

显微镜杂光系数测量标准化 的研究与实验

刘瑞祥 王雅黎 曹明* 曹根瑞**

(应用光学国家重点实验室)

摘要: 利用中科院长春光机所ZG—3显微镜杂光测定仪,测量大量显微镜的杂光特性,从而提出用杂光系数VGI和表征杂光系数 $VGI(NA_c)$ 描述显微镜杂光特性。还介绍了我们对仪器中的可变测量参数,如目标板限制光阑孔径,离焦等因素对测量结果的影响方面所作的实验和分析。最后提出了我们对显微镜杂光特性测量与评价标准化的建议。

一、引言

显微镜的杂光影响其使用效果,使显微镜图像的对比度下降,层次减少,这是理论与实验都已证明了的^[1]。由于显微镜杂光的大小与很多因素有关,要想确定这些因素对其杂光的影响,必须首先解决它的测量问题。但是长期以来一直不具备有效的测量手段,因此很难开展相关的工作。1986年作者开始研制一种适用范围广,尤其是适用于高倍率,大数值孔径显微镜,操作灵活,重复性好的多功能显微镜杂光测定仪。1988年完成了该仪器的试制工作^[2]。鉴定结果表明,在长春光机所研制成功的ZG—3显微镜杂光测定仪满足上述要求并达到重复性优于0.005RMS的高精度指标^[3]。图1是该仪器的原理图。

作者早期的研究与实验表明^[4],在显微镜杂光测量中,各种实验参数,如照明光源亮度,照明光源数值孔径等,它们的选择对测量结果有不同程度的影响,并直接与显微镜杂光特性的表征相关。在研制ZG—3显微镜杂光测定仪时,我们参照相关的国际标准,已经充分考虑了标准化问题并尽可能选取合理的参数,为显微镜杂光的测量与评价,奠定了基础,本文报告的工作是利用我们研制的ZG—3显微镜杂光测定仪,测量一批国内外显微镜,进一步开展关于显微镜杂光特性表征,显微镜杂光测量标准化方面研究的实验结果和理论分析,以及关于显微镜杂光测量标准化的提议。

二、显微镜杂光特性表征——

VGI与不同照明 NA_c 下的显微镜杂光特性

在讨论成像系统评价标准化问题时,国内外的科技工作者均花费了相当多的精力去研究采用何种物理量进行评价,它们的定义,评价方法与评价指标等问题,已经有关于光学传递

注: * 杭州中国计量学院一系; **北京理工大学四系

函数 (OTF), 杂光测量 (VGI) 等方面的标准^{[5][6]}。显微物镜与普通照相成像系统有二个主要差别: 第一, 它的目标离其前表面很近, 即工作距很小, 一般不超过几个毫米; 第二, 它多工作于部分相干照明条件下。作为标准化的主要内容之一, 我们首先讨论在评价显微物镜杂光特性时, 如何根据这二个差别对以往所采取的评价物理量加以判定或修定。

目前, 广泛用来测量评价成像系统杂光特性的, 是黑斑法。由于杂光大小随空间物体亮度分布而变化, 因此在黑斑法中, 杂光系数 (VGI) 通常定义为: 亮度均匀的无限大面扩散光源照明时, 放在它一点上的零亮度的黑体经系统所成像的照度与周围像照度之比。它表征系统实际上可能产生的最大杂光量^[7]。

VGI 的这种定义完全可以适用于显微物镜, 只要在其工作点处构成一个无限大面扩散光源照明即可。由图 1 可知, 这正是 ZG—3 显微物镜杂光测定仪工作原理的基础, 在这种情况下, 显微物镜的 VGI (杂光系数或杂光指数) 即定义为无限大面扩散光源照明时, 即照明光源数值孔径 $NA_c = n \sin Uc$, $\sin Uc = 1$ 时, 黑体目标与它周围目标经显微物镜所成像光强之比, 即

$$VGI = \frac{I_b}{I_w} \tag{1}$$

其中:

I_b ——黑体目标经显微物镜所成像的光强;

