

Bestimmung der Vergrößerung zweier Mikroskope

Bitte zur Versuchsdurchführung einen USB-Stick mitbringen.

Stichworte zur Vorbereitung:

Grundwissen: Lichtbrechung und Lichtbeugung, Abbildungsgleichung für Linsen, Interferenz, reelle und virtuelle Bildkonstruktion, Abbildungsmaßstab, Vergrößerung, Auflösungsvermögen, Sehwinkel, Lupe, numerische Apertur

Weiterführend: Köhlersche Beleuchtung, Abbesche Theorie der Bildentstehung, förderliche und leere Vergrößerung

1 Grundlagen

1.1 Allgemeines

Die Aufgabe eines Mikroskops ist es, dem Auge ein ohne Instrument nicht wahrnehmbares Objekt in der deutlichen Schweite s_0 stark vergrößert darzubieten. Ein Mikroskop besteht im Prinzip aus zwei Sammellinsen, dem Objektiv L_1 und dem Okular L_2 . Der Abstand der beiden Linsensysteme ist wesentlicher größer als die Summe der einzelnen Brennweiten f_1 und f_2 .

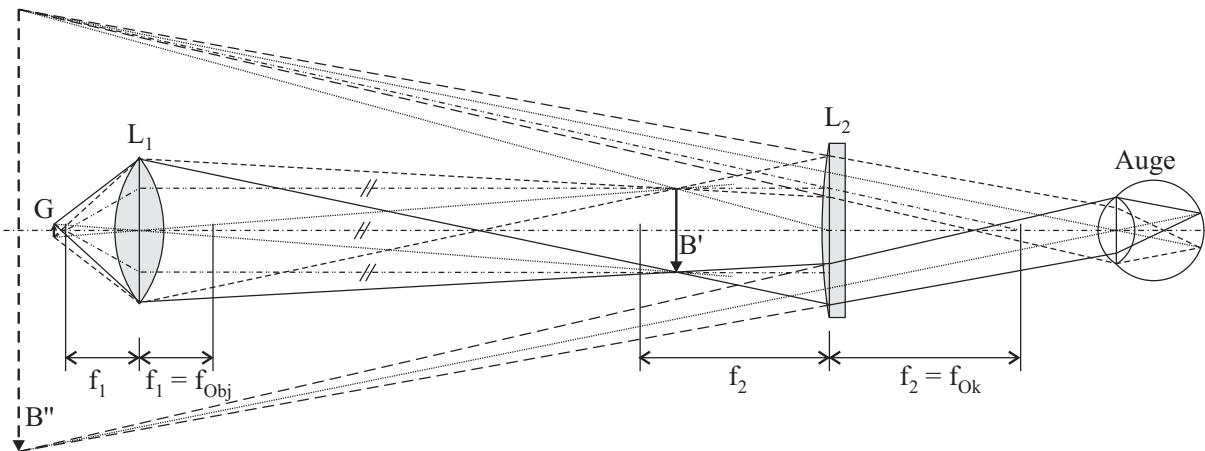


Abbildung 1: Prinzipieller Strahlengang durch das Mikroskop.

Der zu betrachtende Gegenstand G liegt dicht vor dem vorderen Objektivbrennpunkt F_1 . Das Objektiv erzeugt ein reelles, umgekehrtes Bild B' innerhalb der vorderen Brennweite des Okulars L_2 , das somit als Lupe von B' ein nochmals vergrößertes virtuelles Bild B'' erzeugt. Das Auge sieht daher in der deutlichen Schweite s_0 ein umgekehrtes, virtuelles, stark vergrößertes Bild des Gegenstandes G.

