

Ein in-situ Verfahren zur Bestimmung der numerischen Aperturen (NA) der Beleuchtung und der Abbildung optischer Mikroskope

Jan Krüger, Detlef Bergmann, Rainer Köning, Bernd Bodermann

Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Bundesallee 100, 38116 Braunschweig, Germany

<mailto:jan.krueger@ptb.de>

In diesem Beitrag werden die Grenzen eines kürzlich veröffentlichten Verfahrens für die Bestimmung der numerischen Aperturen (NA) eines optischen Mikroskops untersucht. Dafür wird das Verfahren erstmals an zwei kommerziellen Systemen angewandt. Durch Anpassungen der bestehenden Vorgehensweise kann eine insgesamt breitere Anwendbarkeit der Methode hier demonstriert werden.

1 Einführung

Die Kohärenz und Auflösung der mikroskopischen Abbildung ist maßgeblich durch die Beleuchtungs-, und die Abbildungs-NA gegeben. Die beiden NA-Werte beschreiben den maximalen Winkel unter dem ein Kondensator bzw. Objektiv in der Lage ist Licht auf die Probe zu fokussieren bzw. gestreutes Licht von der Probe aufzunehmen. Selbst für ein Auflichtmikroskop stimmen die beiden Werte nicht notwendigerweise überein. Die genaue Kenntnis der NA-Werte ist unter anderem für rigorose Simulationen im Rahmen von modellbasierten Messauswertungen notwendig [1].

Allerdings war bis vor kurzem nach unserer Kenntnis noch kein zufriedenstellendes Verfahren zur gleichzeitigen *in situ* Bestimmung der beiden NA-Werte publiziert worden [2]. Meistens benötigen die bisherigen NA-Bestimmungsverfahren einen externen Messaufbau und können dann nur einen der beiden NA-Werte bestimmen. Insbesondere die Beleuchtungs-NA, die der NA des Kondensators entspricht, aber oftmals durch eine Aperturblende im Mikroskop weiter reduziert wird, macht eine *in situ* Bestimmung notwendig. In [2] wurde kürzlich erstmals ein NA-Bestimmungsverfahren vorgestellt, dass sowohl *in situ* angewandt wird als auch beide NA-Werte gleichzeitig ermitteln kann. Diese Methode wird in Kapitel 2 kurz zusammengefasst, bevor in Kapitel 3 ihre Anwendung auf zwei kommerzielle Systeme gezeigt wird. Abschließend werden die Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert.

2 NA-Bestimmung

Das neuartige NA-Bestimmungsverfahren und seine Anwendung an einem hochaperturigen Auflichtmikroskop mit Köhlerscher Beleuchtung ist in [2] im Detail beschrieben. Prinzipiell werden immer zwei aufeinander folgende Messungen benötigt, die voraussetzen, dass die hintere Brennebene des Mikroskopobjektivs beobachtet wird.

Die erste Messung findet ohne eine Aperturblende und auf einem Spiegel statt, sodass das gesamte Objektiv komplett ausgeleuchtet wird. Der Durchmesser der Austrittspupille des Objektivs in der ersten Messung wird später zur Bestimmung der Abbildungs-NA benötigt.

Für die zweite Messung wird ein Liniengitter mit bekannter und kalibrierter Periode anstelle des Spiegels in der Objektebene platziert. Außerdem wird eine Aperturblende eingesetzt, deren Durchmesser so gewählt bzw. eingestellt wird, dass nur ein kleiner Teil der hinteren Brennebene ausgeleuchtet wird. Daraufhin wird in der hinteren Brennebene des Objektivs ein Beugungsmuster sichtbar. Über die Abstände der Beugungsordnungen zueinander, dem Durchmesser der ersten Messung und mit Hilfe der Gittergleichung und der Definition der NA kann dann ein Wert für die Abbildungs-NA bestimmt werden [2]. Der Durchmesser der 0. Beugungsordnung aus der zweiten Messung entspricht der Beleuchtungs-NA und kann dann über das Verhältnis von NA zu Durchmesser bestimmt werden.

3 Anwendung auf kommerzielle Systeme

In diesem Beitrag wird nun die Anwendung dieser Methode auf zwei kommerzielle Mikroskope beschrieben. Dieses erforderte geringfügige Anpassungen der kommerziellen Systeme und setzt voraus, dass die hinteren Objektivbrennebenen mit einer Kamera beobachtet werden können.

Zunächst wurde ein Durchlichtsystem untersucht. Die dazugehörigen Messungen und Ergebnisse sind in Abb. 1 und Abb. 2 dargestellt. Bei einem Auflichtsystem übernimmt ein Mikroskopobjektiv die Funktion des Kondensators und des Objektivs gleichzeitig. Damit ist i.A. Beleuchtungs- und Abbildungs-NA nahezu gleich groß und die Abbildungs-NA wird ganz, wie in [2] im ersten Schritt beschrieben, ausgeleuchtet. Bei einem Durchlichtsystem hingegen ist die Kondensator-NA oft deutlich kleiner als die Abbildungs-NA, so dass eine vollständige Ausleuchtung des Objektivs nicht erfolgt.

Um dennoch die Ausleuchtung des Objektivs in der hinteren Brennebene beobachten zu können, kann entweder die Belichtungszeit der Kamera oder die Intensität der Lichtquelle deutlich erhöht werden, oder eine Beleuchtung, nur für diese erste Messung, von der Seite als Streustrahlung eingeführt werden. Die erste Möglichkeit wurde in Abb. 1 links angewandt. Aufgrund eines schlechten Justagezustandes des Mikroskops wurde die Austrittspupille des Objektivs von der Kamera nicht vollständig abgebildet. Der Durchmesser konnte allerdings dennoch entlang der in Abb.1 eingezeichneten Diagonalen bestimmt werden.