I_w ——周围目标经显微物镜所成像的光强。

同样地, 它表征被测显微物镜可能产生的最大杂光量。对于显微物镜来说, 这样定义的 VGI 可以为我们提供二方面的信息:

1. 当被测显微物镜的工作目标被照明的尺寸比较大, 或者照明系统 NA_c 大时, VGI 即是这时显微物镜出现杂光的百分比;

2. 当被测显微物镜的工作目标被照明的尺寸比较小, 或者照明系统 NA_c 小时, VGI 则是该系统潜在的出现杂光的最大百分比。

显微物镜经常工作于部分相干照明条件下, 有时仅仅知道 VGI 还不够, 人们往往希望得到它在不同照明 NA_c 条件下, 或者照明的部分相干度改变时的杂光特性。为了与 VGI 相区别, 我们把这时的杂光特性定义为表征杂光系数:

$$VGI(NA_c) = \frac{(I_b)_{na}}{(I_w)_{na}} \tag{2}$$

其中 $(I_w)_{na}$ 和 $(I_b)_{na}$ 分别代表相应照明孔径下白目标像与黑目标像所对应的光强或光信号大小。

简单比较后可知, 当 $\sin Uc \rightarrow 1$ 时, $NA_c \rightarrow n$, $VGI(NA_c) \rightarrow VGI$ 。

一般说来, 知道了一个显微物镜的 VGI 和 $VGI(NA_c)$, 就可以清楚它的杂光特性, 在我们的 ZG—3 测定仪中, 只要改变积分球面扩散光源的光栏 D, 即可模拟不同 NA_c 的照明条件, 求得 $VGI(NA_c)$, 或者使 D 为最大 (80mm) 测得 VGI。这样, VGI 和 $VGI(NA_c)$, 既有其明确的物理意义, 又都是可测得量。

为了探讨用 VGI 和 $VGI(NA_c)$ 表征显微物镜杂光特性的实用性, 我们测量了一些有代表性的显微物镜, 它们的参数分别为:

$10 \times (0.25)$, $16 \times (0.45)$, $25 \times (0.55)$, $40 \times (0.63)$, $40 \times (0.65)$,

$40 \times (0.70)$, $40 \times (0.95)$, $50 \times (0.69)$, $50 \times (0.63)$, $50 \times (0.95)$,
 $100 \times (0.90)$, $100 \times (1.25)$, $100 \times (1.35)$.

括弧中的值是它们的数值孔径。对于这些显微物镜，得到了它们的 $VGI(NA_c)$ 随 NA_c 即随 D 变化的曲线，典型的结果如图 2 至图 6 所示。

实验结果表明：

对多数显微物镜，当照明光源数值孔径 $NA_c < 0.2$ 时，随着 NA_c 的改变 $VGI(NA_c)$ 的变化比较明显；当 $NA_c > 0.2$ 时， $VGI(NA_c)$ 随 NA_c 的变化趋于平缓；即使是中、高倍显微物镜，当 $NA_c \geq 0.4$ 后， $VGI(NA_c)$ 的变化完全可以忽略不计；

根据 $VGI(NA_c) \sim NA_c$ 曲线趋于平缓的特性，又由于

$$VGI = \lim_{(NA_c \rightarrow n)} VGI(NA_c) \quad (3)$$

这样，在 $n = 1$ 时，即空气的情况下，用 $VGI(0.6)$ 代替 VGI 从理论和实验上都是可行的，在 ZG—3 显微物镜杂光测定仪中，这对应于 $D = 80\text{mm}$ 。

