

Erteilt auf Grund des Ersten Überleitungsgesetzes vom 8. Juli 1949

(WIGBL S. 175)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



AUSGEGEBEN AM  
15. NOVEMBER 1951

DEUTSCHES PATENTAMT

# PATENTSCHRIFT

Nr. 821 128

KLASSE 42h GRUPPE 610

*p 52090 IX a / 42 h D*

Hermann Heine, Wetzlar  
ist als Erfinder genannt worden

Ernst Leitz G. m. b. H., Wetzlar

## Verfahren und Einrichtung zur Erzeugung eines Phasenkontrastes

Patentiert im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland vom 16. August 1949 an

Patenterteilung bekanntgemacht am 27. September 1951

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und die zugehörigen Einrichtungen zur Erzeugung eines Phasenkontrastes insbesondere bei der Abbildung mikroskopischer Objekte.

5 Man kennt zwei Methoden, um unter Phasenkontrast zu beobachten; die eine ist in der deutschen Patentschrift 636 168 und in dem Aufsatz von F. Zernike, »Physica I«, (1934), S. 689 bis 704 dargestellt, die andere in »Journal of the Optical Society of America 37« (1947), S. 726 bis 730 von H. Osterberg beschrieben. Es ist außerdem aus der Technik der Schlierenverfahren bekannt, das Beugungsbild einer punktförmigen oder nahezu punktförmigen Lichtquelle teilweise durch eine  
15 Schneide abzublenden, um auf diese Weise Inhomogenitäten eines Objekts oder Unebenheiten einer Spiegelfläche sichtbar zu machen (vgl. auch den obengenannten Aufsatz von Zernike).

Bei der erstgenannten Methode wird in der Aus-

trittspupille eines jeden zur Verwendung kommenden Objektivs eine Phasenplatte angebracht, die mit einer ringförmigen, die Phase verändernden Schicht versehen ist und nach Lage und Breite zu einer ebenfalls ringförmigen, im Kondensator des Mikroskops befindlichen Öffnungsblende konjugiert ist. Die Phasenplatte hat den Zweck, den Phasenunterschied zwischen den beleuchtenden und den im Objekt abgebeugten Strahlen zu verändern.

Bei der zweiten Methode, die unter dem Namen Polanretverfahren bekanntgeworden ist, wird der Phasenunterschied durch polarisierende Hilfsmittel erzeugt.

Durch eine besondere Ausbildung der Phasenplatte bzw. der polarisierenden Hilfsmittel kann man außer der Phasenänderung noch eine Lichtschwächung der beleuchtenden Strahlenbündel in der Austrittspupille des Objektivs herbeiführen.

Durch den Eingriff, z. B. durch die Phasenplatte

nach Zernike oder die Platte nach Osterberg wird bekanntlich die nicht absorbierende Struktur des Objekts als Phasenkontrastbild sichtbar gemacht.

5 Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird dieser Erfolg erreicht ohne die erwähnten Hilfsmittel. Es hat ferner den Vorteil, daß man durch  
10 einfaches Hoch- und Tiefstellen des Kondensors von der gewöhnlichen Hellfeldbeobachtung zur Phasenkontrastbeobachtung und dann zur Dunkel-  
feldbeobachtung übergehen kann, so daß die drei Beobachtungsarten unter ständiger Fixierung des  
15 Objektes ausgeübt werden können. Auch entfällt bei Auswechslung des Objektivs das bei Verwendung einer Phasenplatte erforderliche Auswechseln der  
Kondensorblende und deren Zentrierung; es genügt vielmehr, den Kondensor der Höhe nach einzu-  
stellen.

20 Das Beobachtungsverfahren nach der Erfindung besteht darin, daß man in der Austrittspupille eines das Objekt abbildenden Objektivs ein durch Diffraktion an der engsten Strahlenbegrenzung deutlich  
verbreitertes Beugungsbild einer schmalen, ringförmigen Beleuchtungsbasis erzeugt und die das-  
25 selbe aufbauenden Lichtwellen zur Bildung des Phasenkontrastbildes mit Hilfe von solchen Einrichtungen beeinflusst, die in üblichen Abbildungs-  
systemen bereits vorkommen. Die Forderung, daß die Breite des Ringbildes in der Austrittspupille im  
30 wesentlichen durch die Diffraktion bestimmt ist, setzt voraus, daß erstens die Beleuchtungsbasis genügend schmal ist und daß zweitens die geometri-  
schen Aberrationen bei der Abbildung der Beleuchtungsbasis in die Austrittspupille genügend klein  
35 sind.

