевой полосой.

2.4. Поворачивая воротки 17 (рис. 17), сузить щель так, чтобы её ширина в поле зрения составляла приблизительно 2 мм, и так её установить, чтобы её изображение появилось в середине выходного зрачка объектива (наблюдаемого через вспомогательный микроскоп) и чтобы это изображение было параллельно направлению интерференционных полос.

В случае, если изображение щели не является параллельным направлению нулевой полосы, конденсор вместе со щелевой диафрагмой следует немного повернуть в держателе конденсора 33. Винт 34, зажимающий конденсор, следует слегка отпустить, предотвращая выпадение конденсора рукой. После точной установки направления щели закрутить винт крепче. Затем установить ширину щели так, чтобы она из первой цветной полосы (считая от темной нулевой полосы) отделяла только пурпурный цвет. Эту полосу наводим на изображение щели, перемещая двупреломляющую призму при помощи воротка 15 (рис. 16). Затем, затенителями 18 (рис. 17) ограничить длину щели до такой степени, чтобы изображение „вырезаемой” полосы не было длиннее диаметра выходного зрачка объектива.

Взаимная ориентация изображения щели интерференционных полос, находящихся в выходном зрачке объектива и направлений колебаний света в поляризаторе представлена на рис. 19.

2.5. Если щель совпадает точно с пурпурной частью интерференционной полосы, то поле зрения, наблюдаемое через окуляр должно быть тоже полностью окрашено в пурпурный цвет (рис. 46b), т.е. такой же самый, какой „выделяет” щель из интерференционной полосы. В случае, если поле зрения не окрашено полностью в такой цвет и кроме пурпурного цвета появляются соседние цвета (рис. 46a), то из этого следует, что двупреломляющая призма не находится на соответствующем расстоянии от фокуса объектива. В таком случае следует повернуть накатанное кольцо 14 (рис. 16) в одном или другом направлении пока не покажется поле зрения однородно

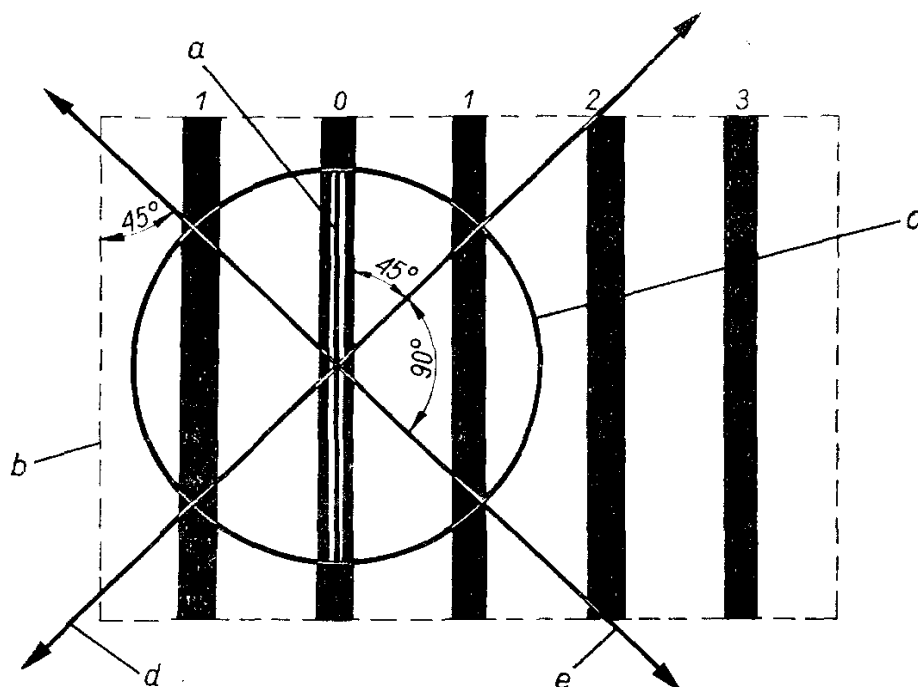


Рис. 19. Изображение выходного зрачка объектива
 а — изображение щели, b — преломляющая грань двупреломляющей призмы, c — выходной зрачок объектива, d — направление колебаний света в анализаторе, e — направление колебаний света в поляризаторе

окрашенное в пурпурный цвет. При поворачивании кольца 14, двупреломляющая призма может передвинуться немного вбок, в одну или другую сторону что вызовет исчезновение пурпурного цвета. Цвет этот приводим обратно поворачиванием воротка. 15. В этом месте следует обратить внимание на то (особенно при применении объектива 10X), не входит ли изображение нитки накала осветительной

лампы в предметную плоскость и не портит ли однородности поля зрения. Если это имеет место, то следует осветительную лампу немного передвинуть в одном или другом направлении, пока не получится, по мере возможности, однородное поле. Неоднородность поля зрения, имеющая свою причину в нитки накала, может быть поправлена посредством матового стекла, которое устанавливается в гнезде основания микроскопа 39 (рис. 16).

Двупреломляющая призма поднимается вверх при поворачивании накатанного кольца 14 вправо, а опускается при поворачивании влево.

2.6. Ввести препарат движениями столика в поле зрения объектива, выбрать исследуемый фрагмент и скорректировать резкость изображения механизмом точной фокусировки.

2.7. Вынуть вспомогательный микроскоп 4 и вставить в его место второй окуляр. Передвинуть окулярные трубки тубуса соответственно расстоянию между глазами наблюдателя и скорректировать резкость изображения, смотря сначала только одним глазом в нефокусированный окуляр, а затем поворачивая диоптрическое кольцо 40 (рис. 16) подогнать сфокусированный окуляр до резкого видения вторым глазом. Это операция, которая нормально выполняется, применяя для наблюдения бинокулярную насадку.

2.8. После выполнения вышеупомянутых операций микроскоп и поляризационно-интерференционное устройство уже приготовлены к проведению наблюдений или измерений, а также к выполнению микрофотографирования. При замене объектива следует проверить, при раздвинутых щеках диафрагмы конденсора и при отключенном анализаторе, установку свечения по пунктам 1, 2 (а, б, в), а также выполнить операции, приведенные в п. п. 2.4. — 2.7.

Имея так установленный микроскоп и однородное поле зрения, окрашенное в пурпурный (чувствительный) цвет первого порядка, автоматически получаем однородное поле зрения в каждом ином интерференционном цвете.

При одном крайнем положении двупреломляющей призмы появляется темное интерференционное поле, а при втором — интерференционный контраст в цветах второго и третьего интерференционного ряда. Устанавливая двупреломляющую призму на темное поле, а затем перемещая его в обратном направлении получаем интерференционный контраст в сером и серозеленом поле (изображение в таком поле до некоторой степени похоже на изображение в фазовом контрасте, однако оно гораздо более пластично и не имеет вредных окаймлений, типичных для фазового контраста), затем появляется светлое поле (изображение фазовых предметов становится мало контрастным или совершенно невидимым) потом выступает желтый цвет (дающий довольно хороший контраст), затем оранжевый, пурпурный (чувствительный), голубой и зеленый.

Между этими цветами выступает целая гамма переходных цветов с разными промежуточными оттенками. Перемещая дальше двупреломляющую призму, попадаем на те же самые цвета второго и третьего интерференционного ряда, однако с немного иным тоном, чем прежние, дающие в общем меньшую контрастность микроскопного изображения. В пределах этих цветов можно, в соответствии с данным препаратом, подобрать наиболее оптимальные условия наблюдения (хорошую контрастность, должную пластичность, и четкость одних или других деталей изображения).

Поворачивая поляризатор 9 (рис. 17) в одном или другом направлении на 90° , т.е. до положений, обозначенных параллельными черточками „||”, можно автоматически производить наблюдения при параллельно установленных плоскостях поляризации поляризатора и анализатора 16 (рис. 16). В этом случае темное поле не появляется. Цвета отдельных рядов интерференции схожи с цветами при скрещенных поляризаторе и анализаторе, но имеют немного иной тон, иногда они создают столь же выгодные условия наблюдения. Чтобы быстро сравнить характер изображения, получаемого в поляризационно-интерференционном микроскопе с характером изображения, получаемого в обыкновенном микроскопе (светлое поле), достаточным будет выключить анализатор или повернуть поляризатор на 45° от положения, обозначенного крестиком „X” или двумя черточками „||”.

3. МЕТОД ОДНОРОДНОГО ПОЛЯ С БОЛЬШИМ РАЗДВОЕНИЕМ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Установив микроскоп со щелевой диафрагмой по пункту 2, установить рычаг 13 (рис. 16) в положение „3”.

Регулировка микроскопа производится таким же образом как в случае дифференциального метода. После наводки микроскопа на однородное поле, приблизительно в среднем положении двупреломляющей призмы появляется темное поле (при скрещенных поляризаторе и анализаторе). Перемещая призму от этого положения в одном или другом направлении, проходим через целый ряд однородных цветов первого, второго, третьего и следующих интерференционных рядов.

Измерения и наблюдения следует производить как можно ближе середины поля зрения в связи с возможностью возникновения некоторой потери однородности окраски по краям поля.

Следует применять микроскоп, снабженный бинокулярной насадкой.

4. МЕТОД ПОЛОС

4.1. Установить освещение по Келеру (п.1), а затем перевести рычаг 13 (рис. 16) в положение „2”.

4.2. Передвинуть препарат (движениями столика) так, чтобы объектив находился за пределами исследуемого препарата, там где изображение не проявляет больших оптических неоднородностей.

4.3. Анализатор установить, как прежде, на значение шкалы „45”, а поляризатор на значение шкалы „45” или „135”, обозначенное крестиком „X”.

4.4. Сильно сузить щелевую диафрагму, заботясь при этом, чтобы она находилась в центральном положении по отношению к оптической оси микроскопа.

Раздвоенное изображение щели, видимое при помощи вспомогательного микроскопа, должно лежать в середине выходного зрачка объектива.

4.5. Смотри в окуляр, наблюдатель должен различать прямолинейные цветные интерференционные полосы (рис. 45) с темной нулевой полосой. Если это не имеет места, то следует переместить двупреломляющую призму в поперечном направлении (посредством рукоятки 15) так, чтобы полосы появились в поле зрения микроскопа.

Затем, при слегка завинченном зажимном винте 34 (рис. 17), повернуть конденсор в гнезде в одном или другом направлении и, поворачивая одну из рукояток 17, так установить ширину щели, чтобы интерференционные полосы получили максимальную четкость и одновременно должную светлоту в поле зрения микроскопа.

4.6. После выполнения этих операций, микроскоп уже приготовлен к наблюдениям в поле полос. При замене объективов следует только соответственно скорректировать ширину щели, апертуру диафрагмы поля и, если окажется необходимым, центровку конденсора. Стоит подчеркнуть, что передвигая двупреломляющую призму вдоль оси микроскопа (поворотом кольца 14) можно до некоторой степени сужать и расширять интерференционные полосы. При верхнем положении двупреломляющей призмы полосы более узки, а при нижнем — более широки.

Рекомендуется производить измерения при самом нижнем положении двупреломляющей призмы.

Ориентировочные значения постоянной p' , которые приведены в таблице II, обязывают именно для этого положения. При выполнении точных измерений следует определить значение постоянной p' для каждого отдельного случая.

5. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕТОД — КОНДЕНСОР С КОМПЕНСАТОРАМИ

5.1. В гнездо подъемника вставить конденсор с компенсаторами. Вдвинуть поляризатор на направляющие конденсора (рис. 13). Конденсор следует установить симметрично по отношению к регулировочным винтам 38 (рис. 17). Зажимный винт 34 затягивается посредством ключика 7 (рис. 18). Анализатор 16 (рис. 16) установлен также как прежде, на значение деления „45”, а поляризатор 9 (рис. 17) на значение „45” или „135”, обозначенное „X”.

5.2. Установить освещение по Келеру в соответствии с п. 1, причем револьверный диск должен находиться в положении „0” (проходное отверстие).

Наблюдение следует производить применяя объектив 10X.

5.3. Поворачивая револьверный диск 22 (рис. 14) включить в ход лучей компенсатор „10”.

5.4. Наблюдая состояние выходного зрачка объектива посредством вспомогательного микроскопа, ввести в зрачок (поворачивая рукоятку 15) пурпурный (чувствительный) цвет первого ряда. Изображение нити накала осветительной лампы, находящейся в зрачке, должно быть заполнено этим цветом. Если этого не наблюдается и кроме пурпурного цвета появляются соседние цвета, то следует повернуть конденсор в держателе подъемника 33 (рис. 17) в одном или в другом направлении.

Поворот следует выполнять слегка отпуская зажимный винт 34 и придерживая рукой нижнюю часть конденсора.

Компенсаторы установлены на заводе и поэтому после замены объектива повторная регуляция не является необходимой (поворот конденсора); а в случае разрегулировки конденсора, т.е. когда это условие не выполнено, следует поправить установку компенсаторов, пользуясь ключиком 24 (рис. 14), который вставляется в гнездо 25. Раз установленные компенсаторы в основном не требуют повторной регулировки при последующем использовании конденсора, при условии, что способ его крепления в держателе всегда такой самый.

5.5. Если изображение нитки накала осветительной лампы, находящееся в зрачке окрашено однородно, то, смотря в окуляр микроскопа, мы должны получить однородное поле зрения, окрашенное в тот же самый цвет, что и выходной зрачок объектива.

Если этого не наблюдается, то двупреломляющую призму следует приблизить или отдалить от объектива, как приведено в пункте 2.5.

5.6. После выполнения вышеописанных операций микроскоп отрегулирован. Последующие операции выполняются в соответствии с пп. 2.6 и 2.7.

При замене одного объектива другим, следует включить соответствующий компенсатор и повторить операции, приведенные в пп. 5.2

и 5.5. Находящаяся под конденсором с компенсаторами ирисовая диафрагма 23 (рис. 14) служит для ограничивания апертуры конденсора, в частности, при обыкновенных наблюдениях в „светлом поле”, когда револьверный диск 22 установлен на „0”.

6. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ ОБЪЕКТИВОВ

6.1. Дифференциальный метод однородного цвета.

Микроскоп следует установить в соответствии с правилами, приведенными выше, с включенной, в зависимости от потребностей, двупреломляющей призмой № 1 или № 3. Затем, вместо обыкновенного объектива вкрутить объектив с двупреломляющей призмой и установить его (поворачивая оправу) так, чтобы его интерференционные полосы, наблюдаемые при помощи вспомогательного микроскопа, были направлены параллельно интерференционным полосам призмы, находящейся в интерференционной головке. В этом случае конфигурации интерференционных полос от одной и второй двупреломляющей призмы накладываются один на другого, в результате появляется новая система интерференционных полос, более узких и более сгущенных. Затем следует прикрыть щель конденсора таким образом, чтобы она из вышеупомянутой результирующей системы „вырезала” пурпурный цвет первого порядка интерференции. В этом случае поле зрения должно быть однородно пурпурное. Если это не происходит, то следует немного поднять или опустить призму в интерференционной головке посредством поворачивания накатанного кольца 14 (рис. 11).

Объектив должен быть установлен так, чтобы было резко видимым изображение препарата. Затем, поворачивая оправу объектива (с находящейся в ней двупреломляющей призмой) на 180° или 45° , получаем иные значения раздвоения изображения.

В случае, если после выполнения этой операции, поле зрения становится неоднородным, следует довести его до первоначального однородного состояния, поворачивая накатанное кольцо 14 в одном или другом направлении.

6.2. Метод полос.

Микроскоп установить согласно правилам описанным выше. Вместо обыкновенного объектива вкрутить объектив с двупреломляющей призмой. Оправу объектива поворачивать так, чтобы в поле зрения появились максимально четкие и контрастные интерференционные полосы, при этом регулируют соответственно ширину щели.

Раздел 4

КАЛИБРОВКА ДВУПРЕЛОМЛЯЮЩИХ ПРИЗМ

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЖПОЛОСНОГО РАССТОЯНИЯ

Межполосное расстояние h , является характерной величиной двупреломляющей призмы W_1 , находящейся в интерференционной головке, призма W_2 находящаяся в объективе не имеет влияния на величину h .

1.1. Определение межполосного расстояния h для дифференциальной призмы (№ 1) и для призмы однородного поля с большим раздвоением изображения (№ 3).

Микроскоп следует точно отрегулировать и установить на однородный цвет поля зрения.

В случае применения монохроматического света (со вставленным интерференционным фильтром), измерение межполосного расстояния h для двупреломляющих призм, дающих однородное поле, состоит в отсчете на барабане микрометрического винта величины перемещения призмы, которая отвечает двум последующим максимальным затемнениям поля зрения.

Для получения большей точности рекомендуется нижеприведенная методика проведения измерения: производится отсчет разности двух наиболее крайних положений призмы, при которых получается еще темное поле зрения, и отсчитанную разность положений делится на количество очередных затемнений поля зрения минус одно (или иначе говоря, разность положений призмы, отвечающих первому и n -тому затемнению поля зрения делим на $n-1$ затемнений). Предположим, например, что W_1 является положением призмы, при котором поле зрения микроскопа затемняется максимально первый раз, а W_5 — положением, при котором поле зрения становится (при постоянном перемещении призмы в одном направлении) пятый раз максимально затемненным; тогда межполосное расстояние составит

$$h = \frac{W_5 - W_1}{4} \text{ мкм.}$$

Можно также поступать и таким образом, что производится отсчет положения двупреломляющей призмы всякий раз когда наступает максимальное затемнение поля зрения, а затем берется среднее значение разностей последующих установок призмы.

В случае применения белого света, калибрование призм, дающих однородное поле, производится таким образом, что двупреломляющую призму устанавливают на темное поле зрения, а затем на чувствительный цвет первого ряда.

Отсчитанная на барабанах микрометрического винта величина производимого при этом перемещения двупреломляющей призмы представляет межполосное расстояние h . Можно при этом использовать также чувствительные цвета второго и третьего интерференционного порядка (как с одной так и с другой стороны темной нулевой полосы), принимая среднее значение разностей очередных положений призмы, при которых получается пурпурная окраска поля зрения.

1.2. Определение межполосного расстояния h для призмы с интерференционными полосами (№ 2)

Калибрование двупреломляющей призмы, дающей поле зрения с интерференционными полосами, производится немного иначе. В этом случае, вместо обыкновенного окуляра в бинокулярную насадку вставляем окуляр $12\times$ со шкалой и поворачивая кольцо 14 перемещаем призму в нижнее положение. Передвигая двупреломляющую призму в поперечном направлении устанавливаем середины перемещающихся в поле зрения интерференционных полос на довольно выбранный штрих окулярной шкалы, отсчитывая одновременно при помощи микрометрического винта очередные значения положений двупреломляющей призмы.

