

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft

von K.-H. Schade, P. Euteneuer, A. Müller-Rentz, Leica Microsystems Wetzlar GmbH

Einleitung

HCS – Harmonic Component System – ist die konsequente Weiterentwicklung des als universelles ∞ -Optiksystem für die Durch- und Auflichtmikroskopie mit den Forschungsmikroskopen Leica DM R 1992 eingeführten **DELTA**-Systems. Neben der für Leica selbstverständlichen Spitzenoptik setzte dieses Optiksystem damals neue Maßstäbe für den uneingeschränkten modularen Einsatz aller optischen Kontrastierverfahren [1].

Unsere Zeit wird immer schneller und die Anforderungen im Bereich Diagnostik und medizinischer Forschung und insbesondere in der Fluoreszenzmikroskopie haben sich rapide weiterentwickelt. Der zunehmende Einsatz von Videotechnik

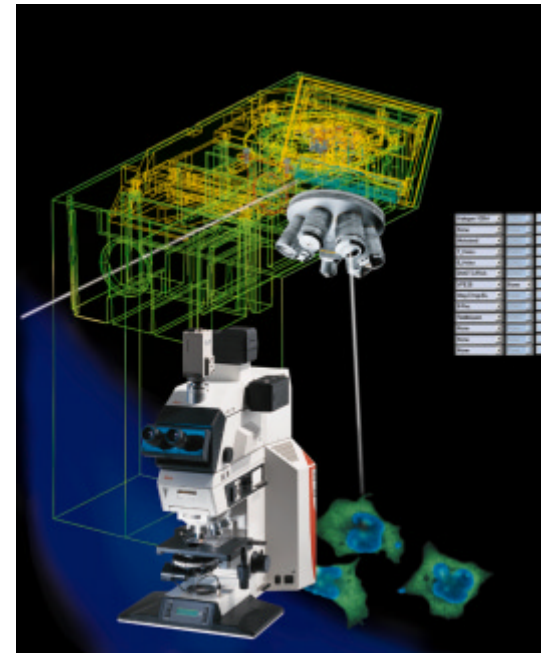


Abb. 1: Fortschrittliches Forschungsmikroskop-System
Leica DM R HCS

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

sowie elektronischer Bildverarbeitung macht eine optimale Anpassung des Mikroskopsystems erforderlich und bedingt neue Anforderungen an das Beleuchtungssystem. Hohe Innovationskraft und -geschwindigkeit sind hier gefragt – Herausforderungen, denen sich Leica aus der Tradition heraus verpflichtet fühlt.

Das **HCS**-System trägt diesen neuen Anforderungen Rechnung. Diese Grundziele und -merkmale des bewährten Optiksystems behalten auch weiterhin ihre Gültigkeit. **HCS** macht das **DELTA**-System noch vielseitiger und öffnet es für die Beantwortung heutiger und zukünftiger Anwenderforderungen und spezieller Problemlösungen.

Komponenten des gesamten Mikroskopsystems. Es garantiert ein ausgewogenes, anwendungsgerechtes Angebot mit optimalem Kundennutzen. Das **HCS**-System ist das Ergebnis einer integralen Systembetrachtung unter Nutzung aller technologischer Potentiale. Seine besonderen Merkmale sind

- ausgewogene optische und mechanische Anschlußmaße,
- ausgewogene Abstimmung aller optischen Systemkomponenten untereinander,
- ausgewogene, anwendungssichere technische Lösungen,
- optische Spitzenleistung mit progressiver Fertigungstechnologie.

Merkmale des HCS-Systems

Das **HCS**-System ist gekennzeichnet durch die »Harmonie« zwischen allen

Harmonie in den optischen und mechanischen Anschlußmaßen

Mit nunmehr 65 Jahren Erfahrung im Umgang mit **Unendlich-Optik** in der Mikro-

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

skopie hat LEICA höchste Kompetenz in der harmonischen Ausgestaltung aller relevanten Systemparameter aufgebaut. So wurden im Laufe der Entwicklung profunde technische Erfahrungen mit »langer« (Bezugsbrennweite 250 mm der Metallmikroskope bis 1987) und auch »kurzer« (Tubuslänge 160 mm) Bezugsbrennweite gesammelt und deren Vor- und Nachteile kritisch analysiert. Als Optimum für die leistungsfähige Gestaltung des Gesamtsystems wurde 1992 mit dem neuen Optikkonzept die **Bezugsbrennweite 200 mm als neuer Leica-Standard** festgelegt, wobei die Vorteile der früheren Systeme harmonisch vereint und deren Systemnachteil beseitigt wurde [1].

Das klassische RMS-Objektivgewinde wurde 1858 von der Microscopical Society of London als Standardgewinde in der Mikroskopie eingeführt. Die neueren Entwicklungen in der ∞ -Optik sowie wachsende Anforderungen, wie hochaperturige Objektive für die Fluoreszenzmikroskopie, ließen erkennen, daß das RMS-Gewinde für die weitere Entwicklung eine

fortschrittshemmende Einschränkung bedeutet hätte. Zur Schaffung neuer Freiheitsgrade hat Leica 1992 mit dem **DELTA**-System das neue **Objektivgewinde M25x0.75** eingeführt und vorausschauend eine wichtige Basis für das **HCS**-System geschaffen.

Im Zuge der Entwicklung des **DELTA**-Systems wurden auch Notwendigkeit und eventuelle Vorteile einer neuen, vergrößerten Abgleichlänge der Objektive untersucht.

Die Abgleichlänge **d** ist ein rein mechanisches Maß, nämlich der Abstand zwischen Objektebene und Objektivanschraubfläche (Abb. 2a). Beim Objektivwechsel durch Revolverumschlag bleibt die Bildschärfe weitgehend erhalten (Parfokalität). Die Abgleichlänge bestimmt zum einen den Einbauraum für Linsenelemente, andererseits beeinflusst sie die konstruktive und ergonomische Gestaltung der Objektive und des gesamten Mikroskopsystems.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Eine große Abgleichlänge, wie z. B. 60 mm oder mehr, schafft zwar gewisse Vorteile für die Darstellung von Objektiven im Grenzbereich von Mikroskopie und Makroskopie, hat aber andererseits erhebli-

che Nachteile für eine technisch und anwendungstechnisch ausgewogene Gestaltung des gesamten Mikroskop-Programms.

Neben einer in vielen Fällen unerwünschten Volumenvergrößerung der Objektive und der nachfolgenden Optikmodule wirkt sich eine verlängerte Abgleichlänge auch ungünstig auf die Ergonomie aus. Der Einblick bei aufrechten und die Position des Objekttisches bei inversen Mikroskopen erhöhen sich mit zunehmender Abgleichlänge zwangsläufig.

