

# Laserový rastrovací konfokální mikroskop LEXT OLS 5000

---

*Lukáš Václavek*

**Společná laboratoř optiky Univerzity Palackého a Fyzikálního ústavu Akademie věd České republiky**

**17. listopadu 50a, 772 07 Olomouc**

---

# Obsah

---

- 1. Klasická mikroskopie a optické zákony**
- 2. Laserová rastrovací konfokální mikroskopie**
- 3. LEXT OLS 5000**
- 4. Možné využití**
- 5. Postup**
  - **Pořízení obrazu**
  - **Analýza**
- 6. Ukázky měření**
- 7. Přednosti laserové rastrovací konfokální mikroskopie**



# 1. Klasický mikroskop

---

- Mikroskop je komplexní optický přístroj, který pomocí několika optických soustav zvětšuje zorný úhel oka, a tím **zlepšuje jeho rozlišovací schopnost** až tisíckrát.
- Soustava čoček – okulár a objektiv (výměnné na carouselu).
- S průchozím prosvícením nebo odrazné.
- Maximální zvětšení dáno součinem zvětšení okuláru a objektivu.
- Maximální zvětšení – rozlišení dáno omezením optických zákonů.
- Hloubka ostrosti – v ose z (hloubce) definovaná zaostřená oblast. Hloubka ostrosti se zmenšuje s rostoucím zvětšením.
- Do výsledného obrazu (i záznamu) se promítá zaostřená oblast ale i rozostřené níže či výše položené oblasti v zorném poli.



první mikroskop  
Nikon  
(kolem r. 1900)

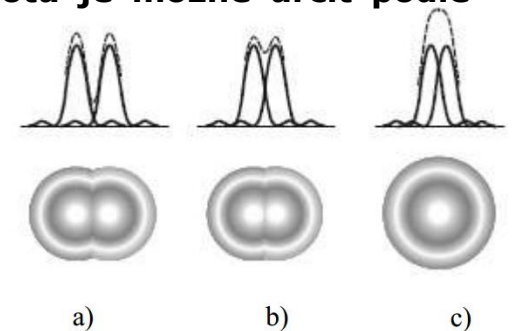
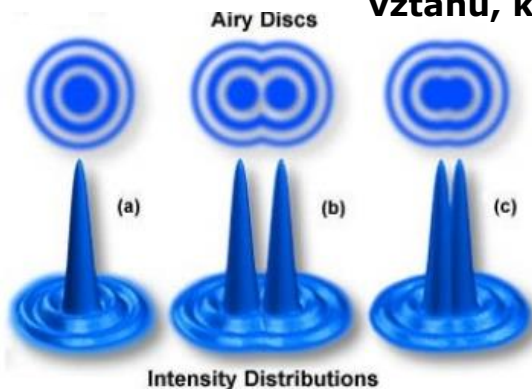
# 1. Klasický mikroskop

- **Rozhoduje kvalitní objektiv, jehož základní parametry jsou:**
  - NA (numerická apertura)  $NA = n \cdot \sin \alpha$ , kde  $n$  je index lomu prostředí před objektivem a  $\alpha$  je aperturní úhel.
  - Rozlišovací schopnost mikroskopu je dána  $d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$ , kde  $\lambda$  je použitá vlnová délka záření a 0,61 je optická konstanta.
  - Rozlišovací schopnost objektivu tedy závisí nejen na numerické apertuře, ale také na vlnové délce světla.

- **Rayleighovo kritérium**

- Optické přístroje, např. oko, mikroskop a teleskop mají obvykle kruhovou výstupní aperturu (průměr výstupního otvoru přístroje). Bodový zdroj promítnutý přes tuto aperturu je deformován difrakce (ohybem) a vytváří **centrální kruhové maximum a řadu světlých a tmavých mezikruží – tzv. Airiho kroužky.**
- V případě dvou bodových zdrojů světla, které navzájem přibližujeme, jsme je schopni **rozeznat jako oddělené do chvíle, kdy střed jednoho obrazu bodu se kryje s prvním minimem druhého obrazu.** To odpovídá zhruba poklesu intenzity světla o 19 %. Vzdálenost mezi středy maxim obrazů světelných bodů se rovná rozlišovací schopnosti a její hodnotu je možné určit podle vztahu, který odvodil Abbe:

$$d_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$



Obrázek: Rozlišovací schopnost, a) obrazy jsou dobře rozlišitelné, b) limitní případ (Rayleighovo kritérium) c) obrazy jsou nerozlišitelné

# 1. Klasický mikroskop

---

- Účelem každého zvětšování v mikroskopii je zvýšit počet informací o pozorovaném objektu, které jsou jinak lidskému oku nedostupné.
- Prostorové rozlišení roste se zvětšením. Kombinací silných spojných čoček bychom mohli sestavit mikroskop s téměř libovolným zvětšením, avšak místo toho zjišťujeme, že za určitou hranici (hranice „užitečného zvětšení“) se rozlišení již nezvětšuje (jde o „prázdňé“ zvětšení).
- K prázdňému zvětšení dochází, když zvětšení překročí rozlišovací schopnost mikroskopu:  $M_U = \frac{R_{\text{oko}}}{R_{\text{mikr}}}$ , kde  $M_U$  je užitečné zvětšení,  $R_{\text{oko}}$  je rozlišovací schopnost lidského oka a  $R_{\text{mikr}}$  je rozlišovací schopnost mikroskopu.
- Pomocí numerické apertury lze vypočítat užitečné zvětšení mikroskopu. Je rovno 1000 násobné hodnotě numerické apertury (NA). NA maximální hodnota je kolem 1,5
- Jestliže se zmenšuje apertura (otvor) kondenzoru, prostorové rozlišení se snižuje, avšak roste kontrast! Proto musíme při volbě apertury kondenzoru dbát o vyváženost prostorového rozlišení a kontrastu. Chceme-li jen snížit jas obrazu, je vhodnější ztlumit lampu než zmenšit apertura kondenzoru, protože takto nedojde ke zhoršení rozlišovací schopnosti.

# 1. Klasický mikroskop

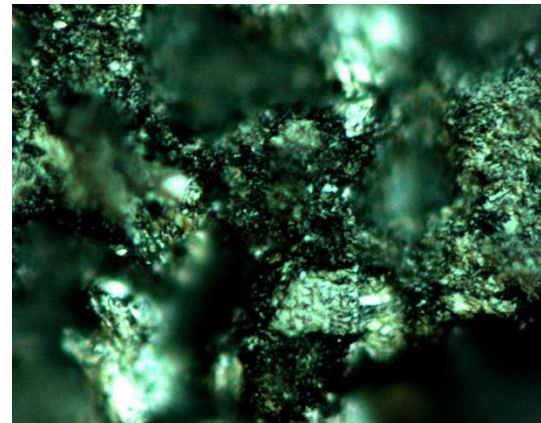
---

## □ Hloubka ostrosti

- Jde o tloušťku objektu podél osy  $z$ , která se současně nachází v ohnisku. Důležité u silnějších vzorků.

