



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

NÁVRH MIKROSKOPOVÉHO LED OSVĚTLOVAČE

DESIGN OF MICROSCOPE LED ILLUMINATION SYSTEM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Monika Gricová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Martin Antoš, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Ústav:	Ústav fyzikálního inženýrství
Studentka:	Monika Gricová
Studijní program:	Strojírenství
Studijní obor:	Základy strojního inženýrství
Vedoucí práce:	Ing. Martin Antoš, Ph.D.
Akademický rok:	2016/17

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Návrh mikroskopového LED osvětlovače

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Konfokální mikroskop s rotujícím Nipkovovým diskem vyžaduje intenzivní zdroj bílého světla. Současné LED technologie dosahují stále vyššího poměru světelného toku k elektrickému výkonu zdroje. Cílem práce je navrhnout osvětlovací optiku pro vybraný LED zdroj a navrhnout konstrukční řešení vhodné k vestavbě do stávajícího mikroskopu.

Cíle bakalářské práce:

1. Proveďte průzkum trhu a vyberte vhodný LED zdroj.
2. Navrhněte optické schéma osvětlovače.
3. Proveďte optimalizaci navrženého osvětlovače.
4. Experimentálně otestujte optické parametry navrženého osvětlovače.
5. Vypracujte výkresovou dokumentaci finalizovaného osvětlovače.

Seznam doporučené literatury:

WILSON, T.: Confocal microscopy. London: Academic Press, 1989.

SEWARD, G.: Optical design of microscopes. Bellingham: Spie press, 2010.

SCHRODER, G.: Technická optika. Praha: SNTL, 1981.

SLABÝ, T. Osvětlovací soustava pro konfokální mikroskop s duálním rastrováním. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 76 s. Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2016/17

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá návrhem osvětlovací soustavy do konfokálního mikroskopu Confocal 2002. První část práce popisuje konfokální mikroskop a jeho rozdělení. Pro správnou funkci mikroskopu je nutné osvětlovat pozorovaný vzorek intenzivním zdrojem bílého světla. Na základě analýzy rešerše je vybrána vhodná LED dioda. V praktické části bylo navrženo osm soustav, které byly sestaveny a jejich parametry následně proměřeny. Na základě porovnání získaných parametrů byla vybrána nejvhodnější soustava, pro kterou byla navržena konstrukce.

Klíčová slova

konfokální mikroskop, LED dioda, Köhlerovo osvětlení, ZEMAX, TIR reflektor

Summary

The objective of this bachelor thesis was to design illumination assemblage in confocal microscope Confocal 2002. First part of this paper describes types and components of confocal microscopes. For correct function of the microscope, high-power illumination by a white light emitter is required. Based on the analysis of the background research, suitable LED diode was selected. In experimental part of this work, eight optical systems are proposed, that has been assembled and evaluated. Based on the evaluation of obtained parameters, the optimal assemblage was selected and designed for production.

Keywords

Confocal microscope, LED diode, Köhler Illumination, ZEMAX, TIR reflector

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Martina Antoše, Ph.D., a že veškerá použitá literatura je v této práci uvedena.

V Brně dne 25.5.2017

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Ing. Martinovi Antošovi, Ph.D., za vedení, konzultace, odborné připomínky a podněty ke zlepšení mé práce, které ho stály mnoho drahocenného času. Dále bych ráda poděkovala všem lidem z Ústavu fyzikálního inženýrství, kteří mě v přátelské atmosféře přijali a vytvořili mi tak dobré podmínky pro vypracování mé bakalářské práce. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu a trpělivost po celou dobu studia.

Obsah

Úvod.....	3
1 Princip konfokálního mikroskopu	4
1.1 Typy konfokálních mikroskopů	6
1.1.1 Laserový rastrovací konfokální mikroskop	6
1.1.2 Rastrovací tandemový konfokální mikroskop	7
2 Konfokální mikroskop Confonfocal 2002	11
3 Osvětlovací soustavy v optické mikroskopii	13
3.1 Kritické osvětlení	13
3.2 Köhlerovo osvětlení	14
4 Zdroje světla optických mikroskopů	15
4.1 Klasické zdroje.....	15
4.2 LED diody	17
5 Analýza problému	19
5.1 Volba vhodné LED diody	19
5.2 Volba TIR.....	20
6 Teoretický rozbor návrhů osvětlovacích soustav	23
7 Návrhy osvětlovacích soustav a jejich experimentální ověření	25
7.1 Varianta A s TIR reflektorem	25
7.2 Varianta B	27
7.3 Varianta C	28
7.4 Varianta D	29
7.5 Varianta E.....	30
7.6 Varianta F.....	31
7.7 Varianta G	32
7.8 Varianta H	33
7.9 Zhodnocení.....	34
8 Konstrukční řešení.....	37
8.1 Chlazení LED diody.....	37
8.2 Uložení optické soustavy	38
Závěr	39
Literatura.....	40

Úvod

Mezi jedno z nejpoužívanějších metod optické mikroskopie patří konfokální mikroskopie. Důvody častého vyhledávání této metody jsou nové možnosti pozorování a analýza zejména biologických vzorků. Princip konfokálního mikroskopu si nechal patentovat americký vědec M. Minsky v roce 1957 [1]. Na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně je umístěn konfokální mikroskop Confocal 2002. V roce 1965 byl tento mikroskop navržen a zkonstruován českými vědci Mojmírem Petránem a Milanem Hadravským a v roce 1968 byl patentován [2]. Při zobrazování dochází k velkým ztrátám světla, proto je důležité osvětlovat mikroskop vysoce výkonným zdrojem. Jako původní zdroj světla je použita vysokotlaková rtuťová výbojka, která dosahuje velkých výkonů, avšak si klade vysoké nároky na chlazení.

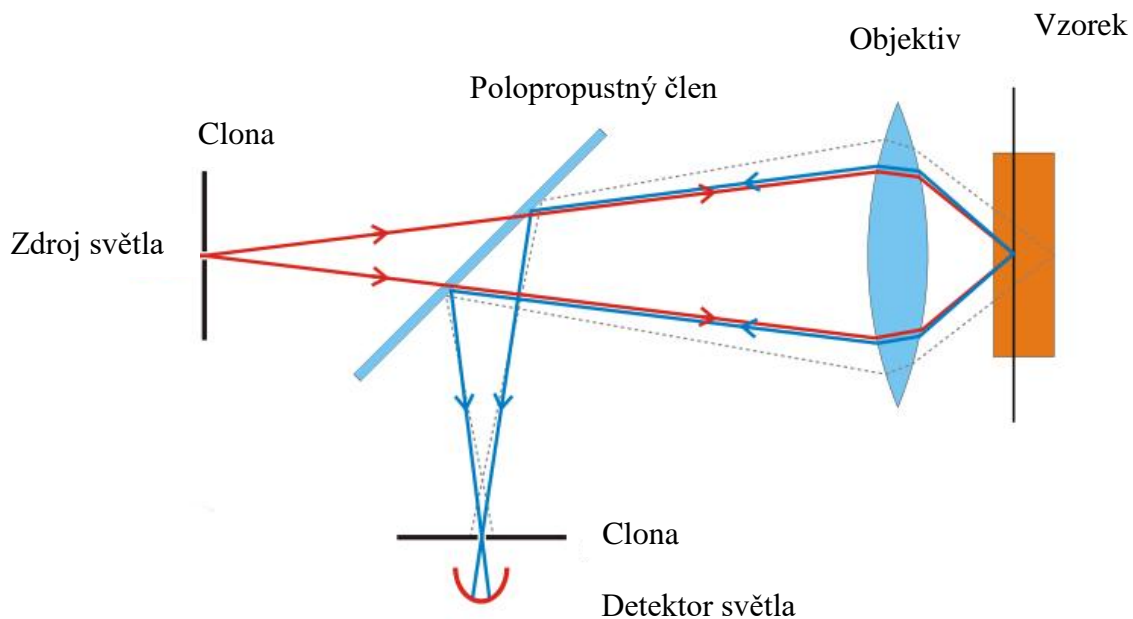
Bakalářská práce se zabývá návrhem osvětlovací soustavy pro konfokální mikroskop Confocal 2002, která umožní přenesení co největšího světelného výkonu ze zdroje na vzorek. Návrh optické soustavy je zapotřebí přizpůsobit stávajícímu zástavbovému prostoru a optickým parametrům mikroskopu. Soustava musí být následně optimalizována a experimentálně otestována.

Hlavní cíle práce jsou:

- **provést průzkum trhu a vybrat vhodný LED zdroj,**
- **navrhnout optické schéma osvětlovací soustavy,**
- **provést optimalizaci navržené osvětlovací soustavy,**
- **experimentálně otestovat optické parametry navržené osvětlovací soustavy,**
- **vypracovat výkresovou dokumentaci finalizovaného osvětlovací soustavy.**

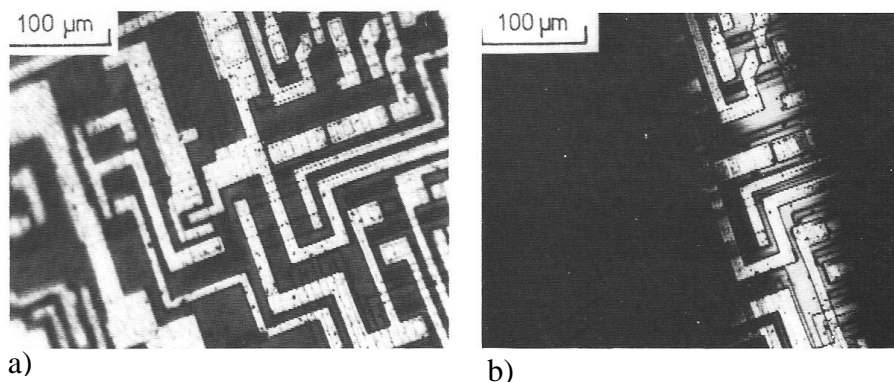
1 Princip konfokálního mikroskopu

Pro zkoumání tenkých biologických vzorků se dříve používaly klasické mikroskopy, které bez problému pozorovaly tenké řezy biologickými vzorky. Problém nastal při pozorování trojrozměrných biologických vzorků, kde byl obraz zkoumaného vzorku rušen rozostřenými obrazy z rovin mimo hloubku ostrosti objektivu. V roce 1957 byl poprvé popsán a patentován první konfokální mikroskop Marvinem Minským [1]. V té době však zůstal bez odezvy, protože nenašel vhodný zdroj světla. Konfokální mikroskop nabízí několik výhod oproti klasickým optickým mikroskopům. Tou nejvýznamnější z nich je osová rozlišovací schopnost, která je dána detekcí světla pouze z obrazové roviny objektivu.



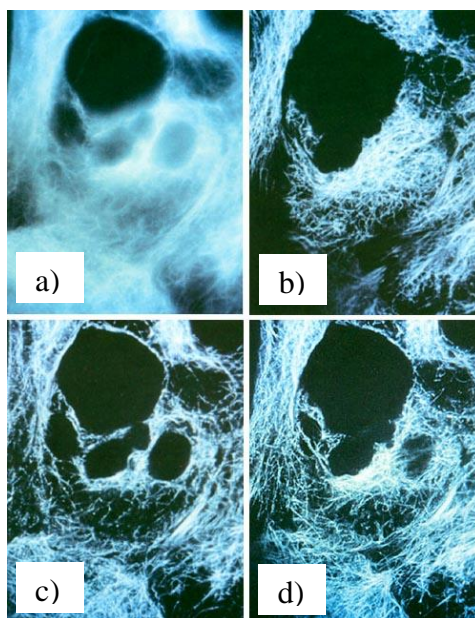
Obrázek 1: Schéma konfokálního mikroskopu. Převzato z [3] a upraveno.

Hlavní výhoda je, že mikroskop osvětluje vzorek bodovým zdrojem velmi malého průměru tak, aby dopadající světlo na vzorek bylo optickým systémem soustředěno do jednoho bodu. Osvětlený bod je zobrazen objektivem na detektor, před kterým je umístěna clona. Je-li oběma clonami synchronně rastrováno, je získán obraz vzorku bod po bodu. Schéma konfokálního mikroskopu je zobrazeno na obrázku 1. Světlo z rovin, mimo rovinu ostrosti obrazu, jsou touto clonou odfiltrováno a nepřispívá ke tvorbě obrazu (viz obrázek 2) [4]. Zacloněním světla z nezaostřené části vzorku dochází ke zvýšení kontrastu a následně mohou být sledovány jemnější detaily [5].



Obrázek 2: Zobrazení téhož vzorku a) konvenčním optickým mikroskopem a b) konfokálním mikroskopem. Převzato z [6].

Díky vysoké kvalitě zobrazení vzorku se konfokální mikroskop stal v poslední době populární obzvláště v biologických aplikacích. Další výhodou jsou kvalitní optické řezy a lepší pozorování trojrozměrných objektů (viz obrázek 3). Při zkoumání tlustých vzorků není kvalita zobrazení negativně ovlivněna překrýváním obrazu roviny, do níž je mikroskop právě zaostřen, s neostřenými obrazy rovin ležících nad ní a pod ní. Prostorová rekonstrukce objektů vzniká na základě několika desítek až stovek optických řezů, jež jsou postupně snímány při plynulé změně hloubky zaostření [2]. Tato schopnost konfokálního mikroskopu se využívá při studiu povrchových vlastností materiálů a při biologických výzkumech.



Obrázek 3: Mikrotubuly v myší jaterní buňce. a) klasická mikroskopie, b)-d) konfokální fluorescenční mikroskopie. Převzato z [2] a upraveno.

Rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu závisí na numerické apertuře objektivu, na vlnové délce použitého světla a na průměru konfokální clony. Pokud je tento průměr roven nejvýše $1/4$ Airyho kroužku bodové rozptylové funkce mikroskopu, je získána maximální rozlišovací schopnost mikroskopu. Zmenšováním konfokální

clony dochází k poklesu intenzity světla v obraze a při zmíněné velikosti clona propustí pouze méně než 10% světla. Proto se obvykle volí průměr clony tak, aby propustila zhruba 50-75% světla [7].

