

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven

von T. Sure, Leica Microsystems Wetzlar GmbH

Einleitung

In den letzten Jahren hat die Konfokalmikroskopie eine rasante Entwicklung genommen. Mit dem LEICA TCS NT und dem LEICA INM 200 Confocal stehen heute Systeme zur Verfügung, mit denen auch für anspruchsvollste Applikationen mikroskopische Bilder aufgezeichnet werden können, die durch ihren hohen Kontrast überzeugen. Wurden vor einigen Jahren Konfokalmikroskope nur von einigen wenigen Spezialisten benutzt um eine Probe optisch in verschiedenen Z-Ebenen zu betrachten, so hat sich heute die Konfokalmikroskopie als eine weitere allgemeine Kontrastieretechnik etabliert. Im Vergleich zum normalen Mikroskop läßt sich, hervorgerufen durch den höheren Kontrast im Konfokalmikroskop, eine effektive Steigerung der Zweipunktauflösung beobachten

[1, 2]. In Kombination mit anderen Techniken, wie z. B. der Mehrwellenlängenfluoreszenz, hat sie Einzug in viele Forschungsbereiche gehalten. Getrieben durch diese Entwicklungen werden an die Objektive, auch in einem Konfokalmikroskop die Herzstücke, neue Forderungen gestellt. Leica hat sich diesen Herausforderungen gestellt und mit neuartigen Verfahren Objektive entwickelt und produziert, die den höchsten Ansprüchen genügen. Die Erfahrungen, die wir hierbei sammeln konnten, kommen natürlich nicht nur der Konfokalmikroskopie zugute, sondern überall dort, wo es auf höchste Bildgüte ankommt. Damit bei der mikroskopischen Abbildung keine Qualitätseinbußen entstehen, dürfen die optischen Komponenten nahezu keinerlei Bildfehler aufweisen. In wie weit einzelne dieser sogenannten Aberrationen zu einer Verschlechterung

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven

(Fortsetzung)

von T. Sure

der Abbildungsqualität führen, wird im folgenden, insbesondere im Hinblick auf die Konfokalmikroskopie, erläutert.

Einfluß der geometrischen Aberrationen

Um die Entstehung der Aberrationen zu beschreiben, betrachte man eine im Brennpunkt eines optischen Systems liegende, punktförmige Strahlungsquelle, die ihr Licht in den vollen Raumwinkel ausstrahlt. Ein Objektiv kann nun bis zu einem maximalen Winkel, der bestimmt wird durch die numerische Apertur, die Lichtstrahlen von dieser Strahlungsquelle aufnehmen. Strahlen, die aus unterschiedli-

chen Winkeln auf die Frontlinse treffen, legen innerhalb des Objektivs unterschiedlich lange Glas- und Luftstrecken zurück. Betrachtet man alle in der Austrittspupille ankommenden Strahlen, so weisen diese im allgemeinen unterschiedliche Wegstrecken auf. Betrachtet man die zu diesen Strahlen gehörenden Wellenfronten, so haben diese, den verschiedenen Wegstrecken entsprechend, unterschiedliche Phasenlagen, die man mit der Pupillenfunktion $OPD(r_p, \varphi_p)$, auch Optical Path Difference genannt, beschreibt. Mit der Kirchhoffschen Beugungstheorie (1) läßt sich aus der $OPD(r_p, \varphi_p)$ die Licht-Amplitudenverteilung $A(x,y)$ in der Umgebung des Bildortes bei $x,y = 0$ berechnen [3].

$$A(x,y) = C \int_0^1 \int_0^{2\pi} \exp\frac{2\pi}{\lambda} OPD(r_p, \varphi_p) \cdot \exp(i\frac{-2\pi}{\lambda}(x \cdot x_p + y \cdot y_p)) r_p dr_p d\varphi_p \quad (1)$$

mit

x,y = kartesische Koordinaten in der Objektebene und

$$x_p = r_p \sin \varphi_p$$

$y_p = r_p \cos \varphi_p$ als kartesische Koordinaten in der Pupillenebene,

C als eine Normierungskonstante.

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

Die Intensität erhält man, indem das Betragsquadrat der Amplitude berechnet wird.

$$I(x,y) = |A(x,y)|^2 \quad (2)$$

Man versucht nun die Objektive so auszu-legen, daß die OPD möglichst klein wird, d. h. die Summe aus Glas- und Luftstrecken für alle Strahlen gleich ist. Um dies zu erreichen hat der Optikdesigner nur 3 Parameter zur Verfügung: die Linsendicken bzw. den Luftabstand zwischen den Lin- sen, den Linsenradius und den Brechungs- index*. Um überhaupt mit nur drei Para- metern die einzelnen Strahlen so zu be- einflussen, daß sie eine möglichst gerin- ge Phasendifferenz in der Pupille aufwei- sen, muß die Brechung auf möglichst vie- le Flächen (Linsen) verteilt werden. Hoch- leistungsmikroobjektive sind daher typisch aus 15 und mehr Linsen aufgebaut.

* Solange man nur monochromatische Bildfehler be- trachtet, braucht die Dispersion des Glases nicht be- rücksichtigt zu werden.

Bei den heute üblichen Mikroobjektiven geht man im allgemeinen davon aus, daß die Aberrationen minimiert sind. Man spricht dann von einer sog. beugungsbe- grenzten Korrektur. Daß auch, theoretisch betrachtet, noch geringe Restaber- rationen vorhanden sind, spiegelt die Tat- sache wieder, daß ein Objektiv immer ei- nen Kompromiß darstellt. Denn außer mi- nimalen Aberrationen werden auch noch Forderungen an die Größe des Objektfel- des, den Arbeitsabstand, die Transmission, die Abgleichlänge, Lage der Austrittspu- pille und je nach Anwendung noch weite- re Kriterien gestellt.

Ein Gütekriterium mit welchen Restaber- rationen ein System als beugungsbegrenzt bezeichnet wird, ist der sog. Strehlwert (SR = Strehl Ratio). Im mathematisch strengen Sinn ist eine beugungsbegrenzte Abbildung nur erreichbar für $OPD = 0$. Dies ist aber praktisch, wie oben aufgeführt, nicht realisierbar. Aus diesem Grund hat Marechal ein Kriterium eingeführt, nach dem ein Objektiv als beugungsbegrenzt

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

aufzufassen ist, wenn der Strehlwert über 80% liegt. Um den Strehlwert mathematisch zu berechnen, wird die Integration in Gl. (1) für den Achspunkt (d. h. $x = 0, y = 0$) ausgeführt und durch den Wert dividiert, die die Integration liefert, wenn $OPD = 0$ gesetzt wird. Sei RMS die mittlere quadratische Abweichung der Wellenfront vom Idealfall $OPD = 0$, dann läßt sich mathematisch zeigen, daß der Strehlwert sich folgendermaßen darstellen läßt:

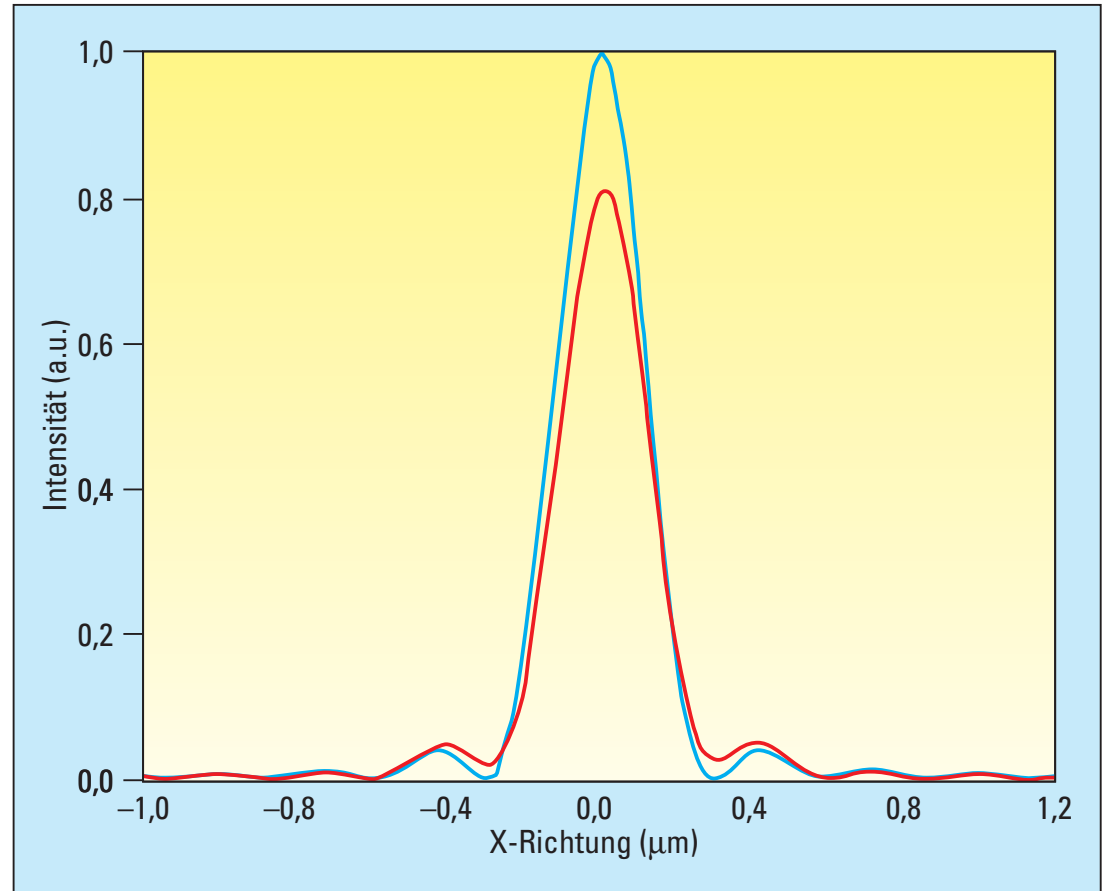
$$SR = \exp(-2\pi \cdot RMS)^2 \quad (3)$$

Was bedeutet anschaulich dieser Strehlwert? Durchdringt Licht eine Blende, respektive die Objektivpupille, so entstehen hinter der Blende Beugungsringe. Für ein ideales optisches System ohne Aberrationen ergibt sich $SR = 1$. Das bedeutet, daß das Objektiv die maximal mögliche Leistung bezüglich der Konzentration der Lichtintensität im Bildpunkt hat. Hierbei findet man ca. 95% der Gesamtintensität im zentralen Beugungsring, und nur ca. 4% im ersten Nebenmaximum. Ist ein System

nicht auskorrigiert, so bedeutet dies, daß das Verhältnis der Intensität in Hauptmaximum zu der im Nebenmaximum abnimmt. In Abbildung 1 ist die Intensitätsverteilung der Beugungsringe senkrecht zur optischen Achse (x-Achse) für ein ideales System ($SR = 1$) (a) und ein mit geringen Restaberrationen ($SR = 0,8$) behaftetes Objektiv (b) aufgetragen ($NA = 1,0; \lambda = 500 \text{ nm}$). Die Auswirkung auf das Auflösungsvermögen eines Objektivs mit der numerischen Apertur NA beschreibt die sogenannte Optische Transferfunktion (OTF). Sie beschreibt den Kontrastumfang als Funktion der Linienpaare pro mm. In Abbildung 2 ist, bezogen auf die Punktbildfunktion aus Abbildung 1, die entsprechende Optische Transferfunktion für ein ideales System ($SR = 1$) und ein mit Restaberrationen ($SR = 0,8$) behaftetes Objektiv aufgetragen. Eine exakte Angabe, welchen Wert die OTF für ein Objektiv aufweisen muß, damit zwei benachbarte Objektlinien bei visueller Beobachtung noch als aufgelöst erscheinen, läßt sich nicht genau angeben. Dies hängt von mehreren Faktoren

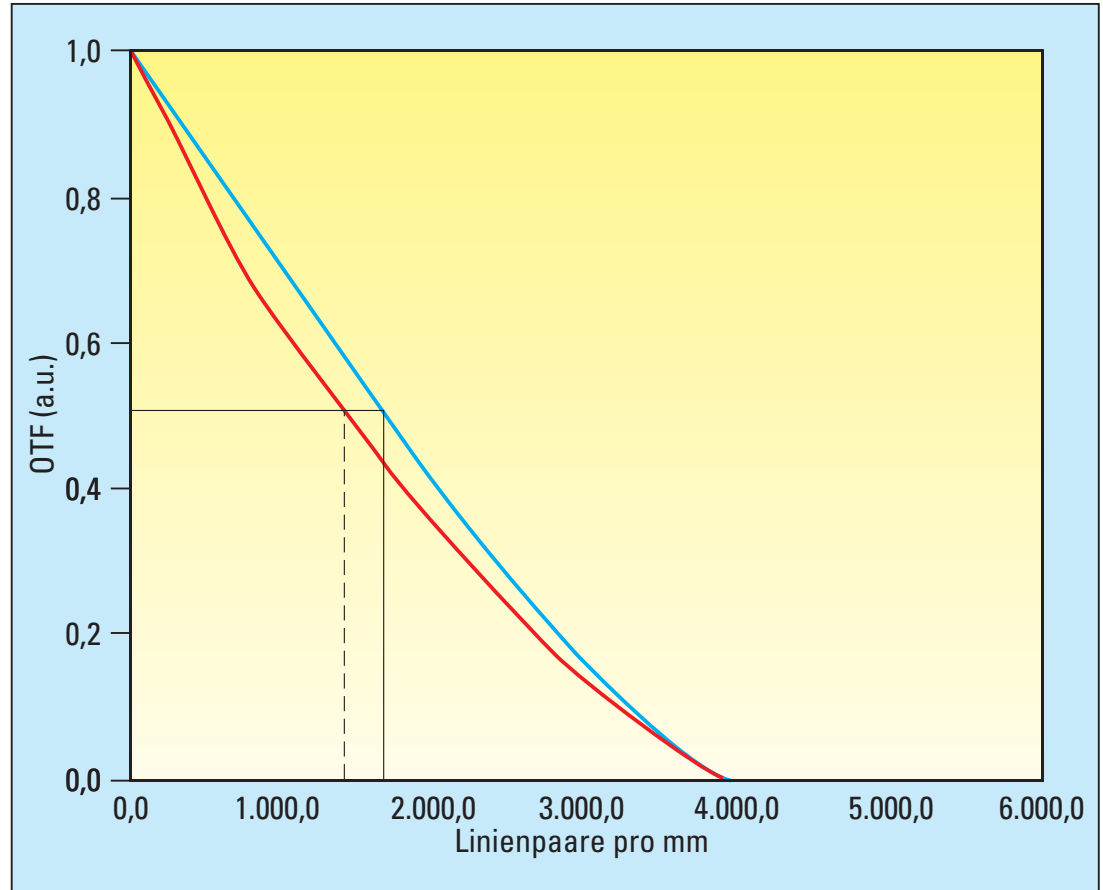
Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure



Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure



Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

ab, wie z. B. der Art der Beleuchtung, oder auch der Physiologie des menschlichen Auges. In der Praxis hat es sich als brauchbar erwiesen, Objektive bei derjenige Anzahl an Linienpaaren zu charakterisieren, bei der OTF = 0,5 ist. Dieser Wert stellt den Kontrastumfang dar, der zum Beispiel benötigt wird, um eine saubere Strukturierung im Photolack zu erhalten.

Mit modernen CCD-Detektoren und entsprechender Bildverarbeitungssoftware lassen sich Objekte darstellen, deren Linienabstand d fast an der physikalischen Grenze

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (4)$$

liegt. Solche Verfahren werden heute in vielfältiger Weise angewandt und lassen sich unter dem Begriff Video enhanced microscopy zusammenfassen.

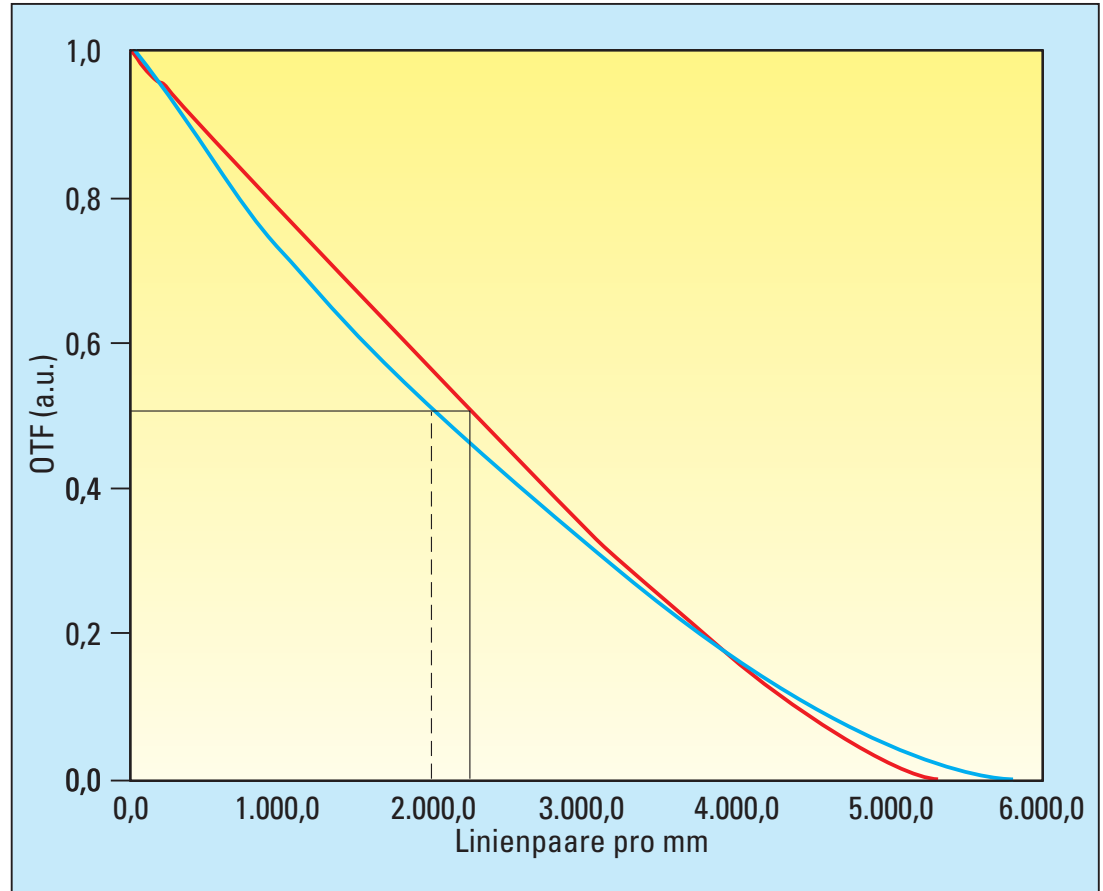
Das Auflösungsvermögen, ob auf das menschliche Auge oder ein CCD-Array

bezogen, skaliert mit der numerischen Apertur (NA) wie man an Gl.(4) sieht. Aus diesem Grunde ist verständlich, daß der Anwender Objektive mit möglichst hoher numerischer Apertur einsetzen möchte. Apertur alleine ist jedoch nicht alles. Betrachtet man einmal Abbildung 3, in der die OTF für (a) ein Objektiv mit $NA = 1,4$ und mit einem Strehlwert $SR = 0,8$ und (b) ein System mit $NA = 1,3$ und $SR = 0,95$ aufgezeichnet ist, so erkennt man, daß mit einem Objektiv geringerer Apertur durchaus eine höhere Auflösung erreicht werden kann, wenn es besser korrigiert ist als jenes mit höherer Apertur.

Der Korrektionszustand, theoretisch durch das Objektivdesign vorgegeben, und durch eine hohe Fertigungsqualität umgesetzt, sind ebenso wichtig wie der reine Zahlenwert der numerischen Apertur. Durch die Einführung der quantitativen Interferometrie zur Vermessung von Objektiven werden heute bei Leica in der Serienfertigung Strehlwerte größer 0,9 standardmäßig erreicht. Für spezielle Kundenwünsche

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure



Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

wird sogar $SR \geq 0,95$ garantiert. Durch diesen hohen Qualitätsstandard wird erreicht, daß die angegebene Apertur der Objektivs auch voll zum Tragen kommt. D. h. die Qualität heutiger Leica Objektivs liegt weit oberhalb dessen, was von Marechal einmal als beugungsbegrenzt definiert wurde.