$$Z = \frac{n}{NA^2}$$

*n je index lomu vzorku (resp. tekutiny obklopující mikroskopovaný objekt).*



# 1. Klasický mikroskop – speciální typy

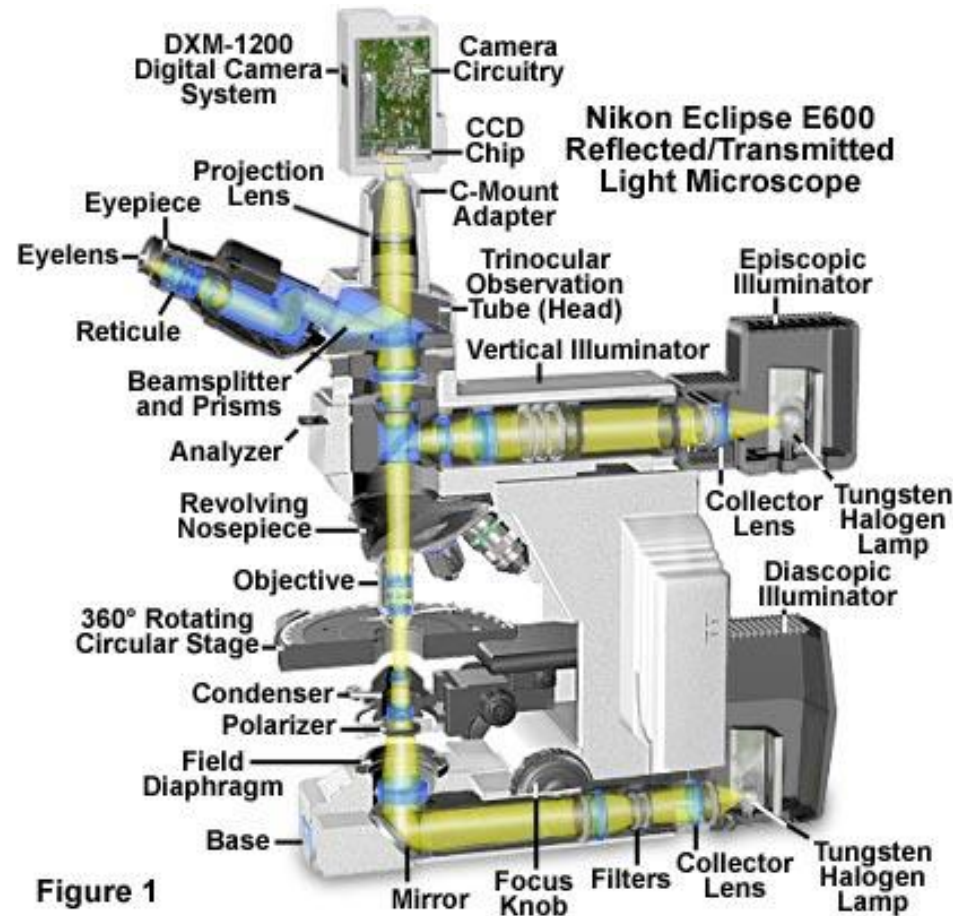
---

- Pozorování ve světlem nebo tmavém poli
- Stereomikroskop (dva mikroskopy se samostatnými objektivy a okuláry, jejichž optické osy svírají úhel asi  $15^\circ$ ) – stereoskopické vidění. V medicíně: mikrochirurgie. Obraz nesmí být převrácený. Operační pole je osvětleno optickými vlákny. Ohnisková délka objektivu se může plynule měnit - zoom – různé prostorové rozlišení.
- Moderní badatelské mikroskopy jsou vybaveny digitálními fotoaparáty pro mikrofotografii nebo mikrokinematografii (video).
- Software pro zpracování obrazu: mění kontrast, jas, ostrost atd. Pokročilý software umožňuje kvantitativní analýzu obrazu, hledání typických tvarů atd.
- Většina druhů mikroskopů může být sestavena z různých objektivů, okulárů, kondenzorů a dodatečně vybavena různými speciálními optickými prvky. Je k dispozici různé příslušenství, např. mikromanipulátory pro umísťování elektrod do buněk, separování organel atd.



# 1. Klasický mikroskop – moderní

- ▶ Transmisní a odrazný mikroskop – různé vzorky potřebují různý typ osvětlení





# 1. Klasický mikroskop – speciální typy

Contrast-Enhancing Techniques in Optical Microscopy

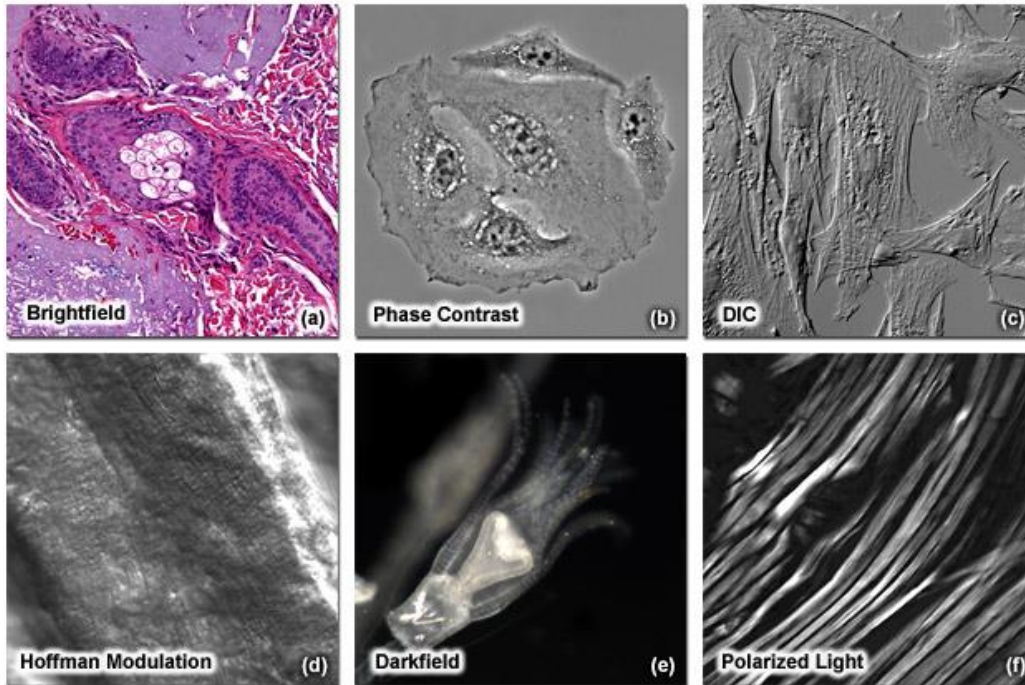


Figure 1

## ▶ BRIGHTFIELD

- ▶ Oldest technique: direct lighting; Contrast relies on differences in light absorption,  $n$ , or color .

## ▶ PHASE CONTRAST

- ▶ Translate phase shifts of light into intensity change.
- ▶ Interference of undiffracted (iluminating) and diffracted (through sample) light.
- ▶ Ideal for unstead samples (like cells on glass).

## ▶ DIFFERENTIAL INTERFERENCE CONTRAST (NOMARSKI)

- ▶ Using of Wollaston prisms and crossed polarizers allows interference of points on sample that are closer than  $d_{min}$ .
- ▶ exaggerate small gradients differences in optical path (thickness, refractive index).