Die zur Beeinflussung erforderlichen Mittel bestehen entweder in einer ringförmigen und zentrierten  
teilweisen Ablendung des durch die Beugung verbreiterten Bildes der Beleuchtungsbasis oder in  
40 der Änderung seiner Phase in der Weise, daß das Beugungsbild auf diejenige Zone der Austrittspupille des Objektivs gebracht wird, welche die ge-  
wünschte Phasenverzögerung bewirkt. Man kann auch bei Verwendung eines Mikroskopobjektivs mit  
45 Korrektionsfassung die Wellenfläche so verändern, daß in der benutzten Zone infolge der Aberrationen die erforderliche Phasenbeeinflussung entsteht.

Zur Schaffung einer schmalen, ringförmigen Beleuchtungsbasis bedient man sich entweder eines  
50 ringförmigen Glühfadens oder beispielsweise eines Kondensors, der unten näher beschrieben ist. Man kann auch den in der amerikanischen Patentschrift  
2 130 494 beschriebenen Auflichtkondensor verwenden, falls man ihn als Durchlichtkondensor unter-  
55 halb des Objekts anordnet. Bei diesem bekannten Kondensor sind die reflektierenden Flächen so ge-  
krümmt, daß sie in seiner Austrittsfläche ein einfallendes paralleles Lichtbündel zu einer ringförmigen  
60 Brennlinie konzentrieren, während bei sonst bekannten Dunkelfeldkondensoren das Lichtbündel im Objekt konzentriert wird.

Für den Fall der Anwendung von Immersionsobjektiven wird zwischen den Kondensor und den

Objektträger eine plankonvexe Sammellinse eingefügt, deren plane Seite mit dem Objektträger  
65 durch eine Immersionsflüssigkeit verbunden wird. Diese Zwischenlinse darf an der Höheneinstellung des Kondensors nicht teilnehmen.

In dem Aufsatz in der »Zeitschrift für Technische Physik«, 16, S. 454 bis 457 (1935) hat Zernike  
70 ausgeführt, daß das Schneidenverfahren Bilder ergibt, die der Struktur des beobachteten Objekts unähnlich sind. Daß durch die ringförmige Schneidenanordnung nicht bestimmte Richtungen im Bild  
ausgezeichnet sind wie bei dem punktförmigen  
75 Schneidenverfahren, folgt aus der Rotations-symmetrie der Anordnung. Darüber hinaus enthält aber die Erfindung die neue Erkenntnis, daß bei  
Verwendung der ringförmigen Schneidenanordnung die Hell-Dunkel-Verteilung im Bild diejenige eines  
80 Phasenkontrastbildes ist. Der Phasenkontrast ist positiv oder negativ, je nachdem das Beugungsbild der Beleuchtungsbasis von innen oder von außen  
abgeblendet wird.

In der Zeichnung sind zur Ausübung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignete Einrichtungen  
85 beispielsweise dargestellt, und zwar zeigt

Fig. 1 ein Mikroskop mit der erfindungsgemäßen Einrichtung, teilweise im Schnitt, den Tubus unter-  
brochen,  
90

Fig. 2 bis 6 den Kondensor aus Fig. 1 in verschiedenen Gebrauchsstellungen.

Das Mikroskop üblicher Bauart besteht aus dem nur teilweise gezeigten Fuß 1, dem ebenfalls nur  
teilweise gezeigten Oberteil 2 mit Scharfstellvorrichtung 3, Tubus 4, Objektisch 5 und Beleuch-  
95 tungsapparat 6. Letzterer kann insgesamt mittels Zahntrieb 7, 8 in der Höhe eingestellt werden. Über dem Spiegel 9 ist die aus der Kollektorlinse 10 und dem  
Kondensor 11 bestehende Beleuchtungsoptik  
100 angeordnet. Der Kondensor 11 ist in seiner Fassung 12 mittels Zahntrieb 13, 13<sup>a</sup> gegenüber der Kollektorlinse 10 in Richtung der optischen Achse  
verstellbar. Der Kondensor 11 kann außerdem durch die in Fig. 1 a dargestellte Linse 11<sup>a</sup> ergänzt werden,  
105 wie in Fig. 3 zu sehen. Auf dem Tisch 5 befindet sich der Objektträger 15 und darüber im Arbeits-  
abstand von den am Revolver 16 sitzenden Objektiv-  
110 jektiven 17 und 18 das Objektiv 17. Am oberen Ende des Tubus 4 ist das Okular 19 eingeschoben. Das Objektiv 17 besteht im wesentlichen aus drei  
Linsengruppen 17<sup>a</sup>, 17<sup>b</sup>, 17<sup>c</sup> und der in der hinteren Brennebene liegenden Austrittspupille 17<sup>d</sup>. Mit 17<sup>e</sup>  
ist eine Blende bezeichnet.

