

Л. С. АГРОСКИН, Г. В. ПАПАЯН, В. К. ПЕТРОВ, Л. П. РАУТИАН
**МИКРОСПЕКТРОФОТОМЕТР С ПРОСТРАНСТВЕННОЙ,
СПЕКТРАЛЬНОЙ И ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МОДУЛЯЦИЕЙ**

(Представлено академиком В. П. Линником 22 VII 1974)

Модуляционная спектрофотометрия, охватывающая различные приемы модуляции светового пучка, получила развитие как метод обнаружения и изучения слабых оптических эффектов, связанных со структурными и энергетическими особенностями образца.

Ниже описывается регистрирующий микроспектрофотометр, обеспечивающий работу модуляционными методами в проходящем и отраженном свете и предназначенный для исследований в области биологии, минералогии, физике твердого тела. Принципиальная схема прибора показана на рис. 1.

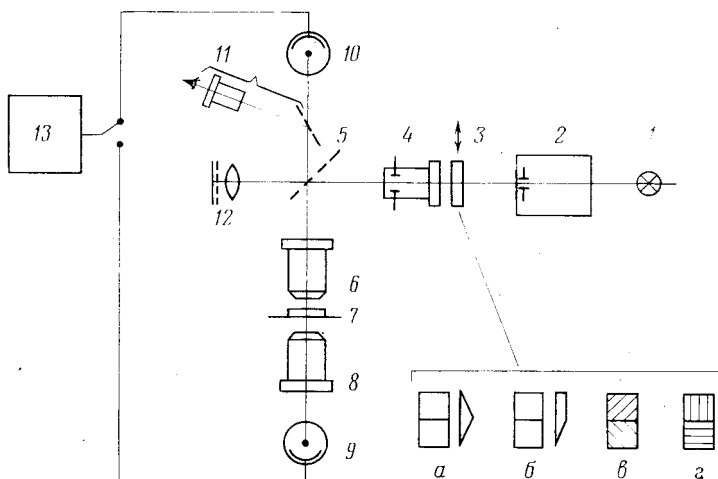


Рис. 1. Принципиальная схема модуляционного микроспектрофотометра и типы применяемых модуляторов

Излучение источника света 1 после монохроматора 2 попадает в микроскоп, работающий в обратном ходе лучей и содержащий окуляр 4, светоделитель 5 и микрообъектив 6. При этом выходное отверстие монохроматора, выполняющее роль полевой фотометрической диафрагмы, изображается с уменьшением в плоскость объекта 7 в виде светового зонда. В случае измерения прозрачного образца прошедший через него поток направляется конденсором 8 на приемник 9. При измерении непрозрачных образцов отраженный поток поступает на приемник 10. Наблюдение исследуемого объекта и фотометрируемого участка осуществляется с помощью визуальной насадки 11 и дополнительных осветителей (на схеме не показаны), а также автоколлимационной схемы 12, работающей только в проходящем свете (1).

Модуляционный принцип измерения обеспечивается конструкцией модулятора 3, который установлен в плоскости входного зрачка микроскопа

и содержит рамку, совершающую возвратно-поступательное движение перпендикулярно оптической оси. Такое устройство позволяет вводить в ход лучей спаренные оптические элементы, скачком изменяющие свойства фотометрического пучка для получения пространственной, спектральной или поляризационной модуляции.

Оптические элементы модулятора схематично изображены на том же рисунке, где элементы *a* и *б* представляют собой призмы с малым углом преломления, элемент *в* состоит из двух узкополосных светофильтров, а элемент *г* содержит два поляроида со взаимно перпендикулярными ося-