为了使用一个单一指标去描述显微物镜的 $VGI(NA_c)$ 并使它与显微物镜的成像质量有一定的内在联系，这里我们如同许多文献那样采用显微物镜照明部分相干度的概念（参看^[4]），即：

$$\sigma = \frac{NA_c}{NA_o} \quad (4)$$

它是聚光系统数值孔径 NA_c 与显微物镜数值孔径 NA_o 之比。有实验表明，当显微物镜照明的部分相干度为 0.7 左右时，它的分辨本领或调制传递函数 (MTF) 最高，故选择

$$\sigma = NA_c / NA_o = 0.7 \quad (5)$$

有比较现实的意义，可以了解显微物镜具有最佳像质时的杂光特性。

通过上述分析，我们确定采用二个指标进行比较：

VGI ——它说明通常定义下的杂光特性；

$VGI(0.7NA_c)$ ——它说明显微物镜照明的部分相干度为 0.7 时的杂光特性；

表 1 是我们对一批显微物镜进行实验的结果之一。由该表可以看出， VGI 和 $VGI(NA_c)$ 都能明晰地表征显微物镜杂光特性；而且， VGI 与 $VGI(NA_c)$ 之差别还表示显微物镜在不同照明相干度下杂光特性的变化。

三、关键实验参数的标准化问题

——目标板限制光阑孔径 d 和离焦的影响

表 1 低倍显微物镜杂光测试结果之一（测量条件： $d = 4\text{mm}$ ）

厂 家	物 镜 参 数	VGI	RMS	VGI (0.7NA _c)
大 连 二 光 厂	10倍 0.25	0.0480	0.0017	0.0480
大 连 二 光 厂	10倍 0.25	0.0224	0.0023	
大 连 二 光 厂	10倍 0.25	0.0250	0.0016	
大 连 二 光 厂	10倍 0.25	0.0296	0.0038	

厂 家	物 镜 参 数	VGI	RMS	VGI (0.7 NA _o)
大 连 二 光 厂	10倍 0.25	0.0330	0.0000	0.0288
威 海 光 仪 厂	10倍 0.25	0.0276	0.0011	0.0318
江 南 光 仪 厂	10倍 0.25	0.0140	0.0007	0.0094
国 产	10倍 0.25	0.0468	0.0028	0.0425
国 产	10倍 0.25	0.0492	0.0008	0.0464
LEITZ W. G.	10倍 0.25	0.0368	0.0010	
OLYMPUS JAPAN	10倍 0.25	0.0994	0.0025	0.0778
OLYMPUS(MPLAN) JAPAN	10倍 0.25	0.0276	0.0005	0.0266
OLYMPUS(MPLAN) JAPAN	20倍 0.40	0.0910	0.0010	
LEITZ (NPL) W. G.	16倍 0.45	0.0120	0.0007	0.0100
LEITZ (NPL) W. G.	25倍 0.55	0.0170	0.0007	0.0155

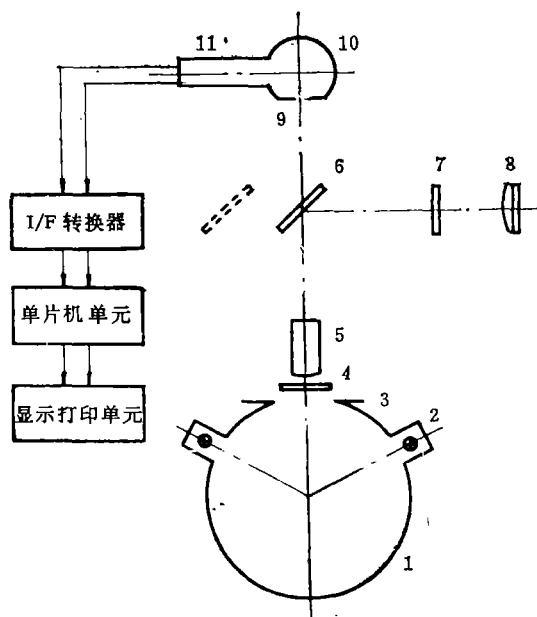


图 1 ZG-3 显微物镜杂光测定仪原理示意图

- 1—积分球面扩展光源； 2—照明灯； 3—可变光阑； 4—黑体目标板；
 5—被测显微物镜； 6—可移反射镜； 7—分划板； 8—观测目镜；
 9—接收小孔； 10—测光积分球； 11—光电倍增管

Lens	d (mm)	VGI (NA _c) (%)				
		$D = 6$	12	20	45	80
10 × (0.25)	46	0.0900	0.0960	0.0800	0.1280	0.1500
CHINA-2	4	0.0636	0.0476	0.0402	0.0456	0.0468