Die für die Aufhellung des Objekts 15 bestimmten  
115 Beleuchtungsstrahlen werden über den Spiegel 9 der Kollektorlinse 10 zugeführt, die dieselben leicht konvergierend zum Kondensor 11 weiterleitet. Die  
aus dem Kondensor austretenden Strahlen hellen dann das Objekt 15 auf, das durch Objektiv 17 und  
120 Okular 19 abgebildet wird.

In den Fig. 2 bis 6 ist der Kondensor 11 in verschiedenen Anwendungen dargestellt, und zwar in  
den Fig. 2, 4, 6 mit demselben Objektiv 17, das eine  
125 mittlere Brennweite haben möge, in der Fig. 3 mit einem kurzbrennweitigen Immersionsobjektiv und

in der Fig. 5 mit einem schwachen, langbrennweiten Objektiv 18. Diese drei Objektive sind jeweils nur durch ihre Frontlinse 17<sup>a</sup>, 25<sup>a</sup> und 18<sup>a</sup> angedeutet, weil der Objektivaufbau an sich bekannt, und die Lage des Beugungsbildes der Basis zur Austrittspupille eines jeden Objektivs der Darstellung in Fig. 1 analog ist.

Der Kondensor 11 ist dem Aufbau nach ein bekannter Dunkelfeldkondensator. Seine Abmessungen sind jedoch kleiner als die der meist gebräuchlichen Kondensoren, so daß seine ringförmige Austrittsfläche 21 vollständig in der Austrittspupille des Objektivs abgebildet wird, wenn der Kondensor sich in der Stellung (Fig. 4) für Phasenkontrast befindet.

Wenn in der Eintrittsfläche 20 des Kondensors ein Gemisch von Strahlen verschiedener Richtungen eintritt, so wird ein Teil dieser Strahlen zurückreflektiert oder absorbiert, die anderen Strahlen verlassen den Kondensor in zwei voneinander getrennten Bündeln, deren eines, das in Fig. 2 mit 22 bezeichnet ist, zur Dunkelfeldbeleuchtung dient, während das Bündel 23 je nach der Höhenstellung des Kondensors zur Phasenkontrastbeleuchtung oder zur Hellfeldbeleuchtung dient.

In Fig. 2 ist dargestellt, daß das zur Dunkelfeldbeleuchtung dienende Bündel 22 innerhalb des Kondensors zweimal reflektiert und im Objekt 15 konzentriert wird. Die Fig. 3 bis 6 zeigen, daß das andere Bündel 23 durch dreimalige Reflexion entsteht und in der ringförmigen Beleuchtungsbasis konzentriert wird. Dieses Bündel verläßt den Kondensor in allen Höhenlagen des Kondensors divergent und in demselben Öffnungswinkel. Damit dieses Bündel voll zur Wirkung kommt, sind, wie in den Figuren durch dickere Linien dargestellt, die Flächen an den das zweite Bündel reflektierenden Stellen verspiegelt mit Ausnahme der Eintrittsfläche 20.

In der dem Objekt 15 nahen Stellung des Kondensors 11, entsprechend der Fig. 2, kommt nur das Strahlenbündel 22 zur Wirkung, so daß das Objekt 15 im Dunkelfeld gesehen wird. Senkt man nun den Kondensor 11 durch Drehen am Trieb 13 etwa in die Stellung nach Fig. 4 ab, so wird das Objekt 15 von dem Büschel 23 beleuchtet, aus dem die Frontlinse 17<sup>a</sup> den Bereich 23<sup>a</sup> aufnimmt, der in der Figur schraffiert ist. Es ist dies das Büschel, das in der Austrittspupille 17<sup>d</sup> des Objektivs 17 das Bild der Beleuchtungsbasis 24 in der zur Erzeugung des Phasenkontrastes richtigen Lage entwirft.