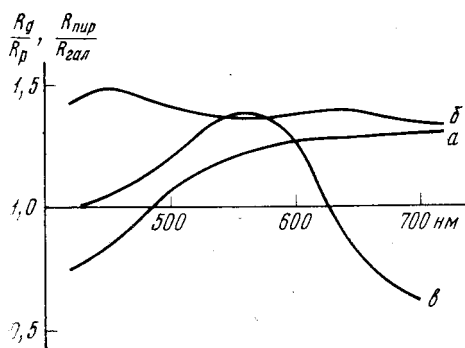


Рис. 2

Рис. 2. Относительный спектр отражения пирита по галениту (*a*) и спектры поляризационного отношения R_g/R_p , $R_{лп/р}/R_{гг/л}$ антимопита (*б*) и умангита (*в*). Объектив 20 \times , зонд 20 мкм

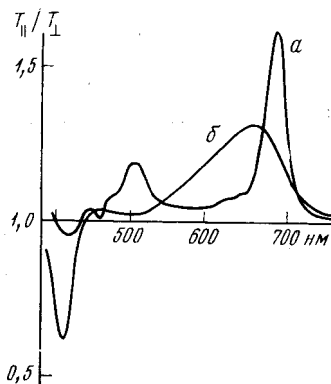


Рис. 3

Рис. 3. Спектры поляризационного отношения $T_{||}/T_{\perp}$ хроматофора водоросли *Closterium* (*a*) и монокристалла красителя метилснвого голубого (*б*). Объектив 60 \times , зонд 5 мкм

ми. Важное достоинство описанного модулятора состоит в том, что свойства фотометрического пучка сохраняются неизменными практически в течение всего полупериода модуляции, что значительно улучшает энергетические характеристики прибора. К этому следует добавить также нечувствительность системы к небольшим смещениям блока модулятора.

Электрические сигналы, соответствующие различным положениям оптического элемента модулятора, распределяются по каналам с помощью синхронного коммутатора и направляются в блок *ИЗ* для обработки и регистрации (²).

Рассмотрим подробнее возможности прибора, определяемые типом используемого модулятора.

1. Модулятор типа *a* создает два пространственно разделенных пучка, направляемых поочередно в две фиксированные точки поля микроскопа. При этом появляется возможность регистрировать различия абсорбционных характеристик двух соседних участков прозрачного объекта и следить за их изменением во времени, что особенно важно при цитофизиологических исследованиях (³). Если один пучок пропустить через объект, а другой через свободный участок поля, регистрируется спектр поглощения или пропускания объекта (⁴).

Тот же модулятор при работе в отраженном свете позволяет регистрировать относительные спектры отражения двух минералов (⁵). В этом случае изучаемый минерал отыскивается в сростке с минералом-эталоном, спектр которого известен. Пример такой записи приведен на рис. 2, *a*. По сравнению с применяемыми для этой цели визуальными фотометрами пространственная модуляция обеспечивает получение непрерывной спектральной кривой, улучшает локальность и точность измерений.

Призмный модулятор может быть использован также для измерения дифференциальных спектров люминесценции микрообъектов и изучения изменения интенсивности свечения во времени ⁽⁶⁾. Особенно целесообразно использование пространственной модуляции при исследовании люминесценции клеток, когда удается исключить вредное влияние фона.

Сочетание призмного модулятора с дополнительной полевой диафрагмой окуляра 4 (рис. 1) позволяет освещать объект в одной точке попеременно двумя длинами волн с небольшим сдвигом $\Delta\lambda$, определяемым углом призмы и дисперсией монохроматора. В результате появляется возможность регистрировать первую производную спектра поглощения по методу, изложенному нами ранее ⁽⁷⁾, а также получать модуляционные спектры отражения, достоинства которых продемонстрированы в работе ⁽⁸⁾ при изучении спектральных особенностей твердого тела вблизи фундаментальных полос.

2. Модулятор типа б, состоящий из плоскопараллельной пластинки и призмы, при меньшем разведении лучей обеспечивает практически те же возможности, что и бипризма. Особенность применения этого модулятора заключается в том, что один пучок идет по оси микроскопа. Это создает удобства при работе с анизотропными образцами в поляризованном свете, когда необходимо вращать образец, а также исключает влияние хроматизма увеличения системы при записи спектров микрообъектов, размеры которых соизмеримы с величиной зонда.