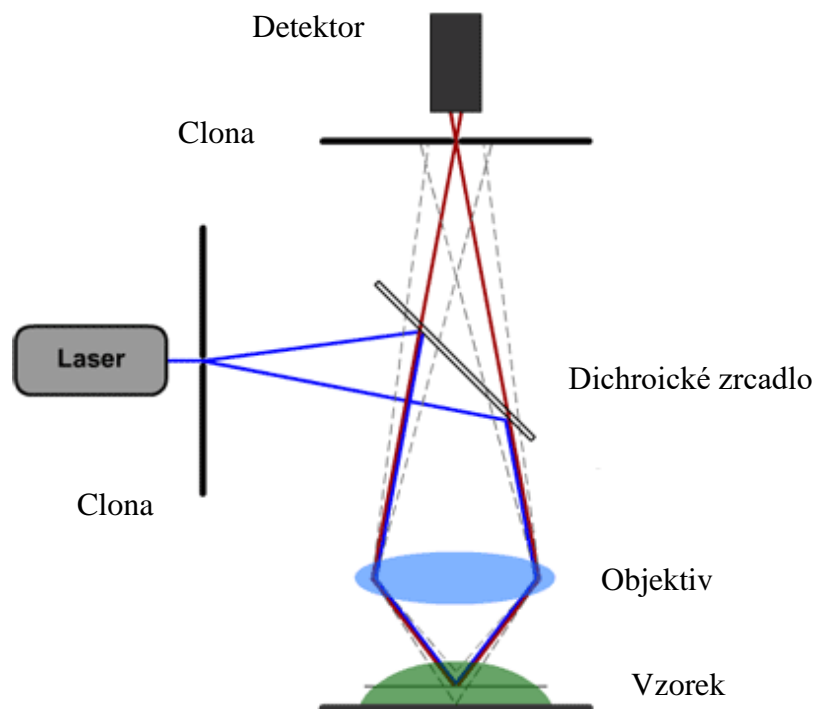
1.1 Typy konfokálních mikroskopů

1.1.1 Laserový rastrovací konfokální mikroskop

Laserový rastrovací konfokální mikroskop LSCM (Laser Scanning Confocal Microscope) je v současné době jeden z nejpoužívanějších konfokálních mikroskopů. První laserový konfokální mikroskop byl vyroben v roce 1978. Jako intenzivní bodový zdroj světla se využívá laserový paprsek, který je fokusován na clonu osvětlovače. Dále je osvětlovací svazek dichroickým zrcadlem odrážen a přes mikroskopový objektiv osvětluje pozorovaný vzorek. Obraz clony je jím fokusován do bodu, jehož průměr odpovídá rozlišovací mezi mikroskopu. Mikroskopovým objektivem se pak sbírá fluorescenční záření, které je vzorkem emitováno. Světlo dále prochází přes dichroické zrcadlo na clonu před detektorem. Tato clona blokuje záření pocházející z oblastí mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Detektor je fotonásobič, který je připojen k počítači. Oběma clonami je rastrováno a tím je obraz skenován. Počítač zároveň dostává informace o souřadnicích snímaného bodu. Na základě těchto informací se skládá bod po bodu konečný obraz (viz obrázek 4) [2,8].

Způsoby rastrování se liší dle konstrukce mikroskopu. Nejčastější způsoby skenování jsou pomocí:

- rozmítání laserového paprsku,
- příčným posuvem vzorku před objektivem,
- posuvem objektivu nad vzorkem.

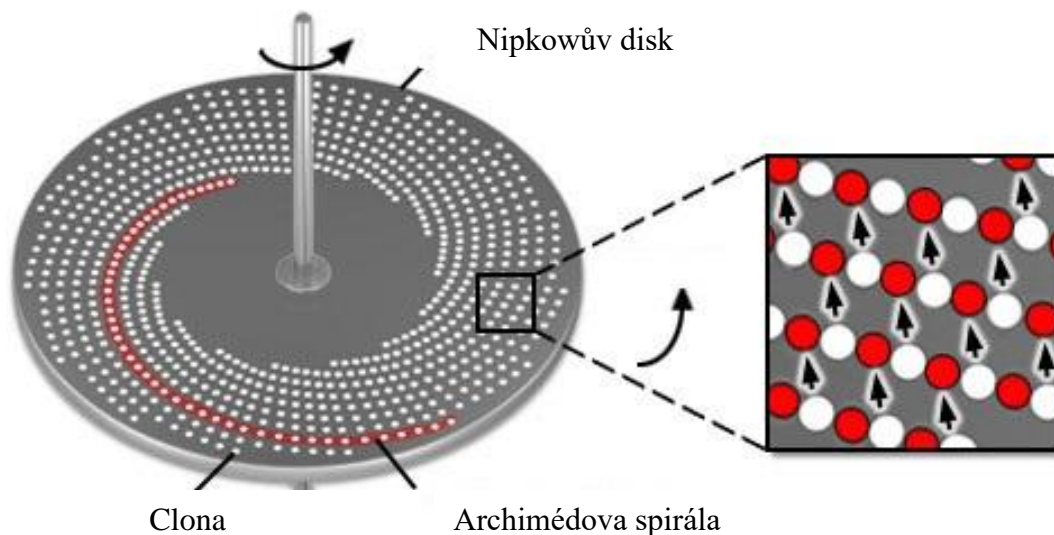


Obrázek 4: Princip laserového konfokálního mikroskopu. Převzato z [9] a upraveno.

Laserový konfokální mikroskop má spoustu výhod. Mezi hlavní výhody patří vysoké rozlišení při vysoké ostrosti obrazu, možnost optických řezů, pozorování vzorků i pod jeho povrchem a rekonstrukce trojrozměrných obrazců. Dále je možno pozorovat nevodivé a porézní (není potřeba vakua) materiály. Obrazy optických řezů vznikají v digitální formě a lze je proto dále upravovat a počítačově zpracovat [10].

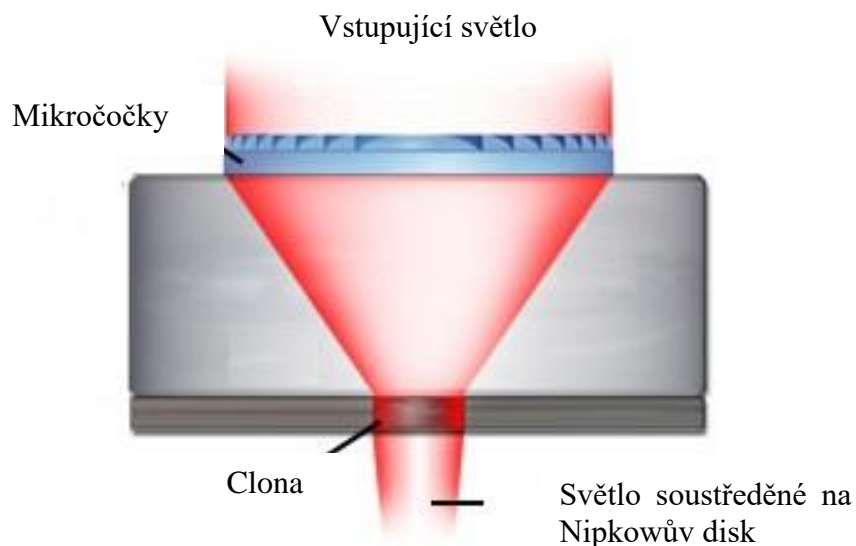
1.1.2 Rastrovací tandemový konfokální mikroskop

Rastrovací tandemový konfokální mikroskop TSCM (Tandem Scanning Confocal Microscopy) využívá rotující Nipkowův kotouč místo skenovacího zařízení. Nipkowův kotouč byl patentován v roce 1884 a používal se k řádkování obrazu v začátcích televize. V kotouči je řada clonek uspořádaných v Archimédových spirálách (viz obrázek 5). V každém okamžiku jsou k dispozici dvě stejná pole dírek, pootočených vůči sobě o 180° . Jedna soustava dírek slouží pro osvětlení vzorku, druhá pro propouštění světla, které bylo odraženo osvětlenými body ze zaostřené obrazové roviny [11]. Disk rotuje s frekvencí až desítky Hz. Vzorek pozorujeme buď v reálném čase okem nebo chlazenou CCD kamerou. Výhodou je vysoká rychlost snímání, především při sledování živých buněk a není třeba rastrovacích pohybů clon. Tento princip byl navržen českými vědci M. Petráňem a M. Hadravským v roce 1986 [2].



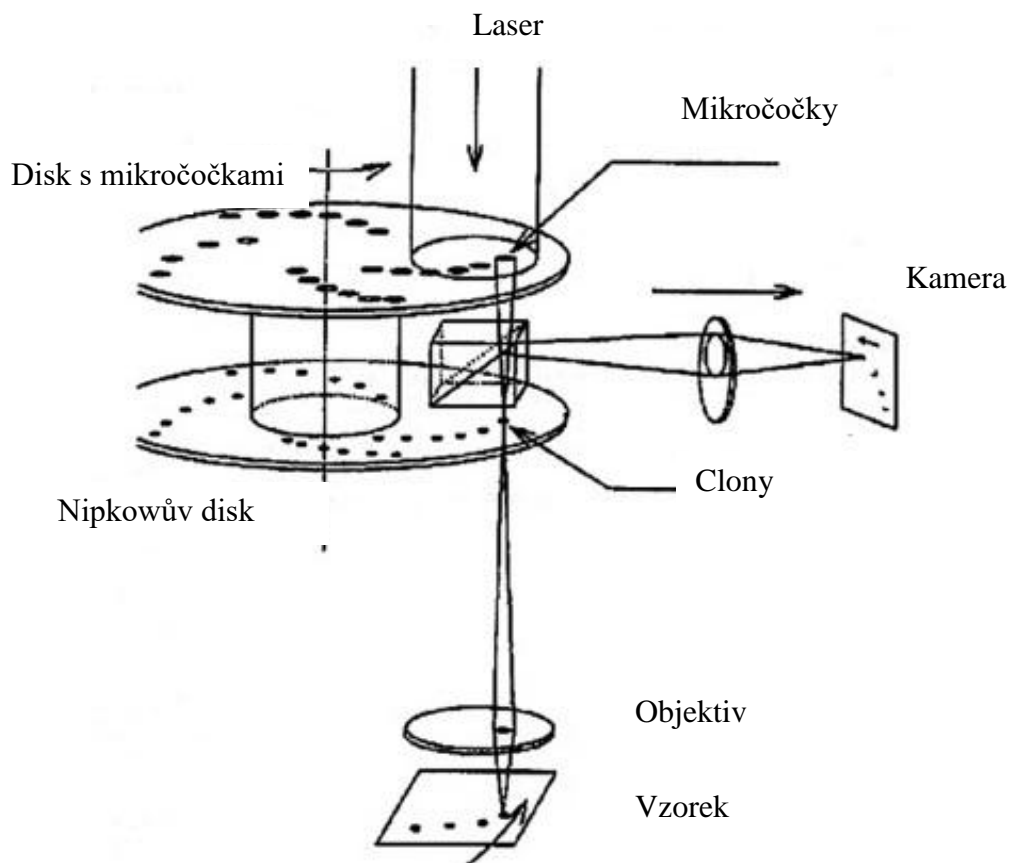
Obrázek 5: Nipkowův disk. Převzato z [12] a upraveno.

Mezi další druhy TSCM patří rastrování pomocí Yokogowa disku. Firma Yokogawa Electric vymyslela nový fluorescenční systém, který se skládá ze dvou koaxiálně uspořádaných disků, Nipkowova disku a Yokogowa disku, mezi které bylo vloženo dichroické zrcadlo. Každý disk obsahuje přibližně 20 000 dírek, uspořádaných ve spirálách. Horní disk je tvořen skleněnou deskou obsahující Fresnelovy mikročočky, které slouží k zachycení co největšího množství světla laserového svazku (viz obrázek 6).



Obrázek 6: Yokogowa disk. Převzato z [13] a upraveno.

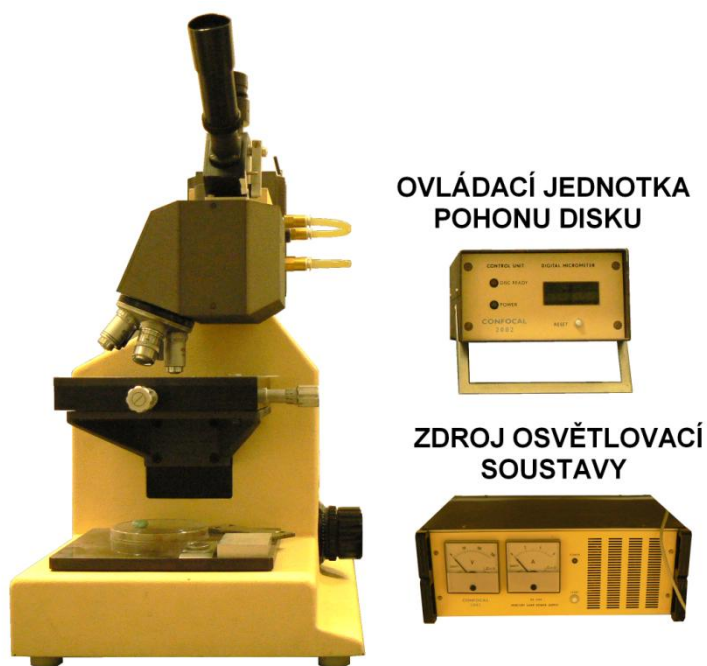
Světlo laseru dopadá na Yokogowův disk. Paprsky jsou mikročočkami fokusovány přes dichroické zrcadlo na Nipkowův disk. Svítící clony Nipkowova disku jsou objektivem zobrazeny na vzorek. Světlo, které je vzorkem odraženo zpět, prochází přes Nipkowův disk a odrazem od dichroického zrcadla na čip kamery [13]. Schéma principu konfokálního mikroskopu na principu dvou disků je zobrazeno na obrázku 7.



Obrázek 7: Schéma skenování u skenovacího konfokálního mikroskopu na principu dvou rotujících disků. Převzato z [13] a upraveno.

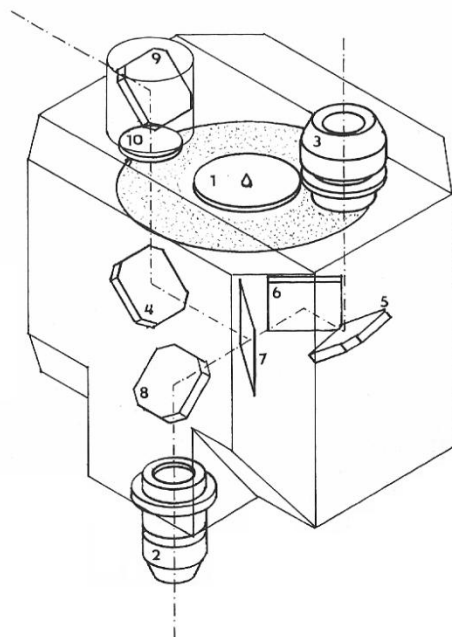
2 Konfokální mikroskop Confocal 2002

Konfokální mikroskop Confocal 2002 je umístěn na Ústavu fyzikálního inženýrství VUT v Brně. Jak bylo zmíněno v části 2.1.2, byl tento mikroskop zkonstruován českými vědci Mojmírem Petráněm, Milanem Hadravským a Miroslavem Malým v roce 1986 a jedná se o konfokální mikroskop s duálním rastrováním TSCM (viz obrázek 8).