Senkt man den Kondensor 11 noch weiter ab, und zwar in die Stellung der Fig. 6, so wird ein anderer Bereich 23<sup>b</sup> des Büschels 23 von der Frontlinse 17<sup>a</sup> aufgenommen, wodurch das Bild der Basis vom Rand der Austrittspupille 17<sup>d</sup> nach innen wegrückt, so daß ein reines Hellfeldbild entsteht.

In der Fig. 3 wird gezeigt, daß das Phasenkontrastverfahren mit dem gleichen Kondensator 11 auch bei Immersionsobjektiven ausgeübt werden kann, wenn man die Linse 11<sup>a</sup> vorschaltet und diese mit dem Objektträger 14 durch eine Immersionsflüssigkeit verbindet. Der Kondensator 11 muß dann gegenüber der Stellung in Fig. 4 angehoben werden.

Aus dem gesamten Büschel wird der Bereich 23<sup>c</sup> von der Frontlinse 25<sup>a</sup> aufgenommen, wodurch dann ebenfalls das Bild der Basis 24 in der richtigen Lage zur Austrittspupille dieses Objektivs hervorerufen wird.

Schließlich zeigt die Fig. 5, daß nach Einschalten des schwach vergrößernden Objektivs 18 der Kondensator 11 sehr stark abgesenkt werden muß, um das Bild der Basis in die richtige Lage zur Austrittspupille des Objektivs 18 zu bringen. Von der Frontlinse wird dann der Bereich 23<sup>e</sup> aufgenommen.

Durch entsprechende Höheneinstellung des Kondensators 11 können auch mit den Objektiven der Fig. 3 und 5 Dunkelfeld- und reine Hellfeldbeobachtungen vorgenommen werden. Lediglich zur Übersichtlichkeit der Darstellung sind die entsprechenden Einstellungen des Kondensors nicht abgebildet.

#### PATENTANSPRÜCHE:

1. Optisches Beobachtungsverfahren mit Phasenkontrast insbesondere für mikroskopische Beobachtungen, dadurch gekennzeichnet, daß man in der Austrittspupille eines das Objekt abbildenden Objektivs ein durch Diffraktion an der engsten Strahlenbegrenzung deutlich verbreitertes Beugungsbild einer hierzu genügend schmalen ringförmigen Beleuchtungsbasis erzeugt und die dasselbe aufbauenden Lichtwellen zur Bildung des Phasenkontrastbildes mit solchen Einrichtungen beeinflusst, die in gewöhnlichen, für Phasenkontrast nicht vorgesehenen Mikroskopen vorkommen, wie z. B. mit einer Aperturblende oder einer Korrektionsfassung.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man auf die seitliche Ausdehnung dieses Bildes durch eine ringförmige, teilweise Abblendung einwirkt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zone des Objektivs, in der das Bild der Beleuchtungsbasis liegt, mit an sich bekannten Mitteln in ihrem Korrektionszustand relativ zu den anderen Zonen des Objektivs derart beeinflusst wird, daß die Verbiegung der Wellenfläche in der Zone des Bildes der Basis sich gegenüber der mittleren Verbiegung in den anderen Zonen um einen für den Phasenkontrast geeigneten Wert unterscheidet.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf das Bild der Beleuchtungsbasis gleichzeitig mit den Mitteln nach Anspruch 2 und 3 eingewirkt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß durch eine Verschiebung des Kondensors längs der Mikroskopachse das Bild der Beleuchtungsbasis auf diejenige Zone des Objektivs gebracht wird, welche die jeweils gewünschte Phasenverzögerung bewirkt.
6. Einrichtung zur Ausübung des Verfahrens

nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektiv in seiner Austrittspupille mit einer Irisblende ausgestattet ist.

5 7. Einrichtung zur Ausübung des Verfahrens nach Anspruch 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektiv in seiner Austrittspupille eine feste Ringblende besitzt, die eine Zone des Objektivs abdeckt.

10 8. Einrichtung nach den Ansprüchen 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß bei Verwendung eines Objektivs, dessen eine Zone durch eine feste Ringblende in der Austrittspupille abgeblendet wird, in der Austrittspupille zugleich eine Irisblende angeordnet ist.

15 9. Einrichtung zur Ausübung des Verfahrens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektiv mit einer sogenannten Korrektionsfassung ausgestattet ist, welche den erforderlichen Korrektionszustand des Objektivs herbeizuführen gestattet.

20 10. Einrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Intensität des Bildes der Beleuchtungsbasis durch absorbierende Mittel beeinflußt ist.