1.2 Vergrößerung

Die Vergrößerung ist definiert als das Verhältnis des Sehwinkels mit Instrument, zum Sehwinkel ohne Instrument. Für die Gesamtvergrößerung des Mikroskops gilt:

$$V_{\text{ges}} = \frac{\tan \psi}{\tan \varphi} \quad (1)$$

mit ψ dem Sehwinkel mit Instrument, φ dem Sehwinkel ohne Instrument. Für kleine Winkel gilt:

$$\alpha \ll 1 \rightarrow \alpha \approx \tan \alpha \quad (2)$$

Aus Abb. 2 folgt ebenfalls:

$$\tan \varphi = \frac{G}{s_0} \quad \text{und} \quad \tan \psi = \frac{\overline{CO_2}}{\overline{O_2A}} \quad (3)$$

Daraus, und aus der Anwendung der Abbildungsgleichung ergibt sich:

$$V_{\text{ges}} = \frac{s_0}{G} \cdot \frac{\overline{CO_2}}{\overline{O_2A}} = \frac{\overline{CO_2}}{G} \cdot \frac{s_0}{\overline{O_2A}} = \frac{t}{f_1} \cdot \frac{s_0}{f_2} \quad (4)$$

t ist die optische Tubuslänge. Sie ist definiert als Abstand zwischen bildseitigem Brennpunkt der Objektivlinse und dem gegenstandsseitigen Brennpunkt der Okularlinse.

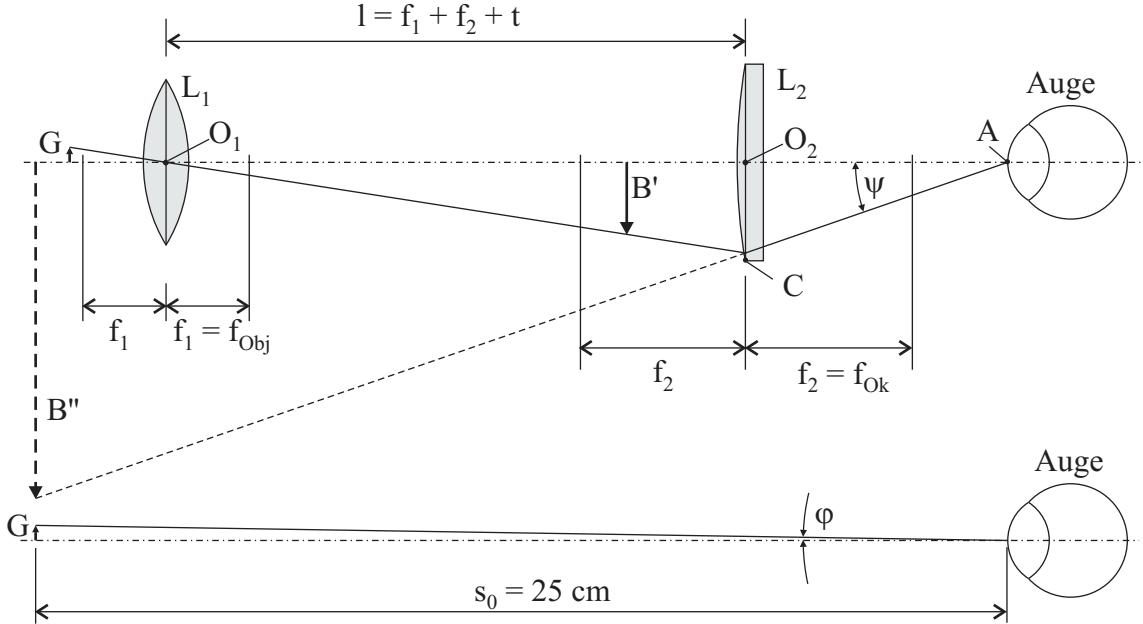


Abbildung 2: Strahlengangsschema im Mikroskop.

Der Term $\frac{f_1 f_2}{t}$ ist die resultierende vordere Gesamtbrennweite (s. [2] S. 79). Damit kann man auch schreiben:

$$V_{\text{ges}} = \frac{s_0}{f_{\text{ges}}} \quad (5)$$

Somit lässt sich das Mikroskop auch als eine Lupe mit einer Gesamtbrennweite f_{ges} auffassen. Jedoch müsste die Gesamtbrennweite entsprechend klein gemacht werden, um eine ausreichende Vergrößerung zu erhalten. Dies lässt sich technisch jedoch nicht mit einer Einzellinse verwirklichen (warum?). Der Gegenstand befindet sich bei dieser Auffassung innerhalb von f_{ges} .