## ▶ HOFFMAN MODULATION

- ▶ Uses special 3 zone mask for oblique illumination to enhance contrast of optical phase gradient.
- ▶ „poor man’s DIC” ☺

## ▶ DARK FIELD

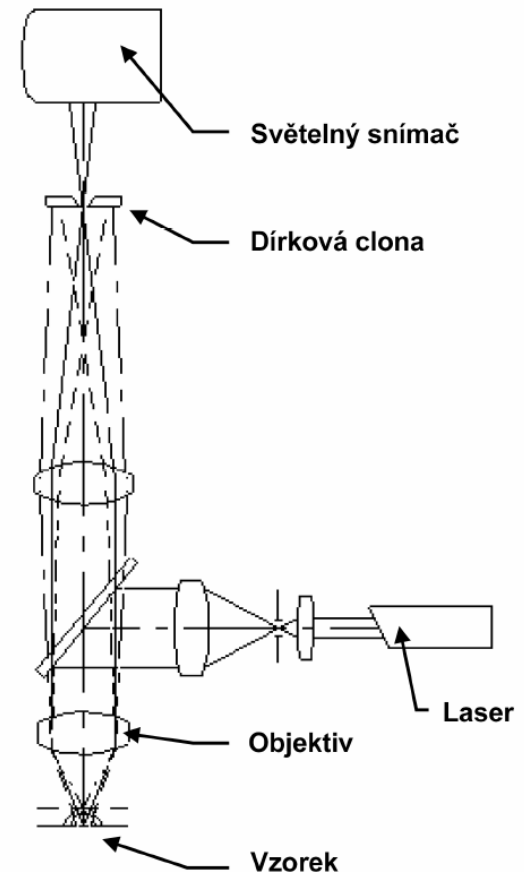
- ▶ Uses oblique illumination. Objective catches only light which direction was altered by sample
- ▶ Contrast of contours and small structural details

## ▶ POLARIZED LIGHT

- ▶ Using of cross-polarization elements to strongly enhance birefringent materials

## 2. Laserová rastrovací konfokální mikroskopie

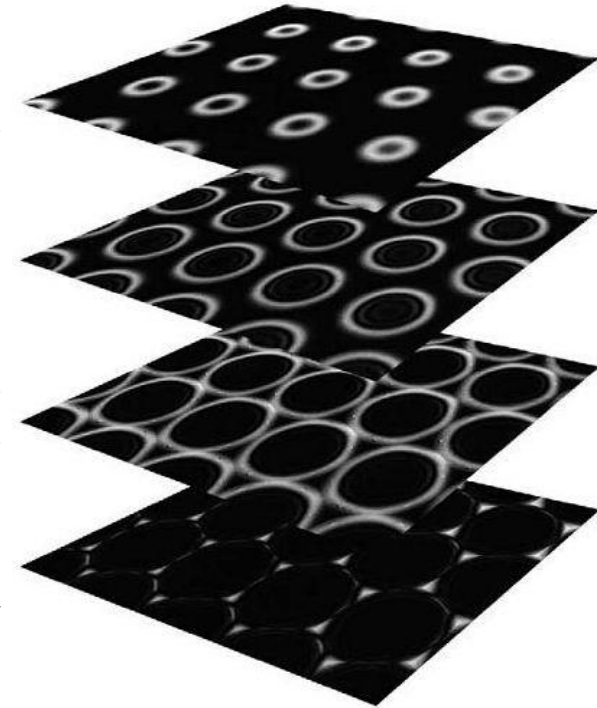
- první konfokální rastrovací mikroskop - Marvin Minsky, 1957
- LCSM běžně - konec 80. let 20. stol. – zdroj světla – laser
- Princip:
  - Úzký laserový paprsek se přes objektiv s velkou numerickou aperturou zaměří na preparát.
  - Dále prochází objektivem až na vzorek, kde je obraz clonky fokusován do bodu, jehož průměr odpovídá difrakční mezi (rozlišovací mez).
  - Přes stejný objektiv jde zpětně i světlo na vzorku odražené či rozptýlené, případně fluorescence (sekundární světlo).
  - Sek. světlo putující zpět prochází opět clonkou, jejichž bodový obraz je s pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobič, kde je umístěna druhá konfokální bodová clonka, která filtruje světlo pocházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu.



## 2. Laserová rastrovací konfokální mikroskopie

---

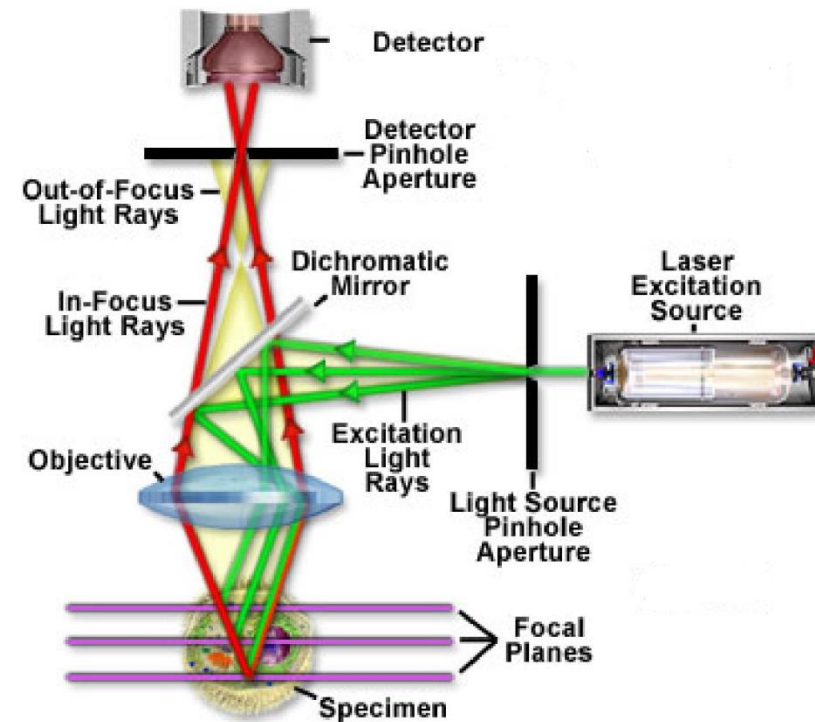
- **Obraz se nevytváří najednou, ale bod po bodu - osvětlen je jen jeden bod, odražený signál prochází dírkovou clonou, umístěnou v konfokální rovině – odfiltruje signál z mimoohniskových poloh → snímán fotodetektorem → obraz na monitoru.**
- **rozmítání laserového svazku zrcadly – řádkování (rastrování) → optický řez v dané rovině  $xy$**
- **přesně definovaný posuv v ose  $z$  – vznikají jednotlivé řezy v ose  $z$   
→ složením vzniká 3D rekonstrukce**



## 2. Laserová rastrovací konfokální mikroskopie

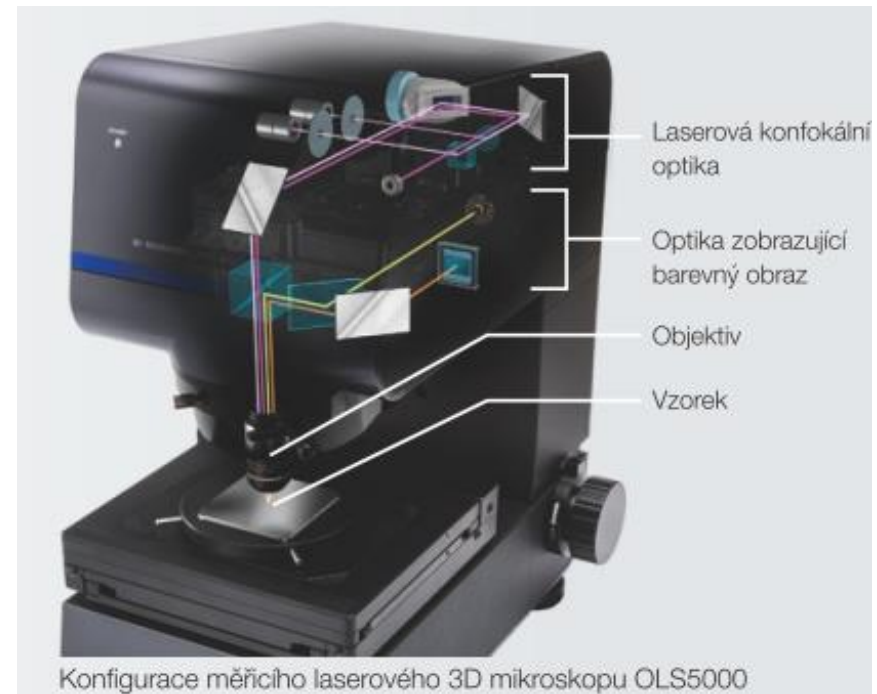
### □ Výhody:

- objekt mimo rovinu ostrosti nezpůsobí rozostření, ale není zobrazen – optické řezy
- získávání 3-D obrazu - po počítačovém zpracování velká hloubka ostrosti
- omezené **blednutí (bleeching)** objektu - omezená doba expozice excitačním zářením
- přesnější **kvantitativní měření** (nejsou zkreslená hloubkou)



# 3. Olympus LEXT OLS 5000

- **Laserový konfokální mikroskop pro 3D měření LEXT OLS5000 je vybaven dvěma optickými systémy – optikou zobrazující barvy a laserovou konfokální optikou.**
- **Optika zobrazující barvy získává informace o barvách pomocí LED zdroje bílého světla a kamery CMOS**  
-> **Získávání informací o barvách**
- **Laserová konfokální optika získává konfokální obraz prostřednictvím 405nm diodového zdroje laserového záření a vysoce citlivého fotonásobiče. Malá hloubka ostrosti dovoluje použití při měření nepravidelností povrchu vzorku**  
-> **Získávání informací o 3D tvaru a konfokálních obrazů s vysokým rozlišením**
- **nedestruktivní zobrazování a měření submikronových povrchových struktur**



# 3. Olympus LEXT OLS 5000

## XY skener

- Ose X využívá elektromagnetickou indukci v MEMS rezonanční skeneru
- Osa Y používající galvanický skener umožňuje umístění XY skeneru do striktně spřažené polohy vůči pupile objektivu.
- Tato kombinace umožňuje výjimečné XY skenování s nízkým zkreslením stopy a menším počtem optických aberací.

## Principy měření výšky

- Je snímám konfokální obrazy prostřednictvím automatického posuvu roviny zaostření.
- Na základě samostatné polohy zaostření a zjištěné intenzity světla odhaduje pro jednotlivé pixely křivku kolísání intenzity světla a získává polohu jejího vrcholu a vrchol její intenzity.
- Protože polohy vrcholů jednotlivých pixelů korespondují s nepravidelnostmi povrchu vzorku, vzniká tak informace o 3D tvaru povrchu vzorku.
- Podobně údaj vrcholu intenzity vytváří obraz, kde jsou zohledněny veškeré polohy povrchu vzorku (rozšířený obraz).





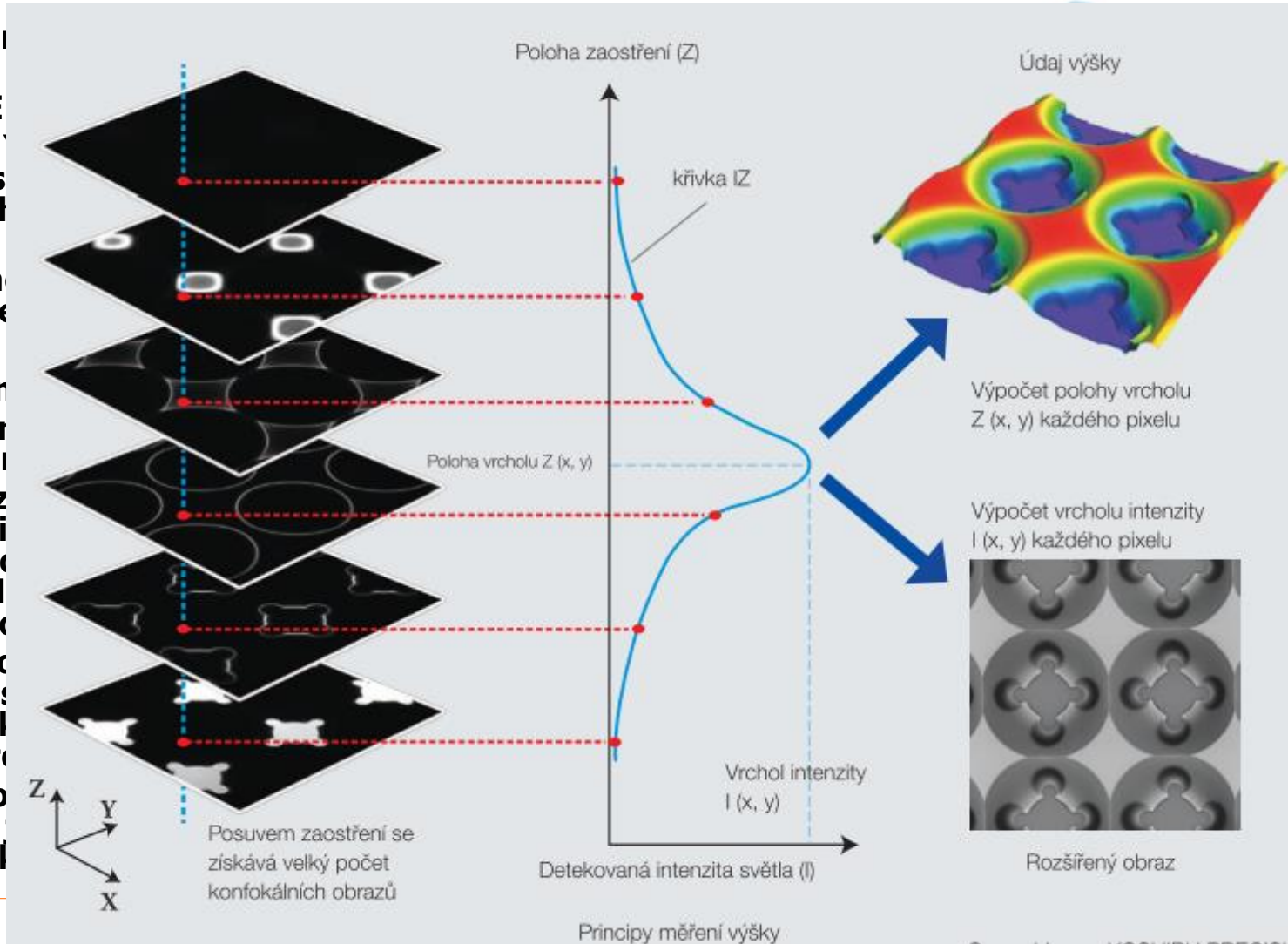
# 3. Olympus LEXT OLS 5000

## XY skener

- Ose v ME
- Osa umís
- Tato sken
- počt

## Principy m

- Je s
- Na z
- a zji
- jedno
- světl
- vrcho
- Proto
- kores
- vzorl
- povr
- Podo
- kde
- vzorl



# 3. LEXT OLS 5000

- Zorné pole 16  $\mu\text{m}$  – 5 120  $\mu\text{m}$
- zvětšení 54x – 17 280x
- Okulár 22x
  - Obj. 5x, 10x, 20x, 50x, 100x + 1x až 8x optický zoom)



- **garantované maximální rozlišení:**  
**120 nm laterálně**  
**12 nm vertikálně**
- **maximální velikost vzorku cca 100 mm x 100 mm laterálně; 210 mm na výšku.**
- **maximální zdvih pro 3D měření 10 mm**
  
- **možné pozorování v reálných barvách (bílé světlo LED + CMOS)**
- **bezkontaktní nedestruktivní měření vodivých i nevodivých materiálů**
- **nevyžaduje speciální přípravu vzorku**



### 3. LEXT OLS 5000

---

- Jako světelný zdroj pro konfokální snímání je používá polovodičový laser fialové barvy o vlnové délce  $\lambda = 405 \text{ nm}$
- Osvětlovací zdroj pro bílé světlo (barevný obraz) je bílá LED dioda