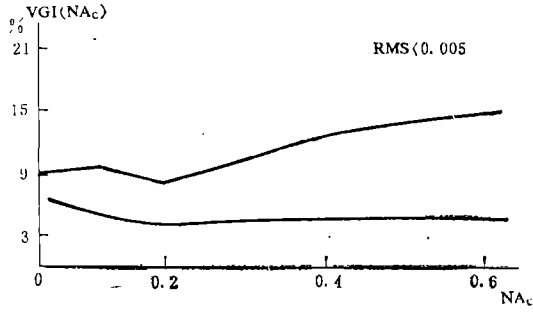


图2 VGI(NA_c) ~ NA_c 变化曲线

Lens	d (mm)	VGI (NA _c) (%)				
		$D = 6$	12	20	45	80
10 × (0.25)	46	0.0132	0.0268	0.0362	0.0410	0.0454
MPLAN	4	0.0300	0.0266	0.0266	0.0280	0.0276

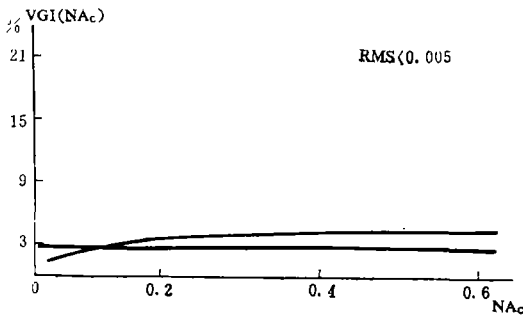


图3 VGI (NA_c) ~ NA_c 变化曲线

Lens	d (mm)	VGI (NA _c) (%)				
		$D = 6$	12	20	45	80
40 × (0.65)	46	0.0146	0.0186	0.0156	0.0182	0.0252
EF LEITZ	4	0.0272	0.0246	0.0220	0.0180	0.0212
	1	0.0264	0.0206	0.0150	0.0174	0.0110

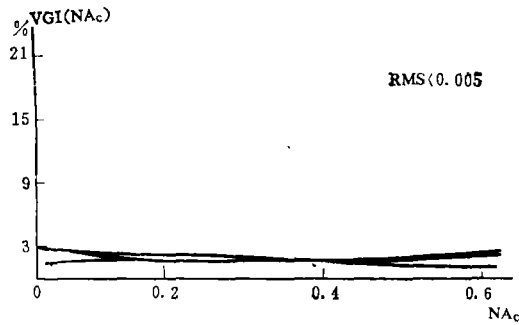


图4 VGI(NA_c) ~ NA_c变化曲线

Lens	d (mm)	VGI (NA _c) (%)				
		$D = 6$	12	20	45	80
100 × (0.90)	46	0.2906	0.1954	0.1534	0.1326	0.1130
MPLAN	2	0.2180	0.1428	0.1264	0.1210	0.1040

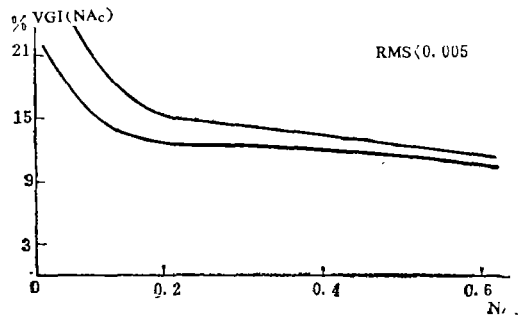
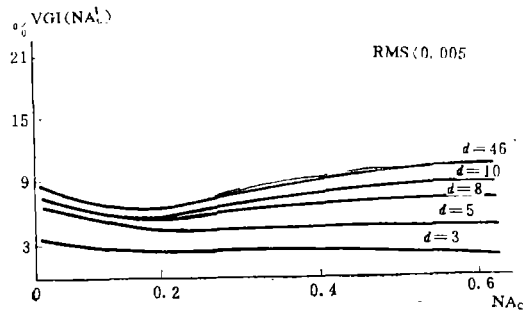


