



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 30 356 T2** 2008.05.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 334 339 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 30 356.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/HU01/00116**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 996 722.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/040953**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.11.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **23.05.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.08.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **05.09.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.05.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01J 4/00** (2006.01)
G02B 21/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0004571 17.11.2000 HU

(73) Patentinhaber:

**Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai
Központ, Szeged, HU**

(74) Vertreter:

**Müller - Hoffmann & Partner Patentanwälte, 81667
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**GARAB, Gyozo, H-6720 Szeged, HU; POMOZI,
István, H-1138 Budapest, HU; WEISS, Georg,
07743 Jena, DE; JÖRGENS, Reinhard, 73550
Waldstetten, DE**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR BESTIMMUNG DER POLARISATIONSEIGENSCHAFTEN
VON LICHT, DAS DURCH EIN MATERIAL EMITTIERT, REFLEKTIERT ODER DURCHGELASSEN WIRD, DURCH
VERWENDUNG EINES LASER-SCAN-MIKROSKOPS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Bestimmen der Polarisations-eigenschaften von durch ein Material emittiertem, reflektiertem oder transmittiertem Licht unter Verwendung eines Rasterlasermikroskops.

[0002] Bei Verwendung eines Rasterlasermikroskops (RLM) werden ausgewählte Punkte (wohldefinierte Volumeneinheiten) des getesteten Materials durch einen fokussierten Laserstrahl bestrahlt, woraufhin Information zur Intensität des transmittierten, reflektierten oder emittierten Lichts erhalten wird, die allgemein in digitaler Form gespeichert werden kann. Das Signal des Rasterlasermikroskops während des Abrasterns eines Felds vorbestimmter Breite und Länge wird dazu verwendet, ein Bild hoher Auflösung für detaillierte Analyse zu erhalten. Die Bildqualität kann unter Verwendung des RLM im Konfokalmodus weiter erhöht werden, wobei der Störungseffekt von Licht, das von anderen Punkten als dem Brennpunkt herrührt, im Wesentlichen ausgeschlossen werden kann. Bei den meisten kommerziell erhältlichen Rasterlasermikroskopen (wie Zeiss 410 oder 510) bildet der Konfokalmodus ein Grundmerkmal, jedoch kann er nur für reflektiertes oder emittiertes Licht (Fluoreszenz) verwendet werden. Der Konfokalmodus eines Rasterlasermikroskops sorgt für eine nicht-zerstörende, optische Scheibenbildung der Probe und eine Rekonstruktion dreidimensionaler "Bilder". Unter Verwendung eines Zwei- oder Mehrphotonenanregungsverfahrens mit einem Laser, das streng auf das Testgebiet eingeschränkt werden kann, wodurch der störende Effekt der Hintergrundstrahlung (Intensität) praktisch vollständig beseitigt werden kann, kann eine stark verbesserte Bildqualität erzielt werden (A. Diaspro und M. Robello: Multi-Photon Excitation Microscopy to Study Biosystems, European Microscopy and Analysis, März 1999).

[0003] Rasterlasermikroskope sorgen – im Vergleich mit herkömmlichen Mikroskopen und Verfahren – für Information der Probenstruktur mit hoher Qualität und hoher Auflösung. Dennoch liefern diese Verfahren keinerlei Information zur Anisotropie und vielen anderen physikalischen Wechselwirkungen der Probe, die nur durch Polarisations-spektroskopieverfahren untersucht werden können.

[0004] Die Verwendung von polarisiertem Licht liefert Bilder der Probe, die Information zur anisotropen Struktur, beispielsweise die räumliche Anordnung der Übergangsdipole, und zur physikalischen Wechselwirkung zwischen einander und der Mikroumgebung enthalten. Die anisotropen Eigenschaften der Materialien beeinflussen allgemein die Polarisations-eigenschaften des durch die Materialien auf anisotrope Weise emittierten, reflektierten oder transmittierten Lichts, weswegen die Untersuchung der Polarisati-

onseigenschaften des durch die Materialien emittierten, reflektierten oder transmittierten Lichts Schlussfolgerungen betreffend die optische Anisotropie und auch die Molekulanordnung des getesteten Materials ermöglicht. Mit polarisiertem Licht ausgeführte Messungen (LD: Lineardichroismus, CD: Zirkulardichroismus) sind von T. C. Oadkberg in Application note, Stokes Polarimetry, Hinds Instruments Inc., 1991 beschrieben. Ein ähnliches Verfahren kann auch zum Messen der Doppelbrechung verwendet werden. Die lineare Polarisation der Lumineszenzemission liefert wichtige Information zur Anisotropie der Emissionsdipole, weswegen die Charakteristik des Anisotropiewerts (R) hierfür wichtige Information zur Materialstruktur liefert, die durch andere Techniken nicht erhalten wird. Der Anteil zirkular polarisierter Lumineszenz (CPL) der Emission (des emittierten Lichts) liefert wichtige Information zur chiralen Struktur des Materials, wenn es angeregt ist, die auf keine andere Weise erhalten werden kann. Weitere wichtige Information ist der Grad der Polarisation (P) der Fluoreszenz, der eine Schlussfolgerung zur Energieübertragung zwischen den Dipolen, der Mikroviskosität der Molekülmgebung, der Anregungslebensdauer und anderer wichtiger Parameter erlaubt. Die Definition, Messung und der physikalische Inhalt von P, R und CPL sind von J. R. Kakovicz in seinem Buch "Principles of Fluorescence Spectroscopy" Plenum Press New York, 1983 und I. Z. Steinberg in seinem in Methods in Enzymology veröffentlichten Bericht detailliert angegeben.

[0005] Während einer Differenzpolarisations-Bildaufnahme, wie sie von Kim et al. in "Differential polarization imaging 1. Theory", in Biophysical Journal Nr. 52(6):911–927 DEC 1987 veröffentlicht ist, werden zwei verschiedene Bilder der Probe unter Verwendung von orthogonal polarisiertem Licht erzeugt, wobei die zugehörige, Intensitäts-normierte Differenzinformation zur anisotropen Struktur des Materials oder der Probe liefert. Der CD-, LD und andere Differenzpolarisationswerte des transmittierten Lichts liefern wichtige Information zur anisotropen Struktur des Materials, die durch andere Techniken nicht verfügbar ist.

[0006] Die Polarisations-eigenschaften der Fluoreszenz (des emittierten Lichts) können im Prinzip dadurch bestimmt werden, dass ein Polarisatorbauelement (beispielsweise ein Polarisationsfilter) vor dem RLM-Detektor platziert wird, das Polarisationsfilter zwischen zwei Winkelpositionen zum Durchlassen der orthogonalen Komponenten linear polarisierten Lichts gedreht wird, und zwei Bilder aufeinanderfolgend an den beiden Positionen des Polarisationsfilters aufgenommen werden. Obwohl dieses Verfahren mit dem Zubehör zum RLM Zeiss 410 ausgeführt werden kann, liefert es wegen der zeitlichen Schwankung der Fluoreszenzintensität, insbesondere bei biologischen Proben, keine zufriedenstellenden Ergeb-

nisse. Ein weiteres Problem kann die Intensitätsvariation des beleuchtenden Laserlichts bilden. Auch können Schwingungen und Bewegungen der Probe oder des Tisches zu einer deutlichen Verzerrung führen.

[0007] US 5,457,536 schlägt eine Verbesserung am RLM von Zeiss vor, wodurch das Rasterlasermikroskop für universelle Anwendung eine punktweise Messung des Dichroismus und der Doppelbrechung des durch die Probe gestrahlten Lichts ausführen kann. Der auf die Probe gerichtete Laserstrahl wird durch einen zwischen die Laserlichtquelle und die Probe eingefügten Polarisationszustandsgenerator moduliert. Um eine Polarisationskomponente des durch die Probe gestrahlten Lichts auszuwählen, existiert auf der anderen Seite der Objektebene ein Polarisationsanalysator. Der Ausgang des Analysator ist mit einem Fotodetektor verbunden, der mit einem Ausgang einer Demoduleereinheit verbunden ist. Ein Nachteil dieser Konfiguration besteht darin, dass bei den meisten RLMs während LD-, und CD- und Doppelbrechungsmessungen, die nur im Transmissionsmodus ausgeführt werden können, der Konfokalmodus nicht verfügbar ist. Dieses Verfahren ermöglicht keine Messung des Polarisationsinhalts des emittierten oder reflektierten Lichts, und damit keine Messung der Anisotropie bei der linearen oder zirkularen Polarisation (r, CPL) der Emission (des emittierten Lichts). Dies bildet einen Hauptnachteil beim Untersuchen biologischer Proben, bei denen in weitem Umfang konfokale Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Bei den meisten biologischen Anwendungen kann wichtige Information zur räumlichen Anordnung der verschiedenen Komponenten dadurch erhalten werden, dass die Emission mehrerer Chromophore beobachtet wird. Jede Einzelinformation transportiert andere Polarisationsinformation, die mit den genannten herkömmlichen Techniken nicht analysiert werden kann. Bei vielen RLMs ist es nicht möglich oder sehr schwierig, wegen der Kopplung des Laserlichts mittels einer optischen Faser das Laserlicht zu modulieren. Es ist auch von Nachteil, dass keine Möglichkeit besteht, den Polarisationsinhalt des Lichts vollständig detailliert zu charakterisieren, weswegen einige wichtige Parameter – die den Elementen der Müller-Matrix zugewiesen sind – nicht bestimmt werden können.

[0008] Daher ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren und eine Vorrichtung zu schaffen, die die Vorteile der Rasterlasermikroskopie und der Polarimetrie kombinieren, wobei die Kombination zu mehr mit einem einzelnen Verfahren gemessenen Parametern führt, oder mit verschiedenen Konfigurationen einer einzelnen Vorrichtung mit speziellem Hinblick auf die Parameter der emittierten Fluoreszenz, wie im Konfokalmodus bei einer einzelnen oder mehreren Wellenlängen im Wesentlichen gleichzeitig gemessen, oder im Hinblick auf die Möglichkeit einer

möglichst kompletten Analyse des Polarisationsinhalts von emittierten, transmittiertem oder reflektiertem Licht.

[0009] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, die Fehler zu eliminieren oder zu kompensieren, die sich aus einer Wellenlängenabhängigkeit und der Polarisationsverzerrung der optischen Bauteile während den Messungen ergeben.

[0010] Diese Ziele werden durch ein Verfahren zum Bestimmen von Polarisationsdifferenzwerten von durch ein Testmaterial emittiertem, reflektiertem oder transmittiertem Licht mit einem Rasterlasermikroskop vom Typ mit Rasterstrahl erreicht. Das Testmaterial wird durch einen Laserstrahl mit bekanntem und einstellbarem oder variablem Polarisationszustand beleuchtet. Gemäß der Erfindung verfügt das Verfahren über die folgenden Schritte:

- Empfangen von Licht von jedem beleuchteten Punkt des Materials, wobei das Licht über einen durch das Material modifizierten Polarisationszustand verfügt oder der Polarisationszustand derjenige des durch das Material emittierten Lichts ist;
- Messen der Intensität zweier orthogonaler Polarisationskomponenten des von jedem beleuchteten Punkt des Materials empfangenen Lichts im Wesentlichen zur gleichen Zeit, und Zuweisen eines Signals zu jeder gemessenen Intensität; und
- Erzeugen eines Differenzsignals aus den zwei gemessenen Intensitätssignalen, um einen Polarisationsdifferenzwert zu erhalten, der für einen jeweiligen Bildpunkt des Materials repräsentativ ist.

[0011] Gemäß einer weiteren Erscheinungsform der Erfindung wird die Intensitätsdifferenz der orthogonalen Polarisationskomponenten entsprechend der ausgeführten Messung durch die Werte 1 , $I_1 + I_2$, $I_1 + 2I_2$ oder irgendeinen anderen Wert, wie er einem Element der Müller-Matrix zugewiesen ist und durch Messen oder Berechnen bestimmt ist, geteilt.

[0012] Gemäß einer anderen Erscheinungsform der Erfindung wird der Lichtstrahl entsprechend dem Polarisationszustand oder einem vorbestimmten Prozentsatz der Intensität des Lichts in zwei verschiedene Strahlen aufgeteilt, und in jedem der Teillichtstrahlen wird die Intensität nur einer der Polarisationskomponenten gemessen.

[0013] Gemäß einer weiteren Erscheinungsform der Erfindung wird die Phase zwischen den Polarisationskomponenten eines vom Material empfangenen Lichtstrahls periodisch entsprechend einer Funktion mit vorbestimmter Frequenz und Form zwischen zwei Endpositionen variiert, und die Polarisationskomponenten werden anschließend mit demselben Analysator gemessen.

[0014] Die Phase zwischen den Polarisationskomp-

onenten des vom Material empfangenen Lichtstrahls variiert vorzugsweise entsprechend einer Sinusfunktion zwischen den zwei Endpositionen.

[0015] Auch kann die Wellenlängenabhängigkeit der Polarisationsseigenschaften durch das Verfahren gemäß der Erfindung bestimmt werden, wobei dem Schritt des Variierens der Phase zwischen den Polarisationskomponenten des vom Material empfangenen Lichtstrahls ein weiterer Schritt folgt, gemäß dem der Lichtstrahl entsprechend ausgewählten Wellenlängen unterteilt wird und Messungen in jedem der Teillichtstrahlen gleichzeitig ausgeführt werden. Die Fehler der gemessenen Werte können falls erforderlich kompensiert werden.

[0016] Gemäß einer anderen Erscheinungsform der Erfindung wird die Phase zwischen den Polarisationskomponenten des beleuchteten Lichtstrahls periodisch entsprechend einer Funktion (vorzugsweise einer Sinusfunktion) mit vorbestimmter Frequenz und Form zwischen zwei Endpositionen variiert, und die Werte FDLC und FDCD werden durch periodisches Messen der Intensität des durch das Material emittierten Lichts mit vorbestimmter Frequenz ($2f$ und f) und Phase bestimmt.

[0017] Messungen in einem Konfokalmodus beinhalten auch den Schritt des Auswählens der vom Brennpunkt des Laserlichts auf der Probe empfangenen Lichtkomponente und zum Ausschließen derjenigen Lichtkomponenten, die von anderen Punkten als dem Brennpunkt empfangen werden. Dies ermöglicht eine optische Scheibenbildung der Probe.

[0018] Gemäß einer weiteren Erscheinungsform der Erfindung wird zum Beleuchten der Probe und zum praktisch gleichzeitigen Veranlassen einer Zwei- oder Mehrphotonenanregung in den Molekülen der Probe Laserlicht verwendet, das eine räumliche und/oder zeitliche Intensitätskonzentration erlaubt. Dieses Verfahren sorgt automatisch für den Vorteil einer konfokalen Messung. Die Probe kann unter Verwendung sehr kurzer Bestrahlungszeiten der einzelnen Pixel abgerastert und für eine längere Zeitperiode gemessen werden, ohne durch das Laserlicht nachteilig beeinflusst zu werden.

[0019] Das Verfahren gemäß der Erfindung sorgt für eine einfache Art zum Bestimmen der Stokes-Parameter (I , Q , U , V) in mindestens einem der Lichtstrahlen des Mikroskops.

[0020] Durch die Erfindung ist ein Verfahren geschaffen, mit dem die Elemente der Müller-Matrix in einem transmittierten oder reflektierten Laserstrahl im Mikroskop durch Ändern des Polarisationszustands des beleuchtenden Laserlichts in vier Schritten (depolarisiert, linear polarisiert mit 0 (oder 90 Grad), linear polarisiert mit $+45$ (oder -45 Grad) und

zirkular polarisiert) bestimmt werden können, während die Stokes-Parameter (I , Q , U , V) in jedem der vier Zustände bestimmt werden.

[0021] Die Ziele der Erfindung werden durch eine Vorrichtung zum Bestimmen der Polarisationsdifferenzwerte von Licht, das durch ein Testmaterial emittiert, reflektiert oder transmittiert wird, erreicht, die über ein Rasterlasermikroskop vom Rasterstrahltyp und ferner Folgendes verfügt:
eine Laserlichtquelle zum Erzeugen eines Laserlichtstrahls, der das Testmaterial oder die Probe punktweise beleuchtet;
einen Polarisationszustandsgenerator, der zwischen der Laserlichtquelle und dem Material oder der Probe, die getestet wird, angeordnet ist, um einen Strahl mit bekanntem und einstellbarem variablem Polarisationszustand zu erzeugen; und
einen Detektor zum Bestimmen der Intensität des Lichts mit einem durch die Probe modifizierten Polarisationszustand oder der Intensität des Lichts mit dem Polarisationszustand des durch die Probe emittierten Lichts, wobei der Detektor das Licht empfängt.

Gemäß der Erfindung

ist eine Einrichtung zum räumlichen oder zeitlichen Aufteilen orthogonaler Polarisationskomponenten zwischen der Probe und dem Detektor angeordnet; und
mit dem Ausgang des Detektors ist eine Verarbeitungseinheit zum Bestimmen der Intensität zweier orthogonaler Polarisationskomponenten und zum Erzeugen der Intensitätsdifferenz dieser Polarisationskomponenten verbunden, um einen Polarisationsdifferenzwert zu erhalten, der für einen jeweiligen Bildpunkt des Testmaterials oder der Probe repräsentativ ist.

[0022] Die Vorrichtung gemäß der Erfindung kann im vom Material empfangenen Lichtstrahl ein optisches Bauteil zum räumlichen Aufteilen der Polarisationskomponenten entsprechend ihrem Polarisationszustand oder entsprechend einem vorbestimmten Prozentsatz der Intensität aufweisen, mit einem Detektor in den entsprechend dem Polarisationszustand der Polarisationskomponenten aufgeteilten Lichtstrahlen, oder mit einem Detektor und einem Analysator vor dem Detektor zum selektiven Durchlassen einer der Polarisationskomponenten in den Lichtstrahlen, die entsprechend einem vorbestimmten Prozentsatz der Intensität aufgeteilt wurden.

[0023] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist im vom Material empfangenen Lichtstrahl ein Photoelastizitätsmodulator (PEM, Kerr-Zelle oder dergleichen) vorhanden, um die Polarisationskomponenten zeitlich zu unterteilen und vor dem Detektor ist ein passiver Polarisationsanalysator vorhanden.

[0024] Um die Wellenlängenabhängigkeit der Polarisationsparameter zu bestimmen, kann die Verfahren gemäß der Erfindung mindestens einen Wellenlängen-selektiven Strahlteiler zwischen dem passiven Polarisationsanalysator und dem Detektor aufweisen, und ferner können in den durch den Wellenlängen-selektiven Strahlteiler aufgeteilten Lichtstrahlen weitere Detektoren vorhanden sein.

[0025] Um den Polarisationszustand des beleuchtenden Laserlichts zu modulieren, kann die Vorrichtung mit einer Polarisationszustand-Einstelleinheit mit einem passiven optischen Polarisationsbauelement und einem Polarisationsmodulator (PEM) versehen sein.

[0026] Die Vorrichtung kann auch mit einer feinen Lochblende im von der Probe empfangenen Lichtstrahl versehen sein, um die auf die Probe fokussierte Lichtkomponente auszuwählen.

[0027] Es kann auch von Vorteil sein, die Vorrichtung mit einer Laserlichtquelle zum Erzeugen von räumlich und/oder zeitlich konzentriertem Laserlicht für Zwei- oder Mehrphotonenanregung der Moleküle der Probe zu versehen.

[0028] Um die Stokes-Parameter zu bestimmen, kann die Vorrichtung gemäß der Erfindung zwischen dem Photoelastizitätsmodulator und dem passiven Polarisationsanalysator einen zweiten Photoelastizitätsmodulator (PEM) aufweisen, dessen optische Achse um 45 Grad in Bezug auf die optische Achse des ersten Photoelastizitätsmodulators (PEM) gedreht ist.

[0029] Um die Elemente der Müller-Matrix zu bestimmen, kann die Verfahren gemäß der Erfindung mit einem Polarisationszustandsgenerator mit einem Depolarisator, einem Linear- oder Zirkularpolarisator und einem optischen Phasenverzögerer oder irgendeiner Kombination hiervon versehen sein.

[0030] Um beleuchtendes Laserlicht mit moduliertem Polarisationszustand zu liefern, kann die Polarisationszustand-Einstelleinheit der Vorrichtung einen Photoelastizitätsmodulator (PEM) aufweisen, der zwischen zwei passiven Linearpolarisatoren mit zueinander parallelen oder orthogonalen Polarisations Ebenen versehen ist, wobei die optische Achse des Photoelastizitätsmodulators (PEM) unter 45 Grad in Bezug auf die passiven Linearpolarisatoren eingestellt ist, wobei hinter dem zweiten Linearpolarisator ferner ein Depolarisator vorhanden ist.

[0031] Gemäß der Erfindung verfügt die Vorrichtung zum Bestimmen der Polarisationsdifferenzwerte, einschließlich des durch Fluoreszenz erfassten, linearen und zirkularen Dichroismus (FDLD, FDCD) des emittierten, durch anisotrop absorbierende Restmateriali-

en reflektierten Lichts, über ein Rasterlasermikroskop vom Rasterstrahltyp mit einem Polarisationszustandsgenerator. Die Vorrichtung weist ferner Folgendes auf:

eine Laserlichtquelle zum Erzeugen eines Laserlichtstrahls, der das Testmaterial oder die Probe punktweise beleuchtet;

ein passives optisches Polarisationsbauelement und einen Polarisationsmodulator zwischen der Laserlichtquelle und dem Testmaterial oder der Probe, um polarisiertes Laserlicht mit einer modulierten Polarisationsorientierung zu erzeugen, die zwischen orthogonalen Polarisationszuständen durchgeföhren wird.

[0032] Gemäß der Erfindung weist die Vorrichtung auch Folgendes auf: einen Detektor zum Bestimmen der Intensität von Reflexionslicht, dessen Polarisationszustand durch die Probe polarisiert wird oder der Intensität von durch die Probe emittiertem Licht, in Zuordnung zu den Polarisationskomponenten des beleuchtenden Lichts, wobei das Material oder die Probe im durch die Probe reflektierten oder emittierten Laserstrahl positioniert ist; und eine Verarbeitungseinheit zum Bestimmen der Intensität zweier orthogonaler Polarisationskomponenten und zum Erzeugen der Intensitätsdifferenz derselben, um einen Polarisationsdifferenzwert zu erhalten, der für einen jeweiligen Bildpunkt des Materials repräsentativ ist, wobei diese Einheit mit dem Ausgang des Detektors verbunden ist.

[0033] Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, kann die Vorrichtung gemäß der Erfindung mit einem Polarisationszustandsgenerator mit einem Photoelastizitätsmodulator (PEN) versehen sein, der zwischen zwei passiven Linearpolarisatoren positioniert ist, deren Polarisations Ebenen parallel oder orthogonal zueinander verlaufen, wobei die optische Achse des Photoelastizitätsmodulators (PEM) unter 45 Grad in Bezug auf die passiven Linearpolarisatoren eingestellt ist, und ferner mit einem Depolarisator hinter dem zweiten Linearpolarisator.

[0034] Um die gemessenen Signale zu wandeln und zu verarbeiten, und um die Fehler während der Messung zu kompensieren, kann die Vorrichtung gemäß der Erfindung mit einer Signalverarbeitungseinheit versehen sein, die mit dem Ausgang des mindestens einen Detektors verbunden ist. Die Signalverarbeitungseinheit verfügt über mindestens einen Lockinverstärker, ein Tiefpassfilter und einen Analog-Digital-Wandler. Bei digitaler Signalverarbeitung und einer Bilderzeugungseinheit mit analogem Eingang ist in der Signalverarbeitungseinheit auch ein Digital-Analog-Wandler erforderlich.

[0035] Die Erfindung wird nun gemäß den beigefügten Zeichnungen detaillierter beschrieben.

[0036] [Fig. 1](#) ist ein schematisches Diagramm einer

Vorrichtung gemäß der Erfindung mit zwei Kanälen zum Arbeiten in einem Emissions- oder Reflexionsmodus;

[0037] [Fig. 2](#) ist ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung gemäß der Erfindung mit zwei Kanälen zum Arbeiten in einem Emissions- oder Reflexionsmodus;

[0038] [Fig. 3](#) ist ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung gemäß der Erfindung mit einem Kanal, um entsprechend dem Modulationsprinzip zu arbeiten;

[0039] [Fig. 4](#) ist ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung gemäß der Erfindung, die gemäß dem Modulationsprinzip arbeitet, um bei verschiedenen Wellenlängen zu messen;

[0040] [Fig. 5](#) ist ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung gemäß der Erfindung, um die Stokes-Parameter zu messen;

[0041] [Fig. 6](#) ist ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung gemäß der Erfindung, um die Elemente der Müller-Matrix zu bestimmen;

[0042] [Fig. 7](#) ist ein schematisches Diagramm einer Signalverarbeitungs- und Bilderzeugungseinheit zum Anzeigen der gemessenen Werte;

[0043] [Fig. 8](#) ist ein schematisches Diagramm einer in der Vorrichtung gemäß der Erfindung verwendeten Signalverarbeitungseinheit;

[0044] [Fig. 9](#) ist ein schematisches Diagramm einer Vorrichtung gemäß der Erfindung, um die FDLD- und die FDCD-Werte zu bestimmen; und

[0045] [Fig. 10](#) ist ein Diagramm zum Veranschaulichen eines Verfahrens zum Kompensieren eines Sinusfehlers der Photoelastizitätsmodulatoren.

[0046] Die [Fig. 1](#) zeigt eine zweikanalige Konfiguration mit einer Probe und einem Objektisch **6**, der mit Laserlicht einer Laserlichtquelle **1** beleuchtet wird, wobei das Laserlicht durch eine Polarisationszustand-Einstelleinheit **2** geschickt wird. Das reflektierte Licht oder das Fluoreszenzlicht wird durch einen Strahlteiler **4** (beispielsweise einen halbdurchlässigen Spiegel) abgelenkt. Auf diese Art werden durch einen zweiten Strahlteiler **8** zwei Lichtstrahlen erzeugt. In beiden Lichtstrahlen ist ein jeweiliger Detektor **16** bzw. **17** vorhanden, um ein Ausgangssignal proportional zur Lichtintensität zu erzeugen, das in Signalverarbeitungseinheiten **18** eingegeben wird. In jedem der Kanäle cs1 und CS2 wird die Intensität nur einer Polarisationskomponente gemessen. Als Strahlteiler **8** kann ein halbdurchlässiger Spiegel verwendet werden. In diesem Fall wird der eintretende

Lichtstrahl mit einem vorgegebenen Intensitätsverhältnis aufgeteilt. In einem der Teillichtstrahlen kann ein weiterer Spiegel **9** platziert werden, um einen ausgewählten Lichtstrahl abzulenken. Beide Teillichtstrahlen (abgelenkte Lichtstrahlen) enthalten alle Polarisationskomponenten, weswegen die zu messenden Polarisationskomponenten durch passive Polarisationsanalysatoren **12** und **13** gemessen werden müssen, die vor dem Detektor **16** bzw. **17** positioniert sind. Als Strahlteiler **8** kann auch ein polarisierender Strahlteiler (beispielsweise ein Wollaston-Prisma oder dergleichen) verwendet werden, um im ersten Teilstrahl nur eine erste Polarisationskomponente durchzulassen und im zweiten Teilstrahl nur eine zweite Polarisationskomponente durchzulassen. Polarisierende Strahlteiler sind kommerziell von Melles Griot oder Oriel erhältlich. Spezielle polarisierende Strahlteiler sind auch von OZ Optics, Ltd. erhältlich. Im abgelenkten Lichtstrahl kann, falls erforderlich, ein weiterer Spiegel **9** platziert sein, um in diesem Fall den Lichtstrahl des Kanals cs1 zum Detektor **16** abzulenken. Wenn ein polarisierender Strahlteiler **8** verwendet wird, sind keine passiven Polarisationsanalysatoren **12** und **13** erforderlich. In den Lichtstrahlen der Kanäle cs1 und cs2 sowie vor den Detektoren **16** und **17** können auch Farbfilter **14** und **15** verwendet werden, um die Intensität des unerwünschten Lichts zu schwächen. In den Lichtstrahlen der Kanäle cs1 und cs2 positionierte Blenden **10** bzw. **11** können für konfokale Bilderzeugung erforderlich sein. Messungen in einem Konfokalmodus beinhalten auch den Schritt des Auswählens der vom Brennpunkt des Laserlichts auf der Probe empfangenen Lichtkomponente, wobei Lichtkomponenten ausgeschlossen werden, die von anderen Punkten als dem Brennpunkt empfangen werden. Dies ermöglicht eine optische Schichtbildung der Probe. Im von der Probe **5** empfangenen Lichtstrahl kann auch, vorzugsweise vor dem Strahlteiler, ein Phasenverzögerer **7** (Viertelwellenlängenplatte) dazu verwendet werden, ein Auswählen der zirkular polarisierten Komponenten selbst dann zu ermöglichen, wenn nur linear polarisierende Strahlteiler oder Analysatoren verwendet werden. Die Anordnung der [Fig. 1](#) ist eine mögliche Ausführungsform zum gleichzeitigen Messen der Intensität zweier verschiedener Polarisationskomponenten, wie sie von der pixelweise beleuchteten Probe durch das Rasterlasermikroskop empfangen werden. Die proportional zu den Intensitätswerten verlaufenden analogen Signale werden in die Signalverarbeitungseinheit **18** eingegeben, wo erforderliche Wandlungs-, Berechnungs- und Korrekturvorgänge ausgeführt werden. Auf Grundlage der zwei Polarisationskomponenten I_1 und I_2 , die im Wesentlichen orthogonal zueinander sind, wird das Ausgangssignal durch eine der folgenden Formeln oder eine der Formeln berechnet, die zum Bestimmen der Elemente der Müller-Matrix verwendet werden:

$$I_{\text{out}} = I_1 - I_2 \quad (1)$$

$$I_{\text{out}} = (I_1 - I_2)/(I_1 + I_2) \quad (2)$$

$$I_{\text{out}} = (I_1 - I_2)/(I_1 + 2I_2) \quad (3)$$

[0047] Die Formel (3) wird vorzugsweise beim Messen der Anisotropie von mit Zylindersymmetrie orientierten Emissionsdipolen verwendet. Die durch das Verfahren gemäß der Erfindung gemessenen Polarisationskomponenten sind orthogonal zueinander. Die sich ergebenden Werte der obigen Formeln werden durch die Signalverarbeitungseinheit **18** bestimmt. Einer der obigen Rechenvorgänge wird für jedes der Pixel (beleuchtete Punkte der Probe) ausgeführt, und das Ergebnis wird in einer Speichereinrichtung abgespeichert. Die abgespeicherte Bildinformation wird auf einer Anzeigeeinrichtung (Schirm, Monitor usw.) durch eine Videosignalverarbeitungseinheit und durch Software angezeigt.

[0048] Bei einer Ausführungsform wird das Ausgangssignal der Signalverarbeitungseinheit **18** einfach zum Bildsignaleingang des RLM geliefert. Bei einer anderen Ausführungsform, wie sie in der [Fig. 7](#) veranschaulicht ist, wird das Synchronisiersignal zum Scannen/Rastern des Laserlichts des RLM und des Ausgangssignals der Signalverarbeitungseinheit **18** ferner durch eine elektronische Steuerungseinheit, beispielsweise einen Computer COMP, zu einem Bildsignal verarbeitet, und dann wird das Bild auf einem Monitor MON angezeigt.

[0049] Die in der [Fig. 2](#) dargestellte Ausführungsform unterscheidet sich von der aus der [Fig. 1](#) erkennbaren Ausführungsform nur dadurch, dass das Laserlicht **3** durch die Probe **5** läuft und die Messungen am transmittierten Licht ausgeführt werden. Für die Messungen werden dieselben Elemente verwendet, wie sie aus der [Fig. 1](#) erkennbar sind. Dieselben Elemente in der [Fig. 2](#) sind mit denselben Bezugszeichen derselben Elemente in der [Fig. 1](#) markiert. Der Spiegel **4'** ist bei diesem Beispiel nicht notwendigerweise ein halbdurchlässiger Spiegel, sondern es kann ein beliebiger optischer Spiegel verwendet werden.

[0050] In der [Fig. 3](#) ist eine andere Ausführungsform der Erfindung zum Messen der anderen Polarisation ohne Aufteilung des von der Probe empfangenen Lichtstrahls, d.h. unter Verwendung nur eines Lichtstrahls, dargestellt. Um dies zu bewerkstelligen, ist eine Anordnung zum zeitlichen Trennen der Polarisationskomponenten verwendet. Zu diesem Zweck wird die Phase zwischen den Polarisationskomponenten des von der Probe **15** empfangenen Lichtstrahls periodisch entsprechend einer Funktion mit vorbestimmter Frequenz und Form (vorzugsweise entsprechend einer Sinusfunktion) zwischen zwei Endpositionen variiert, und die Polarisationskomponenten werden anschließend durch denselben Analysator **25** mit demselben Detektor **27** gemessen.

Zum periodischen Variieren der Phase zwischen den Polarisationskomponenten, ein Polarisationsmodulator, wie ein Photoelastizitätsmodulator (PEM), ein elektrooptischer Modulator (EOM), ein akustooptischer Modulator, eine Kerr-Zelle, eine Pockels-Zelle oder dergleichen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform, wie sie in der [Fig. 3](#) dargestellt ist, wird vor einem Detektor **27** zum Messen der Lichtintensität ein Photoelastizitätsmodulator **23** verwendet, wobei ein dazu proportionales Ausgangssignal geliefert wird. Um nur eine Polarisationskomponente auszuwählen, ist zwischen dem Detektor **27** und dem Photoelastizitätsmodulator **23** ein passiver Polarisationsanalysator **25** verwendet. Ein geeigneter Photoelastizitätsmodulator ist von Hinds Instruments unter der Handelsbezeichnung I/FS50 erhältlich, jedoch können andere Typen oder Einrichtungen mit derselben Wirkung verwendet werden. Der Ausgang des Detektors **27** ist mit einem Eingang der Signalverarbeitungseinheit **28** auf dieselbe Weise, wie sie bereits aus den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) zu ersehen waren, verbunden.

[0051] Vor dem Detektor **27** kann auch ein Farbfilter **26** verwendet werden, um die Intensität des unerwünschten Hintergrundlichts zu schwächen. Eine im Lichtstrahl positionierte Blende **21** kann für konfokale Bilderzeugung erforderlich sein. Im von der Probe **5** empfangenen Lichtstrahl kann auch, vorzugsweise vor dem Photoelastizitätsmodulator **23**, ein Phasenverzögerer **22** (Viertelwellenlängenplatte) verwendet werden, um die Auswahl der zirkular polarisierten Komponenten selbst dann zu ermöglichen, wenn nur ein linearer Polarisationsanalysator verwendet wird.

[0052] Bei der genannten einkanaligen Konfiguration kann die Anzahl der für die Messungen verwendeten Elemente im Wesentlichen auf die Hälfte verringert werden, was auch zu einer wesentlichen Kostensenkung führt. Außer den wirtschaftlichen Vorteilen besteht ferner ein technischer Nutzen dahingehend, dass die Messung im selben Lichtstrahl mit denselben elektrooptischen Bauteilen ausgeführt werden kann, was Fehler aufgrund von Toleranzen der Bauteile verringert. Der Photoelastizitätsmodulator **23** wird durch ein elektrisches Signal mit vorbestimmter Frequenz und Form, wie eine Sinuswechselspannung, gesteuert, wobei die Steuerung zu einer sich sinusförmig ändernden Breite d des Photoelastizitätsmodulators entsprechend $d = d_0 + A \cdot \sin(2\pi f t)$ führt. Die Anfangsbreite des Photoelastizitätsmodulators ohne jede angelegte Steuerspannung ist d_0 . Die Maximalbreite ist $d_0 + A$ und die Minimalbreite ist $d_0 - A$. Im geerdeten Zustand ändert der Photoelastizitätsmodulator die Polarisationsseigenschaften des transmittierten Lichts nicht. Wenn die Maximaländerung der Breite des Photoelastizitätsmodulators $\lambda/4$ beträgt (λ ist die Wellenlänge des verwendeten Lichts), wird das linear polarisierte Einfallslight durch den Photoelastizitätsmodulator in des-

sen Zustand mit $d_0 + A$ in links oder rechts zirkular polarisiertes Licht gewandelt, und im Zustand $d_0 - A$ des Photoelastizitätsmodulators wird das Ausgangslicht in rechts oder links zirkular polarisiertes Licht gewandelt. Wenn die maximale Änderung der Breite des Photoelastizitätsmodulators $\Lambda/2$ beträgt (Λ ist die Wellenlänge des verwendeten Lichts), wird das linear polarisierte Einfallslight durch den Photoelastizitätsmodulator in dessen Zustand mit $d_0 + A$ oder $d_0 - A$ in linear polarisiertes Licht gewandelt, dessen Polarisationssebene um 90 Grad in Bezug auf die Polarisationssebene des einfallenden Lichts gedreht ist. Es sei darauf hingewiesen, dass in diesem Fall beim Erreichen der $\Lambda/4$ -Positionen links oder rechts zirkular polarisiertes Licht abhängig von der Änderungsrichtung geliefert wird.

[0053] So kann festgestellt werden, dass unter Verwendung einer Steuerung, die zu maximalen Änderungen der Breite $A = \Lambda/2$ am Ausgang des gesteuerten Photoelastizitätsmodulators **23** führt, linear polarisiertes Licht mit derselben Richtung wiederholt mit der Frequenz $2f$ in Bezug auf die Frequenz f der Steuerungsspannung erscheint, wohingegen beim Verwenden einer Steuerung, die zu maximalen Änderungen der Breite $A = \Lambda/4$ führt, zirkular polarisiertes Licht mit derselben Richtung wiederholt mit der Frequenz f der Steuerungsspannung erscheint.

[0054] Der lineare Polarisationsanalysator vor dem Detektor lässt nur im Wesentlichen das eine ausgewählte linear polarisierte Licht mit einer Polarisationssebene parallel zur Polarisationsachse des Analysators durch, was wiederum zum Maximum des Detektorsignals führt, wobei alle anderen Polarisationslichtkomponenten zu einem kleineren Wert des Detektorsignals führen. Das linear polarisierte Licht mit der Polarisationsrichtung orthogonal zur Polarisationsachse des Analysators liefert das minimale Detektorsignal. Wenn der Photoelastizitätsmodulator **23** vor dem Analysator **25** positioniert ist, um an den Endpositionen linear polarisiertes Licht mit einem Polarisationswinkel von 0 bzw. 90 Grad relativ zur Polarisationsachse des passiven Polarisationsanalysators **25** zu führen, wechselt das Ausgangssignal die Intensität periodisch mit der Frequenz $2f$ in Bezug auf die Frequenz f in der Steuerungsspannung, wie in der [Fig. 10D](#) dargestellt ist.

[0055] Die Signalverarbeitung unterscheidet sich von derjenigen, die in Zusammenhang mit der [Fig. 1](#) erläutert wurde. Während die Anordnung der [Fig. 1](#) statische Signale für die Weiterverarbeitung liefert, liefert die Konfiguration der [Fig. 3](#) Polarisationskomponenten, und deren gemessene Intensitätswerte ändern sich zeitlich periodisch mit einer relativ hohen Frequenz von mindestens 10 kHz, vorzugsweise mindestens 100 kHz. Unter diesen Umständen muss die Messung synchron zur Sinussteuerungsspannung des RLMs mit exakt vorbestimmten Phasenpositionen

ausgeführt werden. Es können wiederholte Messungen mit vorbestimmter Frequenz an vorbestimmten Phasenpositionen mit einem phasenempfindlichen oder Lockinverstärker ausgeführt werden, der Messungen mit vorbestimmter Frequenz f oder in einem Dualmodus mit vorbestimmten Frequenzen f und $2f$ ausführen kann. Die phasenempfindlichen (Lockin) Verstärker liefern in einem herkömmlichen Differenzmodus einen Intensitätsdifferenzwert $\Delta I = I_2 - I_1$. Phasenempfindliche (Lockin) Verstärker, die mit relativ hohen Frequenzen von mindestens 10 kHz, vorzugsweise mindestens 100 kHz arbeiten, sind von mehreren Herstellern erhältlich, wie von EG&G oder Jupiter.

[0056] Die bei der Konfiguration der [Fig. 3](#) zu verwendende Signalverarbeitungseinheit **28** kann so konfiguriert sein, wie es in der [Fig. 8A](#) dargestellt ist, mit einem Tiefpassfilter LP und einem phasenempfindlichen Verstärker FE, der mit dem Ausgang des Detektors verbunden ist und über einen Analog-Digital-Wandler AD verfügt, der mit dem Ausgang des Tiefpassfilters LP verbunden ist. Bei einer digitalen Signalverarbeitungs- und Bilderzeugungseinheit mit Analogeingang ist auch ein Digital-Analog-Wandler DA erforderlich. Die vorliegenden, von Zeiss hergestellten RLMs verfügen über eine Bilderzeugungseinheit mit Analogeingang, weswegen der Digital-Analog-Wandler DA dafür sorgt, dass die Kompatibilität gewahrt ist.

[0057] Die meisten RLM-Systeme (auch das Zeiss-RLM vom Typ 410) sind dazu geeignet, die Intensität der von einer Probe emittierten Fluoreszenz mit Komponenten verschiedener Wellenlängen dadurch zu messen, dass jede Emissionswellenlänge abgetrennt wird und mit einem speziellen Detektor (typischerweise einem Photoelektronenvervielfacher) gemessen wird. Die Anregung kann bei einer einzelnen Frequenz oder mehreren Frequenzen erfolgen. Zur Abtrennung können dichroitische Spiegel verwendet werden. Bei der in der [Fig. 4](#) dargestellten Konfiguration zum Messen bei verschiedenen Wellenlängen ist die Beleuchtung der Probe **5** dieselbe, wie sie in der [Fig. 1](#) erkennbar ist und in Zusammenhang mit dieser beschrieben wurde. Im von der Probe **5** empfangenen und durch den halbdurchlässigen Spiegel abgelenkten Lichtstrahl befinden sich ein Photoelastizitätsmodulator **31** (wie der von Hinz erhältliche FS50) und ein passiver Polarisationsanalysator **32**. Dem Analysator folgend dichroitische Spiegel oder dichroitische Strahlteiler **33** zum Aufteilen des von der Probe empfangenen Lichts entsprechend den verschiedenen Wellenlängen, und ein optischer Spiegel **34**, falls erforderlich, um einen abgetrennten Lichtstrahl abzulenken. Durch den vor den dichroitischen Spiegeln oder Strahlteilern **33** positionierten Photoelastizitätsmodulator **31** (wie dem Typ FS50 von Hinz) können alle Wellenlängenkomponenten der Fluoreszenz gleichzeitig moduliert werden.

Obwohl die Modulationstiefe des Polarisationszustands aufgrund der verschiedenen Wellenlängen differiert, kann sie berechnet werden und mit einem Korrekturfaktor kompensiert werden. Auf diese Weise kann das in Zusammenhang mit der [Fig. 3](#) beschriebene verfahren auf mehrere Wellenlängen erweitert werden. Betreffend die Tatsache, dass die meisten dichroitischen Strahlteiler für den Polarisationszustand selektiv arbeiten, kann der passive Polarisator **32** manchmal weggelassen oder durch dichroitische Spiegel ersetzt werden. Es sind auch dichroitische Strahlteiler kommerziell erhältlich, die in einem großen Wellenlängenbereich unempfindlich auf den Polarisationszustand von Licht sind. In den verschiedenen Wellenlängen-selektiven Kanälen wird die Intensität in den Detektoren **37** gleichzeitig erfasst, und die erfassten Signale werden an eine gemeinsame Signalverarbeitungseinheit **38** geschickt, um eine Signalverarbeitung, wie sie oben detailliert beschrieben ist, auszuführen. Diese Konfiguration erfordert die Anwendung einer Mehrfacheinrichtung oder Mehrkanaleinrichtung zum Messen. Die Signalverarbeitung ist durch die Tatsache vereinfacht, dass bei dieser Konfiguration die Modulationsfrequenz in allen Kanälen dieselbe ist.

[0058] Es kann eine im Lichtstrahl positionierte Blende **35** für konfokale Bilderzeugung erforderlich sein, und es kann ein Farbfilter **36** dazu verwendet werden, die Intensität des unerwünschten Hintergrundlichts zu schwächen.

[0059] Die bei der in der [Fig. 4](#) dargestellten Konfiguration verwendete Signalverarbeitungseinheit **38** kann dieselbe sein, wie sie in der [Fig. 8A](#) dargestellt ist und in Zusammenhang mit der [Fig. 3](#) detailliert beschrieben ist. Um die dreifache Datenmenge der drei Kanäle zu verarbeiten, kann die Signalverarbeitungseinheit der [Fig. 8A](#) dreifach vorhanden sein, oder bei ausreichend hoher Verarbeitungsgeschwindigkeit ist es auch möglich, die Ausgänge der Detektoren **37** der drei Kanäle abwechselnd mit dem Eingang der Signalverarbeitungseinheit **38** zu verbinden (Multiplexbetrieb).

[0060] Die Anordnung der [Fig. 4](#) kann – bei einem einzelnen Emissionsband – auch dazu verwendet werden, die verschiedenen Polarisationskomponenten des Lichtstrahls zu trennen. Zu diesem Zweck müssen anstelle des einzelnen Modulators und Analysators vor der Ablenkung ein jeweiliger Modulator und Analysator in jedem Kanal angewandt werden. Die Konfiguration eines Kanals ist in der [Fig. 3](#) dargestellt. Demgemäß können in zwei Kanälen die Intensitätsdifferenzen $I(90^\circ) - I(0^\circ)$ und $I(+45^\circ) - I(-45^\circ)$ der linear polarisierten Emission und der zirkular polarisierten Komponente gemessen werden. Die Messung von $I(+45^\circ) - I(-45^\circ)$ wird auf dieselbe Weise wie diejenige von $I(90^\circ) - I(0^\circ)$ ausgeführt, jedoch werden der Modulator auf 0° und der Analysator auf

45° eingestellt. Dies kann bei Anisotropiemessungen besonders wichtig sein. Während dieser Messungen kann auch ein Wert proportional zur vollen Intensität der Fluoreszenz bestimmt werden, und so können Empfindlichkeitsunterschiede kompensiert werden. Dies wird in Verbindung mit der [Fig. 10](#) detaillierter beschrieben. Unter Verwendung von drei Kanälen können alle Charakteristikparameter, beispielsweise alle Komponenten des Stokes-Vektors (I , Q , U , V) des Polarisationszustands der emittierten Fluoreszenzstrahlung oder der Reflexionsstrahlung bestimmt und als Bild angezeigt werden, wie es oben beschrieben ist.

[0061] Es ist bekannt, ein Einkanalverfahren zu verwenden, um die Werte des Stokes-Vektors oder den Zustand des polarisierten Lichts zu bestimmen. Durch Implementieren dieses Verfahrens in einem Rasterlasermikroskop (RLM) können alle Werte (I , Q , U , V) des Stokes-Vektors gemessen und als Bild angezeigt werden ([Fig. 5](#)). Zu diesem Zweck werden zwei Photoelastizitätsmodulatoren **43** und **44** in Reihe mit dem von der getesteten Probe empfangenen Lichtstrahl positioniert. Die optische Achse des ersten Photoelastizitätsmodulators **43** verfügt über einen Winkel von 45° Grad, und diejenige des zweiten Photoelastizitätsmodulators **44** verfügt über einen Winkel von 0° Grad in Bezug auf eine Referenzebene. Zwischen dem zweiten Photoelastizitätsmodulator **44** und dem Detektor **47** wird ein passiver Polarisationsanalysator **45** (wie ein Glann-Thompson-Prisma) mit einer optischen Achse von einem Winkel von $22,5^\circ$ Grad zur selben Bezugsebene verwendet. Der Ausgang des Detektors **47** ist ähnlich wie bei den oben beschriebenen Ausführungsformen mit der Signalverarbeitungseinheit **48** verbunden. In diesem Fall verfügt die Signalverarbeitungseinheit **48** über drei phasenempfindliche (Lockin) Verstärker FE