Die Gesamtvergrößerung lässt sich, wie in Gl. (4) bereits gezeigt, in folgender Form anschreiben:

$$V_{\text{ges}} = \frac{t}{f_1} \cdot \frac{s_0}{f_2}$$

wobei die einzelnen Terme einfache Bedeutungen haben:

$$\begin{aligned} V_{\text{Objektiv}} &= \frac{t}{f_1} \quad \text{und} \\ V_{\text{Okular}} &= \frac{s_0}{f_2} \quad \text{ergeben wieder} \\ V_{\text{ges}} &= V_{\text{Obj}} \cdot V_{\text{Ok}} \end{aligned} \tag{6}$$

Wenn man die Gesamtvergrößerung und die Okularvergrößerung durch Messungen bestimmt, kann man daraus die Objektivvergrößerung sowie die optische Tubuslänge berechnen. Ebenso können die Gesamtbrennweite und die Brennweiten der beiden Linsen errechnet werden.

1.3 Ausführung der Objektive

Wie aus Abb. 1 zu erkennen ist, erfolgt die Abbildung des Objektes durch ein weit geöffnetes Strahlenbündel. Daher müssen die Objektive für die gewünschten kleinen Brennweiten aus mehreren Linsen zusammengesetzt sein, um die Abbildungsfehler so gering wie möglich zu halten. Zur Kennzeichnung der Objektive sind die (bildseitige) Brennweite und die numerische Apertur eingraviert. Die Brennweite gibt in Zusammenhang mit der optischen Tubuslänge die Objektivvergrößerung. Die numerische Apertur ist ein Maß für den Öffnungswinkel des in das Objektiv eintretenden Lichtbündels, und hängt somit vom Durchmesser des Objektivs ab. Sie ist somit auch für das Auflösungsvermögen maßgebend.

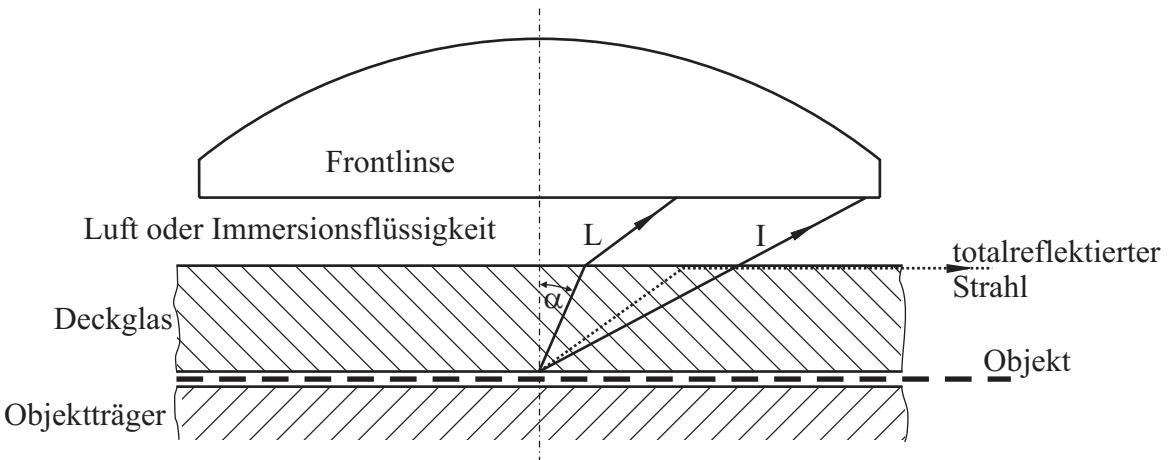


Abbildung 3: Objektiv und Objektträger mit Deckglas.