Obrázek 8: Sestava konfokálního mikroskopu Confocal 2002. Převzato z [4].

Tímto přístrojem byly poprvé získány kvalitní optické řezy tlustým preparátem, konkrétně mozkovou tkání [14]. Mikroskop je tvořen objektivem, okulárem, šesti čočkami osvětlovací soustavy, zrcátky a jedním polopropustným děličem. Optické řezy jsou tvořeny v reálném čase.



Obrázek 9: Hlava konfokálního mikroskopu Confocal 2002. Převzato z [4]. 1 - Nipkowův kotouč, 2 - objektiv, 4,5,6,8,9 - zrcátka, 7 - polopropustný dělič, 10 - polní čočka.

Hlava konfokálního mikroskopu a její uspořádání je zobrazeno na obrázku 9. Paprsky přichází z osvětlovače, jsou zrcadlem 9 odraženy, prochází polní čočkou 10 a osvětlují Nipkowův disk 1. Po průchodu diskem 1 jsou polopropustným děličem 7 a dalšími zrcadly 4,8 odraženy a prochází objektivem 2 až na povrch vzorku. Zde jsou odraženy a putují znovu přes objektiv 2, zrcadlo 8 a polopropustným děličem 7 tentokrát prochází. Dalšími dvěma zrcadly 5,6 jsou směřovány přes Nipkowův disk 1 do okuláru 3. Soustava zrcadel 4-6 a polopropustným děličem 7 musí být velice přesně seřízena, aby zajistila průchod odpovídajícími otvory na druhé straně Nipkowova disku 1.

Jako původní zdroj mikroskopu se využívala vysokotlaková rtuťová výbojka s krátkým obloukem Osram HBO 200W/2 TM L1 [4]. Jelikož je světlo z výbojky vyzařováno pod velkým vyzařovacím úhlem a tento úhel není vhodně usměrněn osvětlovačem, je využita pouze malá část celkového světelného toku výbojky.

3 Osvětlovací soustavy v optické mikroskopii

Jelikož při pozorování v klasické mikroskopii vzorky nevysílají své vlastní světlo, musí být při pozorování prosvětlovány, nebo osvětlovány podle toho, jedná-li se o vzorek průhledný nebo neprůhledný. Aby se využilo veškerých optických vlastností mikroskopu, musí být běžně rozptylující vzorek osvětlen tak, aby byla plně využita numerická apertura kondenzoru. Ta je běžně volena přibližně 70% numerické apertury objektivu, pokud toto není dodrženo, numerická apertura objektivu není zcela vyplněna paprsky a nebude plně využito rozlišovací schopnosti objektivu [15]. Při pozorování vzorku pak nejsou rozlišeny veškeré detaily. Vliv menší apertury paprsků, které vycházejí ze vzorku, než je numerická apertura objektivu nelze kompenzovat zvýšením jasu světelného zdroje. Osvětlovací soustavy se navrhují na základě vlastností vzorku, zda je průhledný nebo neprůhledný a podle jeho rozptylovacích vlastností. Je-li vzorek nerozptylující, nebo slabě rozptylující musí být numerická apertura kondenzoru shodná s numerickou aperturou objektivu. Optické soustavy pracují s umělými zdroji světla, které nahradily přirozený zdroj světla. Záření zdrojů nelze použít přímo bez úpravy tvarů svazků záření, pomocí kolektoru a kondenzoru, které tvoří osvětlovací systém.

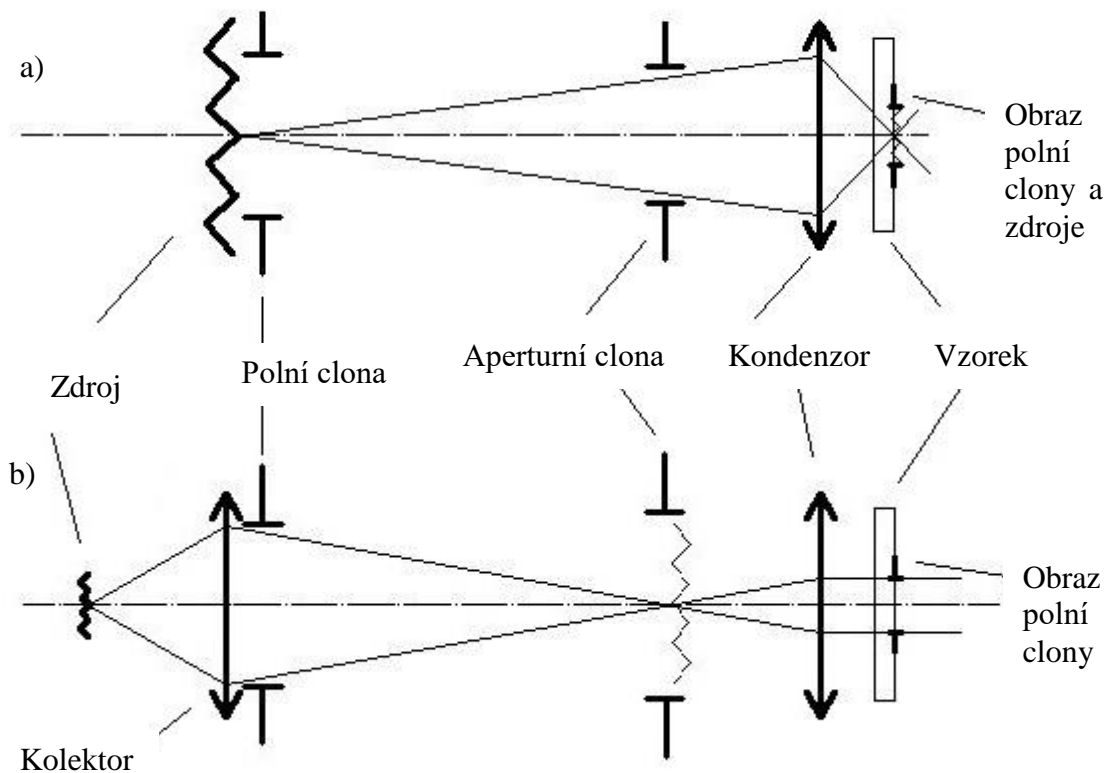
Kolektory mohou být jednočlenné nebo složené z více čoček. U kolektorů je zapotřebí pečlivě korigovat otvorovou vadu. První čočka se nazývá sběrná čočka a jejím úkol je zachytit co nejvíce paprsků vyzařovaných ze zdroje. Pro velké apertury zdroje se jako sběrné čočky používají meniskové čočky. Osvětlovací systém musí zajistit, aby bylo celé zorné pole osvětleno rovnoměrně a osvětlovací svazek vyplnil pupilu objektivu. Pro rovnoměrné osvětlení zorného pole je nutno zachovat systém pupil z geometrické optiky. Výstupní pupila osvětlovacího systému musí splývat se vstupní pupilou mikroskopového objektivu [16]. Dle historického hlediska dělíme principy osvětlení na kritické a Köhlerovo.

3.1 Kritické osvětlení

Tato metoda osvětlení mikroskopu byla poprvé vynalezena britským vědcem Edvardem Nelsonem. Kritické neboli Nelsonovo osvětlení spoléhá na vytvoření obrazu zdroje za použití kondenzoru. Zdroj světla musí být homogenní a umístěný co nejdál od kondenzoru, aby paprsky dopadaly na vzorek pod co největším úhlem [17]. Při kritickém osvětlení je obraz zdroje vytvořen přímo do roviny vzorku pomocí kondenzoru (viz obrázek 10a)). Před kondenzorem leží aperturní clona. Změnou velikosti otvoru aperturní clony můžeme regulovat aperturu osvětlovacího svazku. Polní clona je umístěna těsně za zdrojem a vymezuje zorné pole a zobrazuje se spolu se zdrojem přímo na vzorek. Kritické osvětlení není vhodné v případě, kdy jas zdroje není rovnoměrný, protože dochází k nerovnoměrnému osvětlení vzorku. V dnešní době se mikroskopy osvětlují zdroji, které vyzařují nerovnoměrné světlo. Z toho důvodu se již kritické osvětlení nepoužívá a nahradilo jej Köhlerovo osvětlení.

3.2 Köhlerovo osvětlení

Köhlerovo osvětlení bylo poprvé představeno v roce 1893 Augustem Köhlerem [18]. Toto osvětlení je dnes nejpoužívanější, protože umožňuje plného využití potenciálu mikroskopu. Köhlerovo osvětlení se liší od kritického tím, že zdroj světla se nezobrazuje přímo na vzorek ale do vstupní pupily kondenzoru. Zdroj je kolektorem zobrazen do aperturní clony a vzniká zvětšený obraz zdroje. Aperturní clona určuje aperturu osvětlovacího svazku a tím i rozlišovací schopnost a kontrast. Clona u kolektoru určuje velikost zorného pole, odtud plyne název polní clona. U Köhlerova osvětlení získáváme rovnoměrné osvětlení celého zorného pole. Schéma Köhlerova osvětlení je zobrazeno na obrázku číslo 10b) [18].



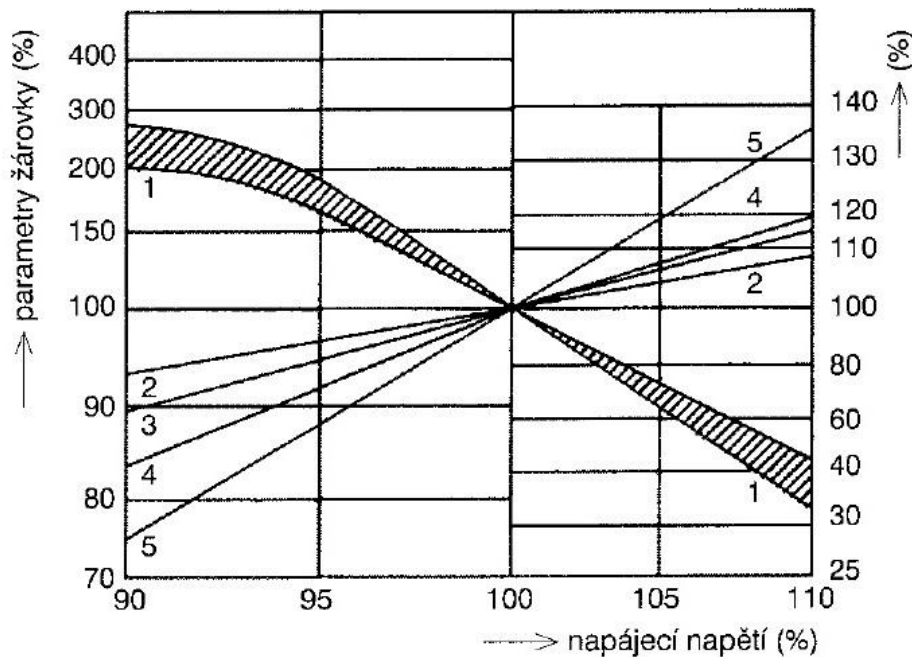
Obrázek 10: Srovnání kritického osvětlení a) a Köhlerova osvětlení b). Převzato z [19] a upraveno.

4 Zdroje světla optických mikroskopů

Dříve se jako zdroj světla u optických mikroskopů využívalo denní světlo. Později se začali používat olejové lampy, ale postupem času se začala konstrukce mikroskopu zlepšovat a s tím i světelné zdroje. Každá konstrukce mikroskopu vyžaduje specifický druh zdroje světla. Snaha využít co nejefektivněji energii světla vyžaduje neustálé zdokonalování umělého osvětlení. Moderní technologie a nové materiály umožňují výrobu kvalitnějších a efektivnějších světelných zdrojů. Nejběžnějším zdrojem pro dnešní mikroskopy bývá výkonná LED dioda.

4.1 Klasické zdroje

Mezi ně lze řadit žárovku, která se skládá z uzavřené skleněné baňky naplněné směsí inertních plynů a z wolframového vlákna. Kvůli vysokým teplotám, které dosahují v blízkosti baňky až 1700 K, musí být baňka žárovky vyrobena ze skloviny typu „vycor“ (sklo s vysokým obsahem oxidu křemičitého). Vlákno je stočené do jednoduché nebo dvojité šroubovice a jeho speciální vlastnosti jsou potřeba u halogenových žárovek. Wolfram-halogenové žárovky vyzařují spojité spektrum světla, které se pohybuje v rozmezí 200 až 3000 nm a s barevnou teplotou v rozmezí 2900-3100 K. Největší intenzity dosahují v rozmezí 700-1000 nm. Osvětlení je stálé po celou dobu životnosti žárovky, která se pohybuje v rozmezí 1000-2500 hodin. Oproti klasickým baňkám se na skle neusazuje wolfram, což zvyšuje dobu života vlákna, tedy i celé žárovky. Halogenové žárovky nabízejí lepší stabilitu světelného toku a úbytek během života nepřevyšuje 5 % počáteční hodnoty. Mezi další výhody patří vyšší účinnost přeměny elektrické energie na světelnou [20]. Problém nastává při častém zapínání a vypínání žárovky na plné napětí, kdy dochází k dřívějšímu přepálení vlákna a zkrácení životnosti žárovky. Wolfram při svícení postupně rekrystalizuje a stává se křehkým. Náhlé zvýšení teploty v zeslabeném rekrystalizovaném místě obvykle způsobí přepálení vlákna. Z tohoto důvodu žárovky je třeba rozsvítit nižším napětím a následně plynulým zvyšováním napětí dosáhneme plné hodnoty světelného toku [15]. Závislost základních parametrů halogenové žárovky na napájecím napětím je zobrazena na obrázku 11.



Obrázek 11: Závislost základních parametrů halogenové žárovky na napětí sítě, 1 - životnost, 2 - proud, 3 - měrný výkon, 4 - příkon, 5 - světelný tok. Převzato z [20].