Für die zweite Messung wird ein Liniengitter mit einer Periode von $1\ \mu\text{m}$ verwendet. Der Kondensator wird dabei ohne Aperturblende betrieben. Die zweite Messung der NA-Bestimmung wurde hier für verschiedene Emissionswellenlängen untersucht, während alle anderen Parameter beibehalten wurden. Beispielhaft werden die Messungen für $\lambda = 400\ \text{nm}$ und $\lambda = 650\ \text{nm}$ in der Mitte und rechts in Abb. 1 dargestellt. Die Größe der Beugungsordnungen ist in beiden Bildern auf der Kamera identisch. Nur die Abstände zwischen den Beugungsmittelpunkten mit der Wellenlänge variieren.

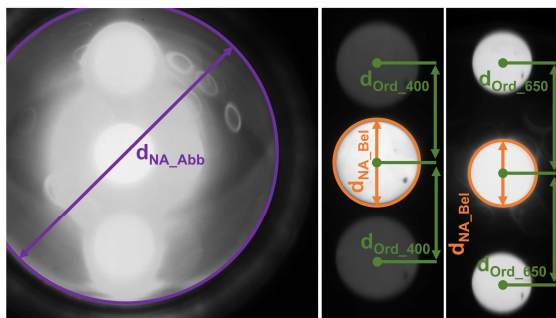


Abb. 1 NA-Bestimmung an einem Durchlichtmikroskop mit verschiedenen Emissionswellenlängen: links die erste Messung; mittig die zweite Messung bei $\lambda = 400\ \text{nm}$; und rechts die zweite Messung bei $\lambda = 650\ \text{nm}$

Die nominalen NA-Werte des Kondensators und des Objektivs sind 0.18 und 0.90. Die Ergebnisse der Auswertung für das Durchlichtmikroskop sind in Abb. 2 dargestellt.

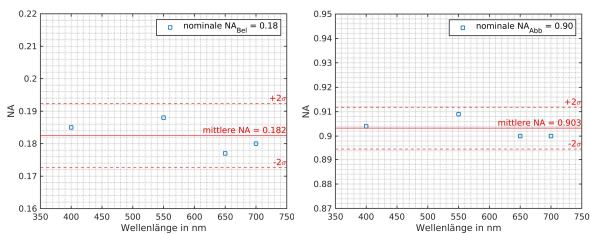


Abb. 2 NA-Ergebnisse der Beleuchtung und der Abbildung in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Das zweite kommerzielle Mikroskop hat eine Auflichtkonfiguration und nutzt eine Irisblende zur Einstellung der Beleuchtungsapertur. Die erste Messung der NA-Bestimmung in Abb. 3 links entspricht der Beschreibung in [2]. Bei einer minimal geöffneten Aperturblende überlappen sich hier die

Beugungsordnungen der zweiten Messung der NA-Bestimmung aber noch und die Beugungsordnungen sind aufgrund der Form der Irisblende Zwölfecke. Dies ist in Abb. 3 rechts zu beobachten. Auch wenn in [2] von voneinander getrennten Beugungsordnungen ausgegangen wird, ist eine Erweiterung der Auswertung auch für überlappende Beugungsordnungen durchführbar. Hierfür bieten sich geometrische Herangehensweisen aus der Bilddatenerkennung an.

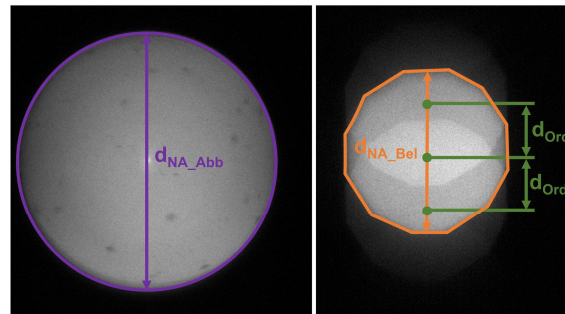


Abb. 3 NA-Bestimmung an einem Auflichtmikroskop mit überlappenden Beugungsordnungen

Die Ergebnisse der Auswertung werden in Abb. 4 dargestellt. Auf eine Auswertung der Beleuchtungs-NA wurde verzichtet, da die Irisblende nicht reproduzierbar auf die gleiche Größe eingestellt werden konnte.

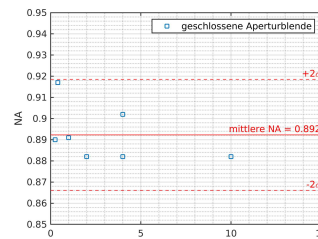


Abb. 4 NA-Ergebnis für die Abbildungs-NA mit einem nominalen Wert von 0.90

4 Zusammenfassung

Das in [2] erstmalig beschriebene Verfahren konnte mit geringfügigen Anpassungen erfolgreich an zwei kommerziellen Systemen angewandt werden. Die erzielten Ergebnisse stimmen im Rahmen der experimentellen Wiederholbarkeit überein und entsprechen den nominalen Werten.

Literatur

- [1] J. Krüger, R. Köning, B. Bodermann, „Systematic approach on illustrating the challenges represented by optical bidirectional measurements using rigorous simulations,“ in: Proc. SPIE **11057**, 110570D (2019)
- [2] J. Krüger, D. Bergmann, R. Köning, B. Bodermann, und E. Manske, "In situ, back-focal-plane-based determination of the numerical apertures in optical microscopes,“ in: Appl. Opt. **62**, 756-763 (2023)