Die Beziehung für die numerische Apertur lautet:

$$A = n \sin \alpha \tag{7}$$

wobei mit n der Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv gemeint ist. α ist der im Deckglas des Objektes maximal gegen das Lot meßbare Winkel eines am Objekt gebeugten Lichtstrahls, der gerade noch in die Objektivöffnung eintreten kann. Er ist einerseits begrenzt durch die an der Grenzschicht zwischen Deckglas und Luft (oder Medium) auftretenden Totalreflexion, andererseits durch den Durchmesser des Objektivs.

Der Grenzwinkel der Totalreflexion ist für den Übergang Deckglas–Luft 41.5° . Mit diesem Winkel wird die Apertur 1. Da das Objektiv aber eine endliche Ausdehnung besitzt, erreicht man nur etwa einen Wert von ca. 0.95. In sogenannten Immersionssystemen, in denen als Medium Wasser oder z.B. Zedernholzöl verwendet werden, erreicht man Aperturen bis zu einem Wert von 1.42. Im letzten Fall tritt, da Zedernholzöl einen Brechungsindex von $n = 1.515$ besitzt, keine Totalreflexion am Deckglas auf.

1.4 Okulare

Sie sind zum Ausgleich von Abbildungsfehlern (Farbfehler und sphärische Aberration) aus mehreren, meist aus zwei Linsen aufgebaut. Das am öftesten verwendete Okular ist aus zwei plan-konvexen Linsen aufgebaut, und heißt Huygens'sches Okular.

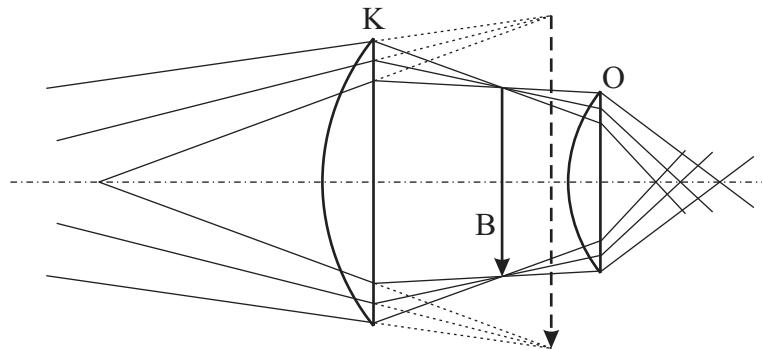


Abbildung 4: Huygens'sches Okular.

Die vordere, sogenannte Kollektivlinse K fängt das Bild bereits auf, bevor es sich zum, vom Objektiv erzeugten reellen Zwischenbild, vereinigt. Dadurch wird das konvergente Strahlbündel etwas divergent gemacht. Die Augenlinse O wirkt als Lupe, mit der man das reelle Bild an der Stelle B betrachten kann. An der Stelle B lässt sich ein Okularmikrometer anbringen, welches man zusammen mit dem Objekt scharf sehen kann. Um das Okular an das jeweilige Auge des Betrachters anzupassen, ist die Augenlinse O in einer verstellbaren Gewindebüchse gehaltert.

1.5 Auflösungsvermögen

Abbe untersuchte den Fall eines durchstrahlten Objektes, das sehr feine Strukturen aufweist, die mit einem Mikroskop untersucht werden sollen. Als Modell eines solchen Objektes dient ein Strichgitter, ähnlich dem verwendeten Objektmaßstab.

Das von der Beleuchtungseinrichtung auf das Objekt fallende Licht (Parallelstrahlbündel) wird am Objekt gebeugt. Wäre das Objekt (Strichgitter) nicht vorhanden, würde das Objektiv in seiner Brennebene ein Bild der Lichtquelle L erzeugen. Da aber das Objekt vorhanden ist und durchleuchtet wird, entstehen außer diesem Zentralbild auch die abgebeugten, spektral zerlegten Bilder der Lichtquelle in mehreren Ordnungen. Die spektral zerlegten Bilder interessieren aber nicht, da man eine getreue Abbildung des Objektes erhalten will. Dieselben Strahlen, die die Beugungsbilder der Lichtquelle liefern, erzeugen jedoch im weiteren Verlauf in der zum Objekt konjugierten Bildebene das reelle Bild des Objekts.