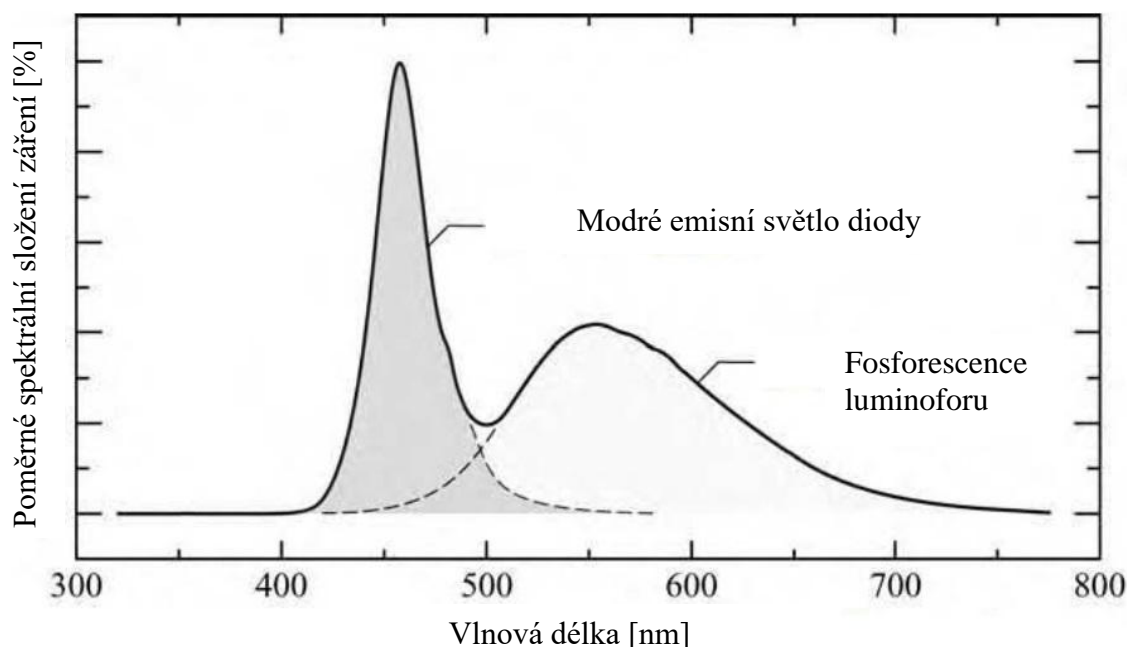
Mezi další skupinu zdrojů patří výbojové světelné zdroje. Základem funkce výbojových zdrojů jsou procesy související s průchodem elektrického proudu prostředím obsahujícím vhodné páry nebo plyny a jejich směsi, zejména páry rtuti, sodíku atd. Podle tlaku pracovní náplně rozdělujeme výbojky na nízkotlaké, vysokotlaké a výbojky s velmi vysokým tlakem. Tlak náplně výrazně ovlivňuje konstrukci světelného zdroje, jeho technické a provozní parametry a tedy i oblast použití. Mezi hlavní představitelé nízkotlakových výbojových zdrojů patří zářivky, kompaktní zářivky, nízkotlakové sodíkové výbojky a indukční výbojky.

Mezi často využívané zdroje světla patří vysokotlaková rtuťová výbojka. Oproti zářivkám mají rtuťové výbojky podstatně vyšší pracovní tlaky a teploty plynů, proto se musí používat odolnější materiály na výrobu hořáku. Ve výbojkách vzniká světlo při elektrickém výboji mezi dvěma elektrodami v ionizovaných plynech nebo kovových parách. Plyn obsahuje nosiče elektrického náboje a stává se elektricky vodivým. Oproti halogenovým žárovkám výbojky vynikají vysokým světelným tokem, který je však prostorově nehomogenní. Světelný tok dosahuje až tisíce lumenů a světelná účinnost až 100 lm/W. Vysokotlakové rtuťové výbojky dosahují rozměry zápalného oblouku 0,3 mm x 0,3 mm a blíží se tak bodovému zdroji světla, proto se využívají u tandemových konfokálních mikroskopů. Z tohoto důvodu je potřeba přesně umístit výbojku do optické osy. Mezi hlavní nevýhody patří nízká životnost a silné zahřívání výbojky [20].

Pro laserový konfokální mikroskop se používá laserové monochromatické elektromagnetické záření s velkou prostorovou koherencí. Světlo je z laseru vyzářováno v úzkém svazku a s malou divergencí. Existuje celá řada různých typů laserových zdrojů, pro které je charakteristické jedinečné emisní spektrum.

4.2 LED diody

Zkratka označení elektronické součástky LED diody pochází z počátečních písmen anglického názvu Light Emitting Diode. LED dioda je polovodičový prvek, který generuje světelné záření při P-N přechodu, který vyzařuje úzké spektrum. Bílé světlo lze získat z čipu diody dvěma způsoby. Například použitím tří různých čipů v jednom tělese LED diody, kde dochází k míchání barev. Každý čip emituje světlo o jiné vlnové délce. Nejčastěji se mísí světlo červené, zelené a modré barvy. Výsledný jas je nižší a v průběhu života dochází k nežádoucím změnám barvy vyzařovaného světla. Druhý způsob je založen na kombinaci LED diody a luminoforu. Vrchlík LED diody je opatřen tenkou vrstvou luminoforu. Část modrého světla, které čip diody emituje je luminoforem absorbována. Luminescencí vznikne žluté světlo a výsledně vzniká bílé světlo (viz obrázek 12).

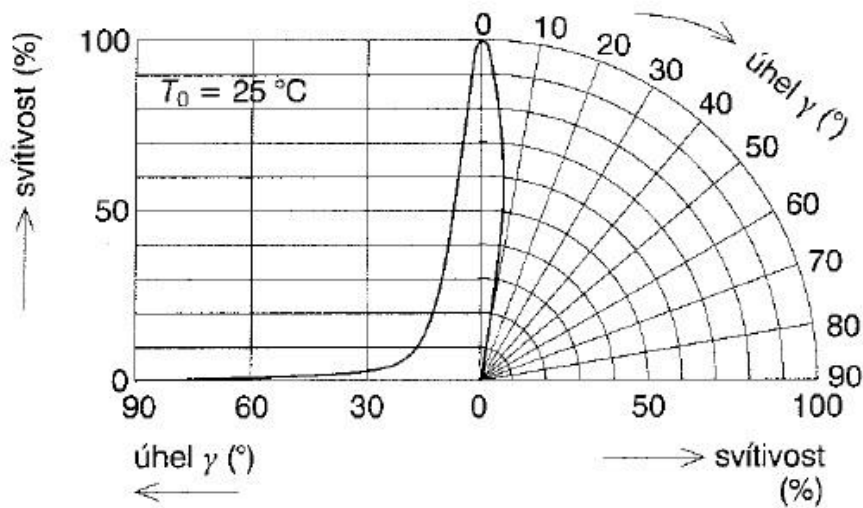


Obrázek 12: Emisní spektrum bílé LED diody. Převzato z [21] a upraveno.

U jiných typů bílých LED diod emituje P-N přechod ultrafialové záření, to je přímo na čipu luminoforem transformováno na bílé světlo. Tato metoda vytváří dokonalejší bílé světlo než první metoda. Barevný tón bílého světla se mění podle množství fosforového luminoforu, díky čemuž lze vytvářet odlišné barevné tóny, jako je teplá bílá, neutrální bílá nebo studená bílá. U diod vyzařujících bílé světlo jsou obsaženy všechny vlnové délky viditelného záření, proto se u nich neuvádí jejich barva ale barevná teplota vyjádřena v stupnicích Kelvin. Teploty se pohybují od 2 500 K do 4 000 K u teplých odstínů a 5 000 K až 10 000 K u chladnějších odstínů.

Mezi hlavní výhody patří vysoká životnost, malý pokles světelného toku v průběhu života diody a možnost okamžitého vypnutí a zapnutí bez snížení její životnosti.

Maximálního světelného toku dioda dosáhne okamžitě po zapnutí. Oproti vysokotlakové rtuťové výbojce mají diody nízký světelný tok a velkou produkci tepla, které je potřeba odvádět mimo tělo čipu. Nedostatečné chlazení LED diody snižuje její životnost a světelný výkon. Mezi další nevýhody patří částečné využití vyzařovaného světelného toku. Na obrázku 13 můžeme vidět závislost svítivosti LED diody na úhlu vyzařování [20].



Obrázek 13: Příklad rozložení svítivosti LED v pravoúhlých a polárních souřadnicích. Převzato z [20].

5 Analýza problému

Jak bylo v úvodu práce zmíněno, tato práce se zabývá návrhem nové osvětlovací soustavy pro konfokální mikroskop s duálním rastrováním Confocal 2002. Osvětlovací systém je založen na principu Köhlerova osvětlení. Cílem práce je navrhnout a zkonstruovat inovativní řešení mikroskopového osvětlovače s vhodným LED zdrojem. Doposud byla v mikroskopu Confocal 2002 použita jako zdroj světla vysokotlaká rtuťová výbojka. Výbojka sice vyniká vysokým světelným tokem a světelnou účinností, bohužel však má spoustu nevýhod, jako je například nízká životnost a nutnost vodního chlazení. Dnes již máme na trhu řadu kvalitnějších osvětlovacích zdrojů - LED diody. Vysoce výkonné luminiscenční diody jsou vhodnou náhradou výbojky v konfokálním mikroskopu Confocal 2002. Snaha je co nejefektivněji využít a přenést světelné záření generované LED diodou za použití mnou vybraných optických členů.

5.1 Volba vhodné LED diody

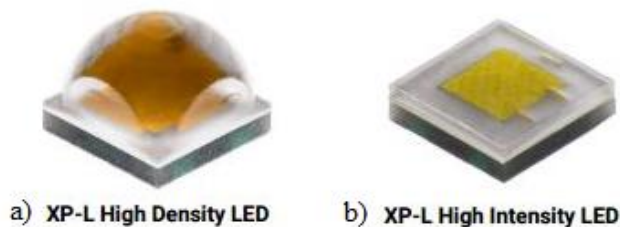
V současné době se na trhu vyskytuje široká nabídka LED diod. Liší se hlavně svojí konstrukcí, velikostí světelného toku a barevnou teplotou. Z principu osvětlovací soustavy bylo potřeba zvolit diodu s malými rozměry emitujícího čipu. Pro efektivní využití vyzařovaného světla zdroje v soustavě požadujeme co nejmenší vyzařovací úhel zdroje. Dalším rozhodujícím faktorem je světelný tok. Pro dostatečné osvětlení vzorku je potřeba vybrat diodu s co největším výkonem a světelným tokem, protože část světla je ztracena při průchodu optickou soustavou mikroskopu a velká část světla je eliminována na Nipkovovu disk. LED diody mají obdobný rozměry čipu a velikost vyzařovacího úhlu, proto se soustředíme při výběru především na hodnoty světelného toku a barevnou teplotu. Při pozorování musí být vzorek osvětlen světlem podobajícím se dennímu světlu. Z toho důvodu jsem vybrala LED diody s barevnou teplotou v rozmezí 4000 K až 6000 K. Pro tyto požadavky jsem provedla průzkum trhu a vybrala nejvhodnější LED diody. Všechny vybrané LED diody dosahují rozměrů 3,45 mm x 3,45 mm.

Požadavky nejlépe splňuje následujících pět LED diod. Parametry těchto LED diod jsou uvedeny v tabulce 1.

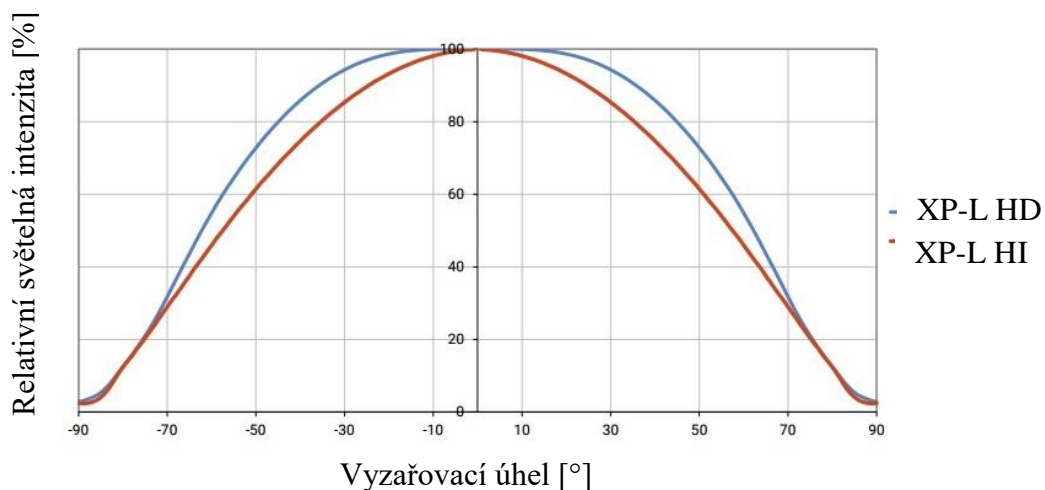
Tabulka 1: Parametry vybraných LED diod. Převzato z [22].

LED dioda	Světelný tok [lm]	Barevná teplota [K]	Vyzařovací úhel [°]	Maximální Odebíraný proud [mA]	Napájecí napětí [V]	Měrný výkon [lm/W]
XP-E	456	10500	125	1050	3,5	124,1
XP-L HI	400	4000	115	1050	2,95	129,1
XP-L HI	400	6500	115	1050	2,95	129,1
XP-L HD	460	4000	125	1050	2,95	148,5
XP-L HD	480	6500	125	1050	2,95	154,9
XHP35 HI	475	4000	115	350	12	113,1

LED dioda XP-L byla vybrána pro nejvyšší měrný výkon a je k dispozici ve dvou konstrukčních řešeních XP-L High Density a XP-L High Intensity (viz obrázek 14). Na XP-L HD je na emitující ploše umístěna čočka. U tohoto druhu LED diody je vhodné použít také TIR (Total Internal Reflection) optiku. Pro návrhy s TIR optikou byla použita LED dioda XP-L HD, kvůli vhodnému chodu paprsků. Rozdíl závislosti vyzařovacího úhlu a relativní světelné intenzity u XP-L HD a XP-L HI je vidět na obrázku 15.