Среднее значение, взятое, например, на 10 очередных установок двупреломляющей призмы, дает межполосное расстояние h . Не следует при этом выбирать полосы, находящиеся далеко от нулевой полосы.

Рекомендуется ограничиваться до пяти интерференционных полос с левой и пяти полос с правой стороны нулевой полосы. При применении белого света за центр окрашенных полос следует принять то место, где фиолетовый цвет переходит в синий. В таблице II приведены значения межполосного расстояния h для отдельных двупреломляющих призм для белого и монохроматического света с длиной волны $\lambda=590$ нм и $\lambda=546$ нм.

Это теоретические значения, в практике рекомендуется однако определение этих величин в таких условиях, в которых производятся определенные исследования.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОСТОЯННОЙ p'

Знание постоянной p' необходимо для измерения разности оптического пути в поле полос (призма № 2), при применении представленного ниже метода передвижения двупреломляющей призмы. Для её определения наиболее удобным является использование в качестве препарата предметного стекла с тонкой царапиной или волокном, а также объектива с увеличением $10\times$ или $20\times$.

Царапину или волокно следует при этом установить параллельно интерференционным полосам .

Точно отрегулировав микроскоп и установив его на резкость, передвигаем двупреломляющую призму в поперечном направлении и наводим середину темной нулевой полосы (или любой иной) сначала на одно изображение царапины, а затем на второе изображение (рис. 20) и производим на барабанах микрометрического винта отсчет

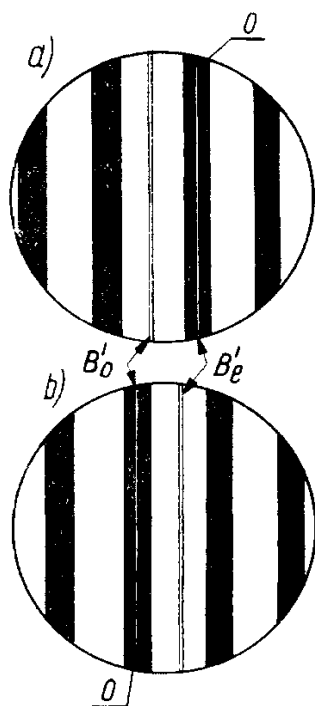


Рис. 20. Способ определения постоянной p' для двупреломляющей призмы (№ 2), дающей интерференционное поле полос
 a — центр нулевой, темной, интерференционной полосы (0), установленный на необыкновенное изображение B'_e , b — центр той же нулевой полосы (0), установленный на обыкновенное изображение B'_o тонкого волокна или риски

величины производимого при этом передвижения двупреломляющей призмы. Ориентировочные значения постоянной p' для призмы с интерференционными полосами (призма № 2) приводятся в таблице II.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИНЫ РАЗДВОЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Знание величины раздвоения r изображения по отношению к предметной плоскости микроскопа необходимо для измерений градиента разности оптического пути, угла контакта, коэффициента преломления и иных величин, определяемых при помощи методов дифференциальной интерферометрии (призма № 1). Это раздвоение зависит от увеличения объектива и его следует определить для каждого из объективов отдельно в условиях нормальной работы микроскопа.

Самым простым образом величину этого раздвоения определяем при помощи окуляра 12 \times со шкалой (или микрометрического оку-

ляра), измеряя расстояние между раздвоенными изображениями очень тонкой риски или какой-либо иной чрезвычайно мелкой детали, какую всегда можно найти на предметном стекле.

Отсчитанное на шкале окуляра значение раздвоения пересчитывается затем на раздвоение, отнесенное к предметной плоскости микроскопа. Наиболее удобно выражать раздвоение в микронах. Для этого, посредством предметной микрометрической плитки (т.н. предметного микрометра), определяется, сколько делений предметной микрометрической плитки приходится на одно элементарное деление микрометрического окуляра.

Элементарное деление входящей в комплект микроскопа предметной микрометрической плитки составляет 10 мкм, а длина всей шкалы — 1 мм. Теоретические величины раздвоений для отдельных объективов приведены в таблице II.

Раздел 5

ИЗМЕРЕНИЕ РАЗНОСТИ ОПТИЧЕСКОГО ПУТИ

1. ИЗМЕРЕНИЕ В ПОЛЕ ПОЛОС — ДВУПРЕЛОМЛЯЮЩАЯ ПРИЗМА № 2

Этот метод применяется главным образом для исследований тонких волокон и узких обрезков, отдельных клеток и всякого рода овальных объектов (диаметром не более 32 мкм), а также тонких слоев и пленок. Измерение разности оптического пути в самом простом случае, заключается в определении ширины межполосного расстояния h' в поле зрения микроскопа и величины смещения d интерференционных полос в изображении исследуемого объекта (рис. 2).

Зная эти величины и длину волны λ примененного света, разность оптического пути Φ определяется по формуле:

$$\Phi = \frac{d}{h'} \cdot \lambda \quad (15)$$

Измерение межполосного расстояния h' и смещения полос d производится посредством окуляра 12 \times с микрометрической шкалой (или посредством микрометрического окуляра, поставленного по специальному требованию). Этот окуляр употребляется подобным образом как всякий иной микроскопный окуляр. Однако, прежде чем приступить к измерению, его нужно точно навести на резкость микрометрической шкалы. С этой целью поворачиваем его глазную

линзу до тех пор, пока не получится максимально резкое изображение шкалы.

Если исследуемым объектом является волокно, узкий обрезок или какой-нибудь удлиненный объект, то лучше всего установить его (вращая столик) под углом 45° к направлению интерференционных полос (рис. 2). При применении белого света, лучше всего проводить измерение при помощи темной нулевой полосы или первой окрашенной полосы. Выгодно при этом производить отсчет двойной величины d , принимая во внимание расстояние между центрами той самой полосы в одном и другом (обыкновенном и необыкновенном) изображении исследуемого объекта (рис. 2). Однако таким образом можно поступать, когда исследуемый объект однороден в отношении толщины и коэффициента преломления. В случае неоднородных объектов, измерение разности оптического пути может относиться только к определенному месту, а не ко всему объекту. В таком случае следует установить препарат так, чтобы в требуемом месте одного или другого изображения исследуемого объекта нашёлся центр смещенной полосы, выбранной для измерения.

То же самое можно получить, и даже более удобным способом, передвигая двупреломляющую призму в поперечном направлении посредством микровинта 15 (рис. 16), в то время как препарат остается неподвижным. Таким же образом следует поступить в случае овальных микрообъектов (рис. 21).

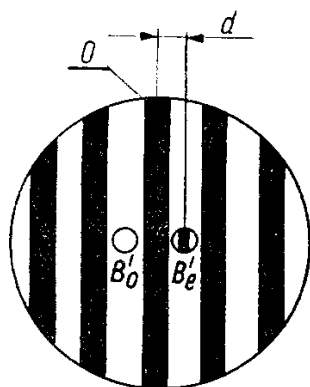


Рис. 21. Измерение разности оптического пути малых, овальных предметов в интерференционном поле полос

В случае изотропных, растаянутых объектов с поперечными размерами, превышающими величину раздвоения изображения, измерение разности оптического пути можно выполнять только в пределах раздвоенных областей. Поворачивая столик микроскопа, можно получить раздвоение изображений любых береговых областей исследуемого объекта (например, клетки). Так как максимальное значение раздвоения для призмы № 2, дающей поле интерференционных полос составляет 32 мкм (для объектива $10\times$), то диа-

метр области, в которой можно измерять в каждом пункте разность оптического пути (применяя поворачивания препарата) составляет 64 мкм. Поясняет это рис. 22.

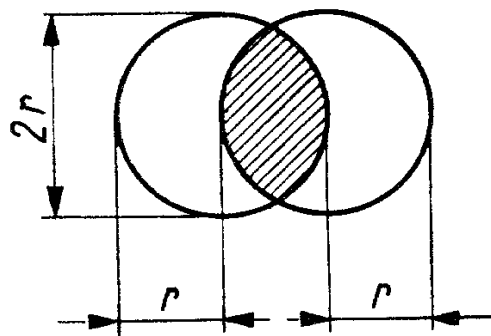


Рис. 22

В случае тонких слоев или пленок, измерения разности оптического пути при применении этого метода можно производить на соответственных узких полосках, уступах или бороздах, устанавливаемых наискось по отношению к направлению интерференционных полос (рис. 23, 24, 25).

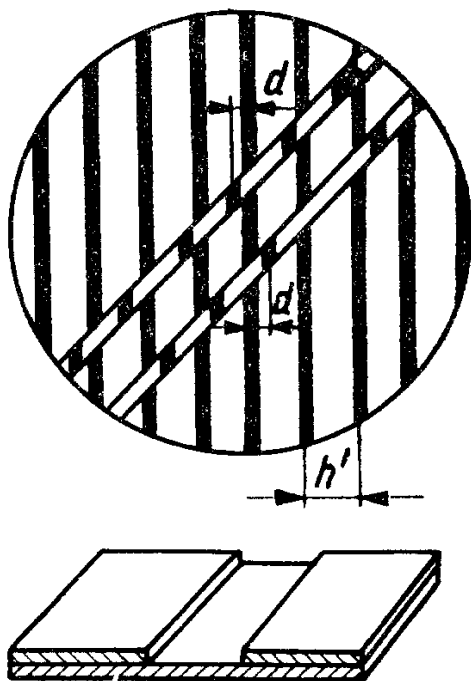


Рис. 23. Изображение порога в интерференционном поле полос

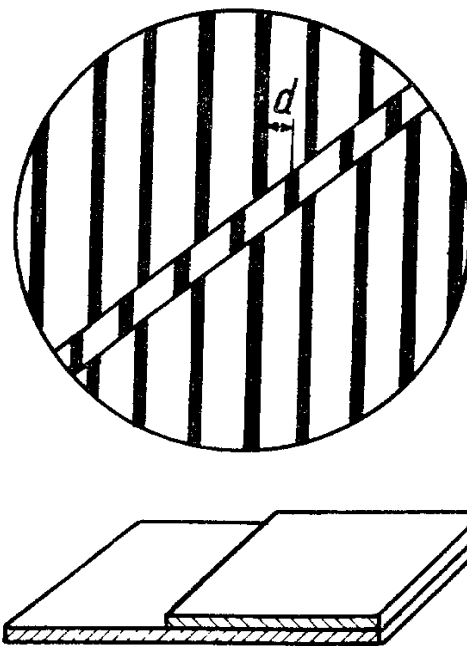


Рис. 24. Изображение ступени (вертикального уступа) в интерференционном поле полос

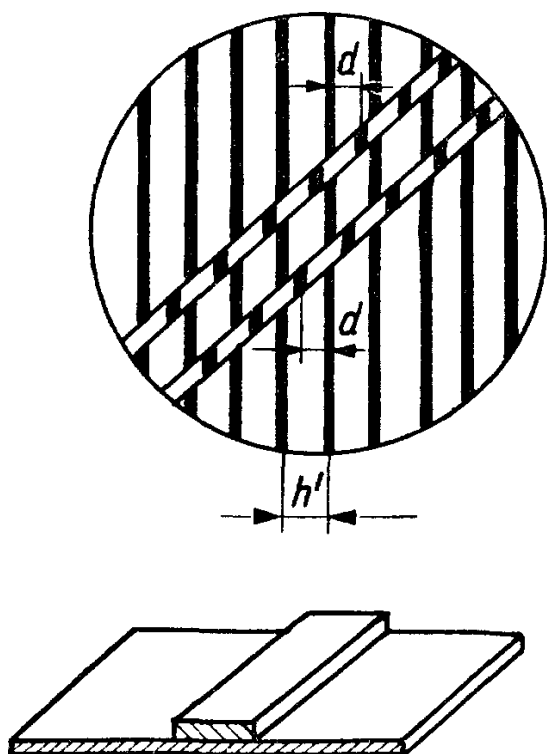


Рис. 25. Изображение борозды в интерференционном поле полос

Вышеописанным способом можно производить измерения разницы оптического пути с точностью порядка $\frac{\lambda}{10}$. Достижение большей точности требует фотографирования интерференционного изображения для более точного определения на микрофотометре или денситометре максимального затемнения интерференционных полос. В этом случае можно получить точность измерения разности оптического пути порядка $\frac{\lambda}{20}$.

Другой метод измерения разности оптического пути в интерференционном поле заключается в измерении величины перемещения $p(p=p_2 - p_1)$ двупреломляющей призмы, которое требуется для максимального затемнения нулевой интерференционной полосой того же самого фрагмента в обоих разделенных изображениях исследуемого объекта (рис. 26). Удлиненные объекты как-то: тонкие волокна, узкие полоски и борозды, следует при этом устанавливать параллельно направлению интерференционных полос.

В этом случае, разность оптического пути может быть выражена следующими формулами:

$$\Phi = \frac{1}{2}(p - p') \frac{\lambda}{h} \text{ для } n > n_1 \quad (16a)$$

$$\Phi = \frac{1}{2}(p+p') \frac{\lambda}{h} \quad \text{для } n < n_1 \text{ и } p > p' \quad (16б)$$

$$\Phi = -\frac{1}{2}(p'-p) \frac{\lambda}{h} \quad \text{для } n < n_1 \text{ и } p < p' \quad (16в)$$

где n является коэффициентом преломления исследуемого предмета, n_1 — коэффициентом преломления иммерсионной среды, λ — длиной волны использованного света, p' — постоянной величиной для данной двупреломляющей призмы, h — межполосным расстоянием двупреломляющей призмы. Межполосного расстояния h не следует мешать с межполосным расстоянием h' , которое было оговорено выше.

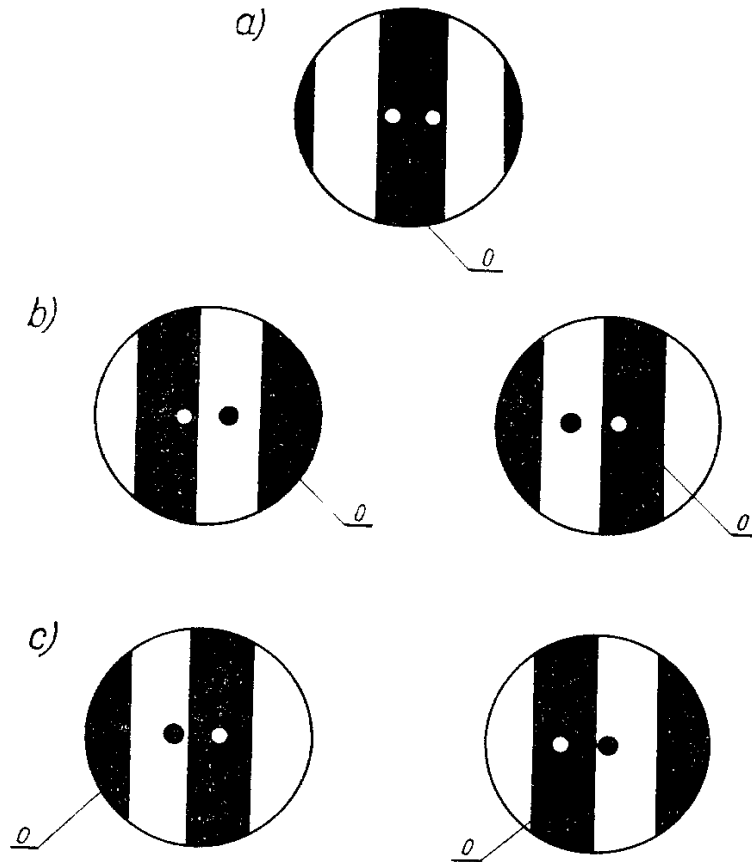


Рис. 26. Способ измерения разности оптического пути в интерференционном поле полос методом затемнения изображений и измерения поперечного передвижения двупреломляющей призмы a — темная нулевая полоса наставлена в центре изображения исследуемого объекта, b — одно изображение исследуемого объекта затемнено нулевой интерференционной полосой (0), c — другое изображение затемнено той же интерференционной полосой (0).

Величина h , которую можно назвать действительной, вытекает из конструктивных данных самой двупреломляющей призмы и определена формулой (1). Для данной длины световой волны она является постоянной величиной и не зависит от кратности увеличения ни объектива, ни окуляра. Значение h и постоянной p' для белого межполосного расстояния монохроматического света с длиной волны $\lambda=590$ нм и $\lambda=546$ нм может быть взято из табл. II или может быть определено вышеописанным способом. Так как значение p' в табл. II подано в микронах, следовательно и перемещение призмы p следует выразить в микронах.

Точность этого метода является порядка $\frac{\lambda}{30}$. Он особенно годится для измерения мелких отдельных объектов, изображения которых ещё совершенно разделены.

2. ИЗМЕРЕНИЕ В ОДНОРОДНОМ ЦВЕТЕ С БОЛЬШИМ РАЗДВОЕНИЕМ ИЗОБРАЖЕНИЯ — ДВУПРЕЛОМЛЯЮЩАЯ ПРИЗМА № 3

Наиболее общим методом измерения разности оптического пути при помощи призм № 3, дающих однородное поле и большое раздвоение изображений, заключается в поперечном перемещении двупреломляющей призмы и приведении окраски одного из раздвоенных изображений к окраске фона поля зрения. При этом наиболее удобно использовать темную полосу нулевого порядка интерференции. Измерение разности оптического пути производится таким образом, что сначала устанавливается для двупреломляющей призмы нулевое положение p_0 , при котором получается максимальное затемнение фона поля зрения микроскопа (рис. 27а), а затем, передвигая призмы в соответственном направлении в положение P_1 максимально затемняется одно из раздвоенных изображений исследуемого объекта (рис. 27б или с). Согласно формулам (3) и (4) разность оптического пути Φ выразится тогда формулой:

$$\Phi = (p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h} \quad (17)$$

где λ является длиной волны примененного света, h — расстоянием между интерференционными полосами двупреломляющей призмы.

Измерение Φ сводится таким образом к отсчету на барабанах микровинта величины перемещения $p_1 - p_0$ двупреломляющей призмы.