3. Модулятор типа в создает чередование монохроматических потоков с далеко отстоящими длинами волн (монохроматор при этом выключается из хода лучей или работает нулевым порядком). Такой прием применяется главным образом для решения конкретных исследовательских или диагностических задач, когда найдены характерные спектральные точки, определяющие специфику образца.

В проходящем свете таким образом удается реализовать двухволновой метод спектрофотометрии, при котором исключается влияние неспецифических потерь света в мутной среде ⁽⁹⁾. Открываются возможности быстрой сортировки микрообъектов по цвету. Примером «цветовой» диагностики в отраженном свете может служить определение пробности золота по красно-синему отношению ⁽¹⁰⁾.

4. Модулятор типа г направляет через одну и ту же точку образца поляризованные световые пучки с ортогональными плоскостями поляризации. В результате прибор регистрирует спектр поляризационного отношения в проходящем или в отраженном свете.

На наш взгляд, такой способ работы в проходящем свете является эффективным приемом обнаружения и исследования слабого дихроизма микрообъектов, отражающего его структурную упорядоченность. Примером подобных исследований в области биологии может служить изучение анизотропии хроматофоров водоросли (рис. 3, а), а в области физики — определение спектральных свойств монокристаллов красителей (рис. 3, б). Модуляционный принцип измерения открывает возможности экспериментального обнаружения расщепления поляризованных полос поглощения, что, в частности, представляет интерес при изучении структуры сложных молекул ⁽¹¹⁾.

В отраженном свете спектр поляризационного отношения может служить средством диагностики анизотропных рудных минералов. В этом нас убеждают следующие особенности модуляционного метода: слабая зависимость результатов измерений от качества полировки шлифа и рельефа зерен, практическая независимость результатов измерений от дефокусировки микроскопа, более четкое определение ориентации зерен в шлифе, поскольку при вращении столика числитель и знаменатель регистрируемого отношения изменяются в разные стороны.

Особая ценность рассматриваемого метода заключается в том, что он по существу является безэталоным, так как настройка прибора может быть

выполнена по любому изотропному образцу. На рис. 2, б, в представлены спектры поляризационного отношения двух рудных минералов.

Подводя итог сказанному, отметим, что модуляционный принцип измерения, реализованный в данном приборе, позволяет наилучшим образом использовать преимущества двухлучевой спектроскопии, так как здесь различия между двумя сигналами отражают в чистом виде изучаемый параметр образца. Особо следует подчеркнуть целесообразность применения модуляционных методов в микроскопии, где при этом удается, с одной стороны, заметно снизить требования к оптической схеме микроспектрофотометра, а с другой — исключить из рассмотрения неспецифический «фон», оказывающий маскирующее действие и обусловленный сложной структурной организацией большинства микрообъектов.

Поступило
3 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Л. С. Агроскин, Г. П. Папаян, Л. П. Рауриан, Цитология, т. 12, № 4, 548 (1970).
² Г. В. Папаян, Оптико-механич. пром., т. 8, 32 (1972). ³ J. Wolken, G. Strother, Appl. Opt., v. 2, № 9, 899 (1963). ⁴ Л. Э. Горн, Л. С. Агроскин и др., Цитология, т. 13, № 5, 644 (1971). ⁵ И. С. Волынский, Определение рудных минералов под микроскопом, М., 1966. ⁶ B. Chance, V. Legallais, Rev. Sci. Instrum., v. 30, № 8, 732 (1959).
⁷ Г. В. Папаян, Л. С. Агроскин, ДАН, т. 207, № 4, 831 (1972). ⁸ М. Кардона, Модуляционная спектроскопия, М., 1972. ⁹ B. Chance, Rev. Sci. Instrum., v. 22, № 7, 634 (1951). ¹⁰ П. С. Бернштейн, С. С. Козак, Тр. ЦНИГРИ, т. 87, 247 (1970). ¹¹ W. Eaton, R. Hochstrasser, J. Chem. Phys., v. 46, № 7, 2533 (1967).