25 11. Einrichtung zur Ausübung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Kondensator verwendet ist, der mindestens eine reflektierende Rotationsfläche und eine Strahleneintrittsfläche aufweist, die in den Kondensator eintretende Strahlen der-

art reflektieren, daß sie aus einer schmalen, ringförmigen Beleuchtungsbasis heraus dem Objekt und dem Objektiv zugeführt werden.

12. Kombination des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 mit bekannten Mikro- 35 skopierverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß der Kondensator in Richtung der Mikroskopachse in einem solchen Umfange verschoben wird, daß bei Entfernung des Kondensators vom Objekt eine Beobachtung des Objekts nacheinander im 40 Dunkelfeld, dann im Phasenkontrast und schließlich im Hellfeld erfolgt.

13. Einrichtung zur Ausübung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und 12 unter Benutzung der Einrichtungen nach einem der 45 Ansprüche 6 bis 11 in Verbindung mit einem Immersionsobjektiv, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem Kondensator und dem Objektträger eine Linse einschaltbar ist, die mit dem Objektträger durch eine Immersionsflüssigkeit 50 verbunden wird und an der Verschiebung des Kondensators gemäß Anspruch 5 oder 12 nicht teilnimmt.

14. Einrichtung zur Ausübung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, 12 und 13, 55 dadurch gekennzeichnet, daß zwischen Kondensator und Lichtquelle eine Kollektorlinse eingeschaltet ist, die dem Kondensator die beleuchtenden Strahlen der erforderlichen Neigung 60 zugeführt.