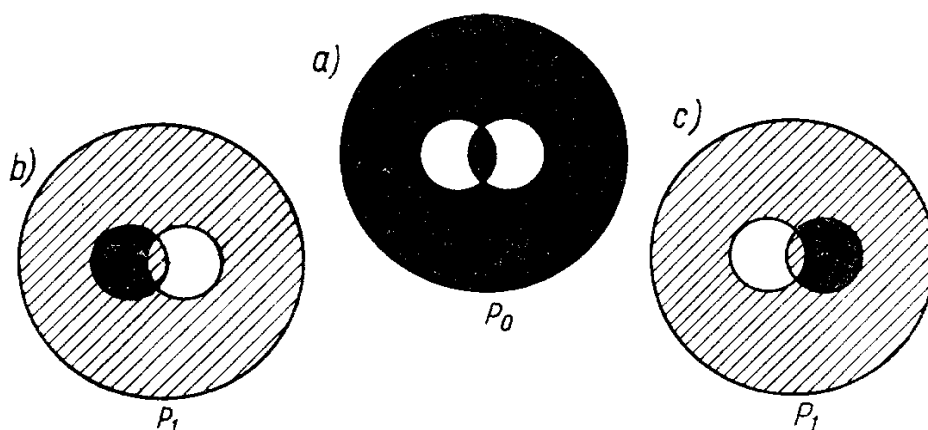


Рис. 27. Измерение разности оптического пути в однородном интерференционном поле методом затемнения одного из раздвоенных изображений исследуемого объекта

Расстояние между двумя интерференционными полосами h определяется способом, описанным выше или принимается по табл. II, если измерения производятся в белом или монохроматическом свете с длиной волны $\lambda=546$ нм и $\lambda=590$ нм. Так как значения h в табл. II приведены в микронах, следует и значение перемещения $p_1 - p_0$ выразить также в микронах, зная, что цена элементарного деления на подвижном барабане составляет 10 мкм, а на неподвижном барабане 1000 мкм.

Для примера допустим, что измерение проводим в монохроматическом свете с длиной волны $\lambda=546$ нм. Отсчитанное на микровинте положение p_0 составляет 4 деления на неподвижном барабане и 34 деления на подвижном барабане, а положение p_1 — 5 делений на неподвижном барабане и 96,5 на подвижном барабане. Определяя перемещение двупреломляющей призмы № 3 в микрометрах получаем $p_1 - p_0 = 5965 - 4340 = 1625$. Тогда разность оптического пути равняется:

$$\Phi = (p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h} = \frac{1625}{830} \lambda$$

Если оба изображения исследуемого объекта совершенно разделены, то более выгодным будет поступать таким образом, что передвигая двупреломляющую призму, затемняем максимально одно изображение, а затем в том же самом месте, второе изображение (рис. 28). В этом случае разность оптического пути выражается формулой:

$$\Phi = \frac{1}{2} (p_2 - p_1) \frac{\lambda}{h} \quad (18)$$

где $p_2 - p_1$ является разностью положений двупреломляющей призмы, при которых максимально затемнено сначала одно изображение, а затем второе. Таким же образом можно поступать также тогда,

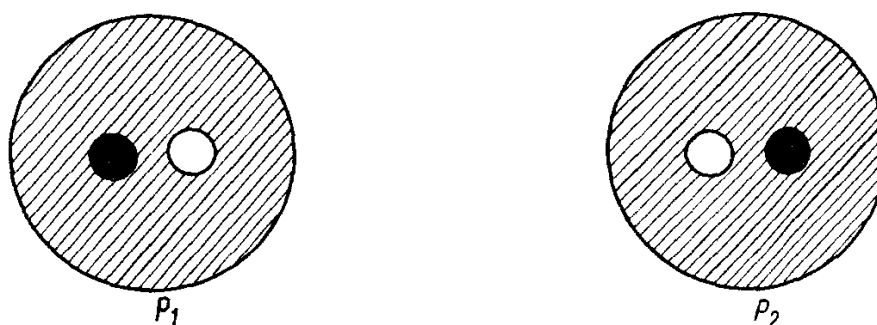


Рис. 28. Измерение разности оптического пути в однородном интерференционном поле методом затемнения одного, а потом другого изображения исследуемого объекта

когда изображения не совершенно разделены (рис. 27), но исследуемый объект однороден в отношении толщины и коэффициента преломления и не является необходимым затемнять изображения точно в том же самом месте. В случае, если разность оптического пути Φ исследуемого объекта меньше длины световой волны ($\Phi < \lambda$), то можно поступать таким образом, что двупреломляющая призма устанавливается в таких положениях p_1 и p_2 , при которых яркость одного, а затем второго изображения исследуемого объекта такая же, как и яркость фона поля зрения (рис. 29). В этом случае разность оптического пути Φ выражается формулой:

$$\Phi = (p_2 - p_1) \frac{\lambda}{h} \quad (19)$$

где $p_2 - p_1$ является разностью положений двупреломляющей призмы, при которых одно, а затем второе изображение становится невидимым.

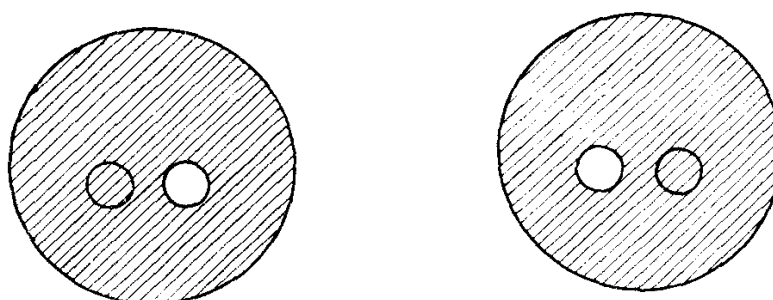


Рис. 29. Измерение разности оптического пути в однородном интерференционном поле методом гашения (уравнивания с яркостью или цветом фона) одного, а потом другого изображения исследуемого объекта

Если в поле зрения микроскопа находится только одно из изображений (например, при измерениях на уступе), то уравнивая яркость этого изображения с фоном поля зрения, получаем половинное значение перемещения $p_2 - p_1$ и разность пути Φ вычисляется по формуле:

$$\Phi = 2(p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h} \quad (20)$$

где p_0 отвечает установке призмы на максимально темный фон, а p_1 — установке, при которой изображение и фон одинаково светлы. Установка призмы на одинаковую яркость фона поля зрения и изображения исследуемого объекта более чувствительна, чем установка на максимальное затемнение, и поэтому, в некоторых случаях, измерение при помощи этого метода может быть более точным. Такое измерение возможно, однако, только в том случае, если исследуемый объект не дает большой разности оптического пути чем 1λ .

Поскольку максимальное значение раздвоения r для призмы № 3 составляет 6,5 мкм, то диаметр зоны, в которой можно вышеперечисленными методами производить измерение разности оптического пути, в каждой точке исследуемого объекта составляет 13 мкм (применяя поворот столика). Следовательно он меньше, чем в случае призмы с интерференционными полосами № 2. Однако точность измерений разности оптического пути посредством призмы № 3 значительно больше и в благоприятных условиях может быть равной $\lambda/80$.

В случае тонких слоев, плиток или пленок, измерения разности оптического пути посредством призмы № 3 можно производить на соответственно узких полосках, уступах и бороздах с острыми краями, установленных более или менее параллельно преломляющей грани двупреломляющей призмы. Тонкие волокна и продолговатые объекты следует также установить таким образом.

Для примера на рис. 55 представлен способ измерения разности оптического пути красных кровяных шариков (сравнить с рис. 27 а, б, с).

Вышеописанные методы имеют однако, некоторые отрицательные стороны. Итак, при первом методе, использующем максимальное затемнение сначала одного раздвоенного изображения, а затем второго, визуальная оценка максимального затемнения изображения является до некоторой степени субъективной. Вытекает это из того, что человеческий глаз не является особенно чувствительным к восприятию минимальной яркости (максимального затемнения) поля или его фрагмента.

Второй метод заключающийся в уравнивании яркости одного, а затем второго изображения с яркостью фона поля зрения, может при-

меняться только в случае очень тонких однородных объектов. В биологических исследованиях, при которых выступают неоднородные препараты, может найти применение только первый метод.

Наоборот, человеческий глаз очень хорошо оценивает равенство яркости двух соседних полей. На этом основании построена специальная насадка с полутеневым окуляром, делающая возможным произведение измерений разности оптического пути более точным образом, чем при применении метода максимального затемнения раздвоенных изображений.

Основным элементом насадки является полуволновая пластинка, помещенная в предметной плоскости окуляра. Исследуемый объект устанавливается посредством передвижения столика так, чтобы одна из граней полосы полуволновой пластинки разделяла на две части раздвоенные изображения этого объекта.

Измерение разности оптического пути производится путем поперечного передвижения призмы w_1 и установки её в двух положениях, при которых яркость одного раздвоенного изображения, а затем второго изображения в пространстве полуволновой пластинки и за её пределами является такой же самой. Производится отсчет обоих положений p_1 и p_2 призмы и высчитывается разность оптического пути по формуле (18).

При этом, микроскопная насадка с полутеневым окуляром сконструирована таким образом, что делает возможным одновременное наблюдение интерференционного изображения исследуемого объекта и наблюдение выходного зрачка объектива. Для этой цели служит включаемая отрицательная линза. При включенном положении этой линзы насадка дает возможность производить наблюдение интерференционного изображения и уравнивания его яркости. Применение микроскопной насадки с полутеневым окуляром делает возможным измерение разности оптического пути с точностью порядка $\lambda/500$.

Примечание: применяя насадку с полутеневым окуляром следует выключить анализатор А (рис. I). Роль этого анализатора выполняет анализатор в насадке с полутеневым окуляром.

3. ИЗМЕРЕНИЕ В ОДНОРОДНОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОМ ПОЛЕ — ДВУПРЕЛОМЛЯЮЩАЯ ПРИЗМА № 1

Как известно, разность оптического пути Ψ между обыкновенной волной и необыкновенной в дифференциальном интерференционном изображении не выражает непосредственно разности пути Φ в предмете, а только градиент этой разности в направлении раздвоения интерференционных волн (рис. 8).

В этом случае, нельзя разности оптического пути Ψ в изображении отождествлять с разностью пути, вызванной исследуемым предметом. Измерение разности оптического пути Ψ в дифференциальном изображении также наиболее удобно производить в однородном темном цвете нулевого порядка интерференции. При наводке двупреломляющей призмы на однородный темный фон поля зрения (нулевое положение призмы p_0), в изображении данного предмета (с размерами превышающими значение раздвоения τ) почти всегда выступает такое место (или несколько мест), в котором цвет такой же самый, как цвет фона поля зрения (смотри рис. 47). В этих местах фронты интерференционных волн взаимно прилегают (касаются один другого) и сдвиг фазы равен нулю. Желая измерять Ψ в любом ином месте исследуемого объекта, следует переместить двупреломляющую призму в такое положение p_1 при котором это место принимает максимально темную окраску. Тогда разность оптического пути в этом месте выразится зависимостью:

$$\Psi = (p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h} \quad (21)$$

Следовательно, измерение Ψ сводится, как и прежде, к отсчету при помощи микровинта перемещения призмы $p_1 - p_0$. Расстояние между двумя интерференционными полосами h определяется способом, описанным выше.

Измеряя разность оптического пути в дифференциальном изображении можно затем определить падение (градиент) этой разности пути в предмете (формула 12), угол соприкосновения (формула 13), кривизну (формула 14), коэффициент преломления света (формула 13) и ряд иных величин.

При благоприятных условиях наблюдения, при применении этого метода можно достичь точности измерения разности пути Ψ порядка $\lambda/250$.

Раздел 6

ИЗМЕРЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ПРЕЛОМЛЕНИЯ И ТОЛЩИНЫ

1. ОЦЕНКА ВЕЛИЧИНЫ КОЭФФИЦИЕНТА ПРЕЛОМЛЕНИЯ ПО ОТНОШЕНИЮ К СРЕДЕ

Предположим, что исследуемый объект B (рис. 30) с неизвестным коэффициентом преломления n находится в иммерсионной среде с известным коэффициентом преломления n_1 . Желая определить коэффициент преломления n , необходимо сначала устано-

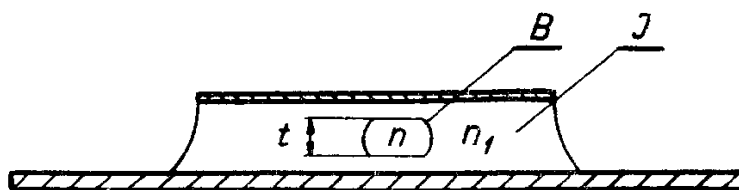


Рис. 30

вить, является ли он большим или меньшим, чем коэффициент преломления n_1 окружающей иммерсионной среды J . В фазово-контрастном микроскопе эта задача решается моментально, наоборот, в случае интерференционного микроскопа ответ не является немедленным и требует некоторого анализа изменения интерференционной окраски или направления отклонения интерференционных полос. Такой анализ наиболее удобно производить в однородном темном цвете или при помощи темной полосы нулевого порядка интерференции.

1.1. Дифференциальный метод (призма № I).

Отличительной чертой этого метода — как было упомянуто — является то, что в изображении наблюдаемого объекта с изменяющейся толщиной почти всегда появляется такое место (или несколько мест), в котором окраска такая же самая как окраска фона (смотри, например, рис. 47 и 50). Особенно сильно выступает это при установке двупреломляющей призмы на окраску фона поля зрения микроскопа. При перемещении двупреломляющей призмы в поперечном направлении темный цвет в изображении наблюдаемого объекта тоже будет перемещаться. Направление перемещения этого цвета отвечает или не отвечает направлению передвижения призмы, что зависит от того, является ли коэффициент преломления n исследуемого объекта меньшим или большим, чем показатель преломления n_1 окружающей среды. В случае, если направление перемещения темного цвета в изображении исследуемого объекта отвечает направлению передвижения двупреломляющей призмы (установленной первоначально на темный фон поля зрения), то коэффициент преломления n этого объекта больше, чем коэффициент преломления n_1 окружающей среды. Напротив, если направление перемещения темного цвета в изображении обратно направлению передвижения двупреломляющей призмы, то коэффициент преломления n исследуемого объекта меньше коэффициента преломления n_1 окружающей среды.

1.2. Метод однородного цвета с большим раздвоением изображения (призма № 3).

При этом методе, в качестве отличительной черты для оценки величины коэффициента преломления исследуемого объекта луч-

ше всего принять последовательность затемнения раздвоенных изображений при передвижении двупреломляющей призмы в поперечном направлении. Если при этом последовательность затемнения изображений темным цветом нулевого порядка интерференции отвечает направлению передвижения двупреломляющей призмы, то коэффициент преломления n исследуемого объекта больше коэффициента преломления n_1 окружающей среды — и наоборот, если последовательность затемнения изображений этим цветом обратна направлению передвижения призмы, то коэффициент преломления n меньше n_1 .

1.3. Метод интерференционных полос (призма № 2)

Перемещая двупреломляющую призму, наблюдаем, с которой стороны темной полосы нулевого порядка интерференции получается затемнение одного или другого изображения исследуемого объекта. Если при этом левое изображение затемняется с правой стороны этой полосы, а правое изображение с левой, то коэффициент преломления n исследуемого объекта больше коэффициента преломления n_1 окружающей среды, — и наоборот, если левое изображение затемняется с левой стороны нулевой темной полосы, а правое изображение с правой стороны этой полосы, то коэффициент преломления n меньше n_1 .

Все вышеперассмотренные случаи приведены в табл. III, на основании которой можно оценить, является ли коэффициент преломления исследуемого объекта большим или меньшим, чем коэффициент преломления окружающей среды.

2. ОЦЕНКА МИКРОНЕРОВНОСТИ ПОВЕРХНОСТИ

Допустим, что имеем прозрачную плитку и что на её поверхности находится микроскопическая неровность. Мы хотим установить, является ли она углублением или выпуклостью.

На основании самого только качественного наблюдения микроскопного изображения нельзя сказать ничего совершенно верного, так как часто случается, что та же самая деталь один раз кажется холмиком, а через мгновение долиной и, кроме того, в одном интерференционном цвете она кажется холмиком, а в другом долиной. Однако интерференционные методы позволяют без всяких сомнений установить, с какого рода неровностью мы имеем дело. Нужно однако знать, является ли коэффициент преломления n плитки, на которой находится неровность, большим или меньшим, чем коэффициент преломления n_1 среды, находящейся над плиткой. При выполнении этого условия, наблюдая направление перемещения темного цвета в изображении исследуемой детали (дифференциальный метод) или последовательность затемнения раздвоенных изоб-

ражений (метод однородного цвета с большим раздвоением изображения и метод полос), можно проверить аналогичным образом, как прежде в случае оценки величины показателя преломления, с какого рода микронеровностями мы имеем дело. Отдельные варианты для каждого метода приведены в табл. III.

3. ИЗМЕРЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ПРЕЛОМЛЕНИЯ И ТОЛЩИНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ ПОЛОС И ОДНОРОДНОГО ЦВЕТА С БОЛЬШИМ РАЗДВОЕНИЕМ ИЗОБРАЖЕНИЯ (ПРИЗМЫ № 2 И № 3)

Измеряя вышеописанным способом разность оптического пути Φ исследуемого объекта по отношению к окружающей среде с известным коэффициентом преломления n_1 , можно затем определить по формуле:

$$\Phi = (n_1 - n)t \quad (22)$$

Коеффициент преломления n исследуемого объекта, при условии, что известна его толщина t , или наоборот — толщины t , если известен коэффициент преломления n (рис. 30), причем для $n < n_1$ берется Φ со знаком „+” а для $n > n_1$ со знаком „—”. Следовательно, чтобы не совершить ошибки, необходимо сначала точно установить, описанным прежде способом, является ли коэффициент преломления n исследуемого объекта больше ($n > n_1$) или меньше ($n < n_1$) коэффициента преломления n_1 окружающей среды. В случае, если измерение разности оптического пути будет выполнено в двух иммерсионных средах, например, в воздухе и в воде (или в воде и иной жидкости), коэффициенты преломления которых n_1 и n_2 , известны, то можно одновременно определить как коэффициент преломления n исследуемого объекта так и его толщину t . В этом случае получаем два уравнения:

$$\Phi_1 = (n_1 - n)t \quad \Phi_2 = (n_2 - n)t \quad (23)$$

из которых определяем n и t :

$$n = \frac{\Phi_1 n_2 - \Phi_2 n_1}{\Phi_1 - \Phi_2} \quad t = \frac{\Phi_1 - \Phi_2}{n_1 - n_2} \quad (24)/(25)$$

причем значение разности оптического пути Φ_1 и Φ_2 следует брать, соответственно, со знаком „+” или „—” по вышеприведенному правилу.

Метод двух иммерсий может быть применен только тогда, когда исследуемый объект ведет себя одинаково, как в одной так и в другой иммерсионной среде. Следовательно, иммерсионные жидкости должны быть так подобраны, чтобы толщина и коэффициент преломления исследуемого объекта не изменялись.