In Abb. 5 ist angenommen, daß die am Objekt gebeugten Strahlen erster Ordnung gerade noch in die Objektivlinse eintreten können.

Laut der Theorie von Abbe ist eine Abbildung der Objektstruktur im sekundären Bild direkt an das Vorhandensein von Beugungsspektren der Lichtquelle geknüpft. Da die Beugungsbilder aller vorhandenen Ordnungen beim Aufbau des reellen Objektbildes mitwirken, sind im Prinzip auch

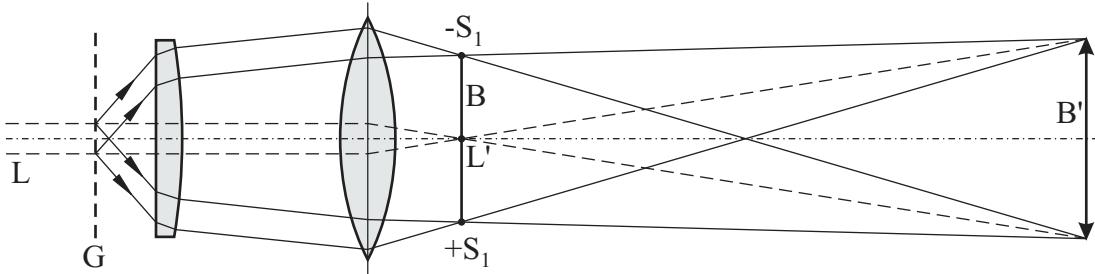


Abbildung 5: Bildentstehung nach Abbe. L, L' Lichtquelle und ihr Bild, G Gitter, B primäres Bild, B' sekundäres Bild.

alle notwendig, um ein vollkommen ähnliches Bild zu erzeugen. Da die Beugungsbilder höherer Ordnung in ihrer Intensität stark abnehmen, sind die Beugungsbilder bis zur ersten Ordnung im Prinzip die wichtigsten für die Bildentstehung. Somit gilt die Forderung, daß zumindest das Beugungsbild erster Ordnung in die Objektivlinse eintreten können muß, um eine Gitterstruktur erkennbar zu machen. Ansonsten sieht man nur eine gleichmäßig helle Fläche ohne irgendeine Struktur.

Für den Winkel, unter dem das erste Maximum der Beugung am Gitter auftritt, gilt:

$$\sin \varphi = \frac{\lambda}{ng} = \frac{\lambda'}{g} \quad (8)$$

mit g der Gitterkonstante, λ der Lichtwellenlänge, λ' der Lichtwellenlänge im Medium vor dem Objekt und n dem Brechungsindex des Mediums nach dem Objekt bzw. nach dem Deckglas. Damit eine Struktur noch erkennbar wird, muß der Winkel φ im Grenzfall gleich dem Öffnungswinkel des Objektivs sein. Das Auflösungsvermögen S ergibt sich aus der Gleichung für die Apertur (Gl. (7)) und (Gl. (8)). Die gerade noch auflösbare Gitterkonstante g wird mit d_{\min} bezeichnet. Dabei gilt $\varphi = \alpha$.

$$S = \frac{\lambda}{n \sin \alpha} = \frac{\lambda'}{A} \quad (9)$$

1.6 Köhlersche Beleuchtung

Für ein optimales Mikroskopieren ist es notwendig, dass die Probe auch optimal beleuchtet wird:

- die Probe sollte gleichmäßig bestrahlt werden,
- es sollte nur das im Mikroskop sichtbare Bildfeld auf der Probe ausgeleuchtet werden, damit Streulicht minimiert wird,
- der Aperturwinkel der Probenbeleuchtung sollte mit dem Aperturwinkel der Objektivlinse übereinstimmen, um das beste Auflösungsvermögen zu erreichen.