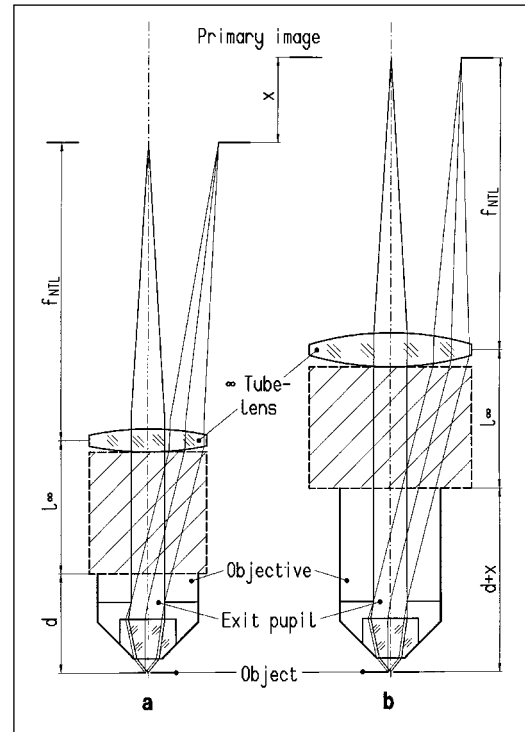


Abb. 2: Anschlußmaße beim ∞ -Mikroskop: Schematische Darstellung der Wirkung einer um x vergrößerten Abgleichlänge d . Bei gleichem Abstand l_∞ zwischen Objektiv und Tubuslinse, d. h. bei gleichem Einbauraum für Beleuchtungs- und Kontrastierkomponenten (schraffiert), wachsen die Durchmesser der Optikkomponenten hinter dem Objektiv sowie deren Abstand von der Austrittspupille. Bei gleicher Bezugsbrennweite f_{NTL} der Normaltubuslinse verlagert sich das Zwischenbild um x .

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Die Lage der hinteren Brennebene (Austrittspupille) der Objektive spielt eine wichtige Rolle bei der Korrektur der nachfolgenden Tubuslinse sowie bei der optischen und geometrischen Auslegung der im Unendlich-Strahlengang zwischen Objektiv und Tubuslinse angeordneten Module für die Bildkontrastierung. Je größer die Abgleichlänge wird, desto größer wird der Abstand der Austrittspupille zu den nachgeschalteten optischen Elementen, was vergrößerte Durchmesser, Korrektionsprobleme, erhöhte Kosten etc. im Gefolge hat. Eine größere Objektivabgleichlänge erhöht die Zentrierempfindlichkeit der Objektive generell [2], was sich gerade bei Hochleistungsobjektiven sehr nachteilig auswirkt (Abb. 2b).

Nach sorgfältiger Analyse und Abwägung aller für ein homogenes Mikroskop-Programm entscheidenden Aspekte hat sich Leica wie auch bereits mit Einführung der **DELTA**-Optik für die Beibehaltung der als Optimum erprobten **Abgleichlänge 45 mm** entschieden.

Diese für das **HCS**-System weiter gültigen Anschlußmaße garantieren Harmonie in der Beantwortung der optischen, mechanischen und ergonomischen Anforderungen an das Gesamtsystem »Mikroskopischer Arbeitsplatz«.

Harmonie in der Abbildung

Die beschriebenen mechanischen und optischen Anschlußmaße legen den geometrischen Rahmen fest, in dem sich die für die Bilderzeugung und Korrektur der optischen Abbildungsfehler einzusetzenden Optikkomponenten »anordnen« können.

Dabei stellen alle mitwirkenden »Komponenten« – Objektive, Okulare, Tubuslinsen, Kamera- und TV-Adapter etc. – aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Aufgabe individuelle Anforderungen an die Korrektur der physikalisch vorgegebenen optischen Aberrationen.

Entstehung und Wirkung der für die Ab-

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

bildung im Mikroskop maßgebenden und zu korrigierenden Aberrationen wurden früher bereits ausführlich beschrieben [1].

Hauptanliegen des Mikroskopbenutzers ist es, über ein für seine jeweilige Aufgabenstellung optimal ausgelegtes Mikroskop zu verfügen. Aufgabe und Interesse des Mikroskopherstellers ist es, die aktuellen Anwendungsfelder im Rahmen seines Gesamtangebotes anwendungsgerecht und wirtschaftlich für seine Kunden und für sich selbst bedienen zu können.

Bei der optischen Auslegung des Gesamtsystems »Mikroskop« und der Verteilung der Korrektionsanteile auf die beteiligten Komponenten sind in der Mikroskopentwicklung verschiedene Wege beschritten worden.

Auf den ersten Blick attraktiv erscheint der Ansatz, jede Komponente als Individuum in sich selbst aberrationsfrei darzustellen. Dies ist prinzipiell zwar möglich, jedoch birgt dieser Ansatz die Gefahr einer »Über-

frachtung« der Einzelkomponenten mit Korrektionsmitteln in sich, wodurch zum einen ein überhöhter Kostenaufwand entsteht und zum anderen Grenzen der Machbarkeit erreicht oder überschritten werden.

Als wesentlich günstiger hat es sich erwiesen, im Rahmen des Gesamtsystems »Mikroskop« die Korrektion bestimmter optischer Aberrationen gesamtheitlich zu betrachten und die Wirkungen auf mehrere Komponenten des Systems zu verteilen.

Öffnungsfehler, Koma und Farblängsfehler werden vorteilhaft am Ort des Entstehens, d. h. in der jeweiligen Komponente korrigiert. Für die Korrektion der chromatischen Vergrößerungsdifferenz (CVD) sowie des Astigmatismus hingegen hat sich schon sehr früh eine Verteilung der Korrektionsaufgaben auf die Objektive und Okulare als vorteilhaft herausgestellt [3]. Seit Einführung der Unendlich-Optik besitzt jedes Mikroskop ein für die Erzeugung

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

des reellen Zwischenbildes erforderliches Tubuslinsensystem, das – wie schon früher beschrieben – zur Herstellung eines bestimmten Korrektionszustandes im Zwischenbild verwendet werden kann [4] und damit zusätzlich Freiheitsgrade schafft.

Mit der **DELTA**-Optik wurde 1992 die Kompensation der CVD der Objektive von den Okularen in die ∞ -Tubuslinse verlagert – ein ebenfalls wichtiger Schritt auf dem Wege zum **HCS**-System. Besondere Vorteile ergeben sich hierdurch für die Konstruktion von Großfeldokularen.