Иной метод одновременного измерения толщины и показателя преломления состоит в измерении разности оптического пути для двух длин волн λ_1 и λ_2 разнящихся между собой. Однако, этот метод может быть употреблен только в том случае, если иммерсионная среда характеризуется большой дисперсией коэффициента преломления, а исследуемый объект очень незначительной. В таком случае имеем два уравнения аналогичные уравнениям (23), в которых n_1 и n_2 являются известными коэффициентами преломления среды, соответственно для длины световой волны λ_1 и λ_2 .

Такой жидкостью, имеющей большую дисперсию, является, например, коричневое масло.

Ещё один метод одновременного измерения коэффициента преломления и толщины состоит в измерении разности оптического пути при двух разных температурах, при которых значительно изменяется коэффициент преломления среды, но не изменяется (или изменяется в незначительной степени) коэффициент преломления и толщины исследуемого объекта. Из формулы (22) следует, что если известны толщина t и коэффициент преломления n какого-нибудь эталонного объекта (например, тонкой и узкой стеклянной плитки), то может быть определен коэффициент преломления n_1 любой иммерсионной жидкости.

4. ИЗМЕРЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ПРЕЛОМЛЕНИЯ ПО МЕТОДУ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ (ПРИЗМА № 1)

Возьмем во внимание какой-либо объект B , отличающий мягким падением разности оптического пути (рис. 31). Зная угол касания α в любой точке H этого объекта и измеряя вышеописанным способом

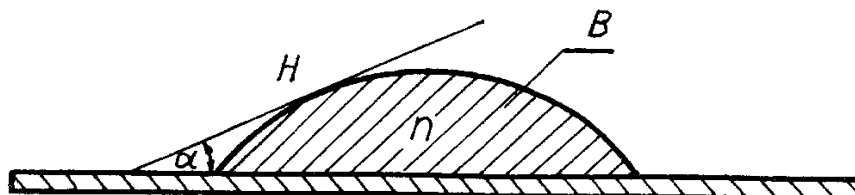


Рис. 31

разность оптического пути Ψ между интерференционными волнами в интерференционном изображении этой точки, можно затем определить коэффициент преломления n объекта B по формуле (13):

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\Psi}{r(n_1 - n)}$$

в которой n_1 — известный коэффициент преломления окружающей среды, r — раздвоение изображения. В вышеприведенной формуле Ψ принимается со знаком „+” для $n_1 > n$ и со знаком „—” для $n_1 < n$

Если измерение разности оптического пути Ψ в данной точке изображения, исследуемого объекта будет произведено в двух разных иммерсионных средах с известными коэффициентами преломления n_1 и n_2 , то можно одновременно определить угол касания α и коэффициент преломления n . В этом случае имеем два уравнения:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\Psi_1}{r(n_1 - n)} \quad \operatorname{tg} \alpha = \frac{\Psi_2}{r(n_2 - n)} \quad (26)$$

из которых определяем n :

$$n = \frac{\Psi_2 n_1 - \Psi_1 n_2}{\Psi_2 - \Psi_1} \quad (27)$$

а затем из одного из уравнений (26) угол α разность оптических путей Ψ_1 и Ψ_2 в формулах (26) и (27) следует принимать со знаком „+” или „—” (в соответствии с правилом, приведенным выше). Для достижения большей точности измерения коэффициента преломления n рекомендуется производить измерения в нескольких точках и брать среднее значение. Конечно, иммерсионные жидкости следует подбирать таким образом, чтобы исследуемый объект не изменял в этих жидкостях своих оптических и геометрических свойств.

Кроме метода двойной иммерсии можно также применять и в этом случае вышеоговоренные методы двух разных длин световых волн и двух разных температур.

Для измерений коэффициента преломления жидкости при помощи дифференциальной призмы (№ 1) предусмотрены специальные рефрактометрические сосуды, поставляемые по специальному заказу пользователя.

Такой сосуд состоит из стеклянной плитки SP (рис. 32), к которой приклеена рефрактометрическая плитка PR с косым уступом, а также вспомогательная плитка PP . Между этими плитками находится узкий канал, в котором помещается капля исследуемой жидкости C , прикрытая микроскопной прикрывающей плиткой SN .

Измеряя разность оптического пути в интерференционном изображении косого уступа рефрактометрической плитки, определяем коэффициент преломления n_1 жидкости C по формуле:

$$n_1 = n \pm \frac{\Psi}{r \cdot \operatorname{tg} \alpha} \quad (28)$$

где n является известным коэффициентом преломления рефрактометрической плитки PR , α — углом косого уступа этой плитки ($\alpha = 45^\circ$), r — раздвоением изображения, зависимым от кратности увеличения объектива (смотри табл. II). Знак „+” в вышеподанной формуле относится к случаю, когда $n_1 > n$, а знак „—” когда $n_1 < n$.

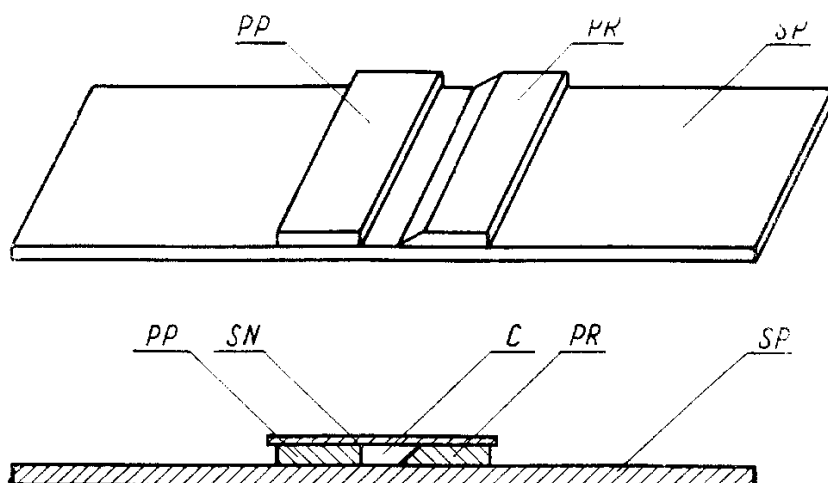


Рис. 32. Сосуд для измерения коэффициента преломления жидкости методом дифференциальной интерференции

PR — рефрактометрическое стекло, *PP* — вспомогательное стекло, *SP* — микроскопное предметное стекло, *SN* — микроскопное покровное стекло, *C* — исследуемая жидкость

Измерение производится при помощи объектива с кратностью увеличения $10\times$.

Рефрактометрические сосуды устанавливаются на микроскопном столике таким образом, чтобы верхняя грань уступа плитки *PR* находилась посередине поля зрения микроскопа и была направлена параллельно преломляющей грани двупреломляющей призмы. Тогда поле зрения микроскопа разделено на две разные части I и II (рис. 33) с разной окраской (при применении белого цвета) и с разной яркостью (при применении монохроматического света).

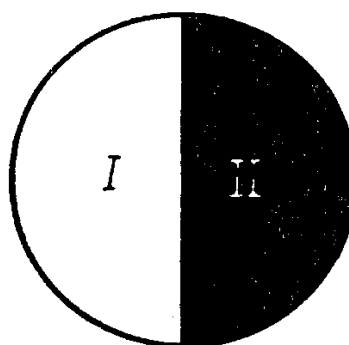


Рис. 33. Поле зрения микроскопа при измерении коэффициента преломления при помощи рефрактометрического сосуда представленного на рис. 32

Измерение разности оптического пути Ψ производится в однородном темном цвете нулевого порядка интерференции, затемняя максимально сначала одну, а затем вторую половину поля зрения или

приводя обе половины к одинаковой яркости. В первом случае разность оптического пути вычисляется по формуле:

$$\Psi = (p_1 - p_0) \frac{\lambda}{h} \quad (29)$$

а во втором, по формуле:

$$\Psi = 2(p_r - p_0) \frac{\lambda}{h} \quad (30)$$

где p_0 является нулевым положением двупреломляющей призмы, при котором достигается максимальное затемнение одной половины поля зрения, являющейся изображением рефрактометрической плитки за пределами уступа, p_1 — положением призмы, при котором достигается максимальное затемнение второй половины поля зрения, являющейся изображением уступа, p_r — положением, при котором обе половины поля зрения принимают одинаковую яркость.

Установка обеих половин на одинаковую яркость возможна только лишь в том случае, если Ψ меньше длины волны примененного света. Установка на максимальное затемнение одной, а затем второй половины поля зрения зависит от визуальной способности распознавания максимума зачернения. Более точной установки двупреломляющей призмы можно достигнуть, наблюдая дифференциальное изображение, появляющееся в фокальной плоскости изображения объектива. С этой целью, в место одного окуляра в бинокулярной насадке вставляется второй вспомогательный микроскоп, который фокусируется на выходном зрачке объектива, где видны оба изображения S_0 и S_1 (рис. 34) щели S (рис. 1). Перемещая дву-

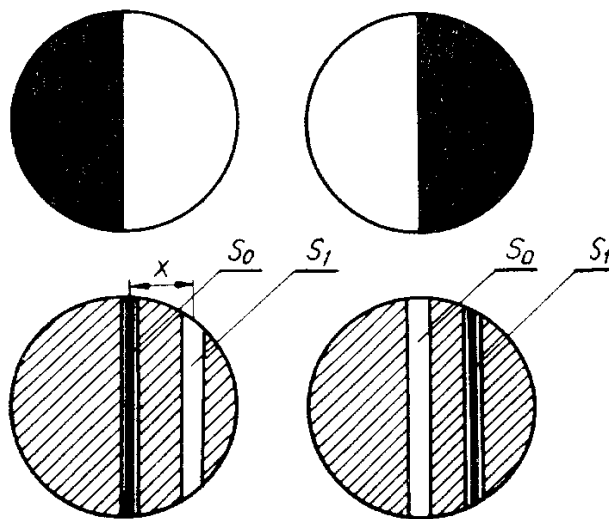


Рис. 34. Способ измерения коэффициента преломления жидкости (при помощи рефрактометрического сосуда, представленного на рис. 32) методом дифференциальной интерференции

преломляющую призму устанавливаем её так, чтобы через середину одного, а затем второго изображения щели проходила нулевая интерференционная полоса. Такая установка отвечает максимальному затемнению одной, а затем второй половины поля зрения и лишена неуверенности, которая выступает при оценке максимума зачернения. Установка нулевой интерференционной полосы точно в центре изображений S_0 и S_1 очень чувствительна и гарантирует установку двупреломляющей призмы с точностью 0,01 мм, что делает возможным производить измерение коэффициента преломления с точностью до 0,0001 мм. Расстояние „ x ” между изображениями щели S_0 и S_1 тем больше, чем больше разность между коэффициентами преломления исследуемой жидкости и рефрактометрической плитки. В случае, если эта разность незначительна, изображения S_0 и S_1 находят на себя и измерение при помощи этого метода делается невозможным.

Рефрактометрических сосудов — два. Они отличаются между собой только коэффициентом преломления n рефрактометрической плитки PR . Эти сосуды представляют собой комплект, посредством которого можно производить измерения коэффициента преломления в диапазоне 1,3—1,8.

5. ИЗМЕРЕНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ПРЕЛОМЛЕНИЯ МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИОНАЛЬНОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ С ПОЛЕМ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ ПОЛОС (ПРИЗМА № 2)

Измерение коэффициента преломления жидкости методом дифференциальной интерференции с полем интерференционных полос (призма № 2) производится применяя вышеописанные рефрактометрические сосуды, коэффициент преломления жидкости определяется по формуле 28. Разность оптического пути выступающая в формуле 28, определяется по формуле 15, измеряя посредством окуляра 12× с микрометрической шкалой ширины полосы h (как описано в разделе 5) и перемещение d интерференционных полос (лучше всего нулевой полосы) в области косого среза.

При измерениях лучше всего применять объектив с увеличением 10×.

Рефрактометрические сосуды устанавливаются на столике микроскопа таким образом, чтобы верхняя грань уступа плитки PR (рис. 32) была направлена параллельно интерференционным полосам в поле зрения микроскопа. Затем движениями микроскопного столика перемещаем рефрактометрический сосуд в направлении перпендикулярном к интерференционным полосам за пределы косого среза и определяем на микрометрической шкале окуляра положение темной нулевой полосы. После произведения отсчета на окулярной

шкале, в поле зрения микроскопа вводится косой срез рефрактометрической плитки PR , производится отсчет перемещения d нулевой полосы. Если перемещение нулевой полосы произошло в направлении исследуемой жидкости, то $n_1 < n$ и значение Ψ вставляем в формулу 28 со знаком „—”, наоборот, если полосы перемещаются в направлении рефрактометрической плитки, то $n_1 > n$ и значение Ψ вставляем в формулу со знаком „+”. (В последнем случае нулевая полоса в границах косого среза и за его пределами может быть наблюдаем одновременно в поле зрения микроскопа).

Для определенного и постоянного положения призмы W_1 в направлении её вертикального движения и для определенной рефрактометрической плитки, выражения $\frac{1}{r \operatorname{tg} \alpha}$ (в формуле 28) и $\frac{\lambda}{h'}$ (в формуле 15) постоянны и, следовательно, формулу 28 можно представить в виде:

$$n_1 = n \pm K \cdot d \quad (28a)$$

где K является постоянной величиной, которую можно легко определить путем измерения отклонения интерференционных полос для какой-нибудь жидкости с известным коэффициентом преломления n_1 при определенном и постоянном (лучше всего максимально верхнем или нижнем) положении призмы W_1 . Для получения большей точности можно применить две или три эталонные жидкости. Более практичным является представить эталонирование микроскопа (определение постоянной K) в виде диаграммы, откладывая на одной из осей прямоугольной системы координат значения коэффициента преломления двух или трех жидкостей, примененных для эталонирования, а на второй соответствующие им величины перемещения нулевой полосы в пространстве косого среза рефрактометрической плитки. Этой диаграммой, как это видно из формулы 28a, является прямая линия, пересекающая ось коэффициентов преломления в точке n отвечающей величине коэффициента преломления примененной рефрактометрической плитки.

В некоторых случаях, когда коэффициент дисперсии исследуемой жидкости определенно отличается от коэффициента дисперсии рефрактометрической плитки, отклоненная темная нулевая интерференционная полоса может иметь окраску, делающую затруднительной её идентификацию.

При таком явлении, для точного определения, какая отклоненная полоса отвечает неотклоненной нулевой полосе, рефрактометрический сосуд устанавливается так, чтобы грань косого среза была направлена под прямым углом к интерференционным полосам, а затем поворачиваем медленно столик и наблюдаем, какая из перемещающихся в пространстве косого среза полос соединяется с темной

нулевой неотклоненной полосой в пространстве, находящемся за пределами косого среза.

Таким образом можно легко безошибочно произвести идентификацию отклоненной нулевой полосы, что является очень важным преимуществом этого метода.

Раздел 7

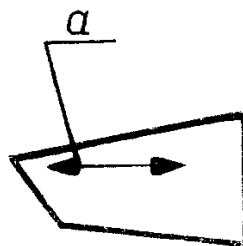
ИЗМЕРЕНИЕ ДВУПРЕЛОМЛЕНИЯ

1. ИЗМЕРЕНИЕ В ПОЛЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫХ ПОЛОС (ПРИЗМА № 2)

Рассмотрим плоскопараллельную удваивающую плитку произвольной формы, вырезанную параллельно оптической оси (рис. 35).

Такая плитка, рассматриваемая в поляризационно-интерференционном микроскопе в поле с интерференционными полосами ведет себя совершенно иначе чем изотропная плитка. Основная разница

Рис. 35. Двупреломляющая плитка
 a — направление оптической оси



выступает в нераздвоенной части изображения. Плоскопараллельная изотропная плитка не вызывает в этой части изображения никаких изменений в характере интерференционного поля, напротив двупреломляющая плитка будет вести себя таким образом только в том случае, когда направление её оптической оси будет составлять угол 45° с направлением интерференционных полос (рис. 36).

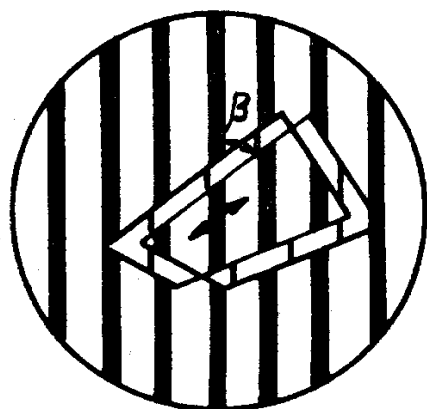


Рис. 36. Двупреломляющая плитка в интерференционном поле полос установлена оптической осью под углом 45° к направлению интерференционных полос

Таких положений плитки имеется четыре. При поворачивании микроскопного столика вместе с плиткой на полных 360° эта ситуация повторяется каждые 90° .

Измеряя при одной из таких установок угол β между направлением интерференционных полос и любой гранью плитки, можно определить направление световых колебаний в двупреломляющей плитке (это направление оптической оси и направлению к ней перпендикулярное). При каждом ином положении плитки в неразделенной области изображения выступает смещение интерференционных полос, причем, если направление оптической оси в плитке является перпендикулярным или параллельным направлению интерференционных полос (рис. 37), то контрастность отклоненных полос максимальна. Отклоненные полосы в неразделенном изображении ничем не отличаются от соответствующих полос в остальной части поля зрения.

Благодаря этому становится возможным легко определить направление оптической оси в двупреломляющих объектах. Удобно при этом пользоваться белым светом. Поступают при этом таким образом,

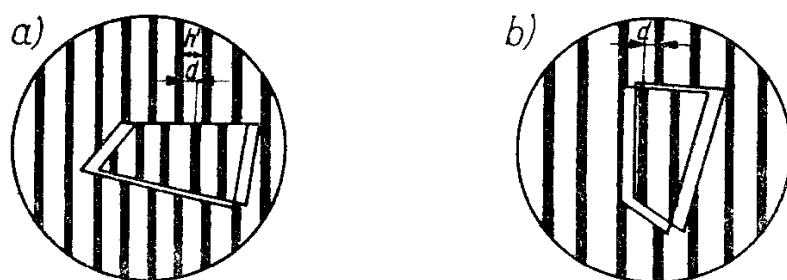


Рис. 37. Двупреломляющая плитка в интерференционном поле полос установлена перпендикулярно (а) и параллельно (б) к интерференционным полосам, а также способ измерения двупреломления методом измерения отклонения d полос

что поворачивая столик микроскопа, устанавливают исследуемый объект так, чтобы отклоненные полосы в неразделенной области изображения этого объекта получили максимальную четкость и такую же окраску как соответствующие полосы в поле зрения.