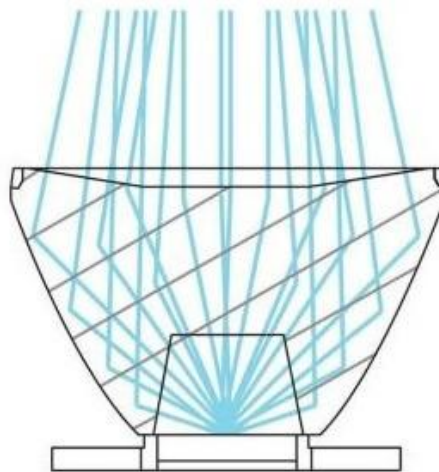
Obrázek 14: LED diody a) XP-L HD b) XP-L HI. Převzato z [22] a upraveno.



Obrázek 15: Závislost úhlu a relativní světelné intenzity LED diod XP-L. Převzato z [22] a upraveno.

5.2 Volba TIR

LED diody mají široký vyzařovací úhel a zpravidla nejsme schopni první čočkou v optické soustavě zachytit veškeré paprsky světla. Proto je potřeba jejich světelné paprsky dále transformovat pomocí sekundárních optických členů. Vzhledem k požadované vysoké světelné účinnosti, mechanické odolnosti a snadné montáži je nejvhodnější řešení použití optických členů TIR reflektoru. TIR reflektor se skládá ze středové čočky a odrazných ploch pracujících na principu totálního odrazu světla (viz obrázek 16).



Obrázek 16: TIR optika. Převzato z [23] a upraveno.

Pro co nejefektivnější využití veškerého světla se musí použít vhodná kombinace LED diody s TIR optikou. Každý výrobce konkrétního TIR reflektoru udává optické parametry pro kombinaci s určitou LED diodou. Mezi hlavní parametry patří: vyzařovací úhel, účinnost a poměr svítivosti ku světelnému toku. Na základě těchto hodnot jsem vybrala nejvhodnější kombinaci diody s TIR reflektorem (viz tabulka 2). Při kombinaci LED diody s TIR reflektorem se nám vyzařovací úhle snížil z 115° na rozmezí intervalu 4-10°. Příklady použitých TIR reflektorů v navržených optických soustavách jsou zobrazeny na obrázku 17.

Tabulka 2: Parametry pro kombinaci LED diody s TIR reflektorem. Převzato z [24].

TIR	LED	Úhel [°]	Účinnost [%]
FCN12076_IRIS-SCREW	XP-E	4	93
	XHP35 HI	7,6	90
	XP-L	8,5	93
FCN13595_CRYSTAL-MINE	XP-L HI	4,5	92
FCN13552_CRYSTAL-RS	XHP35 HI	5,7	89
	XP-L	7	88



a)

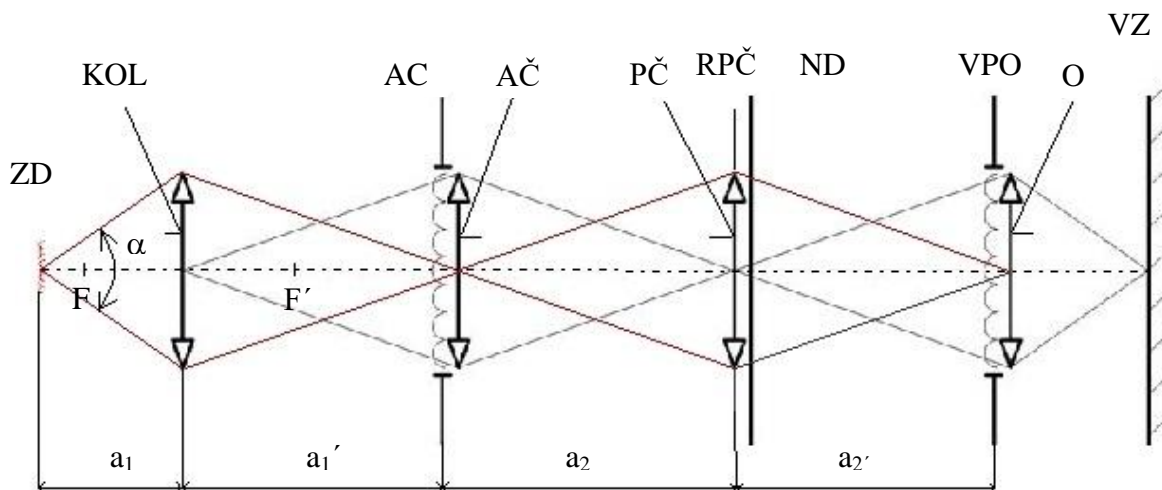


b)

Obrázek 17: TIR optika a) CRYSTAL-MINE b) IRIS SCREW. Převzato z [24].

6 Teoretický rozbor návrhů osvětlovacích soustav

Soustavy byly navrženy tak, aby celá osvětlovací soustava splňovala podmínku Köhlerova osvětlení. Schéma principu osvětlovací soustavy je na obrázku 18. Obraz zdroje ZD je přenesen kolektorem KOL do roviny aperturní clony AC a dále je zobrazen pomocí polní čočky PČ do vstupní pupily objektivu VPO, která je vzdálená 170 mm od polní čočky. Tato vzdálenost je jedním z parametrů, které musí být dodrženy. Velikost obrazu zdroje ve vstupní pupile objektivu musí dosahovat maximálně 8 mm, aby byla plně využita vstupní pupila objektivu. Rovina kolektoru KOL je promítnuta aperturní čočkou AČ do roviny Nipkowova disku ND a osvětluje jeho otvory, které jsou dále zobrazeny na povrch vzorku VZ. Mezi další důležité parametry patří průměr stopy svazku v rovině polní čočky PČ. Tento rozměr nesmí překročit průměr 24 mm, aby celkový obraz stopy prošel vstupním otvorem v mikroskopu a aby nedocházelo k ořezání paprsků a následným ztrátám světla. Dále musí být polní čočka PČ osvětlena rovnoměrně s co největším výkonem pro rovnoměrné osvětlení otvorů na Nipkowově disku ND. U původního osvětlovacího systému mikroskopu Confocal 2002 byla použita polní čočka se sečnou ohniskovou vzdáleností 64 mm. Z důvodu nevhodných parametrů původní polní čočky, umístěné v soustavě, byla tato polní čočka PČ nahrazena čočkou PČ s vyhovujícími parametry. Cílem bylo navrhnout správnou kombinaci kolektoru KOL, aperturní čočky AČ a polní čočky PČ. Zbytek soustavy je stávající optika mikroskopu. Výběr nejvhodnějších čoček byl proveden z nabídky firmy Thorlabs, protože jako jediná uvádí všechny potřebné parametry pro jejich nadefinování v softwaru ZEMAX [25].



Obrázek 18: Schéma osvětlovací soustavy konfokálního mikroskopu. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AC - aperturní clona, AČ - aperturní čočka, PČ - polní čočka, RPČ - rovina polní čočky, ND - Nipkowův disk, VPO - vstupní pupila objektivu, O - objektiv, VZ - vzorek.

Na základě daných parametrů optické soustavy, jako jsou velikost zdroje, vzdálenost polní čočky PČ od vstupní pupily objektivu VPO a velikosti obrazu zdroje ve vstupní pupile objektivu VPO, jsem teoreticky navrhla optickou soustavu osvětlovače mikroskopu. Vytvořila jsem tři varianty optických soustav pomocí zobrazovací rovnice pro tenkou čočku: $\frac{1}{a} + \frac{1}{a'} = \frac{1}{f}$ a rovnice pro výpočet zvětšení $M = \frac{a'}{a}$, přičemž byly hledány minimální předmětové a obrazové vzdálenosti pro jednotlivé čočky (a_1, a_1', a_2, a_2'). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Pro všechny teoreticky vypočítané optické soustavy vyšlo, že jsou vhodné pouze pro vyzařovací úhel LED diody přibližně 13,4°, což neodpovídá reálnému vyzařovacímu úhlu vybrané LED diody, který je 115°. Z toho plyne, že osvětlovací soustava musí být tvořena vyšším počtem čoček, které budou dohromady plnit funkci kolektoru KOL. Což bude ukázáno v návrzích v části 7.

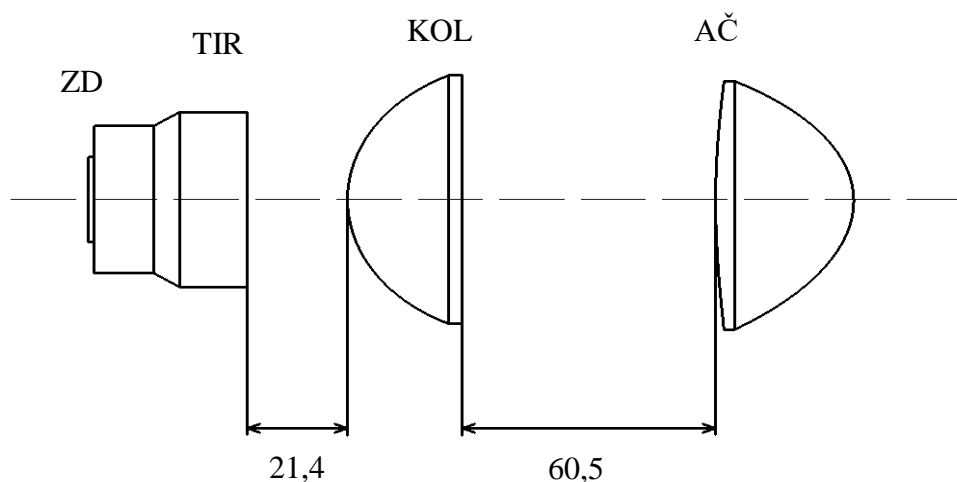
Tabulka 3: Vypočítané parametry tří variant optických soustav.

	1. varianta	2. varianta	3. varianta
a₁ [mm]	170	170	170
a₁' [mm]	340	680	170
a₂ [mm]	170	340	85
a₂' [mm]	170	170	170
velikost zdroje ZD [mm]	5	5	5
velikost obr. zdroje v AC [mm]	10	20	5
velikost obr. zdroje v VPO [mm]	10	10	10
f kolektoru KOL [mm]	113	56	85
Otvorový úhel kolektoru α [°]	13,4	13,4	13,4

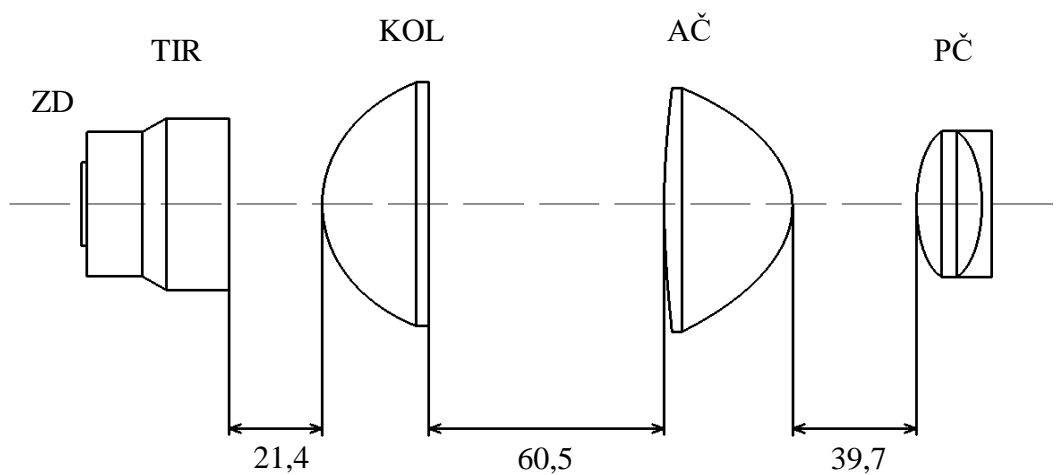
7 Návrhy osvětlovacích soustav a jejich experimentální ověření

7.1 Varianta A s TIR reflektorem

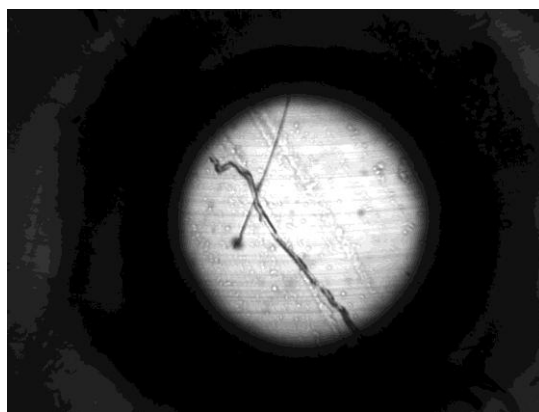
Při návrhu A jsem sestavila osvětlovací soustavu za pomoci TIR optiky. Byla použita LED dioda XP-L HD v kombinaci s TIR reflektorem CRYSTAL-RS. Dále za TIR reflektorem byla jako kolektor použita asférická čočka ACL5040U o průměru volné apertury 50 mm s ohniskovou vzdáleností 40 mm. Jako aperturní čočka byla zvolena asférická čočka ACL50832U o průměru 50 mm s ohniskovou vzdáleností 32 mm (viz obrázek 19). V rovině polní čočky RPC byl naměřen výkon 766 mA a v rovině vzorku VZ 7 μ W. Stopa v rovině vzorku byla nerovnoměrně osvětlená a vytvořily se nepravidelně osvětlené kruhy, což je nežádoucí (viz obrázek 21). Pro jejich odstranění byl do roviny polní čočky RPC přidán dublet AC300-050-A o průměru volné apertury 30 mm s ohniskovou vzdáleností 50 mm (viz obrázek 20). Výkon v rovině vzorku VZ se snížil na 3 μ W (viz obrázek 22). Pokles výkonu je také nežádoucím faktorem. Proto další návrhy osvětlovacích soustav budou provedeny bez TIR reflektoru.



Obrázek 19: Návrh optické soustavy s TIR reflektorem bez polní čočky, varianta A. ZD - zdroj, TIR - TIR reflektor, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka.



Obrázek 20: Návrh optické soustavy s TIR reflektorem s polní čočkou, varianta A. ZD - zdroj, TIR - TIR reflektor, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, PČ - polní čočka.



Obrázek 21: Snímek v rovině vzorku varianta A bez polní čočky.