Als Astigmatismus bezeichnet man bei der optischen Abbildung die typische Erscheinung, daß außerachsal gelegene, in radialer bzw. tangentialer Richtung ausgehende Objektdetails in unterschiedlicher Entfernung entstehen, nämlich auf der gewölbten sagittalen resp. meridionalen »Bildschale«. Bei beseitigtem Astigmatismus fallen diese zu einer – im einfachen Fall gewölbten – »Bildschale« zusammen

(Bildfeldwölbung). Bei einem idealen optischen System ohne Bildfeldwölbung und Astigmatismus liegen die »Bildschalen« in der Gaußschen Bildebene, und die Objektdetails werden im gesamten Sehfeld scharf abgebildet.

Die bei korrigiertem Astigmatismus verbleibende Bildfeldwölbung hängt hauptsächlich vom verwendeten Objektivtyp ab. Je aufwendiger der Objektaufbau gewählt wird, desto geringer wird die Bildfeldwölbung. Die Größe des Astigmatismus wird besonders durch die Formgebung der Linsen bestimmt. Einfache Objektivtypen wie die Klasse der Achromate besitzen grundsätzlich einen bestimmten Restanteil an Astigmatismus, wenn die Grundforderung nach aplanatischer Korrektur, d. h. Korrektur von Öffnungsfehler und Koma, erfüllt ist. Mit ebenfalls aplanatisch korrigierten einfachen Okularen konnte dieser Restastigmatismus mit ausreichendem Erfolg auf »natürliche« Weise kompensiert werden.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Die zusätzliche Korrektur der dabei verbliebenen Bildfeldwölbung wurde erst mit der Entwicklung der aufwendigeren Planobjektive möglich, wobei die Okulare keinen Beitrag leisteten. Die Erfahrung hat aber gezeigt, daß sich gerade im Hinblick auf weitere Leistungssteigerung der Objektive sowie neue Anwendungsanforderungen der Zukunft günstigere Voraussetzungen ergeben, wenn die Korrekturaufwendungen für die Wölbung und den Astigmatismus harmonischer auf die beteiligten Komponenten – die Tubuslinse nun eingeschlossen – verteilt werden. Dies ist mit Einführung des **HCS**-Systems geschehen (Abb. 3).

Konkret bedeutet dies, daß ein Teil des Beitrages der Objektive zur Korrektur der Bildfeldwölbung nun durch den neuen, gemeinsamen Kompensationsanteil der nachfolgenden Komponenten erfolgt. Die Objektive werden hierdurch »entspannt«, und es eröffnen sich neue Freiheitsgrade für spezielle Anwendungen.

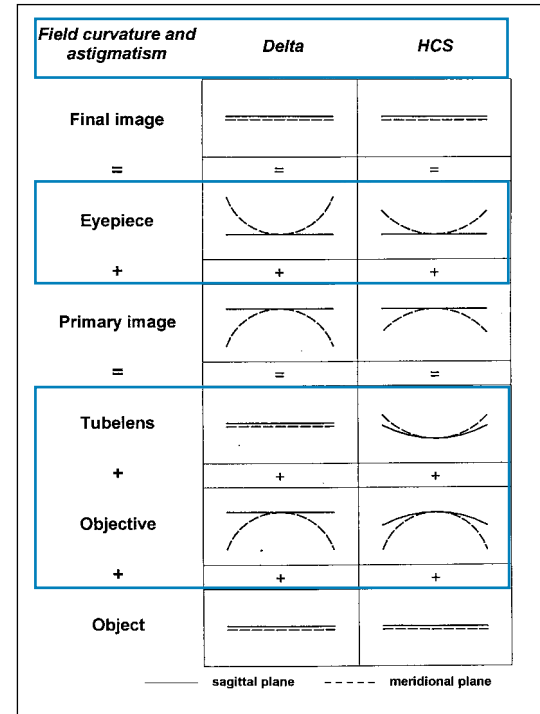


Abb. 3: Kompensation von Astigmatismus und Wölbung im DELTA- und HCS-System. Dargestellt sind jeweils die sagittale und meridionale Bildschale für Objektiv, Tubuslinse und Okular. Im HCS-System ist die Kompensationswirkung harmonisch auf alle Komponenten verteilt.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Typisch für das **HCS**-System ist die Verwendbarkeit aller bisherigen Objektive des **DELTA**-Systems. Die Verwendung HC-gezeichneter Objektive an **DELTA**-Mikroskopen ist bei geringen Zugeständnissen an die Feldkorrektur möglich.

Harmonie von Technik und Anwendung

HC PL Apochromate

Die Planapochromate sind die optischen Hauptleistungsträger eines Mikroskopprogramms. Lag früher bei klassischer Anwendung das Augenmerk primär auf hoher Auflösung und besonders guter Farbkorrektur im visuellen Bereich, so sind heute hohe Zusatzforderungen an Kontrast, Bildfeldkorrektur, UV-A-Transmission, Farbkorrektur im UV-A- und NIR-Bereich und spezifische Präparatbedingungen hinzugekommen.

wurde daher im **HCS**-System überarbeitet und durch eine Reihe von Hochleistungsobjektiven für ein breites Applikationsspektrum erweitert (siehe Tabelle 1).

Der konsequente Einsatz der fortschrittlichsten Rechnertechnologie in Entwicklung, Fertigung und Prüfung war für diesen Schritt notwendig. Mit verbesserten Korrekturalgorithmen und neuen Simulationsprogrammen, einer weiterentwickelten Fertigungstechnologie mit rechnergestützten Montageverfahren sowie automatisierter Prüferferometrie konnten Spitzenobjektive im Bereich der theoretischen Leistungsgrenze von Auflösung, Kontrast und Bildfeldebnung dargestellt werden.

Kontrast, Bildfeldebnung

Ein weithin akzeptiertes Bewertungskriterium für die Beurteilung von Objektiven ist die **Definitionshelligkeit nach Strehl** (SDH). Sie gibt das Verhältnis der