# 4. Možné využití

---

- **2D měření a obrazová analýza - měření rozměrů**
  - měření obsahů ploch
  - struktura materiálů - analýza částic a fází
  
- **3D rekonstrukce povrchu - zobrazení profilů**
  - měření výšek, objemů a povrchů vybraných elementů
  - měření drsnosti, měření plosěné drsnosti
  - měření tloušťky vrstvy
  
- **Materiálový výzkum, metalografie - analýza výbrusů, hodnocení lomových ploch**
- **Morfologie povrchů, studium jemných struktur, povrchových defektů, vyhodnocení indentačních zkoušek**
- **Studium povlaků, nátěrů, oxidických vrstev - tloušťka, poréznost**
- **Studium tenkých vrstev - nečistoty, defekty, deformace, tloušťka**
- **Polovodiče - hodnocení kvality elektrických kontaktů**
- **Keramika - rozdělení velikostí a tvarů částic**
- **Textilní průmysl - měření barevnosti, průměru vlákna, studium nanesených vrstev**
- **Automobilový a letecký průmysl - kontrola výroby komponentů s velmi malou tolerancí přesnosti výroby (měření skutečných vzdáleností, objemů, ploch a průmětů)**
- **Studium chemických a biologických preparátů**

# 5. Postup

---

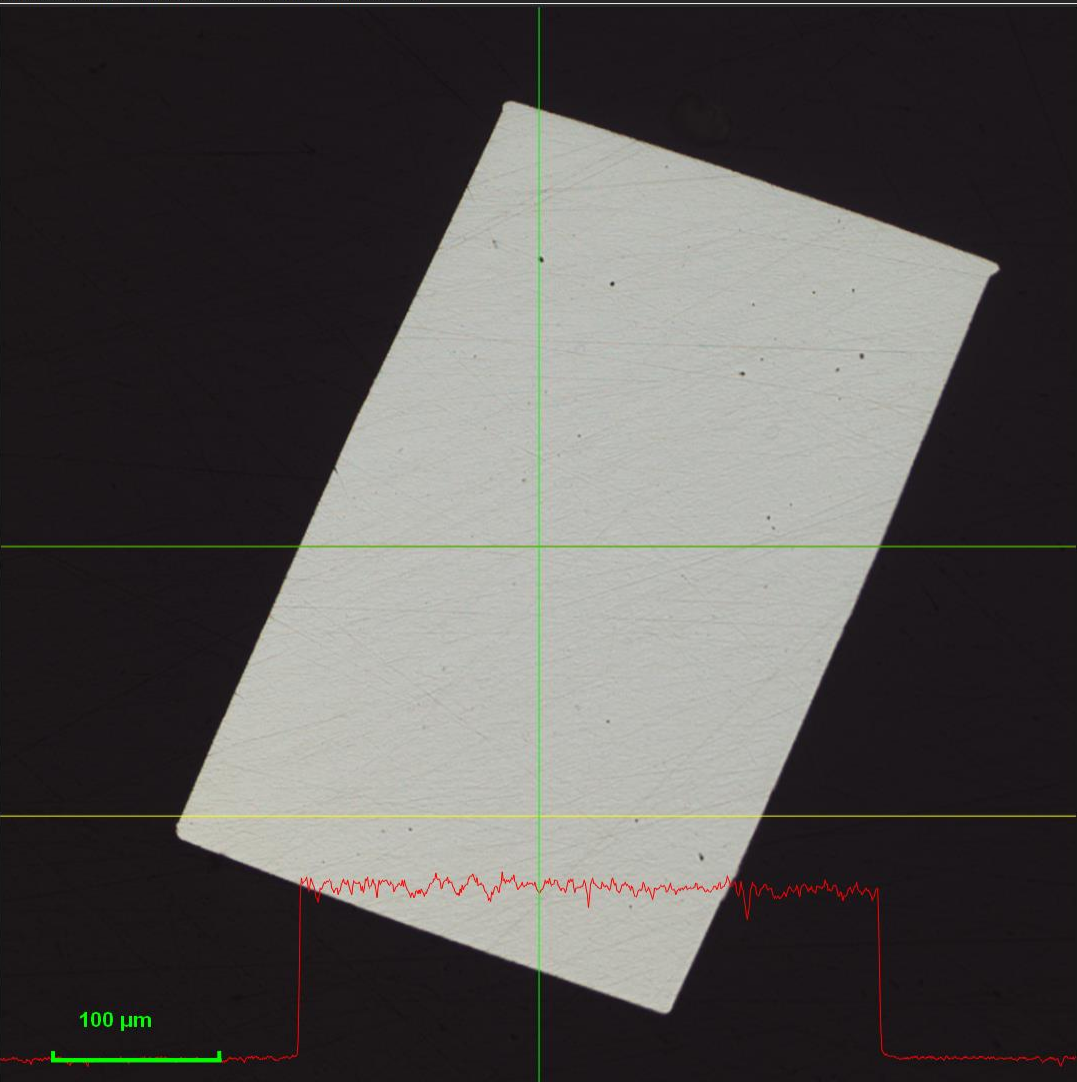
## Pořízení obrazu

- **Volba zvětšení**
- **Zaostření**
- **Nastavení jasu**
- **Zaostření na nejnižší bod**
- **Start**

# Pořizení obrazu

OLYMPUS OLSS000 - Data acquisition application Login user: Lukas

File View Observation Data acquisition Stitching Multiple areas Tool Account Configuration Help



100  $\mu\text{m}$

646 $\mu\text{m}$  x 643 $\mu\text{m}$   $\times$  450 XYZ position (-198 $\mu\text{m}$ , +403 $\mu\text{m}$ , -5.155 $\mu\text{m}$ )

XY stage Brightness Focus (Z) Capture

Change view Auto create map Delete map

### 1 Observe images.

Color  Laser


5x 10x 20x 50x 100x LM 100x Zoom 1.0x

### 2 Set data acquisition conditions.


3D  Film thickness  Single line

Single area  Multiple areas  Stitching

Auto  Manual

 Focus on the lowest part of the sample with the mouse wheel or the focus button. Press [Start] button.

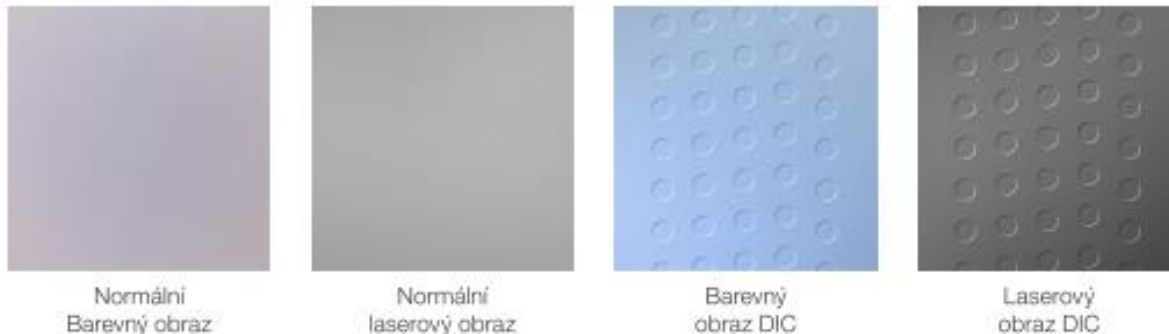
Auto save data

 3D acquisition **Start**

# Možnosti pořízení obrazu

---

- **Single area - jedno zorné pole**
- **Stitching – SW složení více zorných polí do jednoho snímku**
- **Multiple areas – automatické snímání několika zvolených oblastí na povrchu vzorku**
  
- **Přídavné moduly:**
- **DIC: snímání v diferenciálním interferenčním kontrastu**
  - zviditelnění jemných nerovností na hladkém povrchu, např. při leštění povrchů skla nebo kovů apod