Hierzu 1 Blatt Zeichnungen

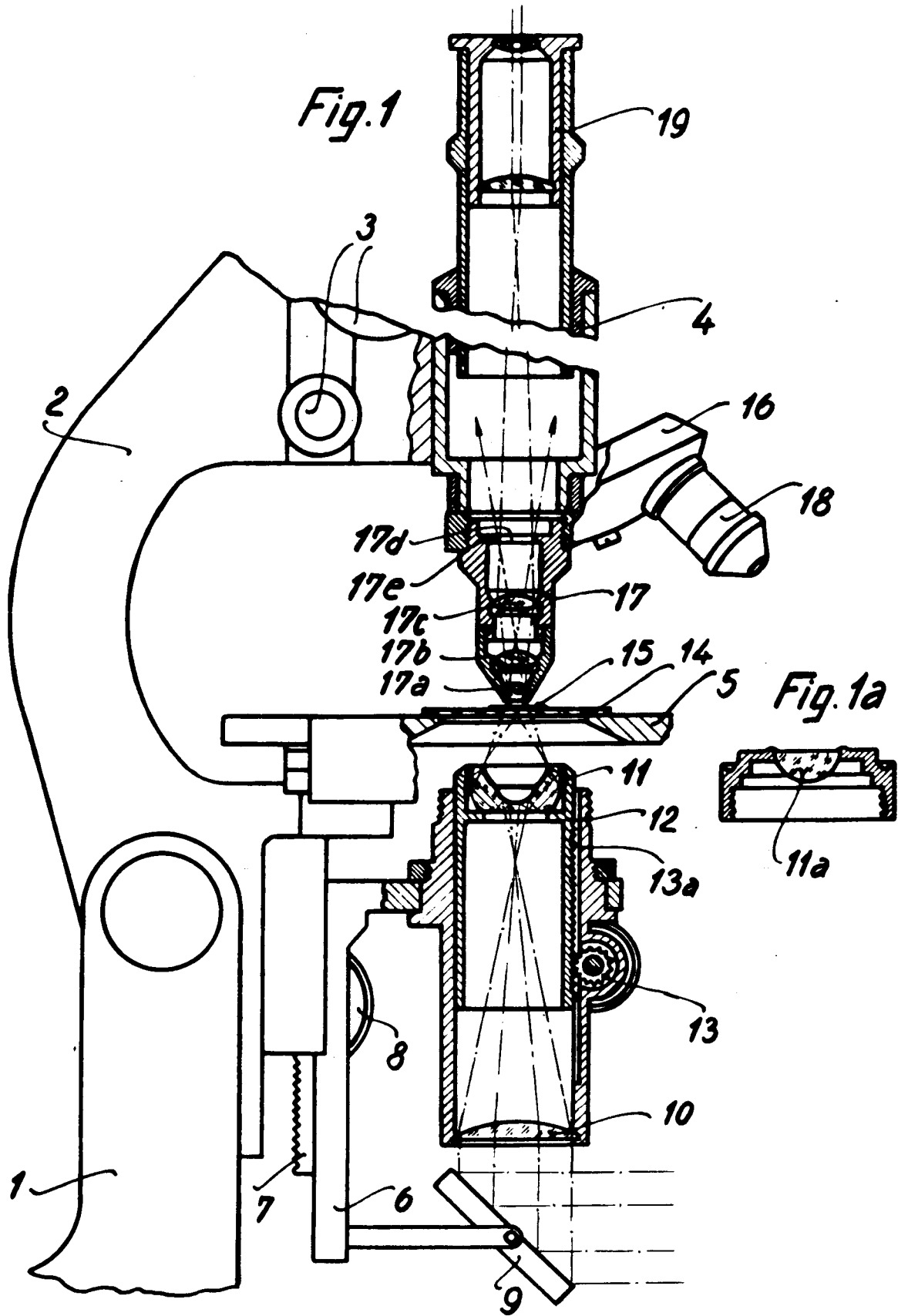


Fig. 2

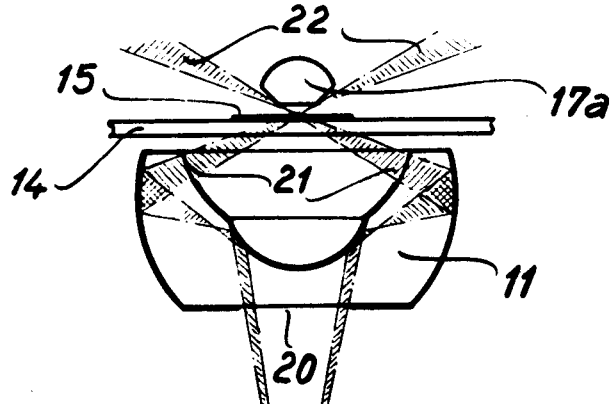


Fig. 3

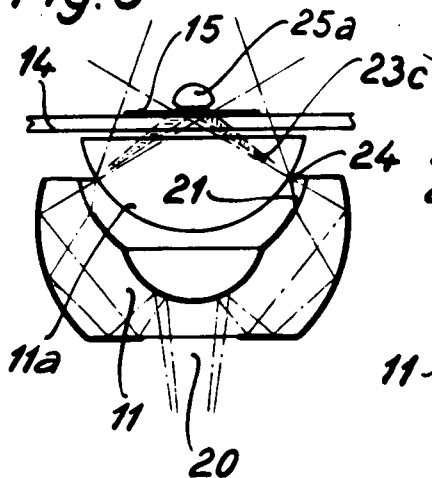


Fig. 4

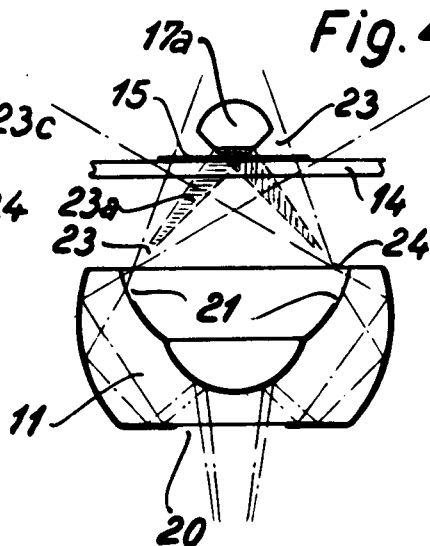


Fig. 5

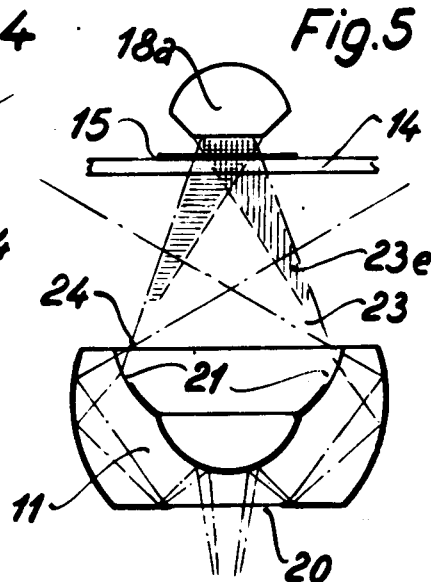


Fig. 6