Diese Kriterien können optimiert werden, indem die Lichtführung von der Lichtquelle bis hin zur Probe u.a. über die Helligkeit der Beleuchtung (rechts hinten am Mikroskop) und die Apertur (Schieber unterhalb des Probentischs) justiert wird (s. Bedienungsanleitung S. 72).

2 Fragen

1. Man leite die Gleichung für die Gesamtvergrößerung aus den in den Unterlagen genannten Ansätzen und unter Anwendung der Abbildungsgleichungen für Linsen her.
2. Es wird angenommen, daß in Abb. 3 der Abstand vom Objekt zur Frontlinse konstant bleibt. Wie hängt die numerische Apertur vom Durchmesser der Frontlinse und wie von der Immersionsflüssigkeit ab?

3. Überlegen Sie sich, wodurch das Auflösungsvermögen begrenzt ist (Vergrößerung aus den Messungen, $A = 0.95$, $\varphi_{\min, \text{Auge}} = 4'$ (Bogenminuten) für bequemes Sehen).
4. Wie funktioniert ein Elektronenmikroskop, und was versteht man unter Röntgenstrukturanalyse?
5. Mit welchen Hilfsmitteln oder Methoden kann man beim Mikroskop den Kontrast erhöhen?

3 Aufgabenstellung

1. Bestimmen Sie die Gesamt- und Objektivvergrößerung des alten Mikroskops für fünf verschiedene Tubuslängen. Wiederholen Sie die Messungen jeweils für alle fünf Tubuslängen drei Mal, um die Ableseunsicherheit bestimmen zu können.
Stellen Sie die Gesamtvergrößerung in Abhängigkeit von der mechanischen Tubuslänge grafisch dar. Ermitteln Sie numerisch die Ausgleichsgerade, und geben Sie die Koeffizienten der Geradengleichung $f(t) = a + kt$ an.
2. Bestimmung der Okularvergrößerung V_{Ok} mit

$$V_{\text{ges}} = V_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}}$$

3. Bestimmung der Objektivbrennweite f_{Obj} aus der Objektivvergrößerung und der zugehörigen Tubuslänge, wobei diese dem Diagramm $V_{\text{ges}} = f(t')$ zu entnehmen ist. Für die Okularvergrößerung ist der gebildete Mittelwert heranzuziehen.
4. Bestimmen Sie die Gesamtvergrößerung des neuen Mikroskops für alle drei Objektive. Führen Sie die Messungen auch hier jeweils drei Mal für jedes Objektiv durch. Hierfür bleibt der Computer noch ausgeschaltet.
5. Vergleichen Sie die beiden Mikroskope miteinander.
6. Untersuchung einer Probe mittels digitalem Mikroskop

Schauen Sie sich das beiliegende Probenbeispiel (A: Altes Transmissionsgitter, B: Graphenprobe) mit Hilfe des digitalen Mikroskops (Software LabScope) an. Vermessen Sie mit Hilfe der Software die Probenstruktur.

- A Gitterbeispiel: Was ist die Liniendichte des Gitters?
- B Graphenprobe: Wieviel Prozent der Oberfläche sind mit Graphen bedeckt?

4 Versuchsdurchführung

4.1 Bestimmung der Gesamt- und Objektivvergrößerung des alten Mikroskops

4.1.1 Gesamtvergrößerung

Für eine bestimmte Tubuslänge ist das Okular mit dem halbdurchlässigen Einblendspiegel einzusetzen, das Auge auf den im Spiegel sichtbaren Vergleichsmaßstab zu akkommodieren, und das Objektmikrometer mittels Feintrieb scharfzustellen. Durch Verdrehen des Beleuchtungsspiegels ist die Helligkeit so zu regulieren, daß beide Maßstäbe deutlich erkennbar sind. Durch Hin- und Herbewegen des Kopfes über dem Okular ist zu prüfen, ob die Bilder der beiden Maßstäbe in einer Ebene liegen, und somit ein Parallaxenfehler beim Ablesen vermieden wird.