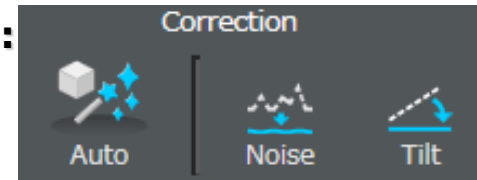


- **Filtr detekce povrchu pro transparentní film OLS50-QWP**
  - **Filtr detekce povrchu je optický prvek, který polarizuje rovnováhu intenzity odraženého světla mezi více hraničními povrchy pomocí polarizace.**
  - **Pomocí filtru detekce povrchu je v některých případech možné detekovat hraniční povrch**

# Analýza

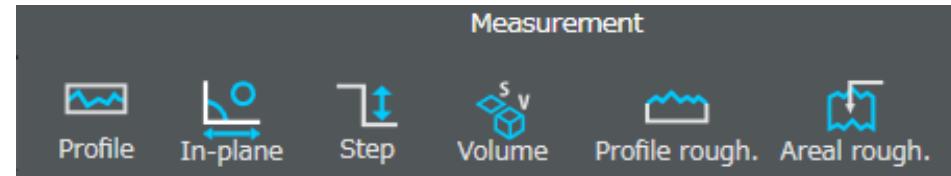
## □ SW pro analýzu umožňuje různé druhy filtrace (korekce):

- Auto: SW provede auto korekci obrazu
- Noise: redukce šumu
- Tilt: redukce náklonu snímku



## □ a různé druhy analýzy (měření)

- Profile: měření v profilu snímku
- In-plane: měření v rovině snímku
- Step: měření ve výškovém profilu snímku
- Profile roughness: liniová drsnost
- Areal roughness: plošná drsnost



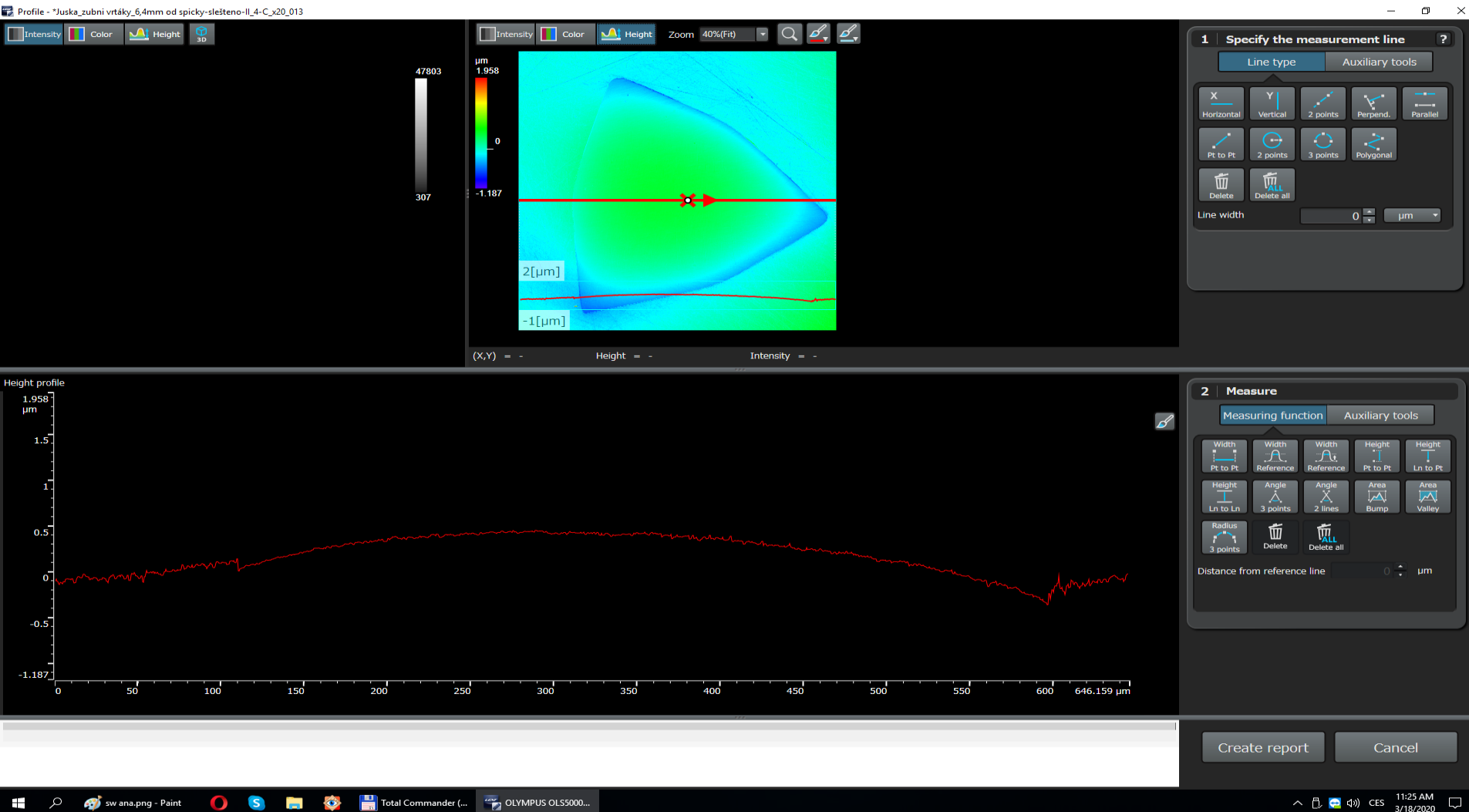
## □ Pokročilé analýzy:

- Particle: částicová analýza ( počet částic, plocha částic, atd.)
- Film thickness: měření tloušťky průhledné vrstvy
- Sphere/plane angle: měření úhlů

# Analýza

The screenshot displays the OLYMPUS OLS5000 - Analysis application interface. The main window shows a 3D surface scan of a triangular object, with a color scale ranging from 0 to 47903. The object's dimensions are displayed as 643.169µm and 646.159µm. The interface includes a menu bar (File, Edit, View, Insert, Data processing, Analysis, Comparison, Tool, Window, Settings, Help) and a toolbar with various analysis tools (Load, Open, Auto, Noise, Tilt, Simple, Profile, In-plane, Step, Volume, Profile rough, Areal rough, Multi-data, Report, Template, Acquire data). A 'Window list' on the left shows the current scan. The main display area is titled '\*Juska\_zubni vrtáky\_6,4mm od spicky-slešteno-II\_4-C\_x20\_013' and contains a 'Front page' and 'Measurement condition' tab. The main display area shows the LEXT logo and a 3D scan of a triangular object. To the right of the main display are four smaller images: Intensity, Color, Height, and Map. A 'History' panel on the right lists the following operations: Noise removal, Noise removal, and Tilt removal. The status bar at the bottom shows the dimensions 646.159 x 643.169 µm. The Windows taskbar at the bottom shows the system tray with the date and time: 11:24 AM, 3/18/2020.