Если исследуемый объект является, например, двупреломляюще положительным ($n_e > n_o$) и полосы отклоняются в правую сторону (рис. 37а), то направление оптической оси в этом объекте перпендикулярно к направлению интерференционных полос. Наоборот, если полосы отклоняются в левую сторону, то направление оптической оси в исследуемом объекте параллельно направлению интерференционных полос (рис. 37б). Для отрицательного двупреломления ($n_e < n_o$) ситуация — меняется на противоположную.

Устанавливая двупреломляющую плитку так, чтобы ось была направлена перпендикулярно или параллельно направлению её интерференционных полос (рис. 37) и измеряя при одном из этих положений величину отклонения от темной нулевой полосы, а также зная толщину t можно затем определить двупреломляемость $n_e - n_o$ исследуемой плитки из следующей формулы:

$$\delta = (n_e - n_o) t = \frac{d}{h'} \cdot \lambda \quad (31)$$

где n_o и n_e является, соответственно, обыкновенным и необыкновенным коэффициентом преломления, t — толщиной плитки, h' — расстоянием между полосами, λ — длиной волны примененного света.

Разность оптического пути δ , вызываемую двупреломлением можно также определить методом поперечного перемещения двупреломляющей призмы. С этой целью, двупреломляющую призму, дающую поле с интерференционными полосами, устанавливаем в такое положение p_o , чтобы темная нулевая полоса в поле зрения пересекала по прямой линии какое-нибудь определенное место B изображения исследуемого объекта (рис. 38a), а затем, передвигая двупреломляющую призму, устанавливаем её в такое положение p_1 , при котором через выбранное место B проходит та же самая интерференционная полоса (рис. 38b).

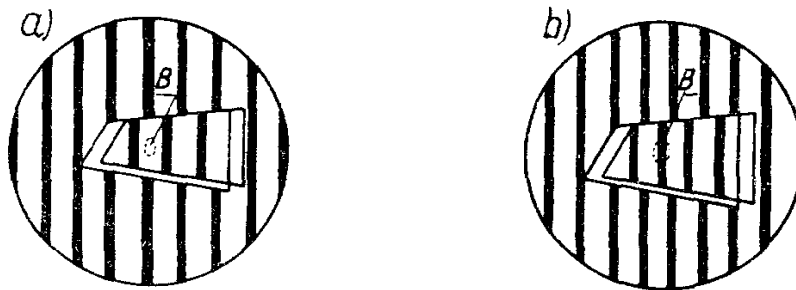


Рис. 38. Измерение двупреломления в интерференционном поле полос методом двупреломляющей призмы

Разность оптического пути δ вычисляется по формуле:

$$\delta = (p_1 - p_o) \frac{\lambda}{h} = (n_e - n_o) t \quad (32)$$

причем h является действительным расстоянием между полосами для двупреломляющей призмы (табл. II, призма № 2). Этот способ позволяет измерять очень большие разности в длине оптического пути δ (до 20λ) и точностью порядка $\frac{\lambda}{20}$.

Коэффициент преломления, обыкновенный n_o и необыкновенный n_e , определяем, устанавливая плитку таким образом, чтобы направление её оптической оси один раз было параллельным, а другой раз перпендикулярным к направлению световых колебаний в поляризаторе (рис. 39).

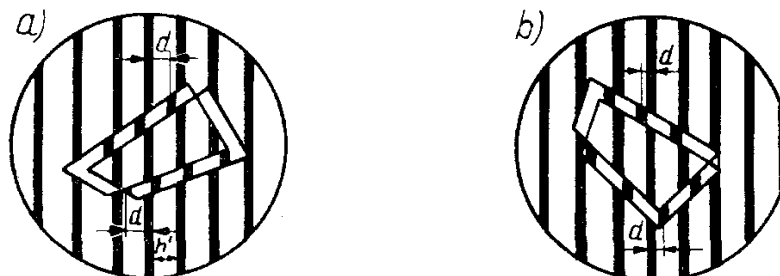


Рис. 39. Измерение коэффициента обыкновенного и необыкновенного преломления двупреломляющей плитки в интерференционном поле полос методом измерения отклонения d полос

Измеряя в обоих случаях отклонение d нулевой полосы в раздвоенной части изображения, вычисляем разность оптического пути Φ для обыкновенного или необыкновенного луча по формуле:

$$\Phi = \frac{d}{h'} \lambda \quad (33)$$

Зная толщину t плитки в месте измерения разности оптического пути Φ , можно затем определить n_o или n_e по формуле:

$$\frac{d}{h'} \cdot \lambda = (n_{oe} - n) t \quad (34)$$

где n является коэффициентом преломления среды, окружающей плитку, n_{oe} — коэффициентом преломления для обыкновенного или необыкновенного луча. Производя измерение разности оптического пути Φ в двух средах с известными коэффициентами преломления n_1 и n_2 можно одновременно определить коэффициент преломления n_o и n_e а также толщину t .

В случае, если двупреломляющая плитка, оптически неактивная, будет вырезана перпендикулярно к оптической оси, то она будет поступать также как и изотропная плитка — в этом случае можно производить измерения только обыкновенного коэффициента преломления n_o . Наоборот, тонкая двупреломляющая плитка, вырезанная наискосок по отношению к оптической оси, будет поступать подобным образом как двупреломляющая плитка, вырезанная параллельно оптической оси с той разницей, что двупреломление такой плитки будет меньше, так как коэффициент преломления для необыкновенного луча не будет иметь в этом случае экстремистского значения.

2. ИЗМЕРЕНИЕ В ОДНОРОДНОМ ПОЛЕ (ПРИЗМА № 1 и 3)

В случае, если двупреломляющая плитка, вырезанная параллельно оптической оси, установлена таким образом, что направление её оптической оси является параллельным или перпендикулярным к направлению световых колебаний в поляризаторе, то в нераздвоенном изображении этой плитки не происходит никакого изменения окраски фона поля зрения.

Следовательно, во время полного оборота столика четыре раза выступает такое положение, когда двупреломляющая плитка в нераздвоенной области изображения принимает такую же окраску и фон поля зрения.

Эти положения называются положениями погасания.

При любой иной установке плитки, не совпадающей с положением погасания, изображение плитки принимает иной цвет (или яркость, если применяется монохроматический свет), причем то же самое изменение цвета во время полного оборота столика выступает четыре раза. Если однако двупреломляющую плитку, от любого положения погасания, повернуть вместе со столиком микроскопа на 45° в одном или другом направлении, то затем, передвигая двупреломляющую призму в поперечном направлении в одну или другую сторону (в зависимости от того, является ли оптическая ось плитки перпендикулярной или параллельной преломляющей грани двупреломляющей призмы), можно цвет в изображении плитки привести к любой исходной окраске фона поля зрения.

Абсолютное значение разности положений p_o и p_1 двупреломляющей призмы, при которых фон поля зрения, а затем нераздвоенное изображение двупреломляющей плитки, принимают тот же самый цвет, является мерой двупреломления $n_e - n_o$ исследуемой плитки:

$$\delta = (p_1 - p_o) \frac{\lambda}{h} = (n_e - n_o)t \quad (35)$$

где t является толщиной плитки.

При помощи дифференциальной призмы № 1 этим методом можно измерять только двупреломление, тогда как при помощи призмы № 3, дающей большое раздвоение изображений, можно производить измерения как двупреломления так и обыкновенного и необыкновенного коэффициента преломления.

Измерение этих коэффициентов преломления производится в раздвоенной части изображения, устанавливая двупреломляющую плитку в двух смежных положениях гашения. Поступают при этом подобным образом как при вышеописанном измерении для изотропных объектов.

Двупреломляющая плитка, оптически неактивная, вырезанная перпендикулярно к оптической оси, в однородном интерференциальном поле ведет себя как изотропная плитка, тогда как тонкая плитка, вырезанная наискось по отношению к оптической оси — так, как плитка, вырезанная параллельно оси.

Раздел 8

ИЗМЕРЕНИЕ СВЕТОПРОПУСКАНИЯ

Поляризационно-интерференционный микроскоп может быть применен не только для исследований совершенно прозрачных фазовых объектов, но также для исследования амплитудных объектов или объектов вообще говоря фазоамплитудных, поглощающих в некоторой степени свет. В отношении таких объектов этот микроскоп может добавочно выполнять роль микрофотометра, при помощи которого можно одновременно с измерением фазового сдвига производить измерение светопропускания исследуемого объекта. Это измерение может быть произведено как в однородном интерференциальном поле так и в поле интерференционных полос с большим раздвоением изображения, причем наиболее удобным является использовать темный цвет или темную полосу нулевого порядка интерференции.

Предположим, что включенная призма 3 установлена на однородный темный цвет фона поля зрения. Фазово-амплитудный объект, поглощающий до некоторой степени свет, и которого попеременные размеры меньше величины раздвоения τ , виден тогда в форме двух светлых разделенных изображений (рис. 40а), т.е. так, как чисто фазовый совершенно прозрачный объект.

Передвигая двупреломляющую призму, в одном или другом направлении, получаем затемнение одного, а затем другого изображения (рис. 40b, c). Однако это затемнение не является максимальным, так как амплитуды интерферирующих волн, вследствие поглощения света исследуемым объектом, не являются одинаковыми в пределах раздвоенных изображений этого объекта. Чтобы выравнять амплитуды в одном или другом изображении и тем самым достичь максимального зачернения (рис. 40d, e), следует повернуть поляризатор в одном или другом направлении (от положения, скрещенного с анализатором) на соответствующий угол γ . Этот угол является мерой светопропускания P .

$$P = \operatorname{tg}^2(45^\circ - \gamma) 100\% \quad (36)$$

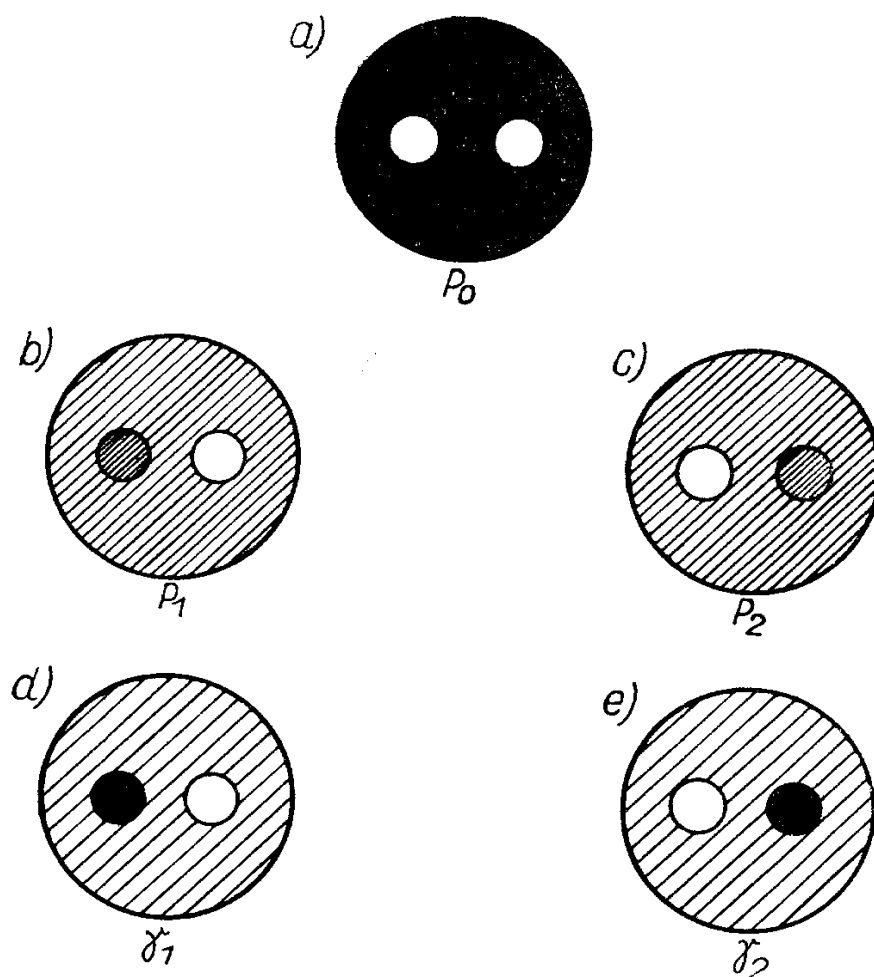


Рис. 40. Способ одновременного измерения разности оптического пути и проницаемости
 а) нулевое положение двупреломляющей призмы, б) выравнивание фазового сдвига в левом изображении, в) выравнивание фазового сдвига в правом изображении, д) выравнивание амплитуды в левом изображении, е) выравнивание амплитуды в правом изображении

При затемнении одной или той же области в одном, а затем в другом изображении наблюдаемого объекта, угол поворота поляризатора в основном должен быть одинаковым. В практике могут однако появиться некоторые разницы. Поэтому, в тех случаях, когда это возможно, необходимо измерение светопропускания произвести на обоих изображениях исследуемого объекта и взять среднее значение от обоих измерений. Рекомендуется при этом поступать следующим образом:

При скрещенных поляризаторе и анализаторе, передвигаем двупреломляющую призму в поперечном направлении и затемняем одно из изображений (рис. 40b), а затем, поворачивая поляризатор в соответственном направлении, устанавливаем поляризатор в такое положение γ_1 , при котором это изображение становится максимально зачерненным (рис. 40d). Положение это отсчитываем на угловой шкале и устанавливаем поляризатор снова в исходное положение (рис. 40b). Передвигая двупреломляющую призму в противоположном направлении, затемняем второе изображение (рис. 40c), которое затем также как и предыдущее максимально затемняем, поворачивая поляризатор в обратном направлении, и отсчитываем второе положение поляризатора γ_2 (рис. 40e). Разность $\gamma_2 - \gamma_1$ разделенная на 2 дает угол γ ; подставляя его значение в формулу (36) вычисляем светопропускание P . Для примера допустим, что $\gamma_1 = 29^\circ$, а $\gamma_2 = 60^\circ$. В таком случае:

$$\gamma = \frac{\gamma_2 - \gamma_1}{2} = \frac{31}{2} = 15,5^\circ$$

т.е. $P = \operatorname{tg}^2(45 - 15,5) \cdot 100\% = \operatorname{tg}^2 29,5^\circ \cdot 100\% = 23\%$

Если при этом произведется отсчет положений призмы p_1 и p_2 , при которых выступает максимальное затемнение изображений, то одновременно можно измерить фазовый сдвиг световой волны, проходящей через исследуемый объект.

В случае применения призмы № 2, дающей поле с интерференционными полосами, измерение светопропускания производится подобным образом; т.е., сначала, при скрещенных анализаторе и поляризаторе, затемняя нулевой интерференционной полосой одно изображение, которое затем максимально гасится соответственным поворотом поляризатора, после чего то же самое производится со вторым изображением.

До сих пор было принято, что изображения исследуемого объекта совершенно разделены. Вполне понятно, что совершенное разделение изображений является обязательно только для оптически неоднородных областей (как в отношении фазового смещения так и амплитуды проходящей световой волны). В случае же однородных объектов, таких как: тонкие слои, плитки или пленки это условие обязательно должно быть выполнено и достаточным является только частичное раздвоение изображений. В таком случае можно производить измерения как светопропускания так и фазового смещения на трех основных типах проб, т.е. на пороге (рис. 23), ступени (рис. 24) и борозде (рис. 25). Из этих проб наименее выгодной является ступень, так как измерения можно производить на одном изображении. В таких случаях необходимо точно определить скрещенное положение поляризатора, при котором достигается максимальное затемнение фона поля зрения. Это положение может в незначитель-

ной степени отличаться от положения, обозначенного на угловой шкале поляризатора делением со значением 45 или 135, отмеченного красным крестиком. Этот случай можно однако привести к случаю двух изображений путем поворота столика с препаратом на 180° . Тогда, при одном положении, получаем, например, обыкновенное изображение, а при втором — необыкновенное. Таким образом можно однако поступать только при применении метода однородного цвета — (призма № 3); при этом следует обращать внимание на то, чтобы после поворота столика исследуемый фрагмент объекта был установлен, по мере возможности, в том же самом месте поля зрения микроскопа.

Отсчет угла поворота поляризатора

Поляризатор (рис. 13) снабжен угловой шкалой 19, нанесенной каждые 5° и описанной в двух противоположных направлениях, от 0° до 180° . Двусторонний нониус 20 и 21 позволяет отсчитывать угол с точностью до 1° . Значение поворота поляризатора с точностью до 5° отсчитывается на угловой шкале пользуясь указателем \blacktriangledown , а с точностью до 1° на том из двух нониусов 20 и 21, которого деление, считая от указателя \blacktriangledown , направлены в сторону увеличивающихся значений угловой шкалы 19. Итак, например, на рис. 13 поляризатор установлен на 45° , так как на угловой шкале мы имеем 45° (указатель \blacktriangledown находится за значением 45°), а на левом нониусе 20 (именно его деления направлены в сторону растущих значений угловой шкалы 19), пятый штрих совпадает со штрихом шкалы 19.

Раздел 9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУХИХ ВЕЩЕСТВ КЛЕТОК

Принимаем, что биологическую клетку можно рассматривать как однородную плитку с толщиной t (рис. 30), погруженную в водяной среде. В таком случае, разность оптического пути Φ_w между светом, проходящим через клетку и светом, проходящим мимо неё, равна

$$\Phi_w = (n_w - n) t \quad (37)$$

где n является коэффициентом преломления внутриклеточного вещества, n_w — коэффициентом преломления воды.

С другой стороны, между коэффициентом преломления n_w растворителя (в данном случае воды) и концентрацией c , выраженной

количеством m граммов вещества, растворенного в 100 миллилитрах раствора, существует зависимость:

$$n - n_w = \delta \cdot c \quad (38)$$

Коэффициент δ называемый удельным приростом коэффициента преломления (по англ. „specific refractive increment”), для большинства биологических веществ равен 0,0018.

Концентрация c в соответствии с вышеподанным определением может быть представлена так:

$$c = \frac{100 m}{A \cdot t} \quad (39)$$

где A является поверхностью проекции клетки в плоскости, перпендикулярной к направлению прохождения света через клетку.

Из вышеописанных трех зависимостей получаем следующее выражение для количества граммов m сухих веществ находящихся в клетке:

$$m = \frac{\Phi_w \cdot A}{100 \cdot \delta} \quad (40)$$

Следовательно, измеряя разность оптического пути Φ_w вышеописанным способом (в однородном интерференционном поле с большим раздвоением изображения или в поле интерференционных полос) и зная из планиметрических измерений величины поверхности A клетки, можно непосредственно из формулы (40) определить полное количество граммов сухих веществ, находящихся в клетке, погруженной в водяной среде.