Aus dem Vergleich der Maßstäbe ergibt sich die Gesamtvergrößerung.

4.1.2 Objektivvergrößerung

Im Anschluß an die Bestimmung der Gesamtvergrößerung muß sofort für die eingestellte Tubuslänge die Objektivvergrößerung bestimmt werden. Dabei darf an der Scharfstellung des Mikroskops nichts geändert werden! (Warum?)

Man nimmt das Okular aus dem Tubus, und setzt dafür das Hilfsokular mit eingebautem Okularmikrometer ein. Um trotzdem ein scharfes Bild des Objektes zu erhalten, zieht man das Okular aus dem Tubus in die Höhe, bis auch das Bild des Objektmaßstabs neben dem Bild des Okularmaßstabs scharf erscheint. Zusätzlich muß gewährleistet sein, daß die beiden Bilder exakt in einer Ebene liegen, um bei Ablesen der Skalenteile einen Parallaxenfehler zu vermeiden.

Führt man das Auge in horizontaler Ebene über dem Okular geringfügig hin und her, so kann man beurteilen, ob die Bilder in verschiedenen Ebenen liegen oder nicht. Registriert man dabei eine Verschiebung der beiden Skalen gegeneinander, so liegen die Bilder nicht in einer Ebene. Aus dem Vergleich der Maßstäbe ergibt sich die Objektivvergrößerung. (Wie?)

Anschließend setzt man wieder das Okular mit dem halbdurchlässigen Spiegel ein, verstellt die Tubuslänge um 5 mm, und bestimmt wieder beide Vergrößerungen.

4.1.3 Graphische Darstellung der Gesamtvergrößerung in Abhängigkeit von der mechanischen Tubuslänge

Aus der Herleitung der Gesamtvergrößerung erkennt man, daß diese über einen weiten Bereich linear ist, und deshalb im $V_{\text{ges}} = f(t')$ -Diagramm durch eine Gerade dargestellt wird. Die Ausgleichsgerade ist auch numerisch zu ermitteln, und die Koeffizienten der Geradengleichung $f(t) = a + kt$ sind anzugeben.

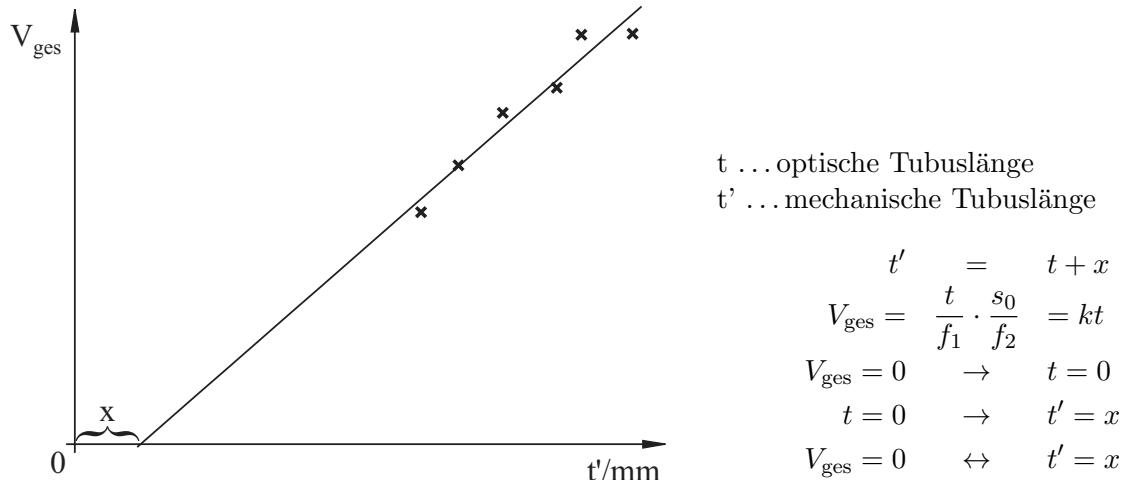


Abbildung 6: Ausgleichsgerade der Funktion $V_{\text{ges}} = f(t)$. V_{ges} ist die Gesamtvergrößerung, t die Tubuslänge.