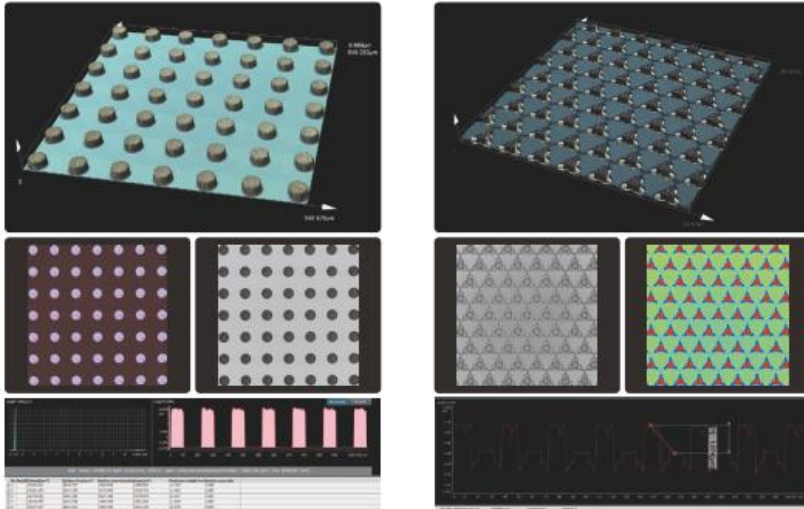
# Analýza – profilové měření





# Ukázky měření

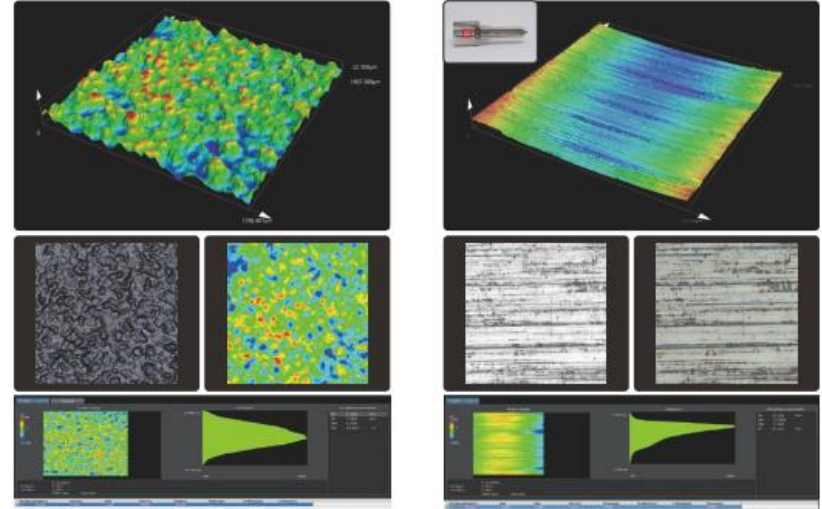
## Elektronické součástky



Výstupky u kovů / jednotnost spojů (hodnocení výšky)  
(MPLAPON20XLEXT)

MEMS ultrazvukový snímač / hodnocení tvaru (měření profilu)  
(MPLAPON50XLEXT)

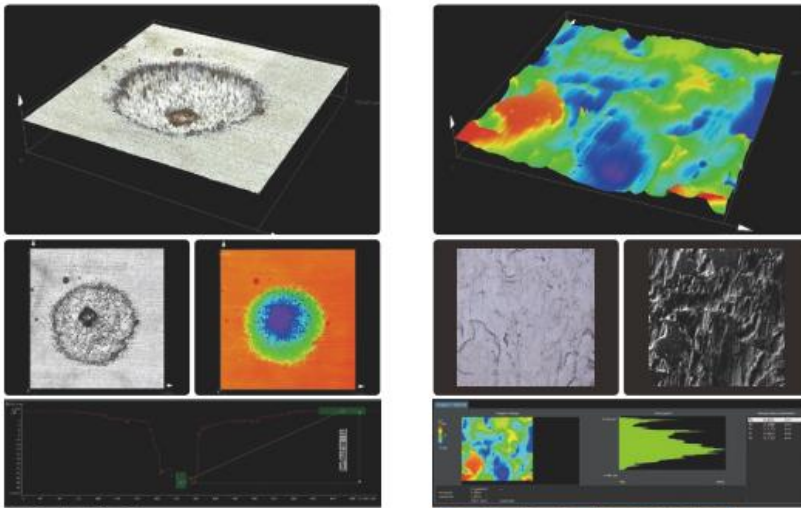
## Automobilový průmysl / zpracování kovů



Hodnocení vnitřní textury / textury (měření plošné drsnosti)  
(MPLAPON20XLEXT / 3x3 složeno)

Tryska vstříkovače paliva (replika) / měření plošné drsnosti  
(LMPLFLN50XLEXT)

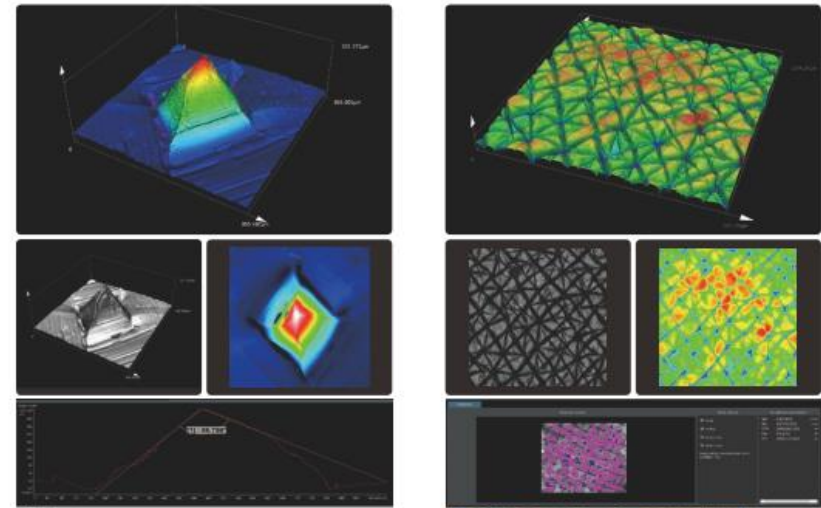
## Materiály



Koroze u nerezové oceli / měření výšky  
(MPLAPON20XLEXT / 3x3 složeno)

Máčená plocha / měření plošné drsnosti  
(MPLAPON50XLEXT)

## Ostatní



Mikrojehta / hodnocení tvaru (měření profilu)  
(MPLAPON50XLEXT / 6x6 složeno)