图5 VGI(NA_c) ~ NA_c变化曲线

Lens	d (mm)	VGI (NA _c) (%)				
		$D = 6$	12	20	45	80
10 × (0.25)	46	0.0854	0.0698	0.0645	0.0966	0.1094
DALIAN	10	0.0746	0.0630	0.0568	0.0840	0.0926
	8	0.0754	0.0622	0.0562	0.0716	0.0760
	5	0.0644	0.0542	0.0434	0.0466	0.0480
	3	0.0364	0.0258	0.0238	0.0264	0.0206

图6 VGI(NA_c) ~ NA_c变化曲线

(一) VGI 与 VGI (NA_c) 同目标板限制光阑孔径的关系

实验发现，目标板限制光阑孔径 d 的大小直接影响测量结果，因而影响显微物镜杂光的评价。从使用的角度看，显微物镜目标处的照明光斑通常都有一定大小，如 4 mm，但也有用灯光不加限制直接照明的；这样，在测量与评价显微物镜杂光特性时就必须考虑目标视场光阑的影响，即必须考虑仪器中目标板限制光阑孔径 d 尺寸的标准化问题。

我们首先取 $d = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 和 46mm，用 3 只国产 10 倍 (0.25)，1 只大连二光厂生产的 40 倍 (0.65) 显微物镜，测量它们在不同 d 值下的 VGI 和 VGI(NA_c)，典型的实验结果如图 7 所示。实验结果表明，对于 10 × (0.25) 物镜，当 $d \leq 10$ mm VGI (NA_c) 随 d 减小而减小，但当 d 大于 10mm 后，VGI(NA_c) 随 d 的变化很平缓。40 × (0.65) 显微物镜也同样，差别仅在于 d 大于 3 mm 后 VGI (NA_c) 随 d 的变化就很平缓。因此我们减少 d 的取点，对另外 15 只显微物镜，分别测量它们在 $d = 2, 4$ 和 46mm 时的 VGI 和 VGI (NA_c)，把 d 作为参数表示在 VGI (NA_c) ~ NA_c 图中，如图 2 至 6 图所示。

这些实验结果表明：

1. d 值改变对低倍显微物镜的 VGI 和 VGI(NA_c) 影响大，对中高倍显微物镜的影响小，这是因为中高倍显微物镜的工作距离很小，当 d 值不太大，譬如 4 mm，它对显微物镜的张角已经很大， d 再继续加大，其影响也就不明显了；而低倍显微物镜则不然，它们的工作距离相对大得多，只有当 d 值很大时，譬如 10mm，对物镜的张角才足够大，因此当 d 值在 4 mm 到 10mm 范围内变化时，VGI 和 VGI(NA_c) 都有较大变化；

2. 与 $d = 46$ mm 相比，当 $d \leq 5$ mm 时，对于所有的显微物镜，它们的 VGI(NA_c)

随 NA_c 的变化都更加平缓。

分析上述实验结果，我们可以看出：

1. 取 $d = (1 \sim 5) \text{mm}$ 比较和适，因为这一取值范围和实际使用状态非常接近；
2. 在 $d = (1 \sim 5) \text{mm}$ 的条件下， $VGI(NA_c) \sim NA_c$ 曲线的变化很快就进入饱和，这样在测量中对 D 值的准确性要求就不是很严，这不仅给实验带来方便，对中高倍显微物镜来说，还可以用 VGI 和 $VGI(NA_c)$ 互相取代，或者互相比较；
3. 在测量过程中发现高倍物镜的 $VGI(NA_c) \sim NA_c$ 曲线中，当 NA_c 很小（比如小于0.2）时， $VGI(NA_c)$ 的测量值不稳定，这一现象可能是由于测量时接收信号太小，信噪比降低，以及若 NA_c 很小有时会出现鬼像等原因所造成的，因此测量 $VGI(NA_c)$ 应避免这一区域。而对于中低倍显微物镜不会有这种现象发生。