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Objektiv- bezeichnung	Min. freier Arbeits- abstand mm	Brenn- weite mm	Deckglas- korrektur mm	DIC- Prisma objektiv- seitig	DIC- Prisma Kondensor 0.90 S1	UV- Trans- mission bei		Bestell- nummer
						340 nm	365 nm	
PL APO 10x/0.40	2,20	20,0	0,17	A	K2	*) +++	*) +++	506511
PL APO 10x/0,40 IMM CORR	0,36	20,0	0 / 0,17	A	K2	+++	+++	506512
PL APO 20x/0.70	0,59	10,0	0,17	C	K2	+++	+++	506513
PL APO 20x/0.70 IMM CORR	0,25	10,0	0 / 0,17	C	K2	+++	+++	506514
PL APO 40x/0.85 CORR	0,24	5,0	0,11–0,23	C	K3	++	+++	506140
PL APO 40x/ 1.25–0.75 OIL	0,10	5,0	0,17	E	K5	+	+++	506105
PL APO 40x/ 1.25 OIL PH 3	0,10	5,0	0,17	E	K5	+	+++	506106
PL APO 63x/ 1.20 W CORR	0,22	3,2	0,14–0,18	D	K5	+	+++	506131
PL APO 63x/ 1.20 W CORR	0,22	3,2	0 **)	D	K5	+	+++	506139
PL APO 63x/ 1.32–0.60 OIL	0,07	3,2	0,17	D	K5	+	+++	506081
PL APO 63x/1.32– 0.60 OIL PH3	0,07	3,2	0,17	D	K5	+	+++	506082
PL APO 100x/ 1.40–0.60 OIL	0,09	2,0	0,17	D	K4	+	++	506038
PL APO 100x/ 1.40 OIL PH3	0,09	2,0	0,17	D	K4	+	++	506042

Tabelle 1: **PL APO**- und **APO** L-Wasserimmersionen des **HCS** Systems.

Fortsetzung S. 13

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Tabelle 1: Apochromate und APO L Wasserimmersionen HCS (Fortsetzung)

Objektiv- bezeichnung	Min. freier Arbeits- abstand mm	Brenn- weite mm	Deckglas- korrektur mm	DIC- Prisma objektiv- seitig	DIC- Prisma Kondensor 0.90 S1	UV- Trans- mission bei		Bestell- nummer
						340 nm	365 nm	
APO L 10x/0.30 W	3,6	20,0	0 / 0.17	D	K2	+++	+++	506142
APO L 20x/0.50 W	3,5	10,0	0 / 0.17	D	K2	+++	+++	506155
APO L 40x/0.80 W	3,3	5,0	0	D	K6	+++	+++	506143
APO L 63x/0.90 W	2,2	3,2	0	D	K7	+++	+++	506148

Bemerkungen:

*) UV-A-Transmission bei 340 / 365 nm: +++ = sehr gut ++ = gut + = ausreichend

**) Mittels der Korrektionsfassung werden bei diesem Objektiv Brechzahlabweichungen Δn unterschiedlicher Salzwasserlösungen ausgeglichen. Außerdem können bei den W CORR-Objektiven Abbildungsstörungen infolge temperaturbedingter Brechzahlabweichungen korrigiert werden.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens bei Abbildung durch ein mit Aberrationen behaftetes Objekt zur entsprechenden Intensität bei einem sonst gleichen, aber ideal korrigierten Objektiv [5] an. Die Größe dieses Wertes ist entscheidend für den Kontrast bei der Abbildung. In der Optikentwicklung wird in der Bildmitte eine SDH von 99% angestrebt und auch erreicht. Um heutige Anforderungen – z. B. aus der Konfokal- oder Halbleitermikroskopie – erfüllen zu können, darf dieser Wert bei Hochleistungsobjektiven durch fertigungsbedingte Toleranzen nicht unter 95% sinken. Zum Bildfeldrand hin wird in der Fachliteratur – den physiologischen Gegebenheiten des Auges angepaßt – ein Absinken der SDH auf 80% zugelassen.

Die **Point-Spread-Function** (PSF) wird für die anschauliche räumliche Darstellung der Intensitätsverteilung in der Airy'schen Beugungsfigur eines selbstleuchtenden Punktes benutzt. Höhe (Intensität) und Breite des Zentralmaximums hängen von

der Apertur ab. Während die SDH die Leistung des Objektivs mit nur einer Zahl beschreibt, gibt die **PSF** Aufschluß über Größe und Charakter des Restfehlers. Sphärische Aberration, Koma und Astigmatismus können hiermit leicht voneinander unterschieden werden.

Je höher und schmaler die Figur ist, desto höher sind Kontrast und Auflösung. Im Falle von Aberrationen sinkt die Intensität im Zentralmaximum und steigt in den Beugungsringen, was zu geringerem Kontrast führt. Zum Sehfeldrand hin geht darüber hinaus zunehmend die Rotations-symmetrie und damit die Abbildungstreue verloren.

Abbildung 4 zeigt am Beispiel 40-facher Objektive aus drei Entwicklungsgenerationen den für das **HCS**-System typischen Leistungsfortschritt.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

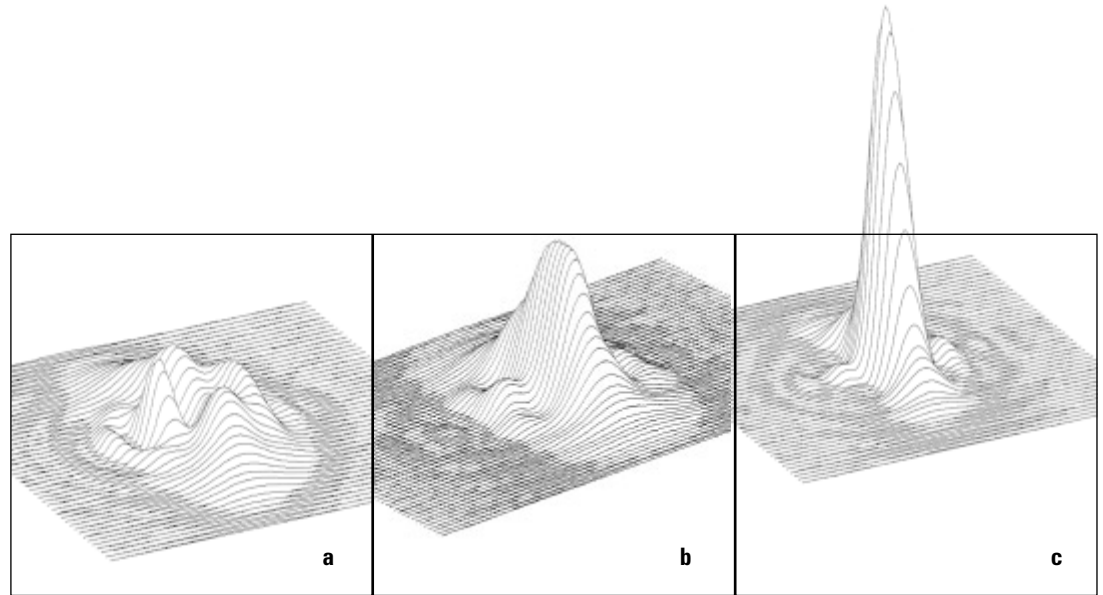


Abb. 4: Point-Spread-Function von Objektiven aus drei Entwicklungsgenerationen bei Sehfeldzahl 25. Beim NPL FLUOTAR 40/1.30 aus dem Endlichsystem geht am Sehfeldrand infolge Astigmatismus und Koma die Abbildungstreue praktisch vollständig verloren (a). Das ∞ -Objektiv PL APO 40x/1.25 zeigt im DELTA-System eine stark verbesserte Feldleistung (b). Im HCS-System weist das gleiche Objektiv eine merklich geringere Bildfeldwölbung mit erhöhtem Kontrast auf (c).