4.2 Bestimmung der Okularvergrößerung V_{Ok} des alten Mikroskops nach Gl. (4)

$$V_{\text{ges}} = V_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}}$$

4.3 Bestimmung der Objektivbrennweite des alten Mikroskops

Die Objektivbrennweite f_{Obj} ist aus der Objektivvergrößerung und der zugehörigen Tubuslänge zu bestimmen, wobei diese dem Diagramm $V_{\text{ges}} = f(t')$ zu entnehmen ist. Für die Okularvergrößerung ist der gebildete Mittelwert heranzuziehen.

$$V_{\text{Obj}} = \frac{V_{\text{ges}}}{V_{\text{Ok}}} = \frac{t}{f_{\text{Obj}}} \neq \text{const} \quad \rightarrow \quad f_{\text{Obj}}$$

4.4 Bestimmung der Gesamtvergrößerung des neuen Mikroskops

Analog zu Aufgabe 4.1.1 ist auch beim neuen Mikroskop der Okularaufsatz mit dem halbdurchlässigen Einblendspielle einzusetzen, das Auge auf den im Spiegel sichtbaren Vergleichsmäßigstab zu akkommodieren, und das Objektmikrometer mittels Feintrieb scharfzustellen. Dazu hilft es, die Beleuchtung des Mikroskops immer wieder auf- bzw. abzudrehen. Der Vergleich der Maßstäbe ist für alle drei Objektive jeweils drei Mal durchzuführen, um auch hier eine sinnvolle Ableseunsicherheit angeben zu können.

4.5 Vergleich der beiden Mikroskope

Vergleichen Sie die beiden Mikroskope in ihrem Aufbau und ihren von Ihnen bestimmten Vergrößerungsleistungen.

4.6 Untersuchung einer Probe mit Hilfe des Digitalmikroskops

Starten Sie den Computer (i511) und die Software Labscope (Mikroskopverbindung: USB). Wählen Sie links unten je nach Objektiv das entsprechende aus, das Sie gerade benutzen. Bestimmen Sie je nach Probe die entsprechenden Dimensionen:

A Altes Transmissionsgitter: Bestimmen sie die Liniendichte des Gitters.

B Graphenprobe: Bestimmen Sie die durchschnittliche Beschichtungsfläche, indem Sie den Durchmesser und den Abstand der Punkte bestimmen, und dann den Flächenanteil über eine Einheitszelle berechnen.

Nach Klicken auf den nach unten gerichteten Doppelpfeil rechts unten in der Software, können mehrere Maßwerkzeuge zur Probenvermessung ausgewählt werden. Bitte Unsicherheiten mit angeben.

Speichern Sie sich für Ihr Protokoll (eine) Aufnahme(n) der Probe. Schauen Sie sich die Probe zum Vergleich im alten Mikroskop an.

4.7 Weiterführende Informationen zur Graphenprobe

Die Graphenproben werden den Grundlaborübungen von der Gruppe von Francesco Greco zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden durch laserinduzierte Pyrolyse einer Polyimidfolie präpariert. Die Belichtung mit dem Laser wandelt das Polymer in eine leitfähige poröse 3D-Graphenstruktur (Laser-Induced Graphen, LIG) um, ohne dass Chemikalien oder andere Prozesse erforderlich sind. Das Muster ermöglicht es uns, die Oberflächeneigenschaften von LIG abzustimmen, die niedrigen Prozent-Werte zeigen ein hydrophobes Verhalten während die hohen Prozentwerte ein hydrophile Eigenschaften zeigen. Die durchstimmmbare Benetzbarkeit des Materials kann z.B. für die Milli-Fluidik genutzt werden (mehr Informationen unter <http://lampselab.com/>).

Literatur

- [1] Skriptum Grundvorlesung Experimentalphysik 1.
- [2] Bergmann-Schäfer, *Bd. III, Optik*, (7. Auflage, Seite 134 ff.).