考虑到大多数显微物镜均由聚光系统在物面上构成大约4mm左右的照明光斑，作综合考虑后我们选用的 d 值为4mm。为了解某些显微物镜随目标被照范围加大后杂光特性的变化，可以取 $d = 46 \text{mm}$ ，测量这时的 VGI 或 $VGI(NA_c)$ 作为参考指标。

(二) VGI 与 $VGI(NA_c)$ 同离焦的关系

在使用ZG—3显微物镜杂光测定仪这类仪器测量显微物镜的杂光系数时，不可避免地要引入调焦误差，研究这种误差对测量结果的影响并确定离焦允差，这是标准化的一项重要内容。

显微物镜的焦深：

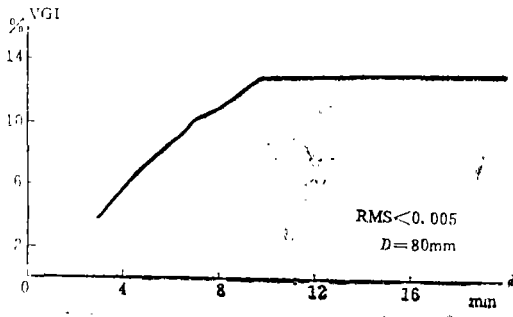


图7 CHINA—2 10倍0.25显微物镜
 $VGI \sim d$ 变化曲线

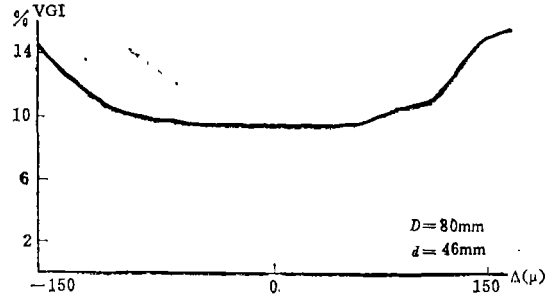


图8 OLYMPUS 20倍0.40显微物镜
 $VGI \sim \Delta$ 变化曲线

$$\Delta = \frac{\lambda}{n(\sin U_c)^2} = \frac{n\lambda}{(NA_c)^2} \quad (6)$$

由此可知，高倍大 NA_c 显微物镜的焦深很小，容易根据黑体目标像的清晰程度把离焦量控制在 4Δ 内，这是小量；然而，低倍小 NA_c 的显微物镜的焦深大，因此选用国产 $10 \times (0.25)$ ，和日本OLYMPUS的 $20 \times (0.40)$ ， $40 \times (0.63)$ 显微物镜进行实验。

为了准确地控置离焦，我们通过观测目镜确定黑体目标位于最佳焦点后，用微调机构和位移传感器，改变并测量物镜离焦量，再测量与之对应的 VGI 值，从而得到 $VGI \sim \Delta$ 或 $VGI(NA_c) \sim \Delta$ 。实验结果如图8所示。

实验表明，对中低倍显微物镜，在离焦量为 ± 4 倍甚至 ± 10 倍焦深的范围内， VGI 的

变化都是很小的。实验当中，操作者根据目视观测所能控制的离焦大小，通常要小于4倍焦深。因此，只要仪器的微调机构足够灵敏，操作者的调校误差一般不会影响中低倍显微物镜杂光测量结果的精度。而对于高倍大数值孔径显微物镜，微量离焦就会被观察到，精心微调就不会由于它而引入测量误差。

(三) 清洁处理

这个问题看似简单，但在实验中不可忽视，我们的实验表明，镜头或目标板污染后将有1%—3%有时甚至高达5%的杂光附加量。所以测量前操作者必须用清洁剂将物镜和目标板处理干净，不得有可见的灰尘和手印。平时，目标板应该保存在洁净的器皿内。

四、关于标准化工作的几点建议

综合作者在杂光测量方面的研究工作和研制 ZG—3 显微物镜杂光测定仪的成果，加上利用该仪器大量测量显微物镜，分析比较这些结果，作者对显微物镜杂光测量与评价标准化问题，诸如测量原理，选用测量仪器及参数，测量条件如照明光源数值孔径，视场光阑大小，物镜调焦，零部件的清洗处理等问题提出如下建议：