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

UV-Transmission, Eigenfluoreszenz

Wie bereits erwähnt, haben sich in der letzten Zeit die Anforderungen an die **PL APO-Objektivklasse** deutlich geändert. Vornehmlich durch neue Fluoreszenzapplikationen sind heute neben der hervorragenden Bildfeldebnung und Farbkorrektur eine hohe UV-A-Transmission bei geringer Eigenfluoreszenz zusätzlich gefordert – Anforderungen, die früher als nicht gleichzeitig erfüllbar schienen.

	UV-A- Transmission	Eigen- fluoreszenz
Glas	stark	stark
opt. Kitt	gering	stark
Entspiegelung	stark	gering

Tabelle 2: Eigenflußgrößen auf die Fluoreszenzeigenschaften der Objektive

Die neuen Freiheitsgrade beim **HCS**-System haben es wegen der günstigeren Korrekutionsverteilung im Gesamtsystem nun ermöglicht, derartige Objektive mit der für Fluoreszenz gewünschten hohen Aper-

tur und ausreichender **UV**-Transmission bei niedriger Eigenfluoreszenz zu entwickeln. Das Gesamtergebnis wird durch die drei Faktoren Glas, optische Kitten und Entspiegelung der Linsenoberflächen beeinflusst. Der Einfluß der einzelnen Faktoren auf das Gesamtergebnis ist in Tabelle 2 dargestellt.

Mit speziell entwickelten Simulationsprogrammen wurde der Einfluß der einzelnen Faktoren auf das Gesamtergebnis bestimmt und es wurden konkrete Forderungen an die Glasbeschaffenheit, die Kittspezifikation und die Eigenschaften von Entspiegelungsschichten abgeleitet. Im Verlauf der Untersuchungen sind neue Lieferstandards mit den Glasherstellern vereinbart worden. Je nach spezieller Anforderung werden bis zu drei verschiedene Kittarten in einem Objektiv verwendet. Neue breitbandige Entspiegelungsschichten mit deutlich verbesserten Eigenschaften im UV-A-Bereich wurden entwickelt und werden gezielt eingesetzt.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Anwendungsgerechte Arbeitsabstände

Gelegentlich wird bei hochaperturigen Ölimmersionsobjektiven ein vergrößerter Arbeitsabstand als besonderes Leistungsmerkmal ins Feld geführt. Ein vermeintlicher Vorteil erweist sich in der Anwendung jedoch häufig eher als Nachteil.

Ölimmersionsobjektive mit höchster Apertur erreichen ihre volle optische Leistung infolge der starken Brechzahländerung des Immersionsöls als Funktion der Temperatur nur in einem relativ engen Temperaturintervall. Wie aus Abb. 5 ersichtlich ist, stört die temperaturbedingte Brechzahländerung die Abbildung um so mehr, je dicker die Ölschicht ist. Für den anwendungssicheren Einsatz muß der Arbeitsabstand daher an die in der Praxis üblich auftretenden Temperaturintervalle angepaßt sein, d. h. Arbeitsabstände von deutlich mehr als 0.1 mm sind nicht mehr anwendungsgerecht.

ein fokussieren in tiefer liegende Präparatschichten eine bedeutende Anwendung. Von den unterschiedlichen Präparatschichten werden Schnittbilder aufgenommen und dann zu 3-D-Bildern weiter verarbeitet.

Voraussetzung für eine ungestörte Abbildung von tieferliegenden Präparatschichten ist eine sehr geringe Brechzahlabweichung von Immersionsflüssigkeit zu Präparat [7]. Hochaperturige Ölimmersionsobjektive sind hierfür nicht geeignet. Die in der Regel stark abweichende Brechzahl von Immersionsöl zu Präparat führt schon bei einer Präparatschichtdicke von 10 µm zu einer sichtbaren Leistungseinbuße.

Da die meisten biologischen Präparate eine wasserähnliche Brechzahl haben, ist Wasser die »natürliche« Immersionsflüssigkeit für diesen Anwendungsfall. Leica hat dafür spezielle Wasserimmersionsobjektive wie das **PL APO 63x/1.20 W** mit Korrekturfassung und einem Arbeitsabstand von 220 mm entwickelt.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