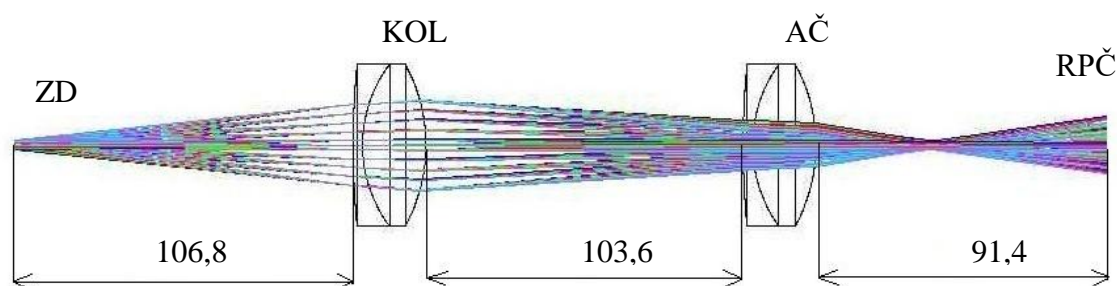


Obrázek 22: Snímek v rovině vzorku u varianty A s polní čočkou.

7.2 Varianta B

První návrh bez TIR reflektoru jsem sestavila za pomoci dvou identických achromatických tmelených dubletů, které jsou orientovány rozptylkou směrem ke zdroji. Dublety AC508-075-A se skládají ze dvou různých materiálů (viz obrázek 23 a tabulka 4). První dublet byl použit jako kolektor KOL se zvoleným průměrem volné apertury 50 mm pro zachycení co největšího množství paprsku vyzařujících ze zdroje. Při experimentu byla použita LED dioda XP-L HI, s vyzařovacím úhlem 115°.

Obrazová ohnisková vzdálenost obou dubletů je shodná a je rovna 75 mm. Nevýhodou použitého dubletu je jeho malá numerická apertura. V rovině polní čočky PČ byl pozorován rovnoměrně osvětlený obraz o průměru 14 mm, což vyhovuje našim požadavkům. Výkon v rovině polní čočky dosáhl 78 mW při maximálním propustném proudu LED diody 1,04 mA. Kvůli nedostatečnému výkonu v rovině polní čočky jsem dále se soustavou nepracovala a rozhodla jsem se navrhnout další soustavu.



Obrázek 23: Návrh optické soustavy, varianta B. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, RPC - rovina polní čočky.

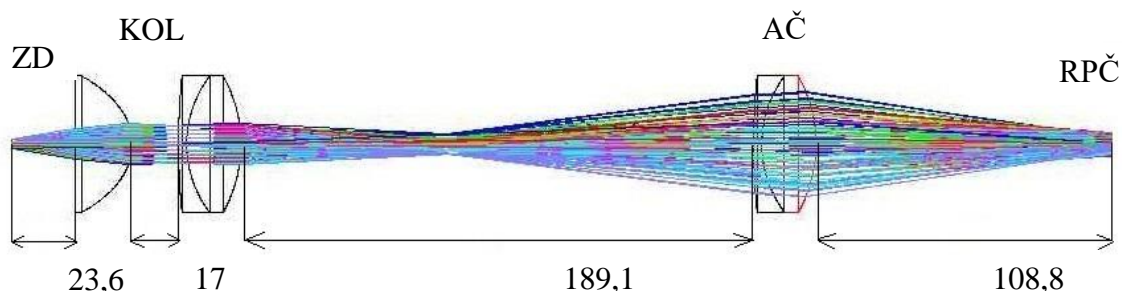
Tabulka 4: Parametry optické soustavy, varianta B.

Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Volná apertura [mm]
1	zdroj ZD	Infinity	106,8		1,73
2	kolektor KOL	247,7	3,0	SF11	25
3	kolektor KOL	41,0	20,0	BAF11	25
4	kolektor KOL	-50,8	100,0		25
5	aperturní čočka AČ	247,7	3,0	SF11	25
6	aperturní čočka AČ	41,7	20,0	BAF11	25
7	aperturní čočka AČ	-50,8	91,4		25

7.3 Varianta C

Pro tento návrh jsem použila kombinaci dvou předešlých dubletů a pomocné asférické čočky. Byla zvolena asférická čočka ACL5040U se zvoleným průměrem volné apertury 50 mm s krátkou ohniskovou vzdáleností 40 mm, vyrobená z materiálu B270 (viz obrázek 24 a tabulka 5). Krátká ohnisková vzdálenost umožňuje její umístění blíže ke zdroji a tím efektivněji využití vyzařovaného světla zdroje ZD. Takto je zkrácená celková vzdálenost navržené soustavy. Kolektor KOL slouží k transformování divergentních paprsků na konvergentní a skládá se z asférické čočky a dubletu. Jako aperturní čočka AČ byla použita stejná spojná čočka jako u kolektoru KOL.

V rovině polní čočky RPČ bylo dosaženo průměru stopy světla 10 mm a výkonu 163 mW při maximálním propustném proudu 1,04 A. Stopa v rovině polní čočky RPČ byla nerovnoměrně osvětlená, tudíž jednotlivé otvory Nipkowova disku NP byly osvětleny odlišnou intenzitou, což způsobí nerovnoměrné osvětlení vzorku. V rovině vzorku VZ byl naměřen celkový výkon 123 μ W.



Obrázek 24: Návrh optické soustavy, varianta C. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, RPČ - rovina polní čočky

Tabulka 5: Parametry optické soustavy, varianta C.

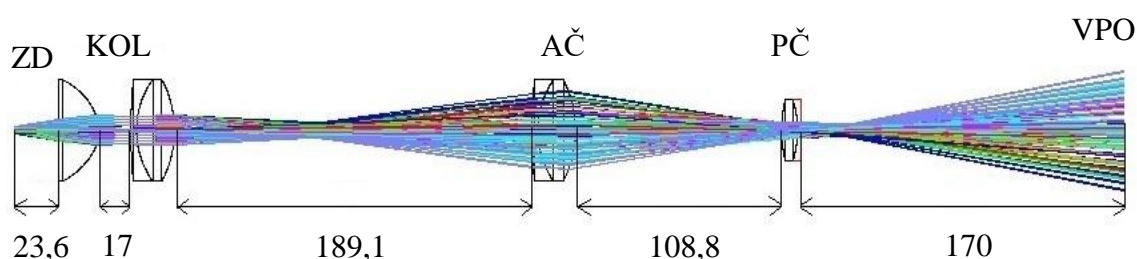
Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Vol. Apertur. [mm]	Konicita k	Param. asfér. č. A_4
1	zdroj ZD	Infinity	23,6		1,73		
2	kolektor KOL	Infinity	21	B270	25		
3*	kolektor KOL	-20,9	17		25	-0,6405	2,00E-06
4	kolektor KOL	247,7	3	SF11	25		
5	kolektor KOL	41,0	20	BAF11	25		
6	kolektor KOL	-50,8	189		25		
7	aperturní čočka AČ	247,7	3	SF11	25		
8	aperturní čočka AČ	41,7	20	BAF11	25		
9	aperturní čočka AČ	-50,8	108,8		25		

* Rovnice parabolického povrchu: $Z = \frac{S^2}{R \cdot (1 + \sqrt{1 - (1+k) \cdot S^2 / R^2})} + A_4 \cdot S^4 + A_6 \cdot S^6 + A_8 \cdot S^8$, kde Z je zakřivení povrchu a S je radiální vzdálenost od optické osy.

7.4 Varianta D

Pro tento návrh jsem použila předchozí soustavu a do roviny polní čočky PČ jsem vložila dublet AC300-080-A se zvoleným průměrem volné apertury 30 mm s ohniskovou vzdáleností 80 mm, který nahradil stávající polní čočku PČ mikroskopu (viz obrázek 25 a tabulka 6). Tento dublet byl vložen z důvodu zobrazení obrazu zdroje ZD do vstupní pupily objektivu VPO ve vzdálenosti 170 mm. Jako aperturní čočka AČ byla zvolena spojná čočka AC508-075-A o průměru volné apertury 50 mm s ohniskovou vzdáleností 75 mm, stejně jako u předchozích soustav.

Po přidání polní čočky do návrhu varianty C jsem pozorovala změny výkonu na vzorku. V rovině vzorku VZ se po přidání polní čočky snížil výkon z 13 μW na 2 μW . Vstupní pupila objektivu O má průměr 8 mm. Ve vzdálenosti 170 mm, ve vstupní pupile objektivu VPO, stopa dosahuje 60 mm, takže dochází k velkým ztrátám světla. Z tohoto důvodu jsem přešla na další návrh.



Obrázek 25: Návrh optické soustavy, varianta D. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, PČ - polní čočka, VPO - vstupní pupila objektivu.

Tabulka 6: Parametry optické soustavy, varianta D.

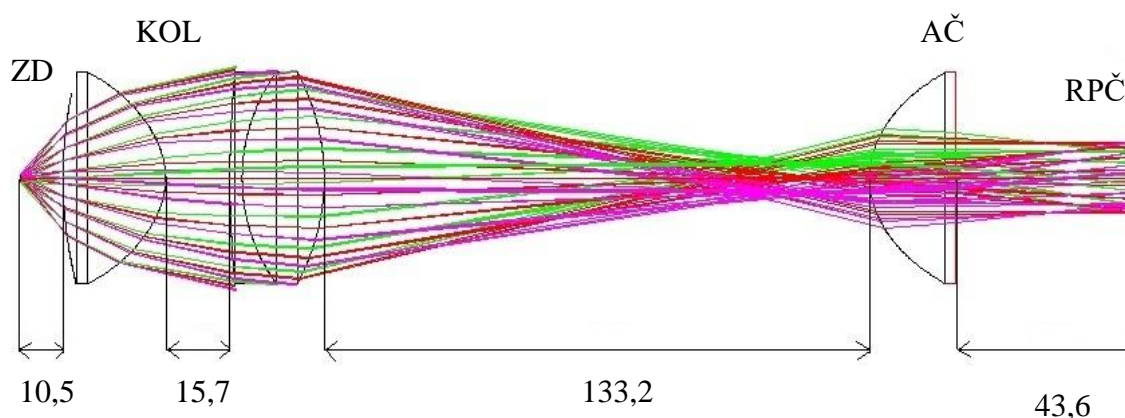
Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Vol. apertura [mm]	Konicita k	Param. asférické čoč. A_4
1	zdroj ZD	Infinity	23,6		1,73		
2	kolektor KOL	Infinity	21,0	B270	25		
3*	kolektor KOL	-20,92	17,0		25	-0,6405	2,00E-06
4	kolektor KOL	247,7	3,0	SF11	25		
5	kolektor KOL	41	20,0	BAF11	25		
6	kolektor KOL	-50,8	189,0		25		
7	aperturní čočka AČ	247,7	3,0	SF11	25		
8	aperturní čočka AČ	41,7	20,0	BAF11	25		
9	aperturní čočka AČ	-50,8	108,8		25		
10	polní čočka PČ	56,0	8,5	BAF10	15		
11	polní čočka PČ	-44,2	2,0	SF11	15		
12	polní čočka PČ	-219,8	170,0		15		

* Rovnice parabolického povrchu: $Z = \frac{S^2}{R \cdot (1 + \sqrt{1 - (1+k) \cdot S^2 / R^2})} + A_4 \cdot S^4 + A_6 \cdot S^6 + A_8 \cdot S^8$, kde Z je zkřivení povrchu a S je radiální vzdálenost od optické osy.

7.5 Varianta E

Pro tento návrh jsem zachovala kolektor KOL jako kombinaci asférické čočky s dubletem. Původní asférická čočka ACL5040U s ohniskovou vzdáleností 40 mm byla vyměněna za asférickou čočku ACL50832U s ohniskovou vzdáleností 32 mm (viz obrázek 26 a tabulka 7). Z důvodu menší ohniskové vzdálenosti je možné přiblížit čočku ke zdroji a tím pádem zachytit větší množství vyzařovaných paprsků. Funkci aperturní čočky AČ v tomto návrhu zastává asférická čočka ACL5040U s ohniskovou vzdáleností 40 mm, jejíž parametry jsou popsány v tabulce 7.

V rovině polní čočky RPČ bylo dosaženo průměru 17,5 mm a rovnoměrného osvětlení. Byl naměřen maximální výkon ze všech soustav 560 mW. Kvůli nedodržení zobrazení zdroje do vstupní pupily objektivu VPO bylo dosaženo v rovině vzorku VZ výkonu 10 μW.



Obrázek 26: Návrh optické soustavy, varianta E. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, RPČ - rovina polní čočky

Tabulka 7: Parametry optické soustavy, varianta E.

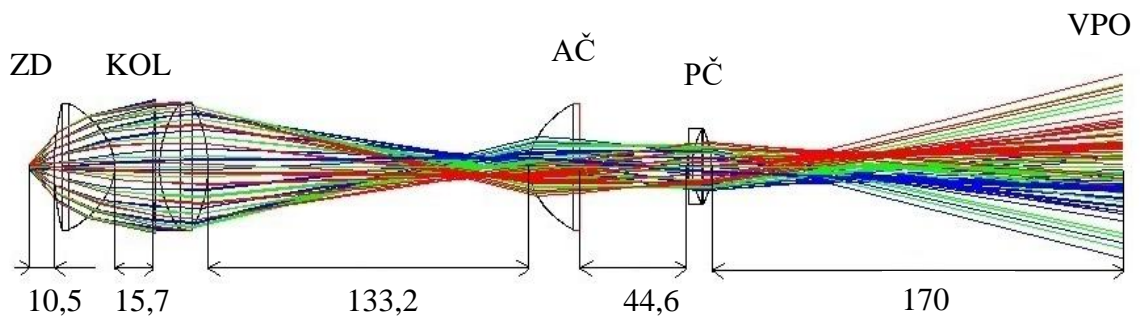
Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Volná apertura [mm]	Konicita k	Par. asfér. čoč. A ₄	Par. asfér. čoč. A ₆	Par. asfér. čoč. A ₈
1	zdroj ZD	Infinity	10,5		1,73				
2	kolektor KOL	99,64	25	B270	25				
3*	kolektor KOL	-18,32	15,7		25	-0,798073	3,40362E-06	6,83627E-09	-1,9656E-11
4	kolektor KOL	247,7	3	BAF11	25				
5	kolektor KOL	41,7	20,0	BAF11	25				
6	kolektor KOL	-50,8	133,2		25				
7*	aperturní čočka AČ	20,92	21	B270	25	-0,6405	2,00E-06	0	0
8	aperturní čočka AČ	Infinity	43,6		25				

* Rovnice parabolického povrchu: $Z = \frac{S^2}{R \cdot (1 + \sqrt{1 - (1+k) \cdot S^2/R^2})} + A_4 \cdot S^4 + A_6 \cdot S^6 + A_8 \cdot S^8$, kde Z je zakřivení povrchu a S je radiální vzdálenost od optické osy.