В случае, если исследуемый биологический объект является в большой степени неоднородным и в разных местах дает разные фазовые смещения, то полное содержание сухих веществ вычисляется путем суммирования парциальных содержаний, в определенных отдельных фрагментах, которые могут считаться почти однородными.

Во многих случаях, особенно при сравнительных исследованиях, достаточно знать количество сухих веществ приходящихся на единицу поверхности:

$$m' = \frac{m}{A} = \frac{\Phi_w}{100 \cdot \delta} \quad (41)$$

В таком случае измерение сводится к измерению разности оптического пути Φ_w . Зная содержание сухих веществ на единицу поверхности и толщину клетки, можно определить концентрацию c находящегося в ней вещества:

$$C = \frac{m'}{t} = \frac{\Phi_w}{100 \cdot \delta \cdot t} \quad (42)$$

Толщину клетки или иного биологического объекта можно определить, между прочим, вышеописанным способом (раздел 6), применяя метод двойной иммерсии или двух длин световых волн. Формулы (40), (41) и (42) правильны только в отношении биологических объектов, погруженных в водяной среде. В случае, когда клетка находится в другой, чем вода среде, причем эта среда не проникает в клетку, то количество сухих веществ следует вычислять по формуле.

$$m = \frac{\Phi_s \cdot A}{100 \cdot \delta} + (n_s - n_w) \frac{A \cdot t}{100 \cdot \delta} \quad (43)$$

где Φ_s является разностью оптического пути клетки относительно к среде, n_s — коэффициентом преломления этой среды.

Следовательно, для определения содержания сухих веществ в клетке, помещенной в неводяной среде, необходимо знать толщину клетки t . Если однако коэффициент преломления n_s иммерсионной среды отличается только в незначительной степени от коэффициента преломления воды n_w , то второй член вышеуказанной формулы ничтожно мал по сравнению с первым членом и в этом случае в качестве толщины t клетки достаточно принять оценочное значение, определенное приближительными методами (например, путем измерения диаметра клетки, если она имеет более или менее шарообразную форму).

Дело обстоит немного иначе, если среда проникает в клетку. В этом случае клетку можно рассматривать как совокупность частиц цитоплазмы, равномерно распределенных в некотором замкнутом пространстве, через которое проникает среда (рис. 41a). Разность



Рис. 41

оптического пути Φ_s , вызванная целой клеткой, является в таком случае эквивалентной разности оптического пути, которая была бы вызвана тонким слоем тесно „упакованных” частиц, цитоплазмы (рис. 41b), имеющим такую же поверхность A , какую имеет клетка.

Пусть n_c будет коэффициентом преломления частиц цитоплазмы, n_s — коэффициентом преломления иммерсионной среды, t — геометрической толщиной клетки, f — частью объема клетки, незанятой частицами цитоплазмы. Если из иммерсионной среды в клетку

проникает только вода, то в таком случае разность оптического пути Φ_s , вызванная клеткой, по отношению к среде s будет равна:

$$\Phi_s = (n_c - n_s)t(1-f) - (n_s - n_w)t \cdot f \quad (44)$$

а формула (38) в этих условиях будет иметь следующий вид:

$$n_c - n_w = \delta \cdot c = \delta \frac{100m}{A \cdot t(1-f)} \quad (45)$$

Соединяя уравнения (44) и (45), получаем следующее выражение для содержания сухих веществ в клетке, в которую из среды проникает вода:

$$m = \Phi_s \frac{A}{100 \cdot \delta} + (n_s - n_w) \frac{t \cdot A}{100 \cdot \delta} \cdot f \quad (46)$$

Наоборот, если в клетку проникает вся иммерсионная среда (как вода, так и растворенные в ней вещества), то в таком случае разность оптического пути Φ_s , будет равна:

$$\Phi_s = (n_c - n_s)t(1-f) \quad (47)$$

а для сухих веществ получаем выражение:

$$m = \Phi_s \frac{A}{100 \cdot \delta} + (n_s - n_w) \frac{A}{100 \cdot \delta} (1-f)t \quad (48)$$

Как видно, для определения сухих веществ клетки, в которую проникает среда, необходимо знать „эффективную” толщину клетки $t' = (1-f)t$. Её можно определить также методом двойной иммерсии.

Для определения сухих веществ клетки, в которую из иммерсионной среды проникает только вода, необходимой является кроме того геометрическая толщина t клетки. Для измерений разности оптического пути клеток и иных биологических объектов можно применять как метод интерференционных полос (призма № 2) так и метод однородного поля с большим раздвоением изображения (призма № 3). Выбор одного или другого метода зависит главным образом от величины исследуемого объекта, желательного раздвоения изображения и конкретных экспериментальных условий. Могут при этом иметь место два случая:

- а) изображения (обыкновенное и необыкновенное) клетки совершенно разделены (рис. 42),
- б) изображения клетки частично разделены (рис. 43).

В первом случае разность оптического пути клетки Φ_s по отношению к иммерсионной среде можно измерить в каждой точке кле-

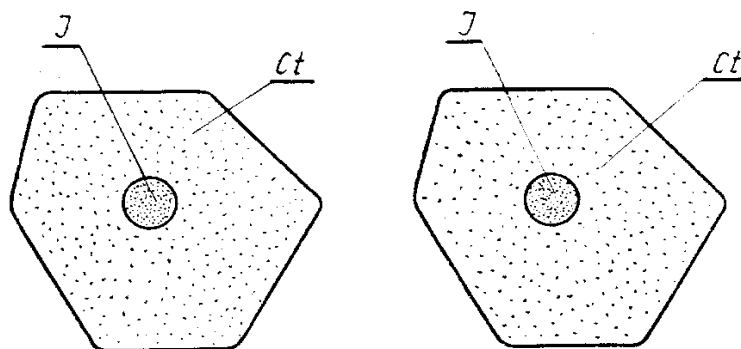


Рис. 42

тки; напротив, во втором случае — только в тех областях, где изображения не находят на себя.

Однако, если имеем дело с клетками, содержащими ядра, то в случае частичного раздвоения изображения клетки можно произвести измерение разности оптического пути самого ядра по отношению к цитоплазме. Величину раздвоения следует при этом подобрать так, чтобы только изображения ядер были раздвоены и чтобы они не выходили за пределы общей области изображения клетки (рис. 43).

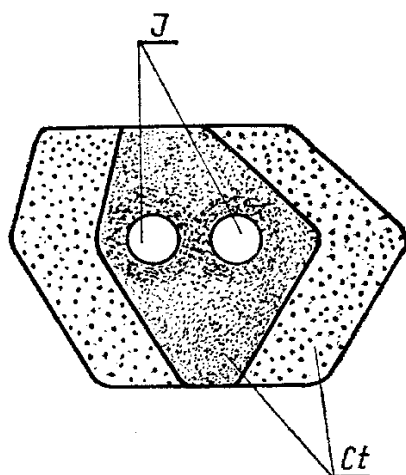


Рис. 43

Наоборот, при полном разделении изображений клетки (рис. 42), в области ядра будет измеряться разность оптического пути ядра по отношению к окружающей клетку среде, однако вместе с цитоплазмой, находящейся над и под ядром, что необходимо учесть при определении сухих веществ ядра.

Пусть Φ_1 будет разностью оптического пути между цитоплазмой C_t в непосредственной близости ядра и окружающей клетку средой

(рис. 44) ; Φ_2 — разностью оптического пути между ядром J , в его центральной области вместе с находящейся под ним и над ним цитоплазмой, и окружающей средой; Φ_3 — разностью оптического пути между самым ядром J и цитоплазмой C_t , окружающей ядро. Ес-

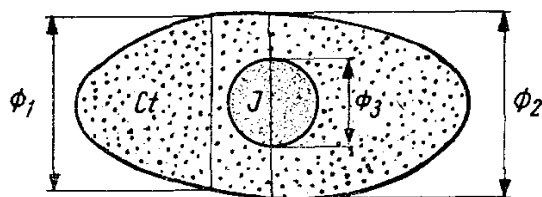


Рис. 44

ли не брать во внимание возможной разницы толщины клетки в месте измерения разностей оптических путей Φ_1 и Φ_2 , правильной является следующая зависимость между Φ_1 , Φ_2 и Φ_3 :

$$\Phi_2 = \Phi_1 + \Phi_3 \quad (49)$$

Следовательно, измеряя Φ_1 и Φ_3 одновременно получаем Φ_2 или измеряя Φ_1 и Φ_2 получаем Φ_3 .

Приведенные здесь общие положения по измерению сухих веществ, коэффициента преломления и толщины клетки, имеют целью только ориентировку читателя в данном вопросе и не могут считаться достаточными. Более точные подробности и практические указания можно найти в литературе, список которой помещен в конце этого описания.

Измерения сухих веществ коэффициента преломления и толщины клеток конечно не исчерпывают всех возможностей микроскопа BIOLAR PI при выполнении измерений в биологических и медицинских исследованиях. Существует целый ряд иных возможностей, как например, измерение светопропускания абсорбционных микрообъектов, измерение градиента разности оптического пути и иных величин, исследования поверхностных явлений и явлений напряжения, измерение диффузии, исследование осмотических реакций, измерение фермы топографии разных объектов и т.д.

Кроме того, поляризационно-интерференционный микроскоп BIOLAR PI дает много интересных и новых возможностей в отношении качественных исследований и наблюдений благодаря, главным образом, его большой пластичности и верности отображения интерференционного изображения (особенно дифференциального), регулировке цветового контраста, возможности плавного перехода от цветового контраста к темному и светлому полю, большой чувствительности примененных в этом микроскопе интерференционных методов, а также возможности наблюдения и исследований как амплитудных так и фазовых объектов.

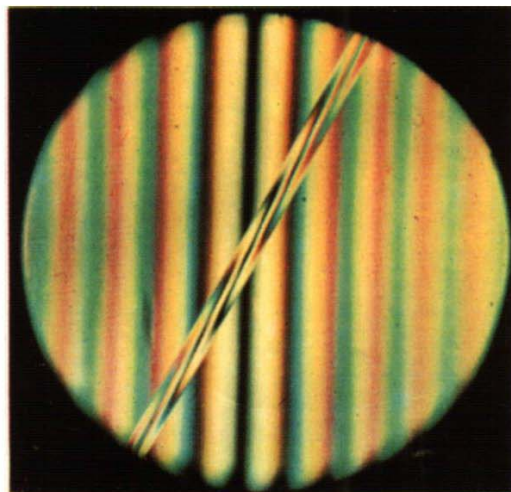
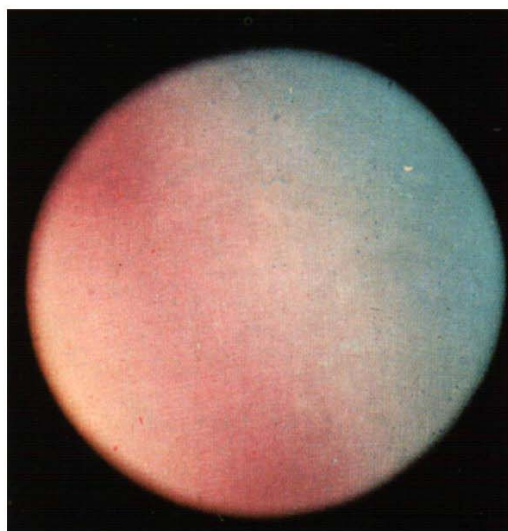


Рис. 45. Интерференционное поле полос в белом свете вместе с раздвоенным изображением волокна канадского бальзама, погруженного в кедровом масле (двупреломляющая призма № 2, объектив с увеличением $10\times$)



a)



b)

Рис. 46. Отрегулирование поляризационно-интерференционного микроскопа на однородно чувствительный цвет 1 порядка интерференции

a) дефектное, b) правильное

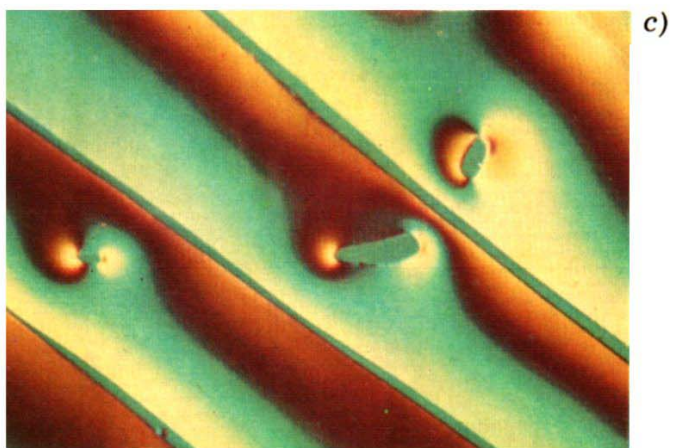
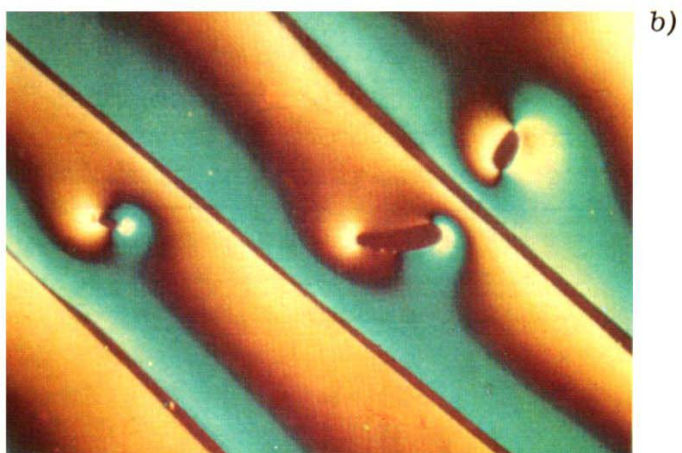
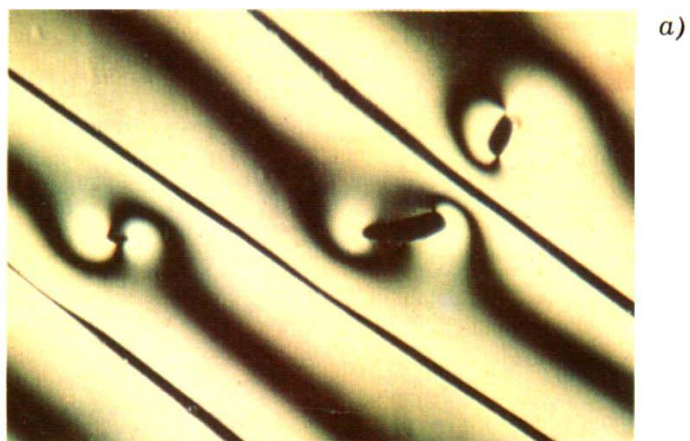
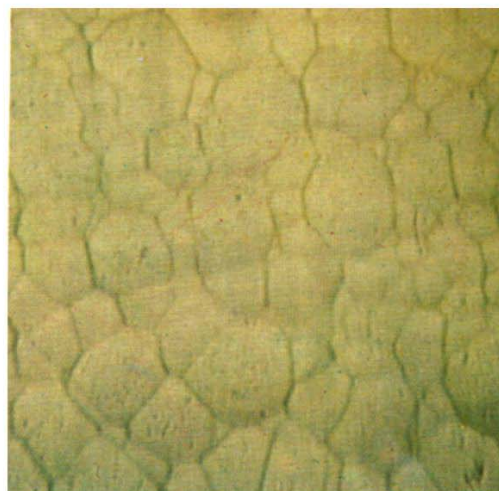


Рис. 47. Изображение волокон полиэфирной смолы в однородном интерференционном цвете
 а) темный, б) пурпурный I порядка, с) голубой I порядка — дифференциальный метод (призма № 1, объектив с увеличением $20\times$)



a)



b)

Рис. 48. Изображение поверхности стеклянной плитки, протравленной фтористоводородной кислотой и залитой водой

a) в дифференциальном, интерференционном поле (призма № I и установленная на однородный чувствительный цвет I порядка),
b) в обычном микроскопе в светлом поле (увеличение объектива $20\times$)

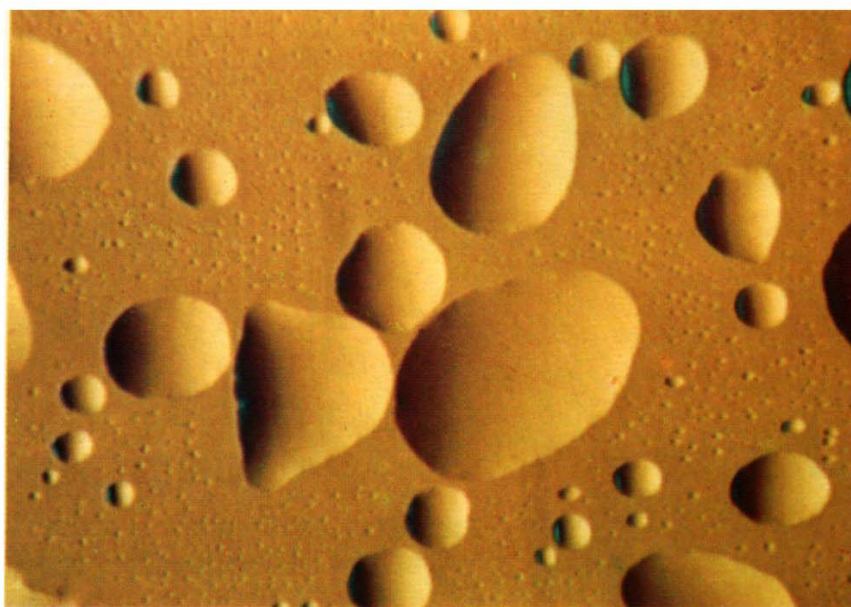
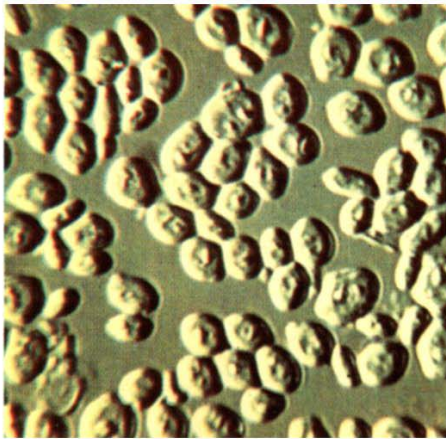
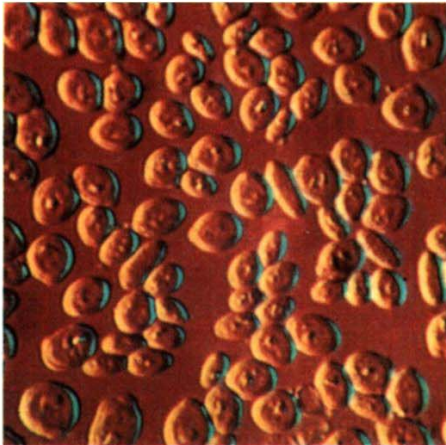