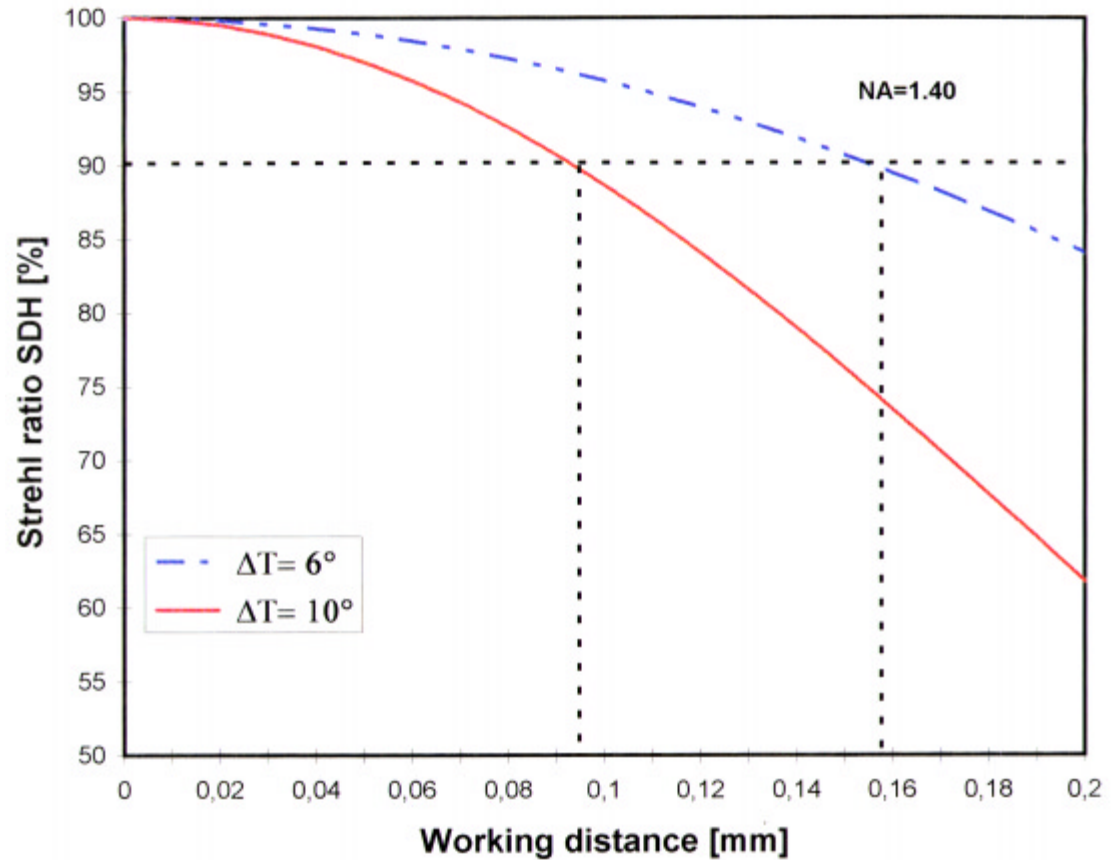


Abb. 5: Strehlsche Definitionshelligkeit SDH in Abhängigkeit von Arbeitsabstand und Temperatur des Immersionsöls. Bei Abweichung um $\Delta T = 10^\circ$ vom Sollwert sinkt bei Apertur 1.40 und Arbeitsabständen über 0,1 mm die SDH bereits unter die kontrastkritische Grenze von 90 %.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

Anwendungsgerechte Corr-Objektive

Im **HCS**-System wurden vier Objektive mit Korrekturfassung ausgestattet, um bei Spezialanwendungen mit wechselnden optischen Bedingungen im Präparatraum individuell immer wieder die vom Objektiv angebotene optische Höchstleistung erzeugen zu können. Bei der Entwicklung der Objektive fließen bestimmte Annahmen zu Dicke und Brechzahl von Deckglas und Immersionsmittel in die Korrektur ein.

Im Falle von Abweichungen tritt sphärische Aberration auf und der Kontrast leidet. Durch gezielte Abstandsänderung von Linsengruppen läßt sich dieser Fehler beheben. So können

- Abweichungen der Deckglasdicke vom Sollwert (Abb. 6),
- unterschiedliche Immersionsmittel,
- Temperaturabweichungen der Immersionsmittel,
- Brechzahleinflüsse des Präparats beim Hineinfokussieren korrigiert werden.

Das bereits bei den **CORR**-Objektiven zum Inversmikroskop **Leica DM IR** eingeführte und patentierte Korrektionsprinzip wurde auch bei diesen Objektiven verwirklicht. Im Gegensatz zu den marktgängigen Typen bleibt hier bei der Betätigung der Korrekturglieder die Bildschärfe erhalten, wodurch das Arbeiten für den Anwender sehr erleichtert wird.

HC APO L-Objektive für Elektrophysiologie

In der Elektrophysiologie werden Zellen in temperierter wässriger Lösung mit Mikromanipulatoren bearbeitet. Im Temperaturgleichgewicht werden geringste Ströme und Spannungen z. B. an Nervenzellen gemessen. Hieraus resultieren spezielle Anforderungen an die mechanische Gestaltung der Objektive (Abb. 7), wie

- schlanke Fassung mit möglichst großem Zugriffswinkel,
- inerte, kratzfeste Oberfläche im gesamten Frontbereich,

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

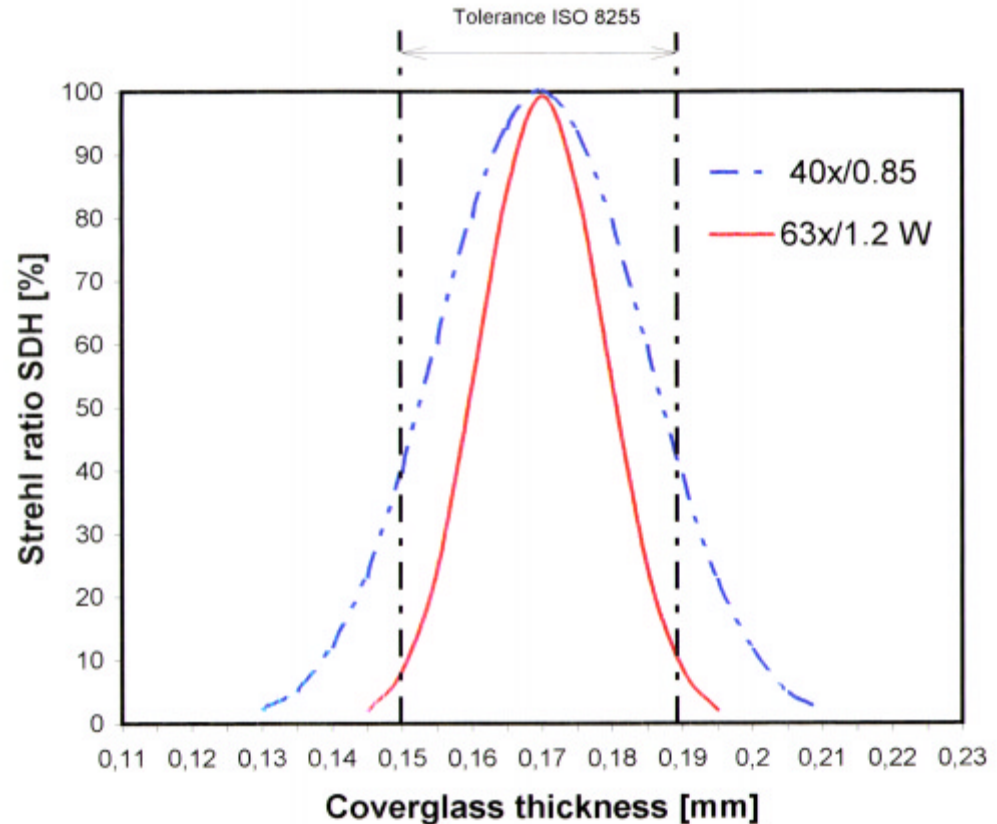


Abb. 6: Strehlsche Definitionshelligkeit in Abhängigkeit von der Deckglasdicke. Bei einer Abweichung um $\Delta = 0,01$ mm vom Sollwert sinkt die SDH bei Trocken- und Wasserimmersionsobjektiven hoher Apertur bereits unter die kontrastkritische Grenze von 90%. Standarddeckgläser nach ISO 8255-1 [6] dürfen eine höhere Toleranz besitzen. Daher werden in kritischen Fällen Korrekturfassungen erforderlich.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

- geringste Oberflächenleitfähigkeit,
- geringste Wärmeleitfähigkeit.