Bedeutung der chromatischen Fehler

Ein optisches System hinsichtlich seiner monochromatischen Aberrationen auszukorrigieren, ist bereits mit einem großen Aufwand verbunden. Dies alleine reicht aber leider nicht aus, da zusätzlich aufgrund der Dispersion der Gläser Farbabweichungen entstehen. Durch die chromatischen Fehler entstehen zusätzliche Zerstreuungskreise und Unschärfen im Bild, die gerade dann besonders auffällig erscheinen, wenn die restlichen Bildfehler gut auskorrigiert sind. Betrachtet man zum Beispiel mit einem nur achromatisch korrigierten Objektiv ein Objektmikrometer,

dann erscheinen die schwarzen Striche und Punkte des Objekts beim Durchfokussieren in den verschiedensten Farbtönen. Mit einem apochromatisch gut korrigierten Objektiv hingegen erscheinen dabei die Objektlinien beim Durchfokussieren farbneutral.

In der Mikroskopie werden üblicherweise die Objektivs in drei Qualitätsstufen unterteilt: Achromat, Halbapochromat und Apochromat. Der Begriff Apochromat wurde bereits von E. Abbe vor mehr als 100 Jahren eingeführt. Abbe beschrieb den Unterschied zwischen einem Achromaten und einem Apochromaten damit, daß beim Achromaten die Fokusstrahlen für zwei Wellenlängen (F' und C'), beim Apochromaten für drei Wellenlängen (F' , e und C')** zusammenfallen. Als apochromatischer Fehler wird der axiale Abstand $\Delta s'$ des gemeinsamen Bildpunktes für Licht der Wellenlängen F' und C' zum Bildpunkt für Licht der Wellenlänge e verstanden. Bei

** $F' = 487 \text{ nm}$, $e = 546 \text{ nm}$, $C' = 644 \text{ nm}$

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

heutigen Apo-Objektiven kann davon ausgegangen werden, daß über den gesamten sichtbaren Spektralbereich der maximale Abstand der Bildpunkte $\Delta s'$ für unterschiedliche Wellenlängen längs der optischen Achse kleiner als die Tiefenschärfe (DOF = depth of focus) ist.

$$\Delta s' \leq \frac{n\lambda}{NA^2} = \text{DOF}, \quad (5)$$

hierbei ist n der Brechungsindex des Mediums (z. B. Immersionsöl oder Wasser). Mit den heute zur Verfügung stehenden Glassorten sind Designansätze entwickelt worden, die es theoretisch ermöglichen, einen Farbfehler zu erreichen, der deutlich unterhalb des oben genannten Wertes liegt.

Mit dem Aufkommen der Konfokalmikroskopie reicht es für hochwertige Apo-Objektive nicht mehr aus, wenn ihre Farbkorrektur die Bedingung (5) erfüllt. In [4] ist folgendes Kriterium angegeben:

$$\Delta s_{\text{conf}} = \frac{0,475 \cdot \lambda}{n(1 - \cos(u))}, \quad (6)$$

das auch als Fluoreszenzauflösung bezeichnet wird. Hierbei ist n der Brechungsindex und u der halbe Öffnungswinkel des Systems. Allerdings hat sich herausgestellt, daß für eine Vielzahl an Applikationen im Bereich der Konfokalmikroskopie dieses Kriterium immer noch nicht ausreicht. In der letzten Zeit haben sich, abhängig von Vergrößerung und Apertur, die in Tabelle 1 angegebenen Richtwerte für den zulässigen Farblängsfehler herausgestellt.

| Vergrößerung | Apertur | $\Delta s'$ (nm) |
|--------------|---------|------------------|
| 10x | 0,4 | 2.000 |
| 20x | 0,7 | 570 |
| 40x | 0,85 | 350 |
| 40x | 1,20il | 250 |
| 63x | 1,2W | 200 |
| 100x | 1,40il | 150 |

Tabelle 1: Zulässige Farblängsfehler

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

Um eine Vorstellung von der Bedeutung dieser Werte zu erhalten, betrachte man die Abbildungen 4 bis 6. Hierbei ist beispielhaft jeweils sowohl die Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse für 2 Wellenlängen, als auch die Summe der Intensität, wie sie von einem nicht farbeempfindlichen Detektor gemessen würde, aufgetragen. Grundlage für die Berechnungen ist ein Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,4 und einer Zentralwellenlänge von 500 nm. Die Abbildung 4 zeigt die Situation, wie sie sich ergeben würde, wenn der maximal zulässige Farblängsfehler für die zweite Wellenlänge der Tabelle 1 entsprechen würde, Abbildung 5 für einen Farblängsfehler nach Gl.(5). Anhand dieser beiden Abbildungen erkennt man, daß bereits eine deutliche Verbreiterung für den zweiten Fall zu beobachten ist, womit eine schlechtere Tiefenauflösung gegeben wäre. Da aber eine der wesentlichen Aufgaben eines Konfokalmikroskops die Auflösung verschiedener Objektpunkte entlang der optischen Achse ist, sollte daher

die Intensitätsverteilung entlang dieser Achse möglichst schmal sein. In Abbildung 6 schließlich wurde für die zweite Wellenlänge ein Farbfehler von 500 nm angenommen. Dies entspricht etwa dem maximalen Farblängsfehler, wie man ihn für Objektive mit Fluotarqualität erwarten würde. Hierbei sieht man bereits, für den Fall, daß Licht von nur zwei Wellenlängen vorhanden wäre, zwei Maxima in der Intensitätsverteilung des Summensignals. Eine Auflösung von Objektpunkten, die im Bereich dieser beiden Maxima liegen, ist somit nicht möglich. Derartige Objektive sind für die Konfokalmikroskopie weniger geeignet.