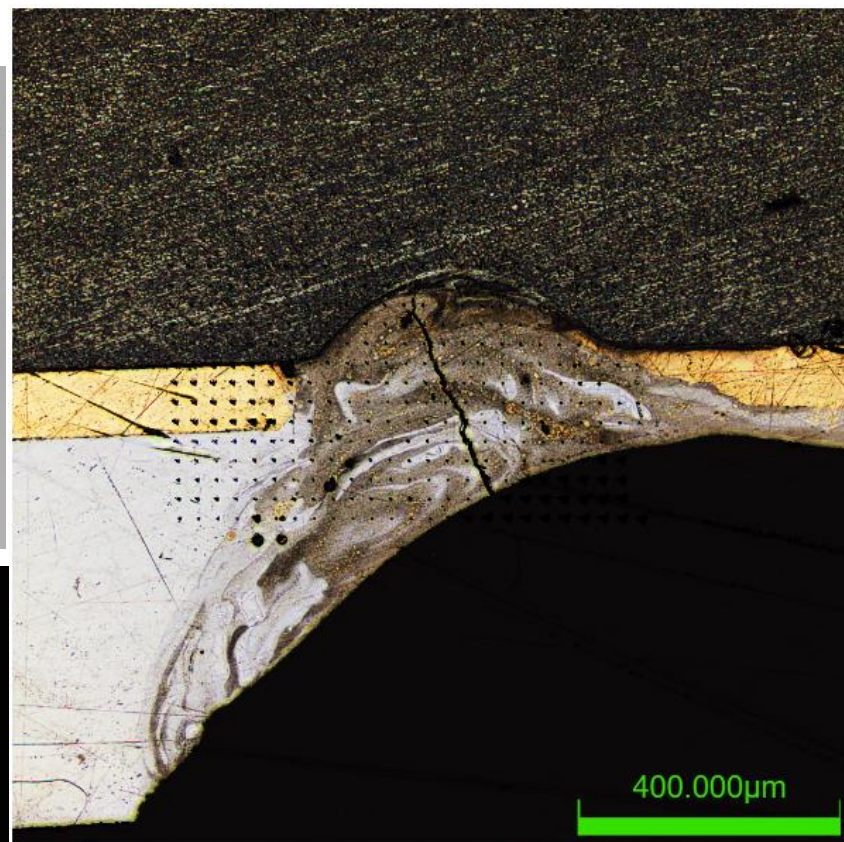
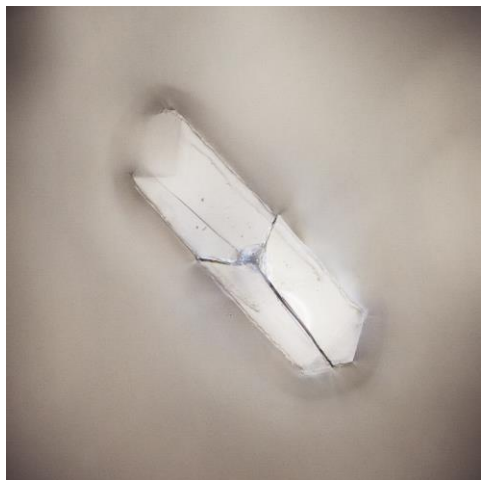
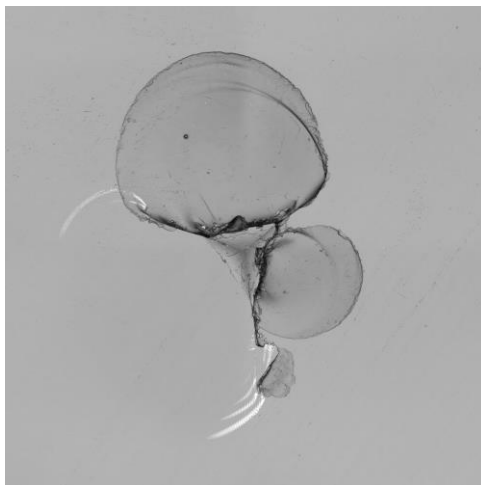
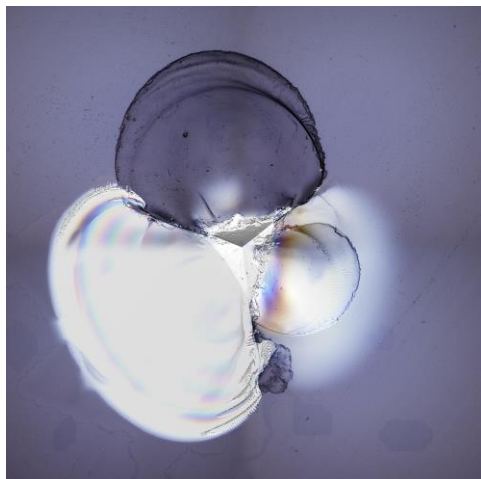
Kůže (replika) / měření plošné drsnosti  
(MPLAPON20XLEXT / 5x5 složeno)

Se souhlasem Laboratoře funkčního designu Fakulty oděvních věd  
Univerzity Bunka Gakuen v Japonsku

# Ukázky měření

---

## Indentace – snímky vtisků



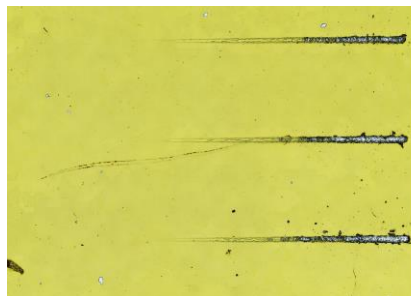
Matice vtisků



# Ukázky měření

Scratch test  
-  
Vrypová zkouška

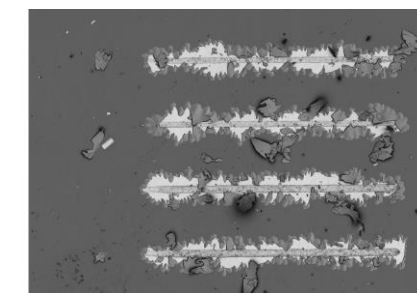
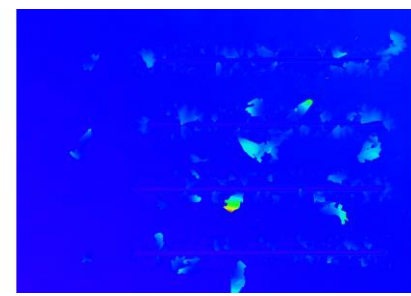
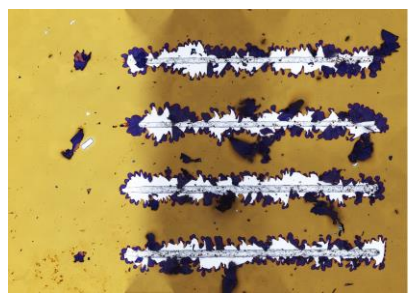
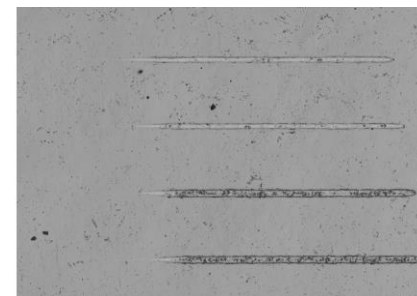
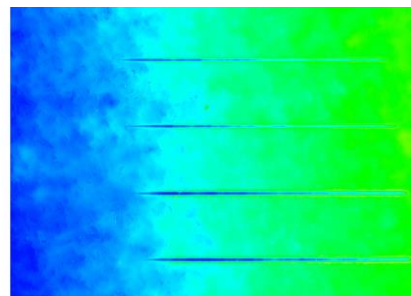
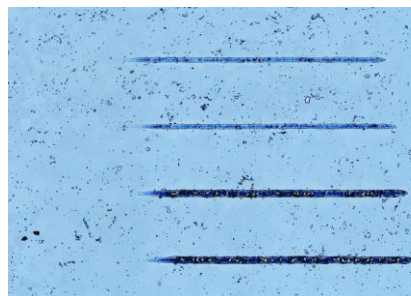
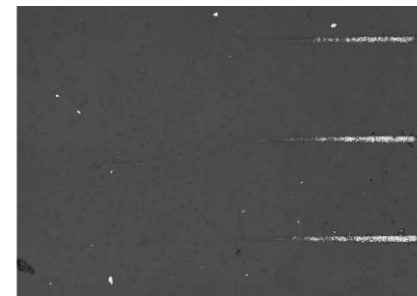
Barevný snímek



Výškový snímek



Intenzitní (konfokální) snímek



# 7. Přednosti laserové konfokální mikroskopie

---

- **Vysoké axiální rozlišení při vysoké ostrosti obrazu**
  - **Konstrukce 3D obrazů**
  - **Díky motorizované stolku možnost skládání snímku (stitching)**
  - **Bezkontaktní měření drsnosti (i málo odrazivých materiálů)**
  - **Možnost snímání obrazu ve skutečných barvách**
  - **Pozorování nevodivých materiálů**
  - **Pozorování porézních materiálů**
  - **Použití obrazové analýzy**
  - **Nedochází k degradaci vzorku**
  - **Jednoduchá výměna vzorku**
  - **Snadná obsluha, opakovatelnost měření**
  - **Možnost optických řezů a pozorování průhledných vzorků i pod povrchem**
- **Přechod mezi optickou světelnou a elektronovou řádkovací mikroskopií**