Besondere Anforderungen werden auch an die Optikkonstruktion gestellt. Diese sind:

- großer freier Arbeitsabstand,
- breitbandige **APO**-Korrektion von 400–1000 nm,
- **DIC** im **NIR** wegen Streulichteinflüssen in dicken Präparaten,
- hohe **UV-A**-Transmission für Fluoreszenz,
- minimale Eigenfluoreszenz,
- Tauglichkeit für Konfokalmikroskopie.

Für dieses Anwendungsfeld wurde eine Serie von Spezialobjektiven entwickelt, die den speziellen Anforderungen besonders Rechnung trägt (siehe Tabelle 1). Auch hierbei ermöglichte das **HCS**-System die gleichzeitige Beantwortung extremer, sich zum Teil widersprechender Leistungsanforderungen an die Optik.

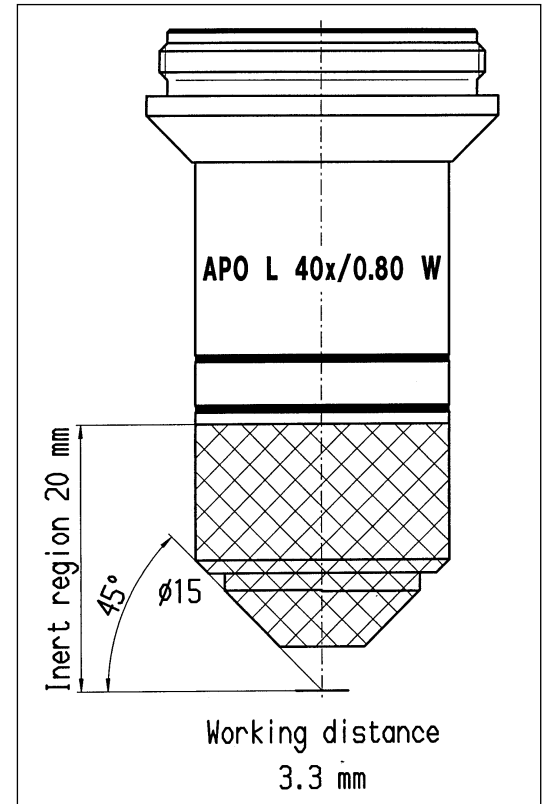


Abb. 7: Beispiel für die typische mechanische Gestaltung der APO L-Objektive. Die Objektive bieten durch ihre schlanke, spitze Fassung und den großen Arbeitsabstand ungehinderten Zugriff auf das Präparat. Der Frontbereich ist bis zur Höhe von 20 mm inert gestaltet.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

PL FLUOTAR- und N PLAN-Objektive im HCS-System

Die günstige Bildfehlerkompensation im **HCS**-System kommt nicht nur den Spitzenobjektiven der **PL APO**-Klasse zugute. Bei den **PL FLUOTAR**-Objektiven im unteren und mittleren Vergrößerungsbereich konnte hierdurch die Apertur gesteigert werden, und die Objektive 2.5x, 5x und 10x sind nun im Durch- und Auflicht universell einsetzbar. Außerdem wurde bei der Auflichtserie **BD** ein neues, leistungsstärkeres Beleuchtungskonzept für Dunkelfeld eingeführt [9].

Ein Maß für die Bildfeldebnung ist die Form der »mittleren Bildfeldschale«. Sie liegt in der Mitte zwischen sagittaler und meridionaler Bildfeldschale. Geebnet erscheinen alle Bildanteile, bei denen die mittlere Bildfeldschale nicht mehr als die optische Schärfentiefe von der Gaußschen Bildebene abweicht. Im **HCS**-System wird diese Bildfeldschale harmonisiert und geebnet. Dies führt besonders bei den **N-Plan**-

Objektiven zu einer um bis zu 20% verbesserten Bildfeldebnung. Abb. 8 zeigt die Wirkung im **HCS**-System gegenüber dem bisherigen **DELTA**-System.

HC-Okulare und TV-Adapter

In [1] wurde bereits über den Bildfehler der chromatischen Vergrößerungsdifferenz berichtet. Im Gegensatz zu den Objektiven steigt er bei den Okularen nicht linear zum Bildfeldrand hin an (»Zonenverhalten«). Ein ähnliches nicht lineares Verhalten zeigen auch die meridionalen und sagittalen Bildschalen der bisher verwendeten Okulartypen. Im Gegensatz dazu sind die entsprechenden Bildschalen der Objektive »zonenfrei«. Eine optimale Vermittlung ist bei diesem gegensätzlichen Verhalten schwierig, d. h. ein bestimmter Restastigmatismus blieb trotz geschickter Vermittlung bei großen Bildfeldern übrig. Im neuen **HCS**-System haben die Okulare einen höheren Anteil an der Wölbungskorrektur zur Entlastung der Objektive