Anforderungen an die Fertigungsqualität

Was bedeutet dies nun für die Entwicklung und Produktion hochwertiger Objektive? Mit den heutigen Rechenmethoden ist es möglich, die Objektive so auszulegen, daß sie einerseits die hohen Anforderungen bzgl. der Farbkorrektur erfüllen, und

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

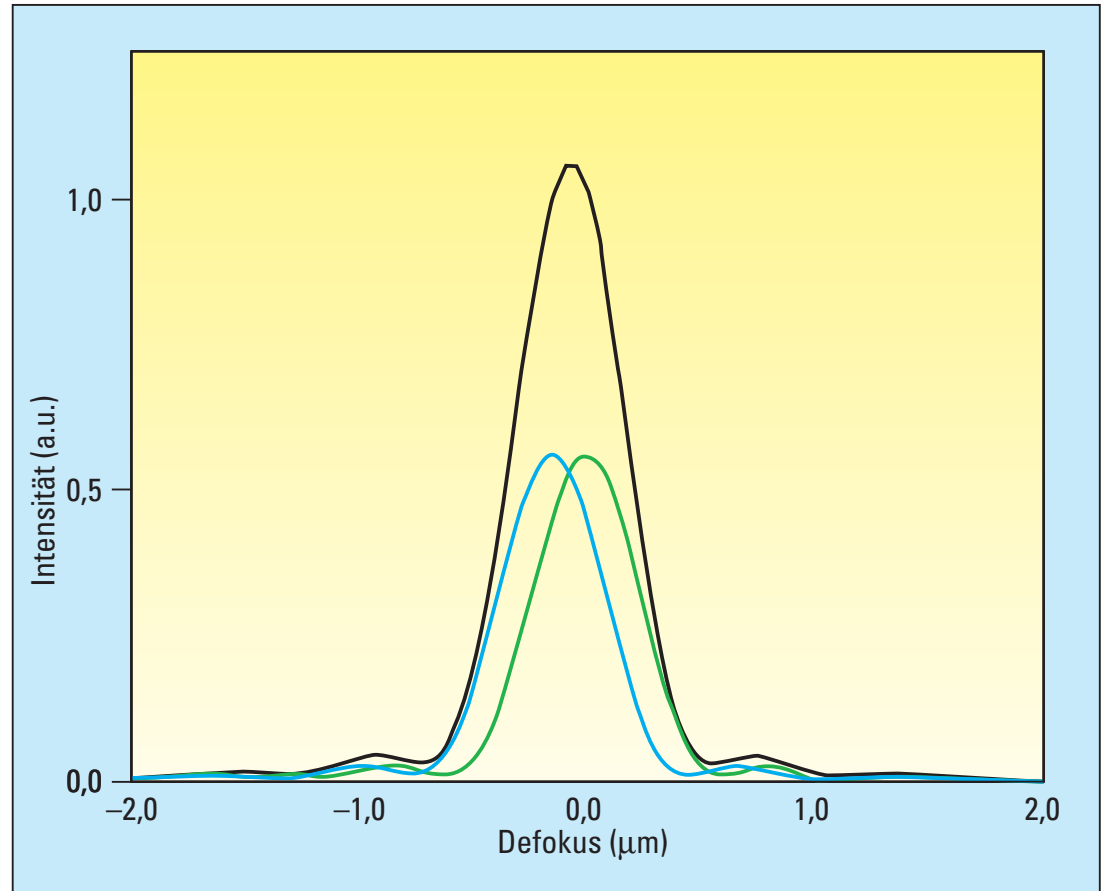


Abb. 4: Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse, grün: Zentralwellenlänge; blau: $\Delta s' = 150 \text{ nm}$; schwarz: Summsignal

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

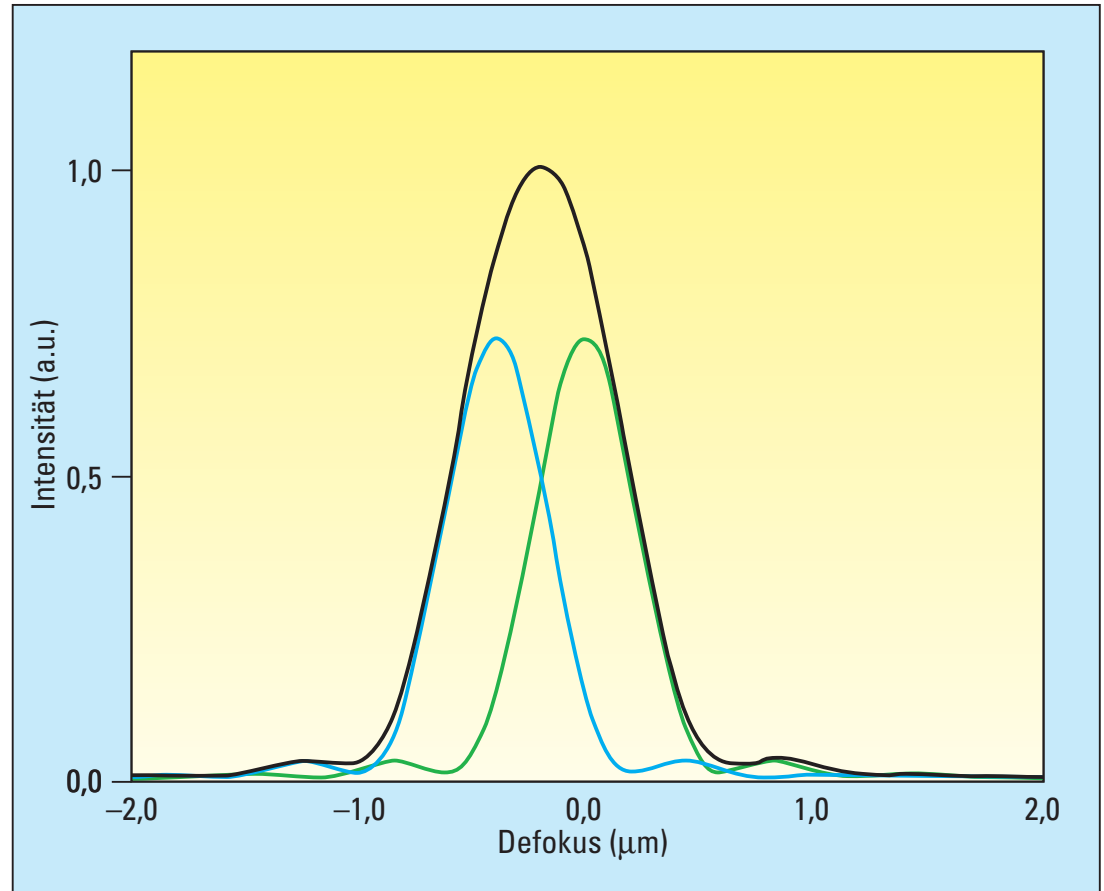


Abb. 5: Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse, grün: Zentralwellenlänge; blau: $\Delta s' = 380 \text{ nm}$; schwarz: Summsignal.

