

## Röntgenmikroskopie, ihre Möglichkeiten und Grenzen\*

Von V. E. COSSLETT

Cavendish Laboratory, University of Cambridge, Cambridge (England)

### Einleitung

Seit Jahren wurden Versuche gemacht, ein Röntgenmikroskop zu konstruieren. Erst in den letzten Jahrzehnten sind die wissenschaftlichen Grundsätze der Röntgenmikroskopie gründlich erforscht und ihre Möglichkeiten und Begrenzungen festgestellt worden. Heute ist man so weit, daß man mit drei verschiedenen Methoden Aufnahmen mit X-Strahlen mit einer Auflösung, die fast gleich der der Lichtmikroskopie ist, machen kann. RÖNTGEN selber hat in seiner allerersten Mitteilung über die neuen Strahlen schon einige Versuche in zwei von diesen Richtungen beschrieben. Er versuchte, eine Brechung der Strahlen in Materie zu messen, konnte aber keine Effekte wahrnehmen. Er schrieb<sup>1</sup>: «... daß man mit Linsen die X-Strahlen nicht konzentrieren kann, ist nach dem Mitgeteilten selbstverständlich.» Erst dreißig Jahre später hat man durch genauere Messungen gefunden, daß ein Brechungsindex zwar existiert, der aber nur sehr wenig von Eins verschieden ist. Auch erwähnte RÖNTGEN<sup>2</sup> einen Versuch zur Herstellung eines Lochkamerabildes. Die ersten Lochbilder wurden kurz nachher von CZERMAK<sup>3</sup> veröffentlicht. Da jedoch die Expositionszeiten mit den damals vorhandenen Röntgenröhren sehr lang waren, ist diese Methode völlig aufgegeben worden. Mit den modernen Hochleistungs-Punkt-fokusröhren ist es jetzt möglich, ein Bild mit hoher direkter Vergrößerung und kurzer Belichtungszeit zu erzielen. Die dritte Methode – Mikroradiographie auf Feinkornplatten mit photographischer Nachvergrößerung – wurde von HEYCOCK und NEVILLE<sup>4</sup> bereits 1898 in Cambridge untersucht. Sie machten Kontaktaufnahmen von einigen Gold-Natrium-Legierungen, um ihre Feinstruktur zu erforschen. 1913 hat GOBY<sup>5</sup> in Frankreich die ersten biologischen Anwendungen der Mikroradiographie begonnen, die später von DAUVILLIER<sup>6</sup> und LAMARQUE<sup>7</sup> fortgesetzt wurden.

Bis ungefähr 1950 war die Mikroradiographie die einzige praktische Methode für Röntgenmikroskopie. Gegenüber der Lichtmikroskopie bietet sie im Prinzip zwei Vorteile: besseres Auflösungsvermögen, weil die Wellenlänge sehr viel kürzer ist, und größere Eindringtiefe, weil der Absorptionskoeffizient im allgemeinen viel kleiner ist. Dazu kommt die Möglichkeit, die vorhandenen chemischen Elemente durch ihre verschiedenen Absorptionskoeffizienten oder ihre Emissionsspektren zu identifizieren, d.h. eine quantitative Mikroanalyse zu machen. Mit diesem lockenden Ziele wurden bedeutende Fortschritte in den letzten zehn Jahren gemacht. Das steigende Interesse auf diesem Gebiet hat uns veranlaßt, mit Unterstützung der International Union of Pure and Applied Physics, ein «Symposium on X-Ray Microscopy and Microradiography» in Cambridge im August 1956 zu veranstalten<sup>8</sup>. Dabei hat sich die Gelegenheit ergeben, einen Überblick über den heutigen Stand der Forschung und der künftigen Möglichkeiten zu gewinnen.

Viele Anordnungen für Röntgenmikroskopie wurden vorgeschlagen, aber nur drei sind bis jetzt zu einem praktischen Mikroskop von hoher Auflösung entwickelt worden:

Das Reflexionsmikroskop, mit polierten Glas- oder Metallspiegeln.

Das Kontaktverfahren, mit optischer Nachvergrößerung.

Die Punktprojektions- oder Schattenmethode, mit direkter Vergrößerung von einem äußerst feinen Röntgenbrennfleck aus.

Zwar ist es im Prinzip möglich, eine Linse für Röntgenstrahlen herzustellen, doch ist der Brechungsindex von allen Stoffen bei dieser kurzen Wellenlänge so wenig von Eins verschieden, daß die Brennweite immer unbrauchbar lang sein müßte.

### Das Reflexionsmikroskop

Bei normalem Einfall auf einen Spiegel ist das Reflexionsvermögen fast Null, weil die Röntgenstrahlen tief in die Oberfläche eindringen. Da aber der Brechungsindex *kleiner* als Null ist, muß eine Totalreflexion in Luft stattfinden.

<sup>8</sup> X-Ray Microscopy and Microradiography, Proceedings of Symposium, Cambridge 1956, Academic Press, New York 1957.

\* Vorgetragen vor der Physikalischen Gesellschaft Zürich am 23. Mai 1957.

<sup>1</sup> W. C. RÖNTGEN, *Sitzungsber. Med.-Phys. Ges. Würzburg* 1895, 137 bis 141.

<sup>2</sup> W. C. RÖNTGEN, *ibid.* 1896, 11-19.

<sup>3</sup> P. CZERMAK, *Ann. Physik (Leipzig)* 60 (1896) 760.

<sup>4</sup> C. T. HEYCOCK und F. H. NEVILLE, *Trans. Chem. Soc. (London)* 73 (1898) 714.

<sup>5</sup> P. GOBY, *C. R. Acad. Sci.* 156 (1913) 686.

<sup>6</sup> A. DAUVILLIER, *C. R. Acad. Sci.* 185 (1927) 1460.

<sup>7</sup> P. LAMARQUE, *C. R. Acad. Sci.* 202 (1936) 684.

Der Brechungsindex  $n$  ist durch die Wellenlänge  $\lambda$  und die Ordnungszahl  $Z$  der Medien bestimmt, wie man aus der klassischen Dispersionstheorie sehen kann. In vereinfachter Darstellung erhält man die Dispersionsformel:

$$n^2 - 1 = (Ne^2Z/\pi m) - 1/(\nu_0^2 - \nu^2),$$

wobei

$N$  die Anzahl der Oszillatoren pro  $\text{cm}^3$ ,  
 $e$  die Ladung und  $m$  die Masse des Oszillators,  
 $\nu_0$  die Eigenfrequenz des Oszillators im Grundzustand des Atoms (Frequenz einer Absorptionskante), und  
 $\nu$  die Frequenz der einfallenden Strahlung, ist.

Mit  $\delta = 1 - n$  bekommt man

$$\delta = 2,74 \cdot 10^{10} \cdot \lambda^2 Z \rho / A.$$

Wenn  $\lambda = 3A$ ,  $Z/A = 0,5$  und die physikalische Dichte  $\rho = 5$ , ist das Brechungsdekrement  $\delta$  gleich  $0,6 \cdot 10^{-4}$ . Der Glanzwinkel für Totalreflexion  $\Phi_c$  ist in erster Näherung durch

$$\Phi_c = (2\delta)^{1/2}$$

gegeben. In den oben erwähnten Bedingungen ist der kritische Glanzwinkel in der Größenordnung  $10^{-2}$ , d. h. ungefähr  $0,5^\circ$ .

Bei streifendem Einfall auf eine Luft-Feststoff-Grenzfläche wird daher ein Röntgenstrahl totalreflektiert. JENTZSCH<sup>9</sup> hat schon 1929 einige Versuche gemacht, ein einfaches Reflexionsmikroskop auf diese Art zu verwirklichen. Er hat gleich erkannt, daß der Astigmatismus ein großes Hindernis bildet. Bei streifendem Einfall auf einen sphärischen Hohlspiegel entsteht ein linearer Fokus, weil die Fokussierung viel stärker in der meridionalen Ebene (Abb. 1) als in der dazu senkrechten

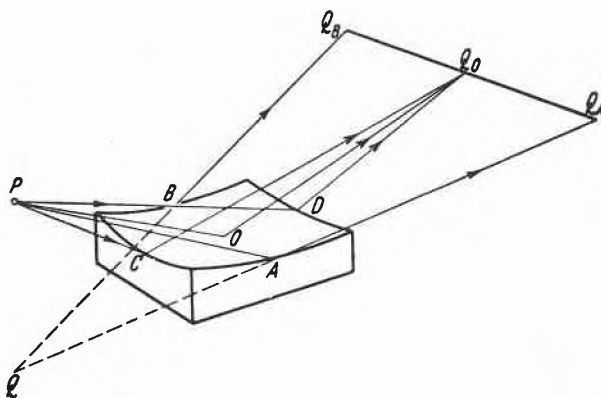


Abb. 1. Bei streifender Reflexion auf einem sphärischen Hohlspiegel entsteht ein astigmatisches Bild (KIRKPATRICK und PATTEE, *Handbuch der Physik*, Band 30 [1957] S. 325, Abb. 13)

sagittalen Ebene wirkt. Erst 1948 haben KIRKPATRICK und BAEZ<sup>10</sup> in Stanford vorgeschlagen, zwei gekreuzte zylindrische Spiegel zu verwenden (Abb. 2). Der erste

<sup>9</sup> F. JENTZSCH, *Physik. Z.* 30 (1929) 268.

<sup>10</sup> P. KIRKPATRICK und A. V. J. BAEZ, *Opt. Soc. Amer.* 38 (1948) 766.

Spiegel wirkt fokussierend in einer horizontalen Ebene, der zweite in einer vertikalen Ebene. So bekommt man ein Punktbild, doch mit etwaiger Verzeichnung, weil die Vergrößerung des zweiten Spiegels weniger als die des ersten ist.

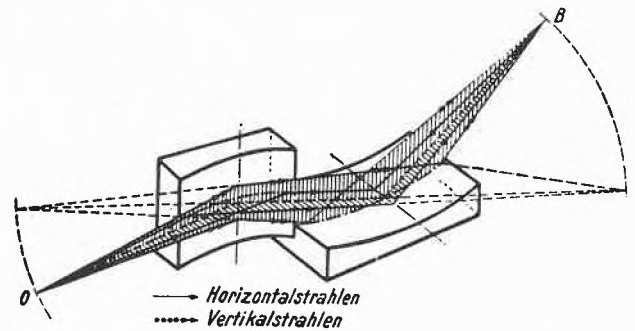


Abb. 2. Totalreflektierendes Zweispiegelsystem, nach KIRKPATRICK und BAEZ<sup>10</sup> (in HILDENBRAND, *Fortschritte der Physik*, Band 4 [1956] S. 20, Abb. 19)

Die optischen Eigenschaften solcher Spiegelsysteme wurden von KIRKPATRICK und seinen Schülern<sup>11</sup> gründlich erforscht sowie auch von DYSON<sup>12</sup> in England, MONTEL<sup>13</sup> in Frankreich, WOLTER<sup>14</sup> und HERRNRING und WEIDNER<sup>15</sup> in Deutschland. Die Abbildungsfehler bei streifendem Einfall sind komplizierter und viel schwerer zu beseitigen als in der normalen Optik, vor allem das Koma und die sphärische Aberration. Die Bildfehler lassen sich zum Teil dadurch reduzieren, daß man zu einem zusammengesetzten Mikroskop übergeht, dessen Optik aus zwei Paaren solcher gekreuzter Zylinderspiegel besteht. Wenn man von der sphärischen oder zylindrischen Symmetrie der Spiegelfläche abgeht und statt dessen elliptische oder paraboloiden Formen nimmt, sollte man noch bessere Auflösungen bekommen.

KIRKPATRICK und BAEZ<sup>10</sup> und später auch PATTEE<sup>16</sup> und MCGEE<sup>17</sup> haben das Zweispiegelmikroskop experimentell untersucht und bald eine Auflösung von ungefähr  $1 \mu$  erreicht. Aber weiterzukommen scheint sehr schwierig zu sein. Die Schwierigkeiten bestehen hauptsächlich darin, daß a) die Spiegeloberfläche die gewählte Form innerhalb weniger als  $50 \text{ \AA}$  genau besitzen soll und b) daß die Oberfläche so gut poliert sein sollte, daß keine lokalen Schleifspuren oder Unebenheiten größer als ungefähr  $10 \text{ \AA}$  vorkommen. Diese Bedingungen sind mehr als eine Größenordnung höher als in der bisher bekannten glasoptischen Technik. KIRKPATRICK hat meistens unbedampfte Glas- oder Quarzspiegel gebraucht und hat besondere Polier- und Prüfverfahren entwickelt. Vor kurzem ist es MCGEE<sup>17</sup> gelungen, ein Auflösungsver-

<sup>11</sup> P. KIRKPATRICK und H. H. PATTEE, *Handbuch der Physik*, Band 30 (1957) S. 305.

<sup>12</sup> J. DYSON, *Proc. Phys. Soc. B* 65 (1952) 580.

<sup>13</sup> M. MONTEL, *Rev. Opt.* 32 (1953) 585.

<sup>14</sup> H. WOLTER, *Ann. Physik (Leipzig)* 10 (1952) 94 und 286.

<sup>15</sup> G. HERRNRING und W. WEIDNER, in G. HILDENBRAND, *Fortschritte der Physik*, Band 4 (1956) S. 1.

<sup>16</sup> H. H. PATTEE, Dissertation, Stanford University, 1953.

<sup>17</sup> J. F. MCGEE, Dissertation, Stanford University, 1956.

mögen von ungefähr  $0,5 \mu$  mit einem Silbergitter als Testobjekt zu erreichen. Sein Mikroskop verwendete zwei einstellbare Aperturen und nur zwei Spiegel, weil die genaue Einstellung von vier Spiegeln bei so kleinen Glanzwinkeln sehr umständlich wird. Er hat Aluminium-K-Strahlung ( $8,3 \text{ \AA}$ ) benutzt, weil sie einen hohen Absorptionskoeffizienten in biologischen Stoffen besitzt. Die Spiegel hatten einen Krümmungsradius von  $8,5 \text{ m}$ , eine Brennweite von  $6,4 \text{ cm}$ . Um kurze Expositionszeiten (etwa  $10 \text{ min}$ ) zu erhalten, sind die Bilder bei nur 7facher primärer Vergrößerung gemacht. Inzwischen hat auch HINK<sup>18</sup> in Berlin über ähnliche Versuche mit zwei gekreuzten Hohlspiegeln berichtet. Er hat ein Feinfokusröntgenrohr mit elektrostatischer Fokussierung konstruiert und bekommt eine Expositionszeit von ungefähr einer Stunde bei 120facher primärer Vergrößerung. Sein Auflösungsvermögen ist aber noch nicht so hoch wie beim Mikroskop von MCGEE.

In letzter Zeit hat PATTEE<sup>19</sup> ein Vierspiegelsystem durchgerechnet. Es besteht aus einem Paar gekreuzter Ellipsoide, kombiniert mit einem Paar gekreuzter Paraboloide, und soll ein Auflösungsvermögen von  $500 \text{ \AA}$  bei einem Objektfeld von  $20 \mu$  haben. WOLTER<sup>14</sup> hat ähnliche Systeme vorgeschlagen, aber mit Spiegeln von voller Rotationssymmetrie, um den Astigmatismus gleichzeitig zu beseitigen. Sie sind jedoch alle, wie auch das System von PATTEE, schwierig herzustellen und sehr umständlich zu zentrieren. Es wird bestimmt ziemlich lange dauern, bis auf diesem Wege ein Hochauflösungsreflexionsmikroskop hergestellt ist.

### Die Kontaktmikroradiographie

Die zwei anderen Methoden der Röntgenmikroskopie, das Kontakt- und das Schattenverfahren, sind viel leichter zu gebrauchen, und, richtig gesehen, sind sie sehr nahe verwandt (Abb. 3). Wenn ein Objekt  $O$  (Durchmesser  $d$ ) von einem Brennfleck  $F$  (Durchmesser  $f$ ) die Entfernung  $a$  hat und von einer Beobachtungsebene  $B$  die Entfernung  $b$ , so entsteht ein Halbschatten von einer Breite  $p$ :

$$p = f \cdot b/a$$

Die Vergrößerung  $V$  ist durch  $V = (a + b)/a$  gegeben. In der makroskopischen Radiographie ist es üblich, diese Randunschärfe als das effektive Auflösungsvermögen anzunehmen. Bezogen auf den Objektraum, wird es zu

$$p_0 = p/V = f \cdot b/(a + b).$$

Wenn man es mit einem Punktobjekt zu tun hat, ist eine Kontrastgrenze noch einzuführen, weil es mit abnehmender Objektgröße immer schwieriger wird, das Objekt überhaupt zu sehen. Der Kernschatten  $u$  wird immer kleiner. Am einfachsten setzt man als Kontrastgrenze die Bedingung  $u = 0$ . Wie man von der Inten-

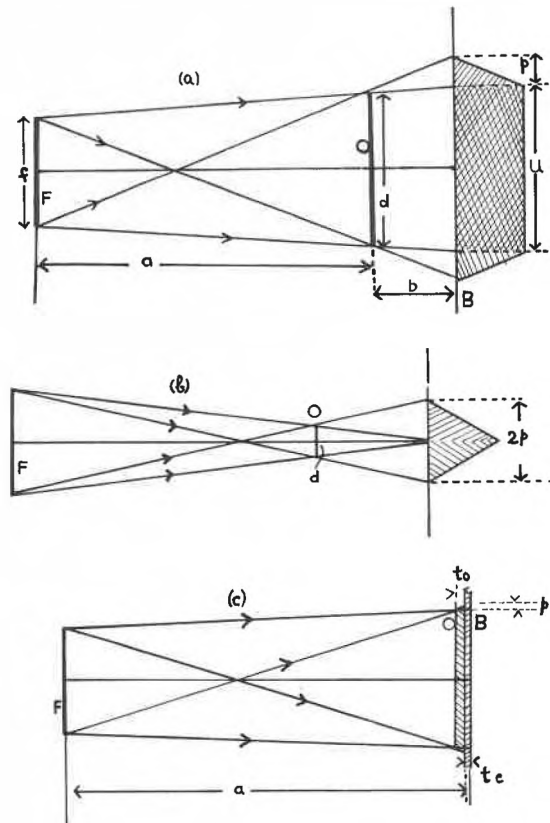


Abb. 3. Kontaktmikroradiographie: (a) Allgemeine geometrische Bedingungen; (b) kritische Auflösungsbedingung ( $u = 0$ ); (c) praktische experimentelle Anordnung, mit der Objektprobe direkt auf die Photoemulsion  $E$  gelegt

sitätsverteilung sofort sieht (Abb. 3b), ist das Objekt noch ganz deutlich zu sehen und leicht von einem Nachbarpunkt zu trennen. Mit

$$u = \{(a + b)d - fb\}/a = 0,$$

hat man

$$d = fb/(a + b) = p_0.$$

Nimmt man das als Kontrastgrenzbedingung an, so sieht man, daß der Halbschatten gleich der Objektgröße wird, was man als das richtige Auflösungsvermögen  $\delta$  (eigentlich die Beobachtungsgrenze) betrachten kann. Also

$$\delta = fb/(a + b) = p_0/(a + b).$$

Das Kontaktverfahren bedingt einen sehr kleinen Bildabstand  $b$  (Abb. 3c), das Projektionsverfahren einen sehr kleinen Objektabstand  $a$ . Also, mit  $b \ll a$  hat man  $\delta = p$  und mit  $a \ll b$  hat man  $\delta = f$ . Das heißt, in dem Kontaktverfahren ist das Auflösungsvermögen durch die Halbschattenbreite und daher durch die photographische Korngröße und in dem Projektionsverfahren durch den Brennfleckdurchmesser bestimmt. In der Kontaktmethode muß man also, um die Halbschattenbreite klein zu halten, entweder mit einer sehr großen Objektentfernung (= Kameralänge) oder mit einer sehr kleinen Korngröße arbeiten. In beiden Fällen wird die Expositionszeit ziemlich lang ( $10 \text{ min}$  oder noch länger).

<sup>18</sup> W. HINK, siehe <sup>8</sup>, S. 151.

<sup>19</sup> H. H. PATTEE, siehe <sup>8</sup>, S. 135.

In der Tat wird die Mikroradiographie fast immer mit einem ziemlich kleinen Brennpunkt ( $\sim 1$  mm) in 10 bis 20 cm Entfernung von einer Emulsion von äußerst feiner Korngröße gemacht. Die Objektprobe, in Form einer Schicht oder eines Mikrotomschnittes, wird direkt auf die Emulsion bzw. auf eine Zwischenschicht von Nitrocellulose oder Plastik gebracht, um die spätere Entfernung des Objektes vor der photographischen Entwicklung zu erleichtern.

Die Kontaktmikroradiographie findet jetzt viele Anwendungen, insbesondere in der Metallographie und in der Biologie. ENGSTRÖM in Stockholm<sup>20</sup> hat sie als eine Forschungsmethode in der Cytologie weit entwickelt. In Zusammenarbeit mit COMBÉE (Philipskonzern, Eindhoven) hat er eine geeignete Röntgenröhre und eine Kamera konstruiert<sup>21</sup>, die jetzt serienmäßig hergestellt werden. Die Kamera ist sehr kurz und kann entlüftet werden, um Absorptionsverluste bei weichen Röntgenstrahlen zu vermindern. Die Spannung ist zwischen 1 und 5 kV variierbar. Das Berylliumfenster ist nur  $50 \mu$

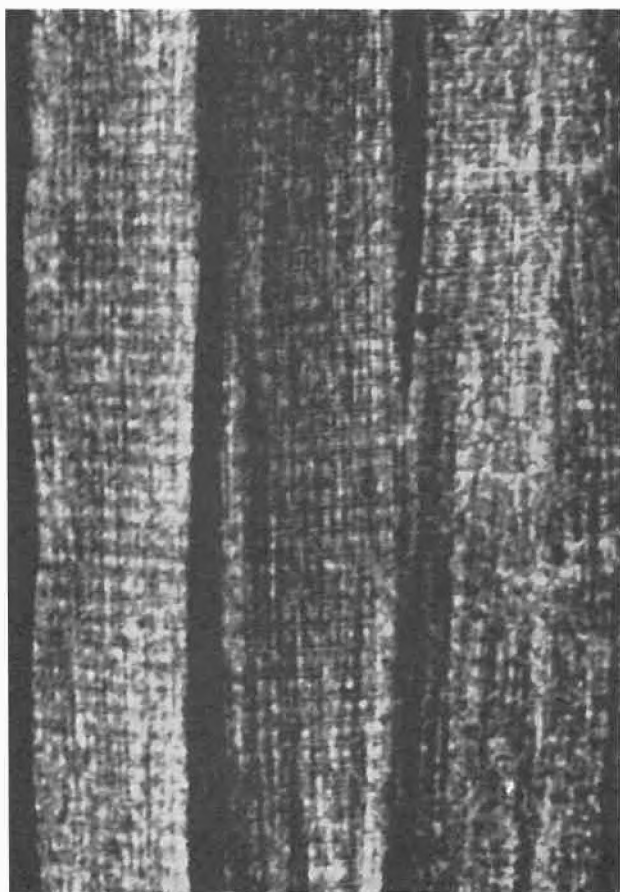


Abb. 4. Kontaktaufnahmen von unbehandelten Muskeln von Ratte, bei 600 V aufgenommen und  $1600\times$  nachvergrößert (ENGSTRÖM, LUNDBERG und BERGENDAHL, *J. Ultrastructure Res.* 1 [1958] 147, Abb. 11)

<sup>20</sup> A. ENGSTRÖM, *Acta Radiol., Suppl.* 63 (1946).

<sup>21</sup> B. COMBÉE und A. ENGSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta* 14 (1954) 432.

dick; bei einer Wellenlänge von  $4 \text{ \AA}$  kommen 80% der Strahlung, bei  $8 \text{ \AA}$  immer noch 20% durch. Jetzt will ENGSTRÖM mit noch längeren Wellenlängen (20–50  $\text{\AA}$ ) arbeiten. Kürzlich hat er<sup>22</sup> eine «Midget-camera» für 500 bis 1500 V Spannung für Zellforschung beschrieben. Seine besten Aufnahmen zeigen eine Auflösung von 0,25 bis  $0,5 \mu$ , bei einer Expositionszeit von ungefähr 20 min (Abb. 4). Solche Ergebnisse sind nur mit Ultrafeinkornplatten, wie z. B. Lippmann- oder Kodak-«Maximum Resolution»-Emulsionen, zu erzielen. Sie haben oft eine Korngröße unter  $0,1 \mu$ . Das Auflösungsvermögen ist aber eigentlich durch das der optischen Nachvergrößerung begrenzt, das nicht besser als  $0,2 \mu$  sein kann.

ENGSTRÖM<sup>23</sup> hat die Mikroradiographie auch für mikroanalytische Zwecke sorgfältig entwickelt. In dem erhaltenen Röntgenbild ist der Kontrast hauptsächlich von der Absorption der Röntgenstrahlen in den verschiedenen Komponenten der Objektprobe bestimmt, die bekanntlich mit der Ordnungszahl  $Z$  eines Elementes sehr rasch zunimmt. Am besten macht man zwei Intensitätsmessungen, je eine an beiden Seiten einer Absorptionskante des zu bestimmenden Elementes (Abb. 5). Aus der Differenz der Messungen kann man die

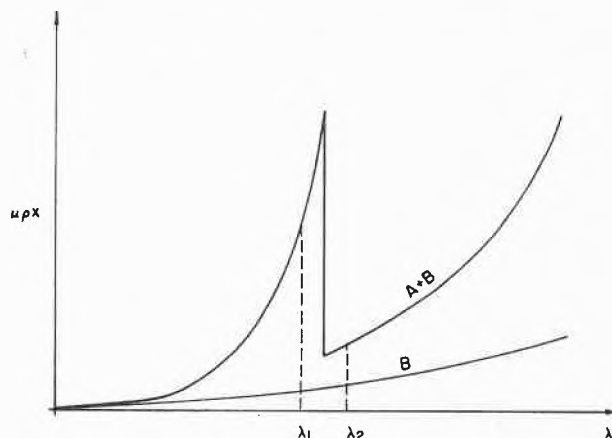


Abb. 5. Schematische Darstellung von Absorptionsmikroanalyse durch zwei Intensitätsmessungen in der Nähe der Absorptionskante des zu bestimmenden Elementes  $A$  in Anwesenheit eines zweiten Elementes  $B$  (ZEITZ und BAEZ, in *X-Ray Microscopy and Microradiography*, Academic Press, New York 1957, S. 424, Abb. 4)

Menge des Elementes je  $\text{cm}^2$  (die «Massendicke») direkt berechnen. Wenn die Probedicke bekannt ist, kann die absolute Masse des Elementes quantitativ bestimmt werden. Durch genaue Photometrierung der Mikrobilder ist es möglich, eine Empfindlichkeit von 1% in einem Volumen von ungefähr 1 Kubikmikron zu erzielen, d. h. eine Masse von  $10^{-13}$  g örtlich wahrnehmbar zu machen. So hat man eine sehr wertvolle Methode für die Mikroanalyse zur Verfügung, die schon viele Anwendungen in der cytologischen Forschung gefunden hat. LINDSTRÖM<sup>24</sup> hat einen besonderen Apparat für diese Rönt-

<sup>22</sup> A. ENGSTRÖM und B. LUNDBERG, *Exp. Cell Res.* 12 (1957) 198.

<sup>23</sup> A. ENGSTRÖM, siehe <sup>8</sup>, S. 24.

<sup>24</sup> B. LINDSTRÖM, *Acta Radiol., Suppl.* 125 (1955).

genspektrometrie gebaut und Bestimmungen des Schwefel- und Phosphorgehaltes einiger biologischer Organe gemacht. Auch in der Metallurgie ist dieses mikroanalytische Verfahren leicht zu verwenden, doch ist es dort einfacher mit dem Projektionsmikroskop zu arbeiten.

### Die Punktprojektionsmikroskopie

Schon 1939 hat VON ARDENNE<sup>25</sup> vorgeschlagen, einen sehr kleinen Röntgenbrennpunkt von großer Helligkeit durch Fokussierung eines Kathodenstrahlbündels mit Elektronenlinsen zu erzeugen. Erst zehn Jahre später sind die ersten erfolgreichen Versuche in dieser Richtung von COSSLETT und NIXON<sup>26, 27</sup> veröffentlicht worden. Die Anordnung ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.

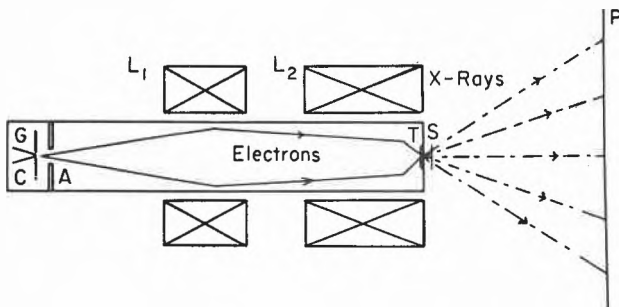


Abb. 6. Schematisches Diagramm des Projektionsmikroskops (COSSLETT, NIXON und PEARSON, in *X-Ray Microscopy and Microradiography*, Academic Press, New York 1957, S. 96, Abb. 1)

Die magnetischen Linsen  $L_1$ ,  $L_2$  bilden die Kathode in verkleinertem Maßstab auf die Antikathode  $T$ .  $G$  ist das Gitter (Wehnelt-Zylinder) und  $A$  die Anode der Elektronenkanone. Bei einer Vergrößerung von  $1/100$  ist der Brennfleckdurchmesser weniger als  $1 \mu$ . Als Antikathode dient eine Metallfolie  $T$  von einer Dicke von  $0,1 \mu$  bis  $5 \mu$ , entsprechend den Elementen (Aluminium, Gold, Kupfer, Wolfram, Silber). Die Röntgenstrahlen von diesem Ultrafeinfokus werfen ein Bild  $P$  von einer Objektprobe  $S$ , die ganz nahe an die Antikathode, jedoch außen an die Rohre herangebracht wird. Die Vergrößerung dieses «Schattenbildes» ist einfach durch den Quotient  $b/a$  gegeben, wobei  $a$  die Objektweite und  $b$  die Bildweite ist. Zum Beispiel mit  $a = 1 \text{ mm}$  und  $b = 10 \text{ cm}$  ist die Vergrößerung 100fach; mit  $a = 0,1 \text{ mm}$  ist sie schon 1000fach.

Um die Expositionszeit klein zu halten, braucht man eine kleine Kameralänge ( $b$ ) und einen möglichst hellen Brennfleck. Wenn die Antikathode gleichzeitig als Austrittsfenster dient, bekommt man sehr gute Wärmeleitungsbedingungen (COSSLETT<sup>28</sup>): In erster Näherung nimmt die Wärmeleitung mit dem Radius des Brennflecks, die Energiezufuhr aber mit dem Quadrat des Radius zu. Daher steigt die Anodenbelastbarkeit unge-

fähr reziprok mit dem Radius an. In einem Brennpunkt von Durchmesser  $1 \mu$  z.B. kann man dauernd einen Strom von 10 Mikroampère bei 10 kV Anodenspannung konzentrieren ohne irgendeine künstliche Kühlung der Antikathode; das ergibt eine Belastung von 100 kW je  $\text{mm}^2$ . Die Dicke der Folie soll ungefähr gleich der Reichweite der Elektronen sein, um ihre Energie völlig auszunutzen. Doch ist die Röntgenstrahlenquelle auch seitwärts um etwa diese Distanz durch Elektronenstreuung ausgebreitet. Daher muß man für hohe Auflösung die Foliendicke noch kleiner machen, was eine Verminderung der Röntgenausbeute mit sich bringt. Immerhin ist die Ausbeute sehr klein bei diesen kleinen Spannungen (2–10 kV). Wir machen zurzeit eine genauere Untersuchung der optimalen Bedingungen für die Erzeugung weicher Röntgenstrahlen. Die Verwendung einer Spitzenkathode mag dabei sehr nützlich sein (HIBI<sup>29</sup>; SAKAKI und MÖLLENSTEDT<sup>30</sup>).

Gegenüber der Kontaktmethode kann man in der Projektionsmethode eine viel gröbere Photoemulsion verwenden. Der Korndurchmesser braucht eigentlich nur so klein wie die Halbschattenbreite in der gewählten Bildebene zu sein. Allerdings kann man in der Kontaktmethode mit einem entsprechend größeren Brennfleck arbeiten. Die photographische Empfindlichkeit steigt aber ungefähr mit dem Quadrat der Korngröße, während die Anodenbelastung nur direkt mit dem Brennfleckdurchmesser zunimmt. So kommt man in der Schattenmethode mit einer kürzeren Belichtungszeit aus als in der Kontaktmethode, bei gleicher Kameralänge und gleicher Auflösung.

Die Auflösung eines Projektionsbildes ist in erster Linie von dem Durchmesser der Strahlungsquelle, in zweiter Linie von der FRESNELSchen Beugung an den Objektdetails bestimmt. Mit einer Antikathode aus Gold von  $0,1 \mu$  Dicke, ist es NIXON<sup>31</sup> gelungen, eine Auflösung von ungefähr  $0,2 \mu$  zu erreichen – was schon dem Gebiet der Ultraviolett-mikroskopie entspricht (Abb. 7). Ein weißer Rand um die Gitterstege ist deutlich zu sehen, der von der FRESNELSchen Beugung verursacht

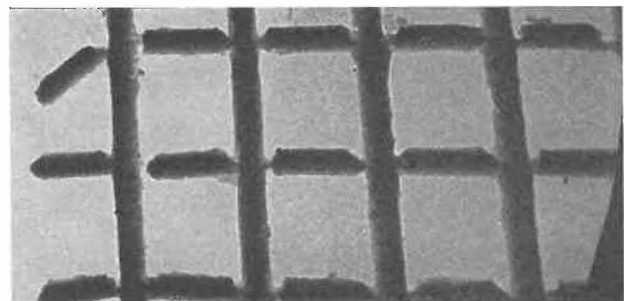


Abb. 7. Projektionsaufnahmen von einem Silbergitter (Stegbreite  $2-3 \mu$ , Periode  $17 \mu$ ), mit FRESNEL-Beugungsränder (10 kV,  $1000 \times$ ). (NIXON, *Nature* 175 [1955], 1078, Abb. 2)

<sup>25</sup> M. VON ARDENNE, *Naturwiss.* 27 (1939) 485.

<sup>26</sup> V. E. COSSLETT und W. C. NIXON, *Nature* 168 (1951) 24.

<sup>27</sup> V. E. COSSLETT und W. C. NIXON, *Proc. Roy. Soc. B* 140 (1952) 422.

<sup>28</sup> V. E. COSSLETT, *Proc. Phys. Soc. B* 65 (1952) 782.

<sup>29</sup> T. HIBI, *J. Electron Microscopy* (Japan, engl. ed.) 4 (1956) 11.

<sup>30</sup> Y. SAKAKI und G. MÖLLENSTEDT, *Optik* 13 (1956) 193.

<sup>31</sup> W. C. NIXON, *Proc. Roy. Soc. A* 232 (1955) 475.

wird. Das Bild ist bei einer primären 500fachen Vergrößerung bei einer Expositionszeit von 5 min gemacht. Mit modernen magnetischen Elektronenlinsen kann man Brennpunkte bis hinunter zu 100 Å ohne besondere Schwierigkeiten machen. Die Begrenzung des Auflösungsvermögens hängt von der Ausbreitung des Elektronenstrahles in der Antikathode ab. Bis 500 Å können wir sicher kommen, ohne daß die Expositionszeiten zu lang werden. Mit besseren Kathoden und noch mehr mit korrigierten Elektronenlinsen (die noch nicht vorhanden sind) lassen sich 200 bis 300 Å erreichen. Ob es sich lohnt, weiter hinunter mit dem Elektronenmikroskop Konkurrenz zu machen, ist sehr fraglich, weil die Absorption auch von weichen Röntgenstrahlen in biologischen Einzelheiten dieser Dicke sehr klein wird. Eine hohe Auflösung nützt nichts, wenn nicht genügend Kontrast vorhanden ist, um das Bild überhaupt sichtbar zu machen.

Wir haben eine ganze Reihe von Anwendungen des Projektionsverfahrens schon untersucht. Es hat den Vorteil gegenüber der Kontaktmikroradiographie, daß die Objekte nicht in engem Kontakt mit einer empfindlichen photographischen Schicht gebracht werden müssen. Man kann das Präparat auch leichter behandeln, z. B. thermisch oder mechanisch; oder in der Biologie lassen sich eine Reihe von Bildern während der verschiedenen Stadien einer chemischen oder enzymatischen Behandlung aufnehmen. Auch ist es leichter, in der Projektionsmethode Stereoaufnahmen zu machen, was in der

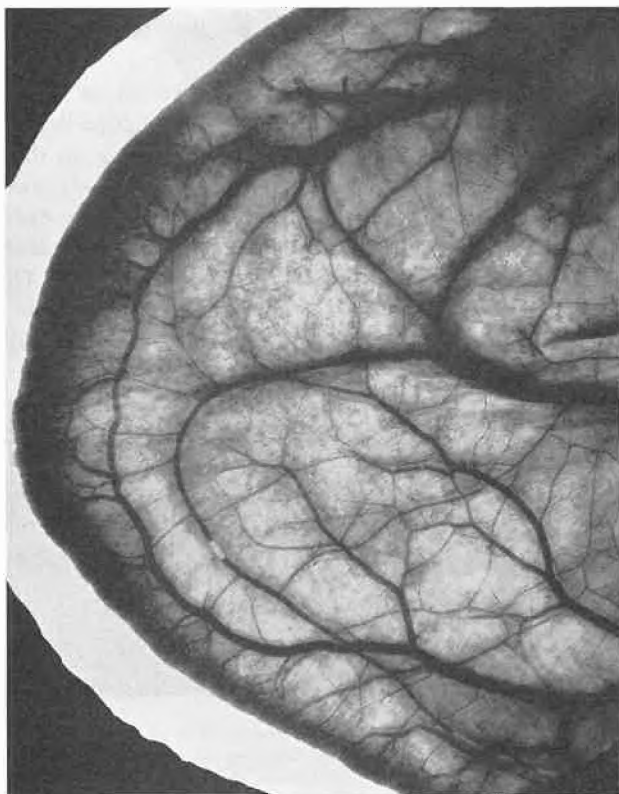


Abb. 8. Ohrenspitze eines Kaninchens, mit Blutkapillaren, nach Thorotrastinjektion; Projektionsaufnahmen bei 15 kV; 4×. (R. L. DE C. H. SAUNDERS, 1957, unveröffentlicht)

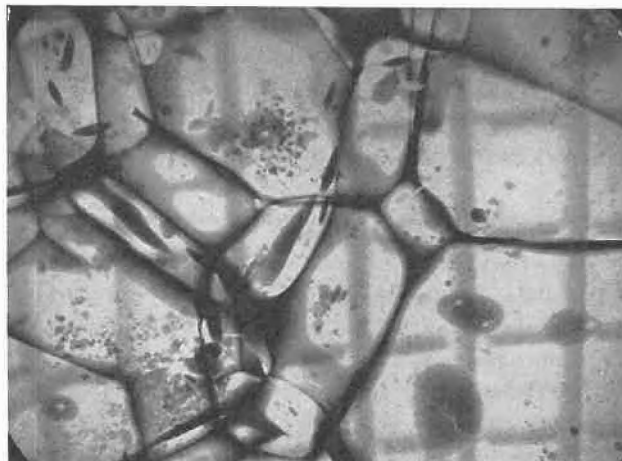


Abb. 9. Aluminium-Zinn-Legierung mit 6% Zinn; die schwarzen Linien sind die Korngrenzen mit hohem Zinngehalt; Projektionsaufnahmen bei 20 kV; 300× (NIXON, *Proceedings of the International Conference on Electron Microscopy, London, 1954*, Royal Microscopical Society, London 1956, S. 307, Abb. 9)

Arteriographie wie auch in der Metallurgie schon Anwendung gefunden hat. In Abb. 8 sieht man die Blutkapillaren des Ohrs eines Kaninchens nach Injektion mit einem Kontrastmedium («Thorotrast»); ein Versuch, der auch am lebenden Tier durchgeführt werden kann (SAUNDERS<sup>32</sup>). Abb. 9 zeigt die räumliche Innenstruktur einer Aluminium-Zinn-Legierung, die noch viel deutlicher in Stereoaufnahmen herauskommt (NIXON<sup>33</sup>). Anwendungen in der Geologie (JACKSON<sup>34</sup>, LONG und MCCONNELL<sup>35</sup>), in der Entomologie (SMITH<sup>36</sup>), in der Medizin (MOSLEY, SCOTT und WYCKOFF<sup>37</sup>, HEWES *et al.*<sup>38</sup>) und in der Holzforschung (JACKSON<sup>39</sup>) sind auch schon veröffentlicht worden.

Die Projektionsmethode ist auch sehr leicht anwendbar für die Aufnahme von Mikrobeugungsdiagrammen, wobei die chemische Identität einer Probe bestimmt werden kann. Wenn nur sehr kleine Einzelkristalle vorhanden sind, gibt die Helligkeit des Brennflecks und die Möglichkeit, sie ganz nahe heranzubringen, eine große Verminderung der Expositionszeit gegenüber einer gewöhnlichen Röntgenröhre. Eine Aufnahme von AgBr-Mikrokristallen z. B. ist in 10 Minuten anstatt 10 Stunden gemacht (NIXON<sup>40</sup>).

Noch anwendungsreicher ist die Projektionsmethode in der Mikroanalyse. Absorptionsspektrometrie ist leicht durchzuführen. Gegenüber der Kontaktmethode kann

<sup>32</sup> R. L. DE C. H. SAUNDERS, *Nature* 180 (1957) 1353.

<sup>33</sup> W. C. NIXON, *Proceedings of the International Conference on Electron Microscopy, London, 1954*, Royal Microscopical Society, London 1956, S. 307.

<sup>34</sup> C. K. JACKSON, siehe <sup>8</sup>, S. 623.

<sup>35</sup> J. V. P. LONG, Thesis, Cambridge 1958; J. V. P. LONG und J. D. C. MCCONNELL, *Miner. Mag.* (im Druck).

<sup>36</sup> D. S. SMITH, siehe <sup>8</sup>, S. 492.

<sup>37</sup> V. M. MOSLEY, D. B. SCOTT und R. W. G. WYCKOFF, *Science* 124 (1956) 683, *Biochim. Biophys. Acta* 24 (1957) 235.

<sup>38</sup> C. G. HEWES, W. C. NIXON, A. V. BAEZ und O. F. KAMPMEIER, *Science* 124 (1956) 129.

<sup>39</sup> C. K. JACKSON, siehe <sup>8</sup>, S. 487.

<sup>40</sup> W. C. NIXON, siehe <sup>8</sup>, S. 336.

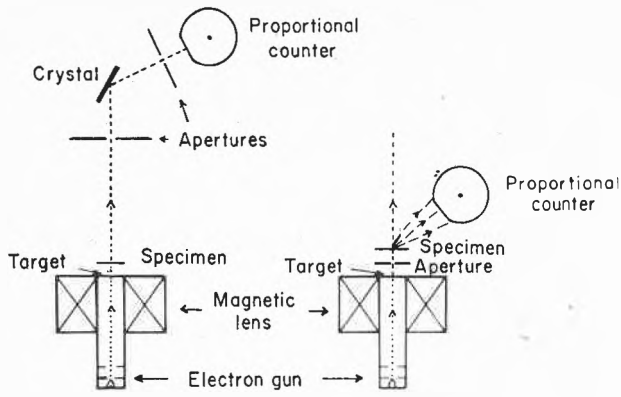


Abb. 10. Schematisches Diagramm der Anordnung für Mikroanalyse (a) durch Absorption und (b) durch Fluoreszenzerregung, mit Hilfe eines Punktprojektionsröntgenmikroskops (LONG und COSSLETT, in *X-Ray Microscopy and Microradiography*, Academic Press, New York 1957, S. 435, Abb. 1)

man die Bilder mit einem relativ breiten Lichtstrahl photometrieren, anstatt mit einer mikrophotometrischen Anordnung. Noch besser bestimmt man die durchgelassene Röntgenstrahlintensität an ausgewählten Stellen des Objektes direkt mit einem Zählrohr (Abb. 10a). Auch ist die Projektionsmethode zur Fluoreszenzanalyse geeignet, wobei die primären Röntgenstrahlen die charakteristische Strahlung der vorhandenen Elemente anregen. Diese sekundäre Strahlung wird dann entweder mit einem einfachen proportionalen Zählrohr oder mit Hilfe eines Kristallspektrometers registriert (Abb. 10b). Hierbei bekommt man eine höhere Empfindlichkeit als in der Absorptionsanalyse (LONG und COSSLETT<sup>41</sup>).

Es kann unter bestimmten Bedingungen vorteilhafter sein, eine Mikroanalyse durch direkte Röntgenstrahlerregung zu machen. Der Brennfleck («Elektronensonde») wird einfach auf die Objekt Oberfläche geworfen und die erregten Röntgenstrahlen (K- oder L-Linien) werden mit einem Spektrometer oder Zählrohr analysiert. Eine solche Emissionsanalyse mit einer Sonde von

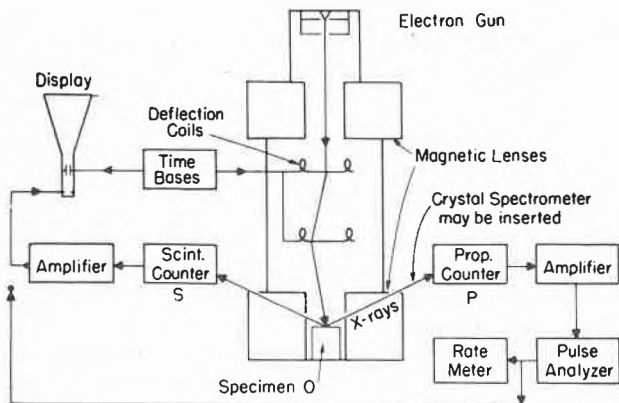


Abb. 11. Blockdiagramm des Röntgenrastermikroskops (DUNCUMB und COSSLETT, in *X-Ray Microscopy and Microradiography*, Academic Press, New York 1957, S. 377, Abb. 3)

<sup>41</sup> J. V. P. LONG und V. E. COSSLETT, siehe <sup>8</sup>, S. 435.

ungefähr  $2 \mu$  Durchmesser ist zum erstenmal von CASTAING<sup>42</sup> gemacht worden. Vor kurzem haben wir eine viel schneller arbeitende Anordnung gebaut, die so auf Fernsehtechnik basiert wird, daß man ein Elektronen- oder Röntgenbild der Oberfläche erhält (DUNCUMB und COSSLETT<sup>43</sup>, DUNCUMB<sup>44</sup>). Die Elektronensonde wird hier in einem gewöhnlichen, aber langsamen Raster über die Oberfläche gesteuert. Die emittierten sekundären Elektronen bzw. die erzeugten Röntgenstrahlen werden in einem Zählrohr registriert, und danach wird dieses Signal durch einen Vervielfacher auf einen Fernsehbildschirm gebracht (Abb. 11). Die örtliche Helligkeit dieses Bildes entspricht also der örtlichen Röntgenstrahl- (bzw. Sekundärelektronen-)ausbeute der Oberfläche. Man kann auf diese Weise ein Bild mit einer bestimmten Emissionslinie herstellen, worin die Verteilung eines Elementes qualitativ dargestellt wird (Abb. 12). Für quantitative Bestimmungen wird die Elektro-

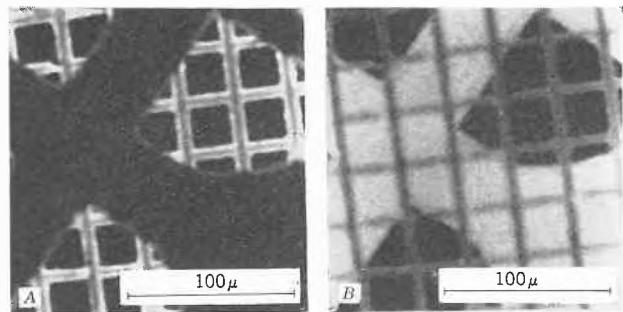


Abb. 12. Röntgenemissionsbild von einem Silbergitter (Periode  $32 \mu$ ) und einem Kupfergitter (Periode  $130 \mu$ ), (A) mit AgL-Strahlung und (B) mit CuK-Strahlung, in dem Röntgenrastermikroskop aufgenommen ( $240 \times$ ). (DUNCUMB und COSSLETT, in *X-Ray Microscopy and Microradiography*, Academic Press, New York 1957, S. 379, Abb. 6)

nensonde über einen beliebigen Punkt stillstehend gehalten, während ein Kristallspektrometer mit einem automatischen Schreiber die Intensität der verschiedenen Röntgenlinien aussortiert (Abb. 13).

Obwohl dieses «Röntgenrastermikroskop» bis jetzt eine Auflösung von nur  $0,5$  bis  $1 \mu$  besitzt, hat es schon viele Anwendungen in der Geologie, in der industriellen Biologie und besonders in der Metallurgie<sup>45</sup> gefunden. Man kann ein Element mit einer Genauigkeit von  $0,1\%$  in einem Volumen von ungefähr  $1$  Kubikmikron quantitativ analysieren, d. h. seine örtliche Verteilung bis zu einer Menge von  $10^{-14}$  g feststellen. Daher ist es möglich, Fremdelemente, Ausscheidungen usw. in kleinster Menge und in den frühesten Stadien eines Vorganges zu identifizieren. Obwohl die Unterscheidung zwischen Karbiden und Nitriden in eisenhaltigen Metallen noch nicht ge-

<sup>42</sup> R. CASTAING, Thesis, Paris 1951.

<sup>43</sup> P. DUNCUMB und V. E. COSSLETT, siehe <sup>8</sup>, S. 374; *Proceedings of the Conference on Electron Microscopy, Stockholm 1956* (ALMQVIST und WIKSELL), Stockholm 1957, S. 12.

<sup>44</sup> P. DUNCUMB, siehe <sup>8</sup>, S. 617.

<sup>45</sup> D. A. MELFORD und P. DUNCUMB, *Metallurgia* 57 (1958) 341.

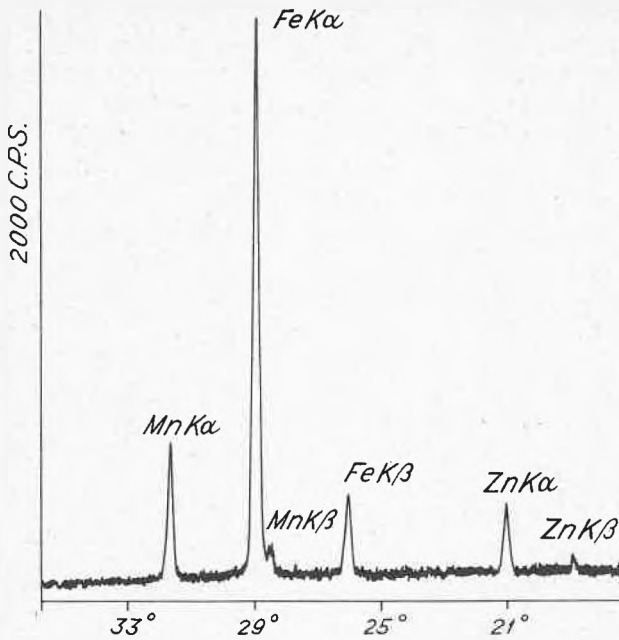


Abb. 13. Relative Intensität der charakteristischen Röntgenemissionslinien von ungefähr  $10^{-12}$  cm<sup>3</sup> eines Ferrites (P. DUNCUMB, unveröffentlicht)

lungen ist, stehen nur technische Hindernisse in dem Wege: Man braucht ein empfindliches Registriersystem für sehr weiche Röntgenstrahlen (30–50 Å). Die örtliche Auflösung kann wahrscheinlich noch um eine Größenordnung besser, bis  $0,1 \mu$  gemacht werden. Wegen Ver-

minderung der Röntgenintensität wird es sehr schwierig, mit noch kleineren Elektronensonden ein Oberflächenbild zu erhalten. Punktweise quantitative Analyse in kleineren Bezirken wird man jedoch machen können, denn man braucht nur mit dem Zählrohr länger zu registrieren, wenn die Intensität abfällt. Daher kann man eine untere Grenze für die Mikroanalyse noch nicht abschätzen; wahrscheinlich liegt sie in der Größenordnung von wenigen hundert Ångström-Einheiten.

#### Schlußbemerkungen

Es ist nicht möglich gewesen, in diesen paar Zeilen mehr als einen Überblick über die Fortschritte in der Röntgenmikroskopie in den letzten Jahren zu geben. Die Einzelheiten und insbesondere die Beschreibung der sehr wichtigen und umfangreichen Anwendungen der Kontaktmikroradiographie in der Biologie sind aus den Referaten und in erster Linie aus den *Proceedings of the Cambridge X-Ray Symposium* sowie aus den zusammenfassenden Berichten<sup>41, 46, 47</sup> zu entnehmen. Hoffentlich hat diese kurze Skizze jedoch klargemacht, wie weit die neuen Methoden von physikalischem und auch chemischem Interesse sind, einerseits für sich selber, andererseits als Ergänzung der bestehenden mikroskopischen Forschungsmethoden.

<sup>46</sup> G. HILDENBRAND, *Ergeb. exakt. Naturwiss.* 30 (1958) 1.

<sup>47</sup> V. E. COSSLETT und W. C. NIXON, *X-Ray Microscopy*, Cambridge, im Druck.