7.6 Varianta F

Při návrhu F jsem použila předchozí soustavu (varianta E) a do roviny polní čočky RPČ jsem vložila dublet AC300-050-A o průměru volné apertury 30 mm s ohniskovou vzdáleností 50 mm, který nahradil stávající polní čočku (viz obrázek 27 a tabulka 8). Po přidání další čočky se obraz zdroje zobrazil do vzdálenosti 170 mm od polní čočky PČ do vstupní pupily objektivu VPO.

Z důvodu velkého obrazu zdroje ve vstupní pupile objektivu VPO a nevyužití veškerého světla dosahuje výkon v rovině vzorku VZ pouze 4 μ W.



Obrázek 27: Návrh optické soustavy, varianta F. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, PČ - polní čočka, VPO - vstupní pupila objektivu.

Tabulka 8: Parametry optické soustavy, varianta F.

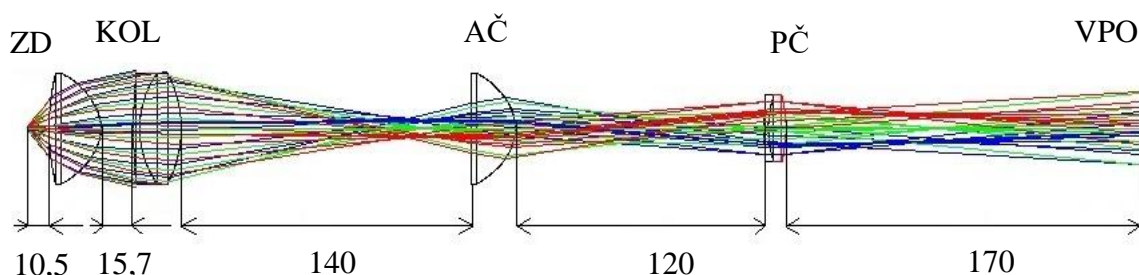
Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Vol. aper. [mm]	Konicita k	Param. asfér. čoč. A ₄	Param. asfér. čoč. A ₆	Param. asfér. čoč. A ₈
1	zdroj ZD	Infinity	10,5		1,73				
2	kolektor KOL	99,63	25	B270	25				
3*	kolektor KOL	-18,32	15,7		25	-0,79807	3,40362E-06	6,83627E-09	-1,96561E-11
4	kolektor KOL	247,7	3	BAF11	25				
5	kolektor KOL	41,7	20	BAF11	25				
6	kolektor KOL	-50,8	133,2		25				
7	aperturní čočka AČ	20,92	21	B270	25				
8	aperturní čočka AČ	Infinity	44,6		25				
9	polní čočka PČ	161,5	2	BAF10	15				
10	polní čočka PČ	29,4	8	BAF10	15				
11	polní čočka PČ	-34	170		15				

* Rovnice parabolického povrchu: $Z = \frac{S^2}{R \cdot (1 + \sqrt{1 - (1+k) \cdot S^2 / R^2})} + A_4 \cdot S^4 + A_6 \cdot S^6 + A_8 \cdot S^8$, kde Z je zkřivení povrchu a S je radiální vzdálenost od optické osy.

7.7 Varianta G

Při návrhu G jsem použila stejnou kombinaci čoček jako při návrhu F, namísto původní polní čočky AC300-050-A, jsem vložila dublet AC300-080-A o ohniskové vzdálenosti 80 mm (viz obrázek 28 a tabulka 9). Z důvodu velkého obrazu zdroje v rovině vstupní pupily objektivu VPO byly pozměněny vzdálenosti mezi čočkami a orientace aperturní čočky. Opět se zobrazil obraz zdroje ZD do vstupní pupily objektivu VPO, tentokrát mnohonásobně menší.

Obraz zdroje ZD v rovině vstupní pupily objektivu VPO dosahoval velikosti 16 mm. V rovině vzorku VZ byl naměřen výkon 20 μ W.



Obrázek 28: Návrh optické soustavy, varianta G. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, PČ - polní čočka, VPO - vstupní pupila objektivu.

Tabulka 9: Parametry optické soustavy, varianta G.

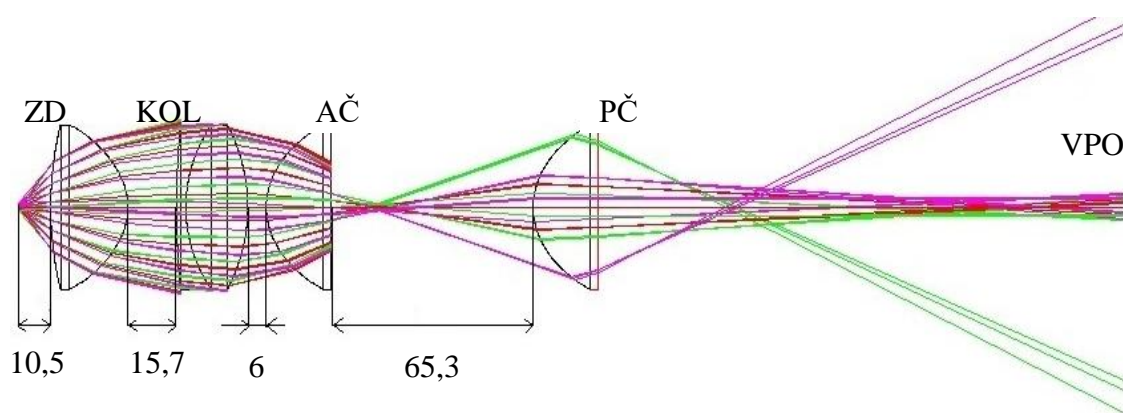
Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Vol. aper. [mm]	Konicita k	Param. asf. čoč. A ₄	Param. asf. čoč. A ₆	Param. asf. čoč. A ₈
1	zdroj ZD	Infinity	10,5		1,73				
2	kolektor KOL	99,64	25	B270	25				
3*	kolektor KOL	-18,31	15,7		25	-0,798073	3,40362E-06	6,83627E-09	-1,9656E-11
4	kolektor KOL	247,7	3	BAF11	25				
5	kolektor KOL	41,7	20	BAF11	25				
6	kolektor KOL	-50,8	140		25				
7	aperturní čočka AČ	Infinity	21	B270	25				
8*	aperturní čočka AČ	-20,92	120		25	-0,6405	2,00E-06	0	0
9	polní čočka PČ	219,8	2	BAF10	15				
10	polní čočka PČ	44,2	8,5	BAF10	15				
11	polní čočka PČ	-56	170		15				

* Rovnice parabolického povrchu: $Z = \frac{S^2}{R \cdot (1 + \sqrt{1 - (1+k) \cdot S^2 / R^2})} + A_4 \cdot S^4 + A_6 \cdot S^6 + A_8 \cdot S^8$, kde Z je zkrivení povrchu a S je radiální vzdálenost od optické osy.

7.8 Varianta H

Při návrhu H jsem zachovala kolektor KOL jako kombinaci asférické čočky s dubletem stejně jako v předchozí soustavě G. Funkce aperturní čočka AČ a polní čočka PČ zastávají asférické čočky ACL5040U o průměru volné apertury 50 mm s ohniskovou vzdáleností 40 mm orientovány stejným směrem (viz obrázek 29 a tabulka 10). Obraz zdroje ZD byl kolektorem zobrazen mezi tyto dvě čočky a následně druhou asférickou čočkou zobrazen do vstupní pupily objektivu VPO ve vzdálenosti 170 mm.

Při průchodu optickou soustavou došlo k velkým ztrátám světla. V rovině polní čočky RPČ byl naměřen výkon pouze 120 mW. Stopa v rovině polní čočky RPČ dosahovala velikosti 17,5 mm. I přes malý výkon v rovině polní čočky RPČ byl v rovině vzorku naměřen výkon 6 μ W.



Obrázek 29: Návrh optické soustavy, varianta H. ZD - zdroj, KOL - kolektor, AČ - aperturní čočka, PČ - polní čočka, VPO - vstupní pupila objektivu.

Tabulka 10: Parametry optické soustavy, varianta H.

Povrch	Komentář	Rádus R [mm]	Tloušťka t [mm]	Materiál	Vol. Apert. [mm]	Konicita k	Param. asf. čoč. A ₄	Param. asf. čoč. A ₆	Param. asf. čoč. A ₈
1	zdroj ZD	Infinity	10,5		1,73				
2	kolektor KOL	99,64	25	B270	25				
3*	kolektor KOL	-18,32	15,7		25	-0,798073	3,40362E-06	6,83627E-09	-1,96561E-11
4	kolektor KOL	247,7	3	BAF11	25				
5	kolektor KOL	41,7	20	BAF11	25				
6	kolektor KOL	-50,8	6		25				
7*	aperturní čočka AČ	20,92	21	B270	25	-0,6405	2,00E-06	0	0
8	aperturní čočka AČ	Infinity	65,3		25				
9*	polní čočka PČ	20,92	21	B270	25	-0,6405	2,00E-06	0	0
10	polní čočka PČ	Infinity	170		25				

* Rovnice parabolického povrchu: $Z = \frac{S^2}{R \cdot (1 + \sqrt{1 - (1+k) \cdot S^2 / R^2})} + A_4 \cdot S^4 + A_6 \cdot S^6 + A_8 \cdot S^8$, kde Z je zkřivení povrchu a S je radiální vzdálenost od optické osy.

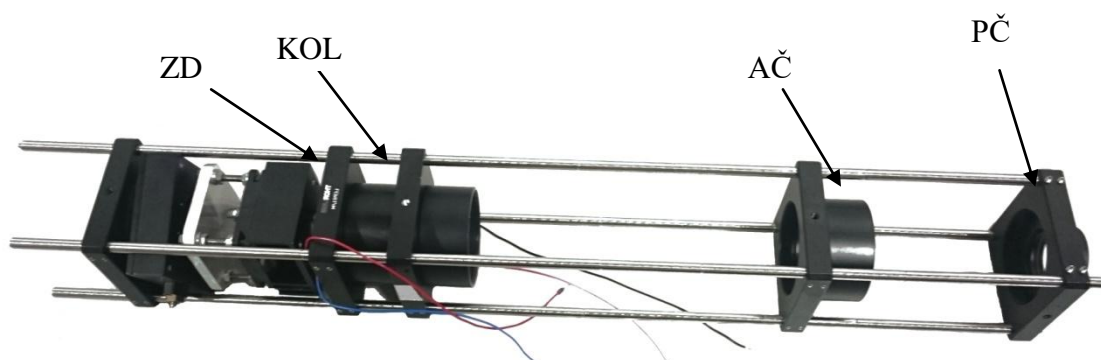
7.9 Zhodnocení

Navržené optické soustavy jsem porovnála a zhodnotila výsledky. Hlavní parametry jsou shrnuty v tabulce 11. Mezi rozhodující parametry patří výkon v rovině polní čočky RPČ a výkon v rovině vzorku VZ a zda je vzorek osvětlený rovnoměrně.

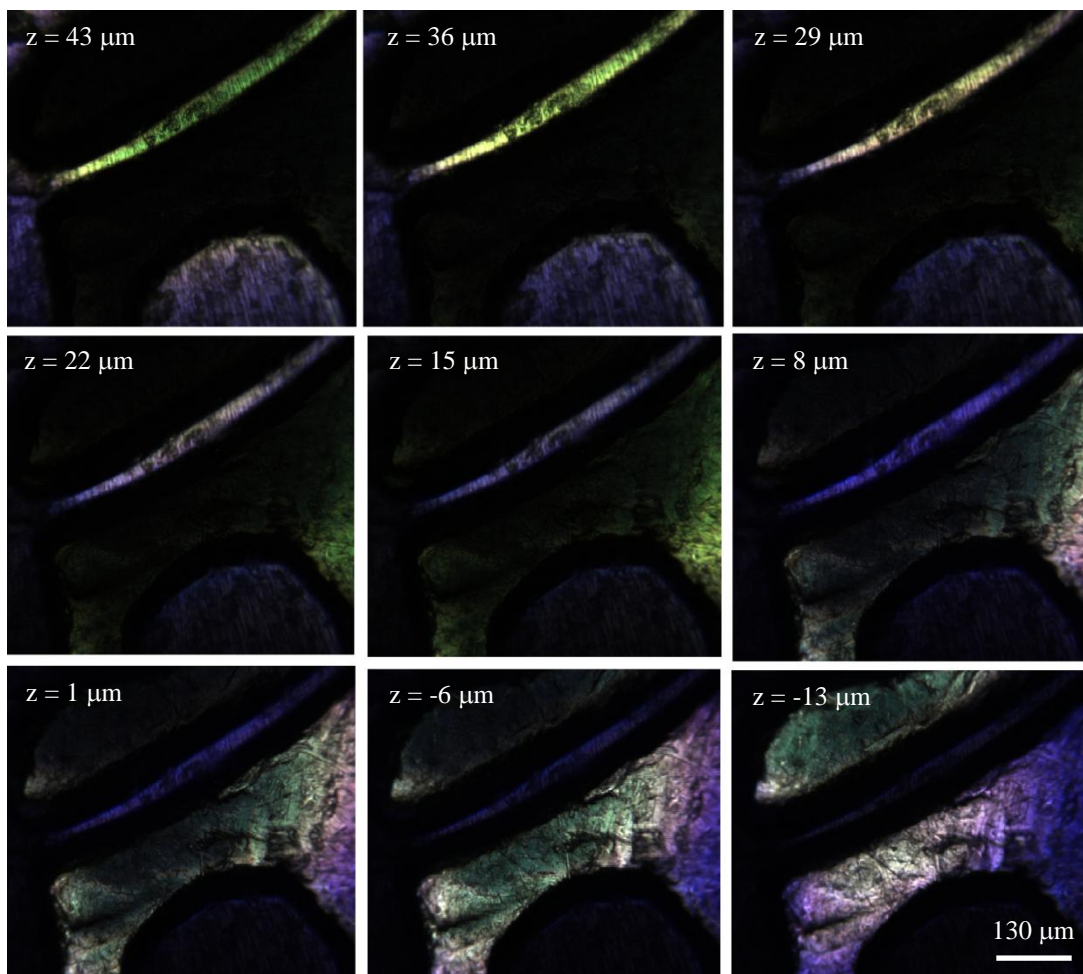
Tabulka 11: Souhrn vlastností navržených optických soustav.