(一) 测量原理和装置概要

1. 黑斑法原理

我们的研究与实践表明：用黑斑法测量显微物镜杂光特性，采用 VGI 和/或 VGI(NA_c) 表征显微物镜的杂光特性具有合理性，方便性和灵敏性。用 VGI(NA_c) 表征不同照明 NA_c 时显微物镜的杂光特性，也可以结合像质评价去选择某一特定的 NA_c ，或 σ ，测量此时的表观杂光系数。

当选用 ZG—3 显微物镜杂光测定仪或类似仪器测量显微物镜杂光系数时，要遵从下述基本原则：

2. 采用积分球面扩散光源作为照明光源

这种照明满足测量显微物镜杂光的基本要求并具有如下优点：(1) 亮度均匀，在整个照明范围内亮度均匀性偏差可达到或小于 $\pm 5\%$ ；(2) 亮度高，有利于提高测量仪器的信噪比；(3) 加可控光阑来模拟不同照明 NA_c ，测量显微物镜相应的部分照明下的杂光特性 VGI(NA_c)。

3. 用条状黑体代替通常的圆形黑体

条状黑体易加工，可以根据需要选定其长度和宽度，加工 0.01—0.02mm 的刻线也不困难，容易使其透射密度大于 $3D$ ，这样就可以把它看作绝对黑体；其边缘便于清晰对焦，有利于保证仪器的重复性；条状黑体宽度的决定：黑条经被测物镜所成像的尺寸为 2mm 左右；

4. 接收小孔大小为黑体像的 1/5 左右。

(二) 测量条件与评价问题

1. 对于一般显微物镜，可以采用 VGI 和 VGI(NA_c) 去表征它们的杂光特性，测量中可取 $NA_c = 0.6$ 时的 VGI(0.6) 代替 VGI，其差别很小；在 ZG—3 中，这对应于积分球面光源的光阑直径 $D = 80\text{mm}$ ；

2. 取 $\sigma = 0.7$ ，测量相应的 VGI($0.7NA_c$)，可以把显微物镜的杂光特性与成像质量联系起来；

3. 选目标板限制光阑 $d = 4 \text{ mm}$; 对于低倍显微物镜, 或为确认显微物镜杂光特性优异否, 可用 $d = 46 \text{ mm}$ 做复校测量。

五、结 语

搞好显微物镜杂光的测量与评价, 是提高其质量的关键环节之一。我们目前还面临许多要解决的问题, 欢迎国内的同行前来合作, 把这方面的工作搞得更好。

参 考 文 献

- [1] 刘瑞祥; 《光学系统成像质量评价及检验文集》, 中国计量出版社, 1988年
- [2] 刘瑞祥、王雅黎; 应用光学开放研究实验室年报, 1989年, 第55页
- [3] 王雅黎、刘瑞祥; 曹明; 同上, 第50页
- [4] 刘瑞祥、王海明; 光学机械, 1987年, 第2期, 13页
- [5] Draft Proposal ISO/DP; Photography Optical Transfer Function Vocabulary (Item No. 122-1)
- [6] TC 42/WG12; “Draft proposal for ISO standard on measurement of veiling glare index of photographic objectives”, 1979
- [7] 龍岡静夫; 光学技術コンタクト, No. 12, 17, 1971

Considerations and Experiments on the Standardization of the Measurement of the Veiling Glare Index of Microscope Objectives

Liu Ruixiang, Wang Yali and Cao Ming

Abstract

This report represents authors's suggestions on describing the Veiling Glare (VG) characteristic of the microscope objectives by Veiling Glare Index (VGI) and Charaterized Veiling Glare Index (VGI(NA.)), which have been proposed on the base of the measurements of a large number of various microscope objectives by using the instrument for testing the VGI of microobjectives developed in the Institute. Furthermore, the report introduces our experiments and discussions about the influence of those variable parameters in the testing instrument, such as the limiting aperture of the black object target, defocus and etc., on the testing results. At last this paper gives our suggestions for the standardization of the measurement and assessment of the VG characteristics of microscope objectives.