HCS – ein Optiksystm mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

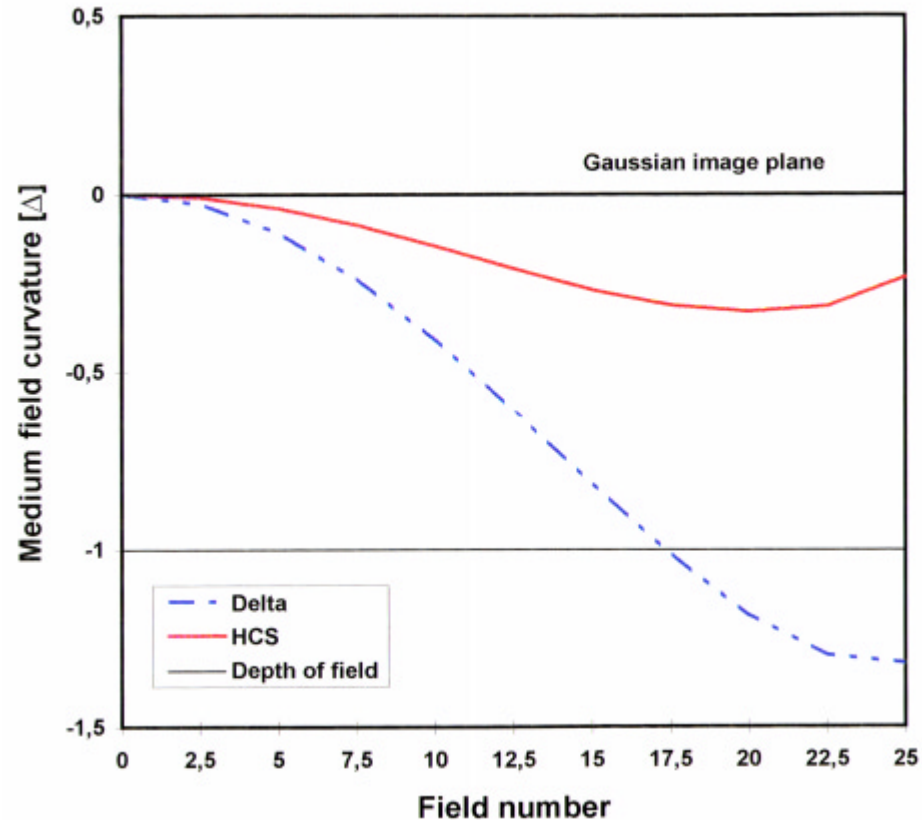


Abb. 8: Schematisch dargestellt ist für die Klasse der N PLAN-Objektive typische Form der »mittleren Bildfeldschale«, wenn diese im DELTA- bzw. HCS-System benutzt werden. Überschreitet der Abstand dieser Bildschale von der idealen Gaußschen Bildebene die Schärfentiefe 1Δ , so tritt zunehmend Unschärfe ein. Die Feldleistung der N PLAN-Objektive wird im HCS-System sichtbar gesteigert.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

übernommen. Diese neue Aufgabe führte zu komplexeren Okulartypen mit größeren Freiheitsgraden für die Korrektur der Restbildfehler wie Verzeichnung und Astigmatismus. Das Ergebnis sind die neuen **HC**-Okulare mit einer erstmals »zonenfreien« Korrektur der Bildfeldschalen. In Abb. 4 ist die deutlich verbesserte Gesamtkorrektur von Wölbung und Restastigmatismus im Vergleich dargestellt.

Für die Videomikroskopie wird heute eine große Anzahl unterschiedlichster TV-Kameras angeboten. Ein klarer Trend ist nicht eindeutig zu erkennen. Zum einen geht er bei einfachen Kameras hin zu kleineren Chipgrößen und zum anderen werden **CCD**-Digitalkameras und hochauflösende **3-CCD**-Kameras mit größeren Chips angeboten. Die sehr einseitig auf das visuelle Okular ausgerichtete bisherige Korrekutionsverteilung machte es immer schwieriger, die wechselnden Anforderungen für die unterschiedlichsten TV-Applikationen zu realisieren. Mit dem neuen **HCS**-System und der neuen mechanischen Wechsel-

fläche ist eine optimale Schnittstelle zur Darstellung heutiger und zukünftiger TV-Adaptionen geschaffen worden.

Harmonie von Abbildung und Beleuchtung

Das abbildende System des Mikroskops kann noch so leistungsstark sein, in der Anwendung erbringt es seine volle Leistung jedoch erst im Zusammenwirken mit einem System harmonisch abgestimmter Beleuchtungs- und Kontrastierkomponenten.

Für den universellen Einsatz aller Kontrastierverfahren wurde auch hier mit dem **DELTA**-System 1992 bereits ein entscheidender Schritt in die Zukunft vollzogen.

Doch die Innovation kann auch vor der Beleuchtung nicht Halt machen, denn spezifischer werdende Fluoreszenzanwendungen und neue Fluorochrome erhöhen den Anspruch an Lichtintensität und Spek-

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft (Fortsetzung)

von K.-H. Schade et al.

tralbereich, und die zunehmende Bedeutung digitaler Bildaufzeichnung und Bildverarbeitung stellt eine weitere Herausforderung an die Homogenität der Ausleuchtung dar. Über die im **HCS**-System erzielten Fortschritte wird an anderer Stelle dieser Ausgabe berichtet [8, 9].

Zusammenfassung

Mit dem **HCS**-System setzt **Leica** die Tradition in der Innovation und Entwicklung hochwertiger Spitzenoptik fort.

Das technische Konzept baut auf den seit Einführung der **DELTA**-Optik bewährten optischen und mechanischen Anschlußmaßen für Abgleichlänge, Objektivgewinde und Bezugsbrennweite auf. Es beinhaltet eine Harmonisierung der optischen Korrektionswirkung zwischen den beteiligten Systemkomponenten. Hierdurch wurde es möglich, unter Beibehaltung der Universalität des Optiksystems Optiken zu entwickeln, die zusätzlich zur

klassischen Abbildungsleistung spezifische neue Applikationsforderungen z. B. der Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie oder der Elektrophysiologie erfüllen.

Die **Leica-Mikroskop-Optik** ist mit dem **HCS**-System für die weiteren Herausforderungen der Zukunft gerüstet

Literatur

- [1] **Euteneuer, P., Müller-Rentz, A. u. Schade, K.-H.:** Delta – das neue Mikroskop-Optiksystem von Leica, Mitt. f. Wiss. u. Techn. Bd. X, Nr. 4, S. 114–122, 1992.
- [2] **Haferkamp, H.:** Optik, Verl. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1994.
- [3] **Metz, C.:** Neue Okulare zur Ebnung der Gesichtsfelder der Apochromate, Z. f. wiss. Mikr. u. f. mikr. Techn. 37, S. 49–52, 1920.

HCS – ein Optiksystem mit Zukunft

von K.-H. Schade et al.

[4] **Schade, K.-H. u. Klein, W.:** Unendlich-Optik, was bringt sie?; Leitz – Mitt. f. Wiss. u. Techn., Bd. 6, Nr. 5, S. 185–191, 1975.

[5] **Beyer, H.:** Handbuch der Mikroskopie, VEB Verlag Technik Berlin, 1973, S. 91.

[6] **ISO 8255/1 – 1986:** Optics and optical instruments – Microscopes – Cover classes – Part 1: Dimensional tolerances, thickness, and optical properties, First edition – 1986-09-01.

[7] **Hell, S., Reiner, G., Cremer C., Stelzer, E. H. K.:** Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index, J. Microsc., Vol. 169, S. 391–405, 1991.

[8] **Krüger, R.:** Kontrastverfahren des neuen Mikroskop-Systems DM R HCS, Mitt. f. Wiss. u. Techn., Ausgabe **CDR 1**, August 1998, S.27–39.

[9] **Schönenborn, J.:** Die Beleuchtungsoptik im neuen Mikroskop Leica DM R HCS, Mitt. f. Wiss. u. Techn., Ausgabe **CDR 1**, August 1998, S. 40–50.

[10] **Schade, K.-H.:** Lichtmikroskopie: Technologie und Anwendung, Landsberg/Lech; Verl. Moderne Industrie, 1993 (Die Bibliothek der Technik; Bd. 82).

Anschrift der Verfasser (Korrespondenz-anschrift):

Dipl.-Phys. K.-H. Schade, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Bereich Entwicklung und Technologieplanung, Postfach 2040, D-35530 Wetzlar