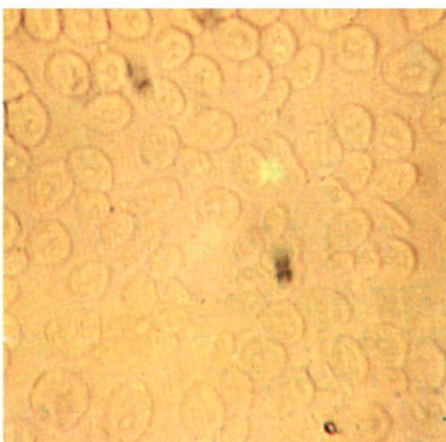
Рис. 49. Изображение капель кедрового масла на микроскопном стекле в однородном желто-оранжевом цвете I порядка интерференции — по дифференциальному методу (двупреломляющая призма № 1, объектив с увеличением $20\times$)



a)



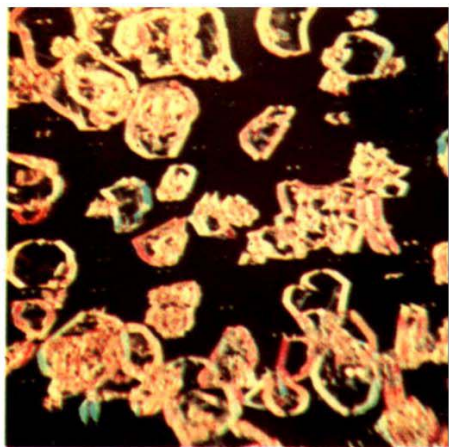
b)



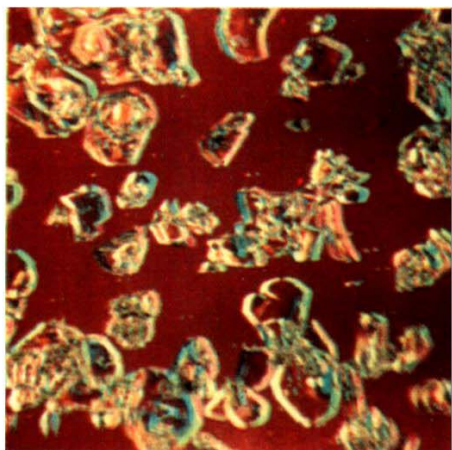
c)

Рис. 50. Изображение клеток дрожжей в водяной среде:

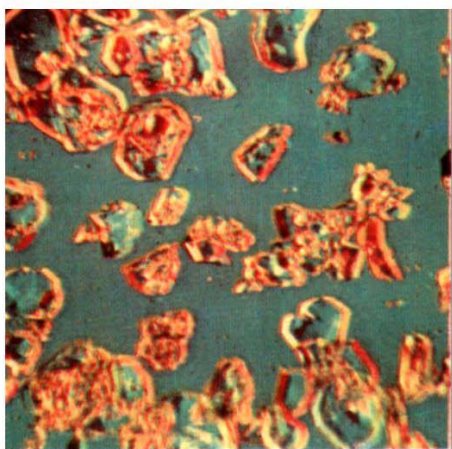
a) в однородном серо-зеленом цвете, b) в однородном чувствительном цвете I порядка интерференции (двупреломляющая призма № I, иммерсионный объектив 100X), c) в обыкновенном микроскопе в светлом поле



a)



b)



c)

Рис. 51. Изображение кристаллов корунда в однородном цвете:

a) темном, b) пурпурном I порядка
c) голубом I порядка — по методу
однородного поля с большим раз-
двоением изображения (призма № 3,
объектив с увеличением 10×)

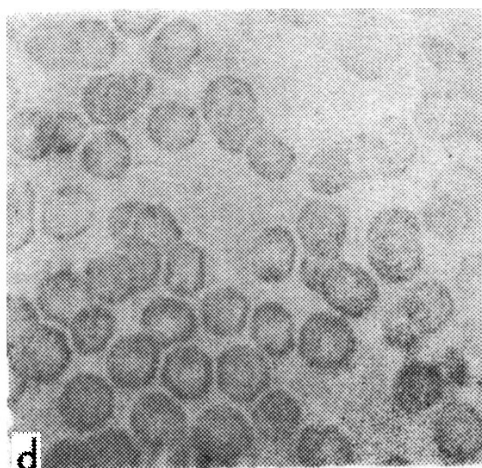
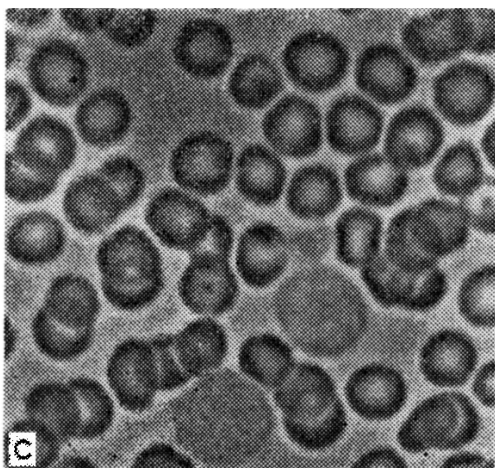
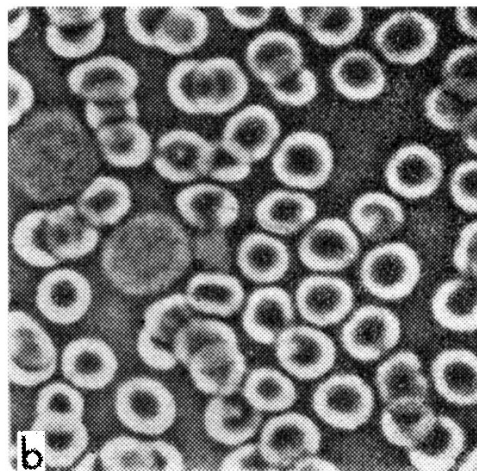
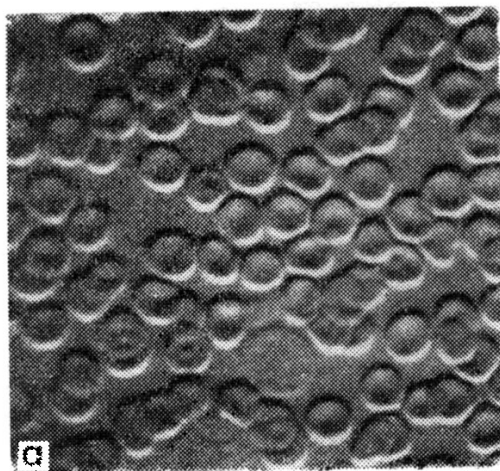


Рис. 52. Изображение кровяных шариков (мазок) залитых кедровым маслом

а) в поляризационно-интерференционном микроскопе в однородном дифференциальном поле (двупреломляющая призма № I), б) в микроскопе с фазовым, отрицательным контрастом аноптрального типа, в) в микроскопе с фазовым, положительным контрастом, д) в обыкновенном микроскопе в светлом поле с сильно прикрытой ирисовой диафрагмой (объектив с увеличением 40×)

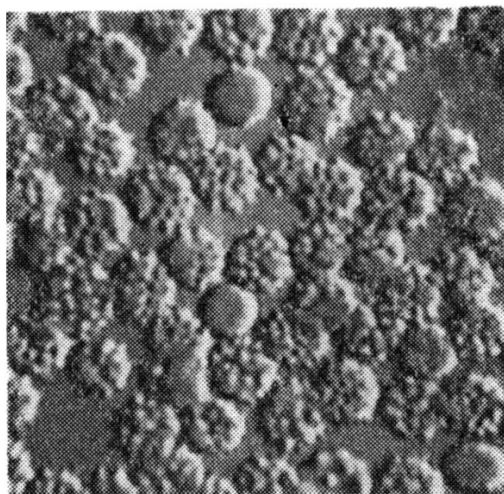


Рис. 53. Изображение кровяных красных шариков, погруженных в водяной, гипертонической среде в поляризационно-интерференционном микроскопе, в однородном дифференциальном поле (двупреломляющая призма № 1)

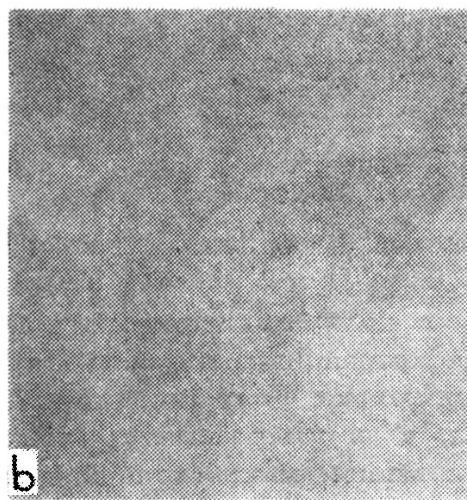
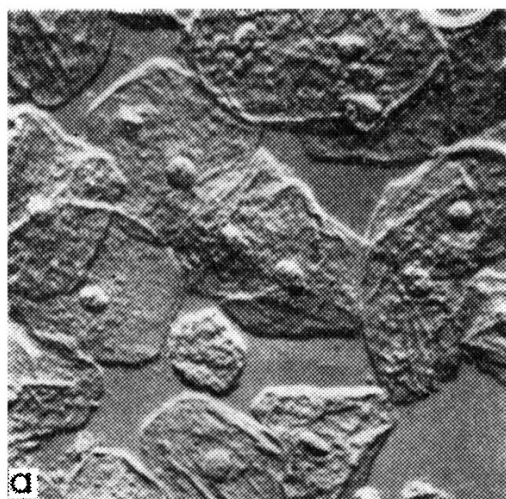


Рис. 54. Изображение эпителиальных клеток с губы, погруженных в слюне

a) в поляризационно-интерференционном микроскопе в однородном дифференциальном поле (двупреломляющая призма № 1), *b)* в обыкновенном микроскопе в светлом поле (объектив с увеличением $20\times$)

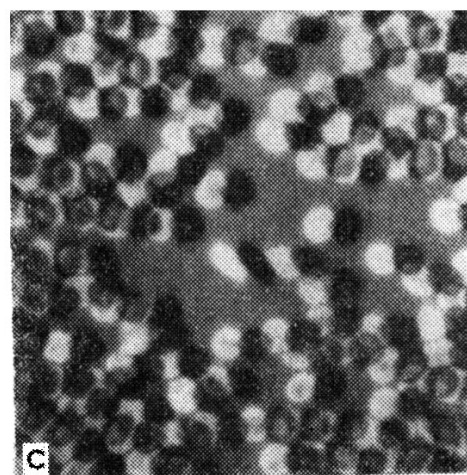
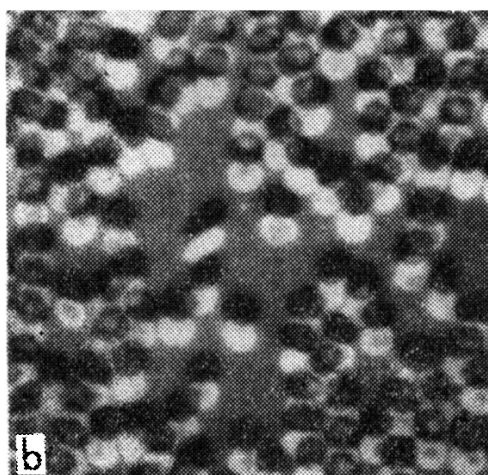
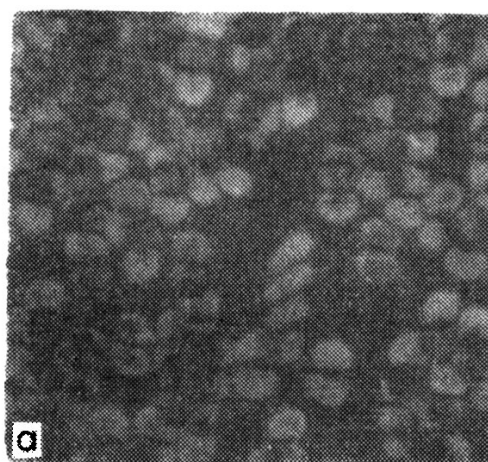


Рис. 55. Изображение красных кровяных шариков, залитых кедровым маслом, наблюдаемое в поляризационно-интерференционном микроскопе с призмой № 3 (однородное поле с большим раздвоением изображения). Способ измерения разности оптического пути методом затемнения раздвоенных изображений (объектив с увеличением $20\times$)

- а) двупреломляющая призма, наставленная на темный фон поля зрения, б) максимально затемненное правое изображение шариков, в) максимально затемненное левое изображение

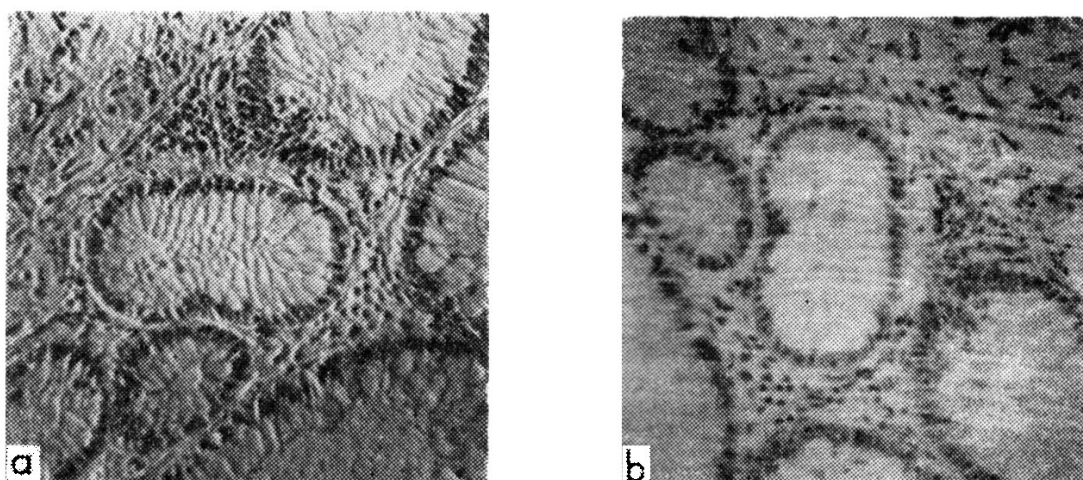


Рис. 56 Изображение гистологического препарата, окрашенного и за-
клеенного канадским бальзамом

a) в поляризационно-интерференционном микроскопе в однородном
дифференциальном поле (двупреломляющая призма № 1), **b)** в обы-
кновенном микроскопе в светлом поле (объектив с увеличением 20×)

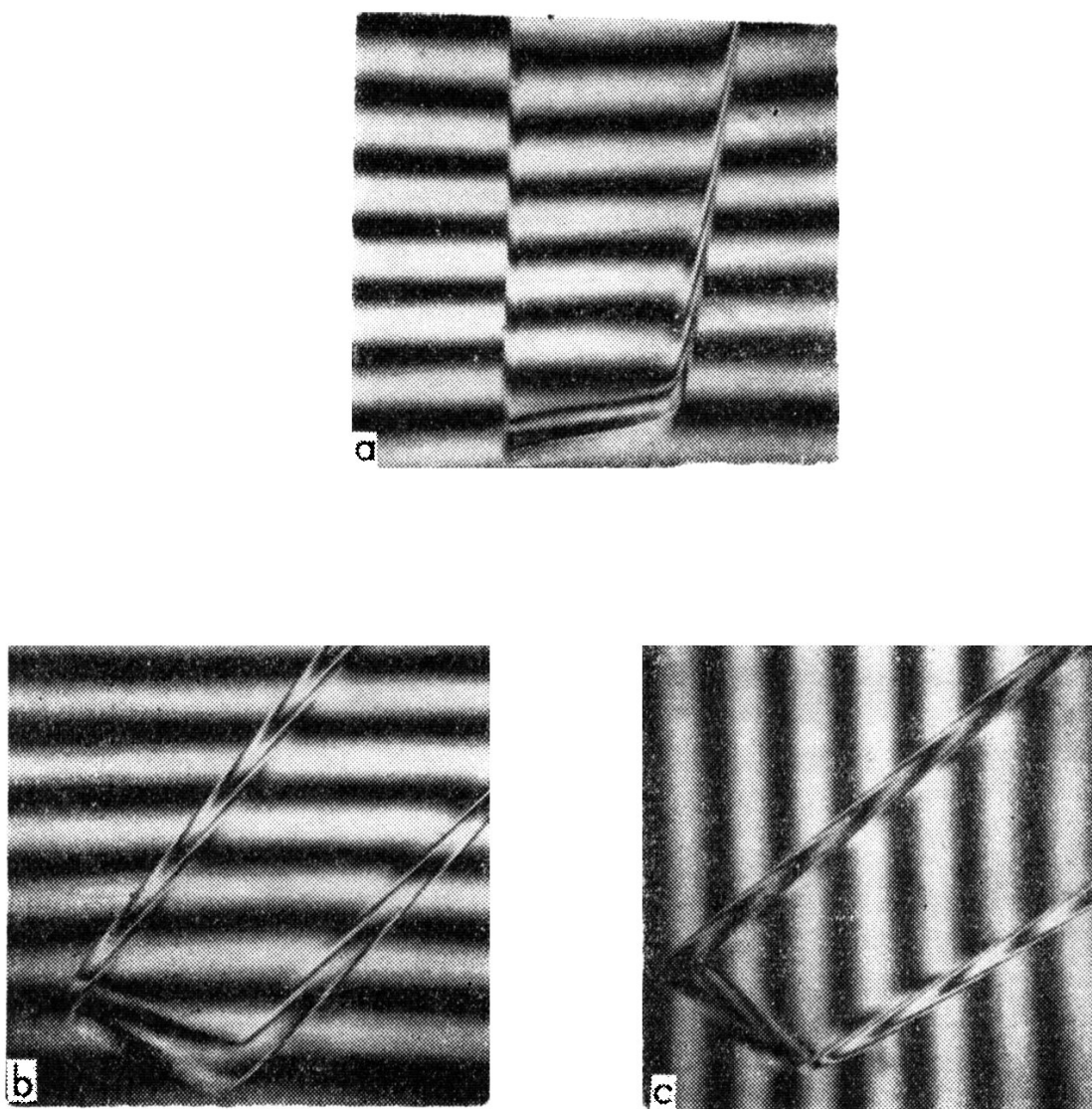


Рис. 57. Изображение двупреломляющей полоски из целлофана в интерференционном поле полос
 а) полоска, установленная оптической осью перпендикулярно к направлению интерференционных полос, б) и с) полоска, установленная оптической осью параллельно и перпендикулярно к направлению колебаний света в поляризаторе (двупреломляющая призма № 2, объектив с увеличением $10\times$)

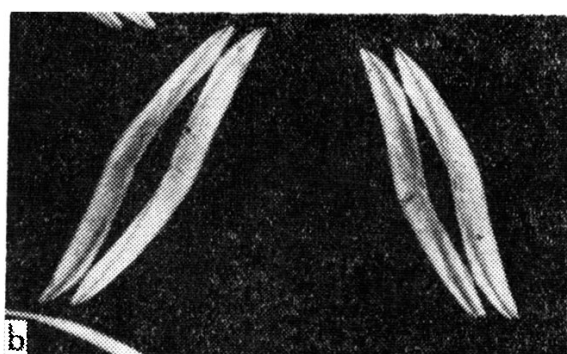


Рис. 58. Изображение диатомовых водорослей „*Pleurosigma angulatum*” в однородном интерференционном поле при разных установках двупреломляющей призмы относительно призмы № 3 (W_1) а) преломляющая грань призмы W_2 создает угол 45° с преломляющей гранью призмы W_1 ; б) направление преломляющего угла Φ_2 призмы W_2 противоположно направлению преломляющего угла Φ_1 призмы W_1 ; в) направление преломляющего угла Φ_2 призмы W_2 одинаково с направлением преломляющего угла Φ_1 призмы W_1 . Увеличение объектива $10\times$. Полное увеличение около $200\times$.