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

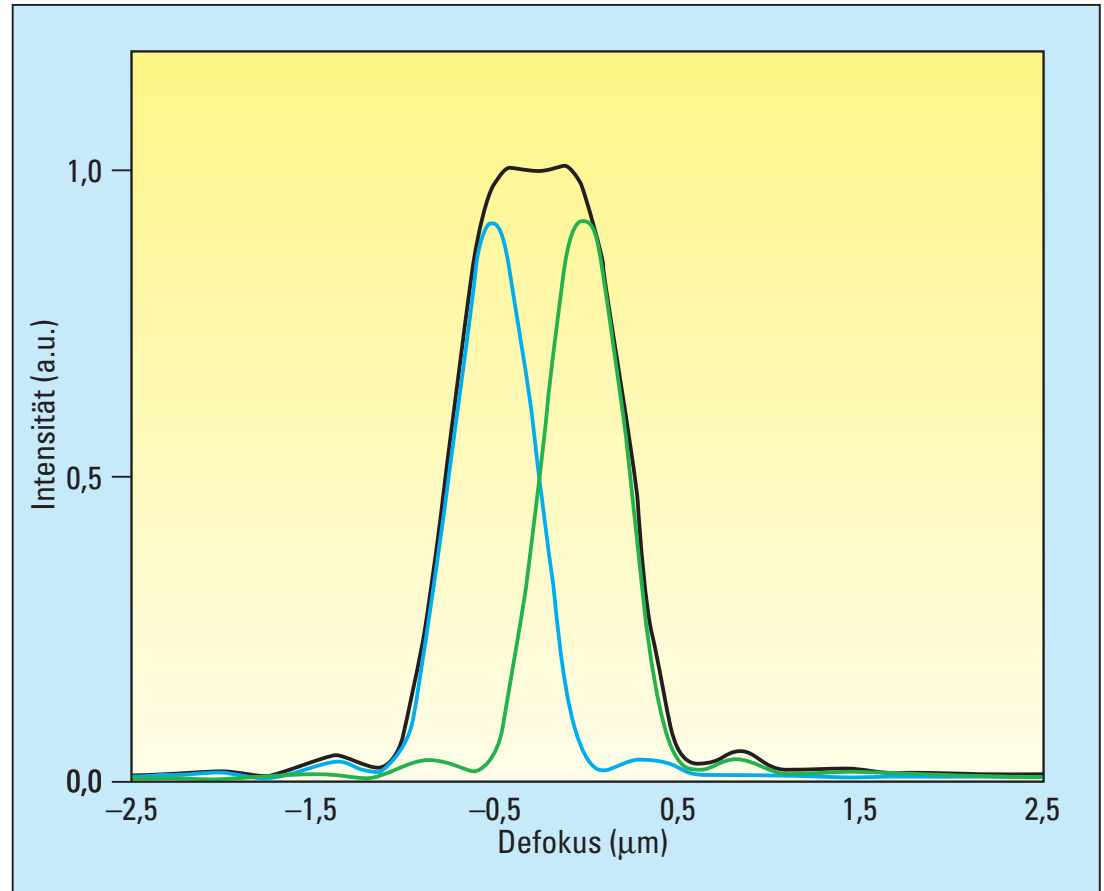


Abb. 6: Intensitätsverteilung entlang der optischen Achse, grün: Zentralwellenlänge; blau: $\Delta s' = 500 \text{ nm}$; schwarz: Summsignal.

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

gleichzeitig bzgl. der geometrischen Abbildungsfehler für große Objektfelder nahezu auskorrigiert sind. Zusätzlich zu den durch das Objektivdesign vorgegebenen Restaberrationen, kommen die Fertigungstoleranzen hinzu. Abweichungen der Linsendicken und Radien von ihren Sollwerten führen zu sphärischen Fehlern. Astigmatismus entsteht, wenn die Linsen von der idealen Kugelform abweichen. Fallen die einzelnen optischen Achsen der Linsenuntergruppen nicht mit der optischen Achse des Gesamtsystems zusammen, entsteht Achskoma. All diese Einflußgrößen müssen im Fertigungsprozeß minimiert werden. Jeder Fehler führt zu einer Abweichung der Wellenfront von ihrer Idealform und führt, aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit des Strehl-werts vom RMS-Wert (Gl. (3), zu einer drastischen Verschlechterung der Abbildungsleistung.

Die Wellenfrontdeformationen lassen sich mit Hilfe der Zernikepolynome mathematisch darstellen [3]. Mit Hilfe leistungs-

fähiger Computer läßt sich somit für ein optisches System die theoretisch zu erwartende Wellenfront berechnen.

Für die Beschreibung der Aberrationen werden üblicherweise 36 dieser Radialpolynome herangezogen, da diese Anzahl eine ausreichend genaue Beschreibung der Wellenfront garantiert. Durch Variation des optischen Aufbaus erkennt man, welche Linsen, oder auch komplexere Baugruppen, den sphärischen Fehler, Astigmatismus, Koma und den Farblängsfehler beeinflussen. Wird die Wellenfront eines Objektivs mit Hilfe eines phasenschiebenden Interferometers vermessen, so lassen sich die Ergebnisse ebenfalls durch Anpassen von 36 Zernikepolynomen an die Meßdaten darstellen. Entspricht das Resultat nicht den Vorhersagen, so läßt sich durch Vergleich der aus theoretischen Rechnungen bestimmten Zernikepolynomen mit den aus den interferometrischen Messungen gewonnenen Daten diejenige Baugruppe finden, die den wesentlichen Beitrag liefert.

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

Aus der Entwicklung der Zernikekoeffizienten weiß man, daß der sphärische Fehler (je nach NA) durch leichtes Defokussieren in gewissen Grenzen ausgeglichen werden kann. Diesen Effekt kann man um so weniger nutzen um Fertigungsschwächen auszugleichen, je größer die numerische Apertur und je höher die Anforderungen an den Farblängsfehler sind. Aus diesem Grund müssen Objektive, die in der Konfokalmikroskopie eingesetzt werden, sphärisch auskorrigiert sein. Um Toleranzen innerhalb der Fertigungsprozesse auszugleichen, ist es seit längerem Stand der Technik einen Setzabstand im Design zu berücksichtigen. Durch Änderung dieses Abstands zwischen zwei Linsen während der Objektivmontage können Abweichungen bzgl. der Radien, Mitten-dicken und Brechungsindices ausgeglichen werden. Erfolgt diese Montage, wie bei Leica üblich, unter Kontrolle eines Interferometers, das die quantitative Auswertung der Wellenfront ermöglicht, kann man gewährleisten, daß diese Objektive bzgl. des sphärischen Fehlers ausgesetzt

sind. Rein auf den sphärischen Fehler bezogen sind daher Strehlwerte von $SR = 0,99$ keine Seltenheit.