Návrh	Výkon v RPČ [mW]	Průměr v RPČ [mm]	Výkon v RV [μ W]	Úhlopříčka obrazu zdroje v VPO [mm]
A (s TIR a bez PČ)	766	-	7	-
A (s TIR bez PČ)	766	-	3	-
B (bez PČ)	78	14	-	-
C (bez PČ)	163	10	13	-
D (s PČ)	163	10	2	60
E (bez PČ)	560	17,5	10	-
F (s PČ)	560	17,5	4	64
G (s PČ)	560	17,5	20	16
H (s PČ)	120	17,5	6	10

Nejvyšších hodnot jsem dosáhla při návrhu G, kde výkon v rovině polní čočky RPČ dosahoval 560 mW a v rovině vzorku 20 μ W. Stopa v rovině polní čočky RPČ byla osvětlena rovnoměrně. Úhlopříčka obrazu zdroje je vstupní pupile objektivu VPO dosahovala 16 mm. Realizovaná optická soustava je zobrazena na obrázku 30. Funkčnost osvětlovací soustavy jsem otestovala při zobrazení reliéfu hlavy Iva vyražené na minci s nominální hodnotou 2 Kč. Snímky byly pořízeny v různých výškových hladinách s rozestupem 7 μ m (viz obrázek 31).



Obrázek 30: Snímek realizované optické soustavy.



Obrázek 31: Zobrazení reliéfu hlavy lva vyražené na minci s nominální hodnotou 2 Kč konfokálním mikroskopem. Snímky byly pořízeny s výškovým rozstupem 7μm.

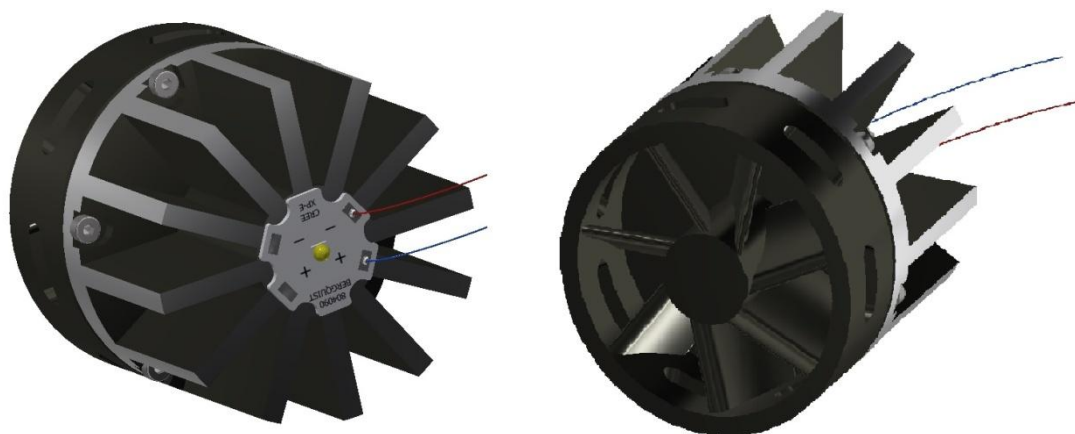
8 Konstrukční řešení

8.1 Chlazení LED diody

Z důvodu velkého zahřívání LED diod je zapotřebí intenzivní chlazení. Kvalitní chlazení zabraňuje poškození LED diody. K chlazení byl použit chladič (Ebm-papst Inc., 381-2641-ND, viz obrázek 32), který zajišťoval potřebný odvod tepla z LED diody. Za pasivním chladičem je umístěný ventilátor, který napomáhá dalšímu odvodu tepla do okolí. Pasivní chladič s ventilátorem je navzájem spojen šrouby M2x8. LED čip byl od výroby umístěn na hliníkové desce. Následně byla hliníková deska spojena šrouby s hliníkovým profilem pasivního chladiče. Na obrázku 33 je zobrazen model chladiče.



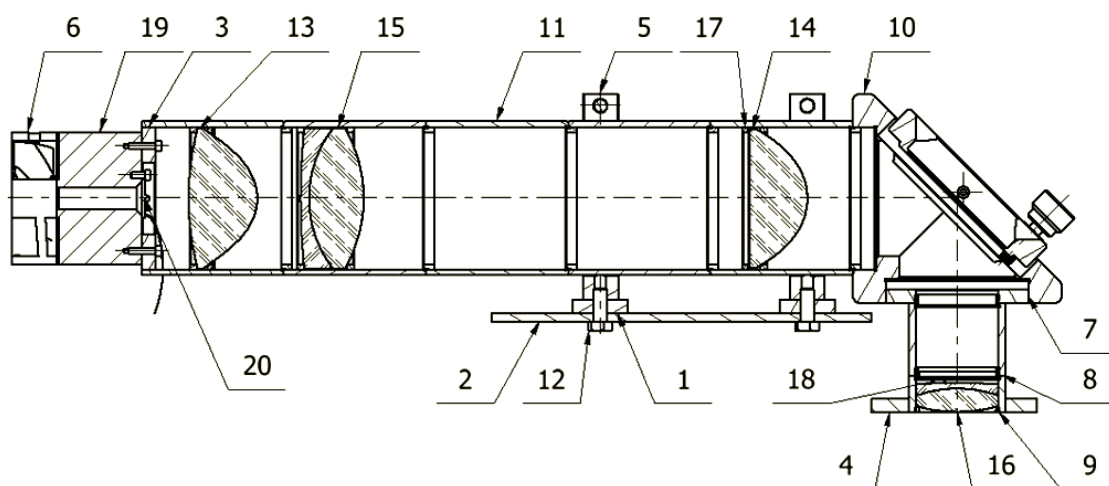
Obrázek 32: Originální chladič. Převzato z [22] a upraveno.



Obrázek 33: Model chladiče.

8.2 Uložení optické soustavy

Uložení optické soustavy se skládá z příruby 4, víka 2, distančních členů 1, tubusů 8,9,11, pojistných kroužků 17,18, objímek 5, redukce 3,7 a zrcadla 10. Čočky byly uloženy do 1" a 2" tubusů 8,9,11 z firmy Thorlabs. Tubusy mají z vnitřní strany vyřezaný závit pro jejich spojení a pro uložení čoček. Proti axiálnímu pohybu byly čočky zajištěny z obou stran vnitřními pojistnými kroužky 17,18, které jsou pro snadnější montáž opatřeny drážkami. Vnitřní pojistné kroužky, o průměru 1" a 2", byly rovněž zakoupeny od firmy Thorlabs. Na začátku osvětlovače je chladič 19 spojen dvěma šrouby M2x10 s redukcí 3 uloženou v tubusu 11. Dále byly čočky 13,14,15 o průměru 50 mm uloženy ve 2" tubusech 11 a zajištěny vnitřními kroužky 17. Na konci byl použit 1" tubus 8 s polní čočkou PČ 16, který byl s vůlí uložen do příruby 4. Příruba byla spojena s mikroskopem pomocí dvou šroubů M3x8. Osvětlovač je pomocí objímek 5 z firmy Thorlabs upevněn k víku 2 šrouby M4x12 12. Víko 2 je s mikroskopem spojeno pomocí čtyř šroubů M3x8. Díky kameře, která bránila ve vertikálním uložení celé soustavy, musela být soustava pomocí zrcadla 10 sklopena o úhel 90°. Aby nedocházelo k ořezání paprsku optické soustavy, je zapotřebí svazek vycentrovat na střed otvoru v mikroskopu. Nejvýhodnějším způsobem, z pohledu jednoduchosti výroby konstrukce, je umožnění pohybu v transversálních osách, pomocí vůle v otvoru na šrouby v přírubě 4 a ve víku 2. Řez osvětlovačem je zobrazen na obrázku 34.



Obrázek 34: Konstrukční návrh osvětlovače. 1-Distanční člen, 2-víko, 3-redukce, 4-příruba, 5-objímka, 6- ventilátor, 7- redukce, 8-tubus, 9-tubus, 10-zrcadlo, 11-tubus, 12- šroub M4x12, 13- asférická čočka, 14- asférická čočka, 15-dublet, 16-dublet, 17-pojistný kroužek, 18- pojistný kroužek, 19-chladič, 20-LED dioda

Závěr

První části bakalářské práce byly popsány typy konfokálních mikroskopů a jejich vlastnosti. Další část se zabývá osvětlovacími soustavami a vhodnými zdroji světla pro optický mikroskop. Popsány byly wolfram-halogenové žárovky, nízkotlakové výbojky, vysokotlakové rtuťové výbojky, lasery a více do detailů byly rozebrány LED diody. Na základě průzkumu současných technologických možností byla vybrána vhodná LED dioda pro konfokální mikroskop Confocal 2002. Rovněž bylo zvažováno využití vlastností TIR reflektoru v kombinaci s vhodnou LED diodou.

Druhá část bakalářské práce je praktická a byla vytvořena na základě simulací optických návrhů v programu ZEMAX a jejich následnému experimentálnímu ověření. Všechny navržené soustavy jsem sestavila a proměřila jejich parametry. Jako zdroj byla vybrána vysoce výkonná LED dioda XP-L. U návrhu A byla použita LED dioda XP-L HD, z důvodu použitého TIR reflektoru. Při návrhu B-H jsem pracovala s LED diodou XP-L HI. Rozhodujícími parametry byly naměřené světelné výkony v rovině polní čočky RPČ a v rovině vzorku VZ. Dále byly naměřeny průměry stop v rovině polní čočky RPČ a rozměry obrazu zdroje ve vstupní pupile objektivu VPO. Následně jsem pozorovala rovnoměrnost osvětlení stopy v rovině polní čočky RPČ. Na základě těchto parametrů byla vybrána osvětlovací soustava varianta G, která dosahovala nejvyššího výkonu v rovině polní čočky RPČ u návrhu bez TIR reflektoru a nejvyššího výkonu v rovině vzorku VZ. V rovině polní čočky RPČ bylo dosaženo 560 mW a v rovině vzorku VZ 20 μ W. Dále bylo úspěšně provedeno pozorování s navrženou optickou soustavou G povrch mince při osvětlení LED diodou XP-L HI. V kapitole konstrukčního řešení bylo navrženo chlazení pomocí aktivního a pasivního chladiče a dále navrženo vhodné umístění optické soustavy do osvětlovače a následně jeho vestavba do mikroskopu. Na závěr byla vypracována výkresová dokumentace navrženého osvětlovače s ohledem na minimalizaci výrobních nákladů. Proto byly při konstrukčním návrhu využity komerčně dostupné mechanické a optické komponenty.

Literatura

- [1] MINSKY, M.: Microscopy apparatus. United States Patent Office, Patent No. 3013467, 1961.
- [2] *Vesmír* [online]. 1995/5, **1995**(74) [cit. 2017-06-09]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/konfokalni-mikroskop>
- [3] Confocalprinciple. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Confocalprinciple.svg>
- [4] SLABÝ, T. *Osvětlovací soustava pro konfokální mikroskop s duálním rastrováním*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 76 s. Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.
- [5] BRIFFA, Keith R. a Timothy J. OSBORN, 1999. Seeing the Wood from the Trees. *Science* [online]. B.m.: Nature Publishing Group, **284**(May), 926–927. ISSN 13601385. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1946
- [6] WILSON, T.: Confocal microscopy. London: Academic Press, 1989. 426 p. ISBN 0-12-757270-8.
- [7] PLÁŠEK, Jaromír. Nové metody optické mikroskopie. *Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*. Praha: Jednota českých matematiků a fyziků, 1996, **41**(1), 1-24
- [8] SEHADOVÁ, Hana, Biologické A V Č R a Č BUD, 2011. Fluorescenční a konfokální mikroskopie.
- [9] Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Lichtmikroskopie online - Theorie und Anwendung [online]. Austria: Universität Wien [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: https://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/clsm/1_einleitung.htm
- [10] Aktuality pro veřejnost. *Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze* [online]. Praha: ČVUT v Praze [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <https://www.fbmi.cvut.cz/files/predmety/30/public/Amikroskop.pdf>
- [11] *Vesmír* [online]. 1997/11, **1997/11**(76) [cit. 2017-06-09]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/opticke-mikroskopy-s-velmi-vysokym-rozlisenim>
- [12] GRZNÁROVÁ, Petra a Jan LIPOV. *Optická mikroskopie*. Praha. Dostupné také z: https://vscht.cz/nmr/mol_model_bioinfo/lekce/mikroskopie1.pdf
- [13] Yokogawa disk. Scientific Volume Imaging [online]. The Netherlands: Scientific Volume Imaging b.v., 2002 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <https://svi.nl/YokogawaDisk>
- [14] VIKOVÁ, M. *Textilní fyzika*. Liberec. Dostupné také z: http://dirk.kmi.tul.cz/depart/ktc/sylaby/Textilni_Fyzika/8.Mikroskopie%20V.pdf
- [15] DVOŘÁČEK, Ing Vladimír, S LAMP a Panenské BŘEŽANY, 2008. Světelné zdroje – halogenové žárovky. 56–58.
- [16] HAVELKA B.: Geometrická optika. Díl 2. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1955. 344 p.
- [17] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael DAVIDSON. Microscope Illumination. *Microscopy: Resource center* [online]. Olympus America, 2012 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/illumination.html>
- [18] ABRAMOWITZ, Mortimer a Michael DAVIDSON. Köhler Illumination. *Microscopy: Resource center* [online]. Olympus America, 2012 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/kohler.html>
- [19] LOŠŤÁK, M. *Programovatelná osvětlovací soustava pro optický mikroskop*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 46 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

- [20] HABEL, Jiří. *Světlo a osvětlování*. Praha: FCC Public, 2013, 622 s. ISBN 978-80-86534-21-3.
- [21] SLÁMA, P. *Vliv teploty na světelně-technické parametry LED*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 50 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Tomáš Pavelka,
- [22] *Mouser Electronics* [online]. Mouser Electronics, 2017 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <http://cz.mouser.com/Electronic-Components/>
- [23] LIAO, Alice. LEDs: Understanding Optical Performance. In: *Architectural Lighting* [online]. Hanley Wood Media, 2017 [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: http://www.archlighting.com/technology/leds-understanding-optical-performance_o
- [24] LEDIL. *LEDIL* [online]. Ledil [cit. 2017-06-09]. Dostupné z: <http://www.ledil.com/>
- [25] THORLABS [online]. Newton: Thorlabs, c1999-2017 [cit. 2017-06-11]. Dostupné z: <https://www.thorlabs.com/>