УКОМПЛЕКТОВАНИЕ

1. УКОМПЛЕКТОВАНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО МИКРОСКОПА BIOLAR PI

№№ пп	Наименование	Символ	Цифровой символ	Коли- чество штук
1	2	3	4	5
1	Штатив	B Zs 1	23080701	1
2	Интерференционная головка	UPI Zs 1	25520701	1
3	Крестообразный столик	SK 14 Zs 1	27090701	1
4	Окулярная насадка	MND8 Zs 1	25120701	1
5	Конденсор со щелью	MPI3 Zs 3	25510703	1
6	Поляризационно-ин- терференционный кон- денсор	KPI2 Zs 1	26400701	1
7	Поляризатор в оправе	MPI3 Zs 4	25510704	1
8	Объективный револьвер	RO4 Zs 1	27500701	2
9	Ахроматический объек- тив 10×	Ob 103C Zs	3529	1
10	Ахроматический объек- тив 20×	Ob 203C Zs	3530	1
11	Ахроматический объек- тив 40×	Ob 404 Zs	3539	1
12	Ахроматический объек- тив 100×	Ob 1003C Zs	3532	1
13	Поляризационно-интер- ференционный объек- тив 10×	Ob 103PI Zs	3720	1
14	Поляризационно-интер- ференционный объек- тив 20×	Ob 203PI Zs	3721	1
15	Поляризационно-интер- ференционный объек- тив 40×	Ob 403PI Zs	3722	1
16	Поляризационно-интер- ференционный объек- тив 100×	Ob 1003PI Zs	3723	1
17	Окуляр Гюйгенса 8×	OK8H Zs 1	39310701	2
18	Широкоугольный оку- ляр 10×	OK10SK Zs 1	41200701	2

1	2	3	4	5
19	Ортоскопический окуляр 12,5×	OK7a Zs 0	41300701	2
20	Измерительный окуляр 12×	OK12MO Zs 1	41380701	1
21	Вспомогательный микроскоп	MPh Zs 1	26320701	1
22	Интерференционный светофильтр $\lambda=546\text{нм}$	FI 546 Zs 1	28580701	1
23	Интерференционный светофильтр $\lambda=590\text{нм}$	FI 590 Zs 1	28590701	1
24	Синий светофильтр	MB30 cz 1-05	23040105	1
25	Зелёных светофильтр	MB30 cz 1-06	23040106	1
26	Жёлтый светофильтр	MB30 sz 1-07	23040107	1
27	Матовое стекло	M440 cz 1000	23110101	1
28	Окулярная микрометрическая плитка 10/100	MOL 10/100 cz 1-01	28340101	1
29	Оправа лампы	OS21 Zs 1	26790701	1
30	Лампа 6в/15 вт	OSRAM 8018	0.9.99.0029	5
31	Микроскопный питатель	ZM6/50	2926	1
32	Ключ	B Zs 4	23080704	1
33	Ключик	KPI2 Zs 1-7	26400807	1
34	Ключик конденсора	KFI5 Zs 2	25860702	1
35	Предметный микроскоп	PP1/100 Zs 1-01	28310001	1
36	Флакончик с иммерсионным маслом	SOJ Zs	2874	1
37	Флакончик с удалителем „XYLOL”	SZX Zs	2875	1
38	Кожух тубуса насадки	ON1 cz 1-1	41561001	2
39	Глазная раковина	MM1 cz 1-1	28001001	2
40	Кисточка	<u>ZN-57(MPC)</u> 15-01090	0.9.07-0100	1
41	Фланелевая салфетка IA № 1	<u>ZN-57(MPC)</u> 15-01124	0.9.08.0100	1
42	Упаковка	BP1-F Zs	23920750	1
43	Техническое описание		23922980	1
44	Карта гарантии качества		23922998	1

2. УКОМПЛЕКТОВАНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО УСТРОЙСТВА UPI

№№ пп	Наименование	Символ	Цифровой символ	Коли- чество штук
1	2	3	4	5
1	Интерференционная головка	UPI Zs 1	25520701	1
2	Конденсор со щелью	MPI 3 Zs 3	25510703	1
3	Поляризационно-интерференционный конденсор	KPI 2 Zs 1	26400701	1
4	Объективный револьвер	RO4 Zs 1	27500701	1
5	Поляризационно-интерференционный объектив 10×	Ob 103 PI Zs	3720	1
6	Поляризационно-интерференционный объектив 20×	Ob 203 PI Zs	3721	1
7	Поляризационно-интерференционный объектив 40×	Ob 403 PI Zs	3722	1
8	Поляризационно-интерференционный объектив 100×	Ob 1003 PI Zs	3723	1
9	Поляризатор в кожухе	MPI 3 Zs 4	25510704	1
10	Измерительный окуляр 12×	OK12MO Zs 1	41380701	1
11	Вспомогательный микроскоп	MPh Zs 1	26320701	1
12	Интерференционный светофильтр $\lambda=546$ нм	FI 546 Zs 1	28580701	1
13	Интерференционный светофильтр $\lambda=590$ нм	FI 590 Zs 1	28590701	1
14	Окулярная микрометрическая плитка 10/100	MOL 10/100 cz 1-01	28340101	1
15	Эталонная плитка	PP1/100 Zs 1-01	28310001	1
16	Ключик	KPI 2 Zs 1-7	26400807	1

1	2	3	4	5
17	Ключик конденсора	KF15 Zs 2	25860702	1
18	Кисточка	ZN-57(MPC) 15-01090	0.9.07.0100	1
19	Фланелевая салфетка IA № 1	ZN-57(MPC) 15-01124	0.9.08.0100	1
20	Упаковка	UPI-F Zs	25520750	1
21	Техническое описание		23922980	1
22	Карта гарантии качества		25522998	1

3. ОСНАЩЕНИЕ МИКРОСКОПА BIO-LAR PI ИЛИ ПОЛЯРИЗАЦИОННО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОГО УСТРОЙСТВА UPI, ПОСТАВЛЯЕМОЕ ПО ЖЕЛАНИЮ ЗАКАЗЧИКА

Наименование	Символ	Цифровой символ	Количество штук
1	2	3	4
Рефрактометрические плитки	PRF Zs	4154	1
Микроскопная насадка с полутеневым окуляром	MNOP Zs	2487	1
Планахроматический объектив 10×	Ob 108 Zs	3620	1
Планахроматический объектив 20×	Ob 208 Zs	3627	1
Планахроматический объектив 40×	Ob 408 Zs	3622	1
Планахроматический объектив 100×	Ob 1008 Zs	3623	1
Планкомпенсационный окуляр 8×	Ok 8 PK Zs1	39780701	2
Планкомпенсационный окуляр 16×	Ok 16 PK Zs1	39790701	2
Фотографическая микроскопная насадка 6,5×9 см	MNF Zs	2560	1
Фотографическая микроскопная насадка 24×36 мм	MNFA Zs	2566	1
Соединитель для камеры „Ехаста-Varex”	MNF Zs 8	25600706	1

1	2	3	4
Соединитель для камеры „Practica” — „Contax”	MNF Zs 10	25600707	1
Соединитель для камеры „Leica” — „Zorki”	MNF Zs 12	25600708	1
Галоидный осветлитель	OH Zs	2680	1
Проекционная микроскопная насадка	MNP1 Zs	2541	1
Рисовальный микроскопный окуляр	MOR Zs	2534	1
Монокулярная насадка	MNJ5 Zs	2490	1
Вращающийся столик	SO7 Zs	2717	1
Крестообразная насадка	NK6 Zs	2733	1

Рефрактометрические плитки служат для измерения коэффициента преломления жидкости. Их конструкция и способ измерения описаны в разделе 6 пункт 4.

Микроскопная насадка с полутеневым окуляром MNOP предназначена для увеличения точности и усовершенствования размеров разности оптического пути при методе однородного поля с большим раздвоением изображения. Разность оптического пути можно измерять с почти двукратно большей точностью, т.е. $\lambda/500$.

Способ измерения описан в разделе 5 п. 2.

Планахроматические объективы вместе с компенсационными окулярами гарантируют получение микроскопного изображения высшего качества во всем поле зрения. Применяя планахроматические объективы можно произвести на микроскопе BIOLAR PI все описанные измерения без получения добавочного раздвоения. Планахроматические объективы следует заказывать вместе с компенсационными окулярами.

Устройство для микрофотографии позволяет выполнять снимки микрообъектов на стеклянных плитках $6,5 \times 9$ см, или на порезанных пленках 6×9 см и на рулонных плёнках 24×36 мм.

MNF — фотонасадка для фотографирования микроскопических препаратов на плитках или фотографических пленках $6,5 \times 9$ см. Установка резкости изображения производится путем наблюдения изображения в корректоре резкости (смотровое отверстие фотографической насадки). Время экспозиции устанавливается вручную.

MNFA — фотонасадка для фотографирования микроскопических препаратов на рулонных плёнках 24×36 мм. Установка резкости и экспозиции как в MNF.

Обе насадки, а прежде всего насадка MNFA, имеют соединители для типовых фотокамер:

MNF Zs 8 — для камеры „Exacta-Varex”

MNF Zs 10 — для камер „Practika” и „Contax”

MNF Zs 12 — для камер „Leica” и „Zorki”

Эти соединители не выступают в укомплектованиях MNF и MNFA и поставляются в отдельной упаковке по желанию пользователя в зависимости от обладаемой ним фотокамеры.

Галоидный осветлитель ОН с галоидной лампой 100 вт/12в можно применять вместо осветлителя накаливания, когда необходимо применение сильного источника света, например для выполнения микро-снимка, рисования и т.п.

Проекционная микроскопная насадка MNP1 предназначена прежде всего для дидактических целей. Она позволяет наблюдать микроскопное изображение на экране нескольким лицам одновременно.

Диаметр экрана составляет 140 мм, а собственное увеличение насадки $8\times$ и $12,5\times$.

Соответственная яркость изображения получается через применение галоидного осветлителя НО.

Микроскопный рисовальный окуляр MOR служит для набрасывания эскизов, наблюдаемых под микроскопом объектов, позволяя одновременно наблюдать препарат и острие карандаша.

В окуляр можно вкладывать окулярные микрометры, служащие для измерения препарата. Глазок окуляра можно перемещать в диапазоне, гарантирующем диоптрическую регулировку от -4 до $+3$ диоптрий.

Увеличение окуляра — $10\times$.

Окуляр может совместно работать только с моноокулярной насадкой MNJ5.

Моноокулярная насадка MNJ5 на оси окулярного тубуса, отклоняемая от вертикали на угол 55° .

Увеличение насадки $1\times$.

Вращающийся столик SO 7 предназначен для работ, требующих оборота плитки столика на \pm н. 360° и её установки в произвольно избранном положении. Отобенно рекомендуется для исследований в поляризованном свете. На столике можно закрепить крестовую насадку NK6.

Два регулировочных винта и ключики позволяют центрировать столик в оси микроскопа. Точность отсчета угла оборота — $0,1^\circ$.

Храповой механизм позволяет фиксировать положение верхней плиты каждые $45^\circ \pm 1^\circ$.

Крестовую насадку NK6 можно крепить на столике SO 7.

Она позволяет механически перемещать препарат во взаимно перпендикулярных направлениях в пределах 25×75 мм.

Таблица I

**Интерференционные цвета для разностей оптического пути между
обыкновенной и необыкновенной волной**

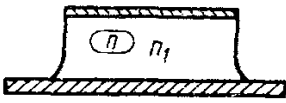
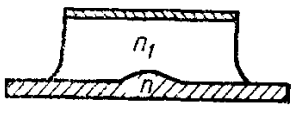
Разность оптичес- кого пути в нм	Скращенные поляризатор и анализатор	Параллельные поляри- затор и анализатор
1	2	3
00	чёрный	белый
40	металло-серый	белый
97	лавандово-серый	жёлтовато-белый
158	серо-синий	жёлтовато-бледный
218	серо-светлейший	жёлто-коричневый
234	зелёновато-белый	бурый
259	белый	красно-светлый
267	жёлтовато-белый	красно-карминовый
275	соломенно-бледный	красно-коричневый
281	соломенно-жёлтый	темно-фиолетовый
306	светло-жёлтый	индиго
332	жёлто-живой	голубой
430	коричнево-жёлтый	серо-голубой
505	красно-оранжевый	голубовато-зелёный
536	красный тёплый	бледно-зелёный
551	тёмно-красный	жёлтовато-зелёный
565	пурпурный	зелёный светлый
575	фиолетовый	зелёновато-жёлтый
589	индиго	золотисто-жёлтый
664	голубой (как небо)	оранжевый
728	голубой	коричнево-оранжевый
747	зелёновато-зелёный	красно-карминовый
826	светло-зелёный	светло-пурпурный
843	жёлтовато-зелёный	фиолетово-пурпурный
866	зелёновато-жёлтый	фиолетовый
910	жёлтый чистый	индиго
948	оранжевый живой	тёмно-голубой
998	оранжево-красный	зелёновато-голубой
1 101	красный тёмный	зелёный
1 128	фиолетово-голубой светлый	жёлтовато-зелёный жёлто-коричневый
1 151	индиго	
1 258	голубой с зелёноватым оттенком	телесный
1 334	зелёный морской	коричнево-красный
1 376	ярко-зелёный	фиолетовый


**Техническая характеристика
микроскопа
BIOLAR PI
(ориентировочные данные)**

Техническая характеристика микроскопа BIOLAR PI (ориентировочные данные)		Двупреломляющая призма № 1 (дифферен- циальная)	Двупреломляющая призма № 2 (с полосами)	Двупреломляющая призма № 3 (однородного поля с большим раз- двоением изображения)									
Межполосное расстояние h (в мкм)	Для света: зелёного ($\lambda=546$ нм) жёлтого ($\lambda=590$ нм) белого ($\lambda=550$ нм)	2 500 мкм	190 мкм	760 мкм									
		2 750 мкм	205 мкм	830 мкм									
		2 550 мкм	193 мкм	770 мкм									
Максимальное раз- двоение изображения, отнесенное к пред- метной плоскости (в мкм) --- призма W_1	для зелё- ного света ($\lambda=546$ нм)	Увеличение объектива											
		10×	20×	40×	100×	10×	20×	40×	100×				
		1,84	0,98	0,50	0,20	32	17	8,7	3,4	6,45	3,45	1,75	0,70
--- призма W_1+W_2		40	20	12	4	70	37	29	8	45	23	14	5

Значение постоянной p' (в мкм) — при верхнем положении призм W_1 (призма W_2 отключена) — для призм $W_1 + W_2$ Диапазон измерения разности оптического пути (выраженный в длинах световой волны)	для зеленого света ($\lambda = 546$ нм)	Двупреломляющая призма № 1 (дифференциальная)	Двупреломляющая призма № 2 (с полосами)	Двупреломляющая призма № 3 (однородного поля с большим раздвоением изображения)
— при верхнем положении призм W_1 (призма W_2 отключена)		—	200 мкм	—
— для призм $W_1 + W_2$		—	430 мкм	—
Диапазон измерения разности оптического пути (выраженный в длинах световой волны)		3λ	$\pm 25\lambda$	$\pm 5\lambda$
Точность измерения разности оптического пути		$\lambda \over 250$	$\lambda \over 30$	$\lambda \over 80$
Точность измерения светопропускания		$\pm 1\%$ для светопропускания от 0 до 70%		

**Ключ для оценки величины коэффициента
преломления микрообъектов и неровностей поверхности *)**

Форма объекта	Коэффициент преломления	диффе- рен- циаль- ный метод (призма № 1)	метод одноро- дного поля с боль- шим раз- двоением изображе- ния (призма № 3)	метод полос (призма № 2)
		распознавательная примета		
		направ- ление переме- щения темного цвета в изобра- жении	последо- ватель- ность гашения раздвоен- ных изобра- жений	гашение раздвоенных изображений
1	2	3	4	5
 или	$n > n_1$	согласно с направ- лением переме- щения двуупре- ломля- ющей призмы	согласно с направ- лением переме- щения двуупре- ломля- ющей призмы	левое изо- бражение затемняется с правой стороны тем- ной полосы, а правое изображение с левой сто- роны
 (бугор)	$n < n_1$	противо- положна направ- лению переме- щения двуупре- ломля- ющей призмы	противо- положная направ- лению переме- щения двуупре- ломля- ющей призмы	левое изоб- ражение затемняется с левой сто- роны темной полоски, а правое изображение с правой стороны

1	2	3	4	5
 <p>(долина)</p>	$n > n_1$	противоположное направлению перемещения двупреломляющей призмы	противоположная направлению перемещения двупреломляющей призмы	левое изображение затемняется с левой стороны темной полосы, а правое изображение с правой стороны
	$n < n_1$	согласно с направлением перемещения двупреломляющей призмы	согласна с направлением перемещения двупреломляющей призмы	левое изображение затемняется с правой стороны темной полосы, а правое изображение с левой стороны

*) Примечание: правильно при согласной установке призм W_1 и W_2 (рис. 9) или при нейтральном положении призмы W_2 .