Der Farblängsfehler wird wesentlich durch Schwankungen der Abbe-Zahl v_e beeinflusst, eine Größe, die sich aus Brechungsindices bei verschiedenen Wellenlängen errechnet und ein Maß für die Dispersion der Gläser darstellt. Betrachtet man z. B. ein 100x/1.4 Ölimmersionsobjektiv, für das ein maximaler Wert für den Farblängsfehler von 150 nm gefordert wird, so zeigen Toleranzrechnungen, daß selbst bei Einsatz sog. 1/1 Glasqualität eine Objektivfertigung mit ihren normalen Standardprozessen diesen Wert nicht garantieren kann. Für Glas der Stufe 1/1 ist eine Abweichung von v_e um 0,2% vom Katalogwert der Glashersteller erlaubt. Mittels der Fehlerfortpflanzung kann man berechnen, daß im ungünstigsten Fall bereits durch ein einzelnes Kittglied ein Farbfehler von 180 nm entstehen kann. Dieser Wert wäre für einen klassischen Apochromaten immer noch hervorragend, für die

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

Anwendung in der Konfokalmikroskopie reicht dies aber nicht mehr aus.

Hieran erkennt man, daß es notwendig ist, nicht nur die geometrischen Aberrationen auszusetzen, sondern ebenso muß eine Möglichkeit geschaffen werden, um während der Objektivmontage den Farbfehler zu minimieren. Wie oben beschrieben, eignet sich die Interferometrie hervorragend zur Prozeßkontrolle der geometrischen Aberrationen.

Um die Objektive optimal auf die Bedürfnisse der Konfokalmikroskopie auszurichten, wurde ein Mehrwellenlängeninterferometer aufgebaut. Mit diesem Interferometer werden die Wellenfronten für verschiedene Wellenlängen während des Montageprozesses vermessen. Die computergestützte Auswertung, in die die Vorgaben des Objektivdesigns einfließen, geben dem Setzer die benötigten Informationen, um das Objektiv bzgl. der geometrischen und chromatischen Aberrationen optimal aussetzen zu können.

Hinweise für den Einsatz von Hochleistungsmikroobjektiven

In den vorherigen Kapiteln ist beschrieben worden, welcher hoher Aufwand nötig ist, um Objektive zu fertigen, die den Ansprüchen der Konfokalmikroskopie genügen. Während der Entwicklungsarbeiten für die Meßtechnik mußten wir eine Vielzahl an Problemen lösen, die ebenso typisch für Arbeiten innerhalb von Forschungslabors sind. Diese Ergebnisse und Erfahrungen sollen im folgenden kurz dargelegt werden.

Temperaturproblematik

Für die meisten Objektive werden Farblängsfehler deutlich unter einem Mikrometer garantiert. Ein typisches Objektiv, dessen Fassungsinnenteil aus Messing gefertigt ist, erfährt eine Längenänderung von ca. 750 nm pro Grad^{***}. Wir haben festgestellt, daß bereits die Handwärme während des Einschraubens in das Interfero-

^{***} Längenausdehnung für Messing $\alpha = 16,9 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

meter zu einer Temperaturerhöhung des Objektivs führt. Während der Objektivmontage wird zur Bestimmung des Farblängsfehlers die Messung der Fokuslagen für verschiedenen Wellenlängen sequentiell durchgeführt. Die jetzt stattfindende Abkühlung des Objektivs reicht aus, um das Meßergebnis zu stören. Wir führen deswegen mehrere Messungen durch, um mit einem geeigneten Algorithmus die Temperaturdrift herauszurechnen.

Einsatz von Immersionsöl

Diesem häufig eher vernachlässigten »Etwas« zwischen Probe und Objektiv muß doch eine besondere Beachtung beigegeben werden. Auch hier sei zuerst auf die Probleme hingewiesen, die durch Temperaturschwankungen entstehen.

Die Brechungsindices für die einzelnen Wellenlängen sind temperaturabhängig. Die Größenordnungen sind für die meisten im Handel erhältlichen Öle etwa gleich, wie beispielhaft in Tabelle 2 gezeigt wird.

| Wellenlänge | $\Delta n/\Delta T [K^{-1}]$ Leica | $\Delta n/\Delta T [K^{-1}]$ Cargil |
|-------------|---------------------------------------|--|
| F' | $4,05 \cdot 10^{-4}$ | $4,15 \cdot 10^{-4}$ |
| e | $3,85 \cdot 10^{-4}$ | $4,17 \cdot 10^{-4}$ |
| C' | $3,74 \cdot 10^{-4}$ | $3,99 \cdot 10^{-4}$ |

Tabelle 2: Temperaturabhängigkeit der Brechwerte von Immersionsölen.

Die auf den ersten Blick gering erscheinenden Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit der Brechungsindices für die einzelnen Wellenlängen wirken sich aber erheblich im v_e -Wert aus. Dieses führt dazu, daß bei einer Änderung der Temperatur nur um $5^\circ C$ der Farblängsfehler für z. B. ein 100x/1.4 Ölimmersionsobjektiv um 55 nm zunimmt. Ein Betrag von 55 nm entspricht bereits über 30% des spezifizierten Farblängsfehlers. Aus diesem Grund werden alle Hochleistungsobjektive bei Leica in klimatisierten Räumen bei $23^\circ C$ montiert. Beim Einsatz dieser Objektive sollte deshalb darauf geachtet werden, daß die Umgebungstemperatur $23^\circ C \pm 3^\circ$ beträgt. Zu-

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

| | DIN 58884 | ISO 8036/1 |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| Brechungsindex | $n_e = 1,5180 \pm 0,0004$ | $n_e = 1,5180 \pm 0,0005$ |
| Dispersion | $v_e = 44 \pm 5$ | $v_e = 44 \pm 3$ |

Tabelle 3: Optische Daten für Immersionsöl.

sätzlich sollte darauf geachtet werden, daß eine unnötig starke Bestrahlung der Probe oder Teile des Objektivs durch die Mikroskopbeleuchtung vermieden wird, durch z. B. eine zu groß eingestellte Leuchtfeldblende.

Die optischen Daten von Immersionsölen sind in der DIN 58884 bzw. ISO 8036/1 festgeschrieben. Für eine Temperatur von 23° C gelten die Werte gemäß Tabelle 3.

Das Leica Immersionsöl besitzt exakt die Sollwerte der DIN/ISO Vorgabe (Tabelle 3). Die Objektive werden designmäßig und fertigungstechnisch auf diese Werte eingestellt. Für normale Anwendungen reicht die Einhaltung der Norm aus. Allerdings führt bei den Anforderungen, wie sie in Tabelle 1 definiert sind, ein v_e -Wert, der bzgl. der Norm

an der oberen Grenze liegt, bei einem 100x/1.4 Ölimmersionsobjektiv bereits zu einem Farblängsfehler von 50 nm. Auch hier sei daran erinnert, daß dies bereits 30% des als zulässig erachteten Farblängsfehlers sind.

Einflüsse der Deckgläser

Deckgläser werden heute in der Regel mit einer Dicke von 170 µm eingesetzt. Die optischen Daten sind in der DIN 58884 bzw. ISO 8036/1 festgeschrieben (Tabelle 4):

| DIN/ISO Werte für | Deckgläser |
|-------------------|-------------------------|
| Brechungsindex | $n_e = 1,524 \pm 0,003$ |
| Dispersion | $v_e = 56,5 \pm 0,5$ |

Tabelle 4: Optische Daten für Deckgläser.

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven

(Fortsetzung)

von T. Sure

Auch hier verursachen Variationen des v_e -Wertes einen Anstieg des Farblängsfehlers.

Variationen der Deckglasdicke im 10 μm Bereich verursachen für Mikroobjektive mit hoher numerischer Apertur bereits eine sichtbare Verschlechterung der Bildgüte, insbesondere bei Trockenobjektiven.

Kommt zusätzlich ein Glas mit den falschen optischen Daten zum Einsatz, ist eine dramatische Verschlechterung der Bildgüte die Folge. Dies ist exemplarisch in Abbildung 7 gezeigt, in der die Optische Transferfunktion für ein 40x/1.25 Immersionsobjektiv aufgezeichnet ist. Hierbei wurde ein 180 μm dickes Deckglas aus BK7 zugrunde gelegt.

Hierbei erreicht die gesamte Abbildungskette (Objektiv plus Deckglas) nur noch einen Strehlwert von etwa 40%.

Es sei hierbei darauf hingewiesen, daß n_e von BK7 den von der DIN erlaubten Wert

der Abweichung des Brechungsindex nur um einen Faktor 2 überschreitet.

Ebenso sollte man bedenken, daß ein Großteil der im Handel erhältlichen Deckgläser aus gezogenem Material besteht. Bei diesem Fertigungsverfahren entsteht eine Welligkeit im Glas, die für eine Verschlechterung der Bildgüte über das Objektfeld verantwortlich ist. Um die volle Leistung eines Objektivs ausnutzen zu können, sollte man doppelt geläppte Deckgläser einsetzen.

Zusammenfassung

Die heutigen Designansätze schaffen die Voraussetzungen für Mikroobjektive, die eine hohe Bildgüte garantieren. Oft wird bereits bei diesen Betrachtungen die Grenze des physikalisch Machbaren aufgezeigt. Eine Umsetzung in der Fertigung erfordert an vielen Stellen den Einsatz modernster computerunterstützter Meßtechnik. Nur ein ständiger Vergleich zwischen

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

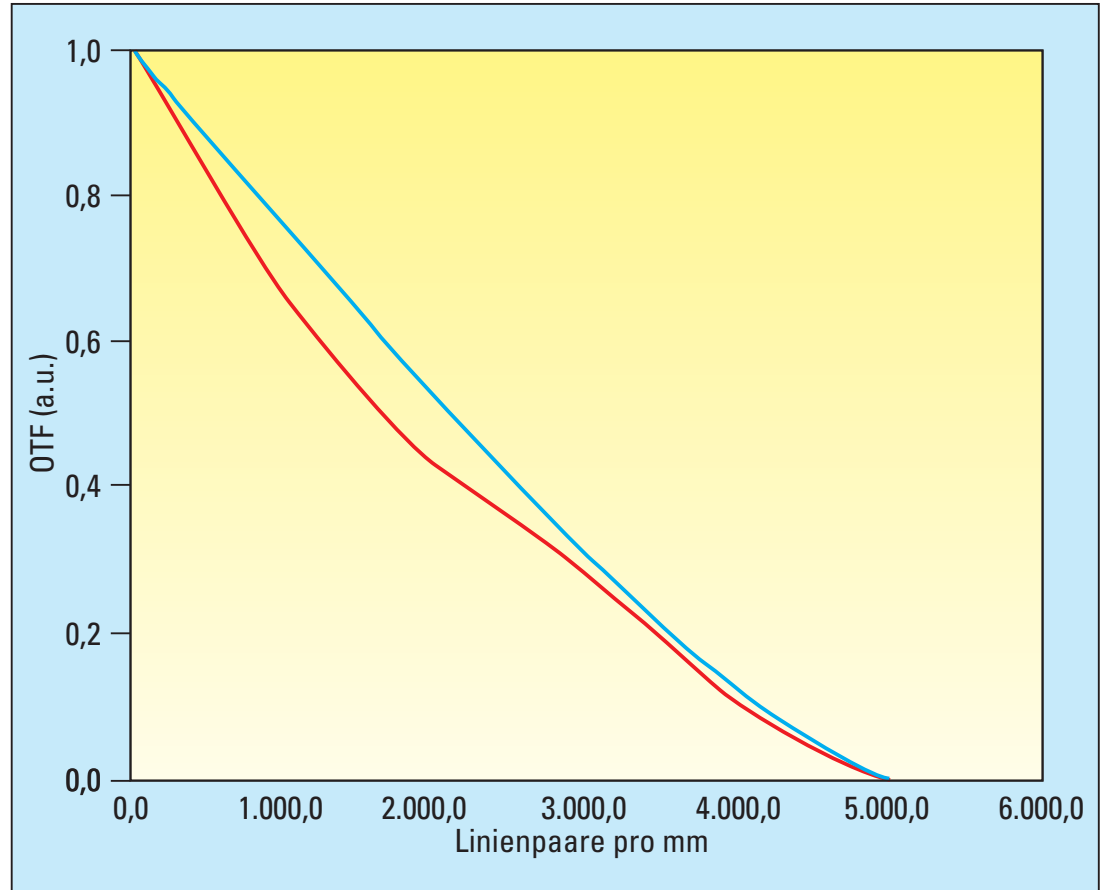


Abb. 7: Optische Transferfunktion bei Einsatz eines Deckglases aus BK7; blaue Linie bei Einsatz eines DIN-Deckglases.

Anforderungen der Konfokalmikroskopie an die Qualität von Mikroobjektiven (Fortsetzung)

von T. Sure

den theoretischen Vorhersagen mit den technischen Daten der realisierten Komponenten garantiert eine gleichbleibende Produktqualität. Damit dieses hohe Niveau auch in den Applikationen voll zum Tragen kommt, muß sorgfältig auf das gesamte zum Einsatz kommende Equipment geachtet werden. Wie gezeigt wurde, verliert man schnell einen Faktor 2 bezüglich der Spezifikation der Bildgüte, wenn nicht optimales Zubehör zum Einsatz gelangt.

Literatur

- [1] **Wilson, T., Sheppard, C.:** Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy, Academic, London 1984.
- [2] **Sure, T.:** Real-Time Confocal Scanning Microscope, an Instrument with a better depth resolution, in Scanning Microscopy, Symposium Proceedings, Springer, pp. 167, 1992.
- [3] **Born, M., Wolf, E.:** Principle of Optics, Pergamon Press, 1993.
- [4] **Wilson, T.:** Confocal Microscopy, Academic Press, London, pp. 371, 1999.

Anschrift des Verfassers:
Dr. Thomas Sure,
Leica Microsystems Wetzlar GmbH,
Optik – Technologie – Entwicklung,
Ernst-Leitz-Str. 17–37,
D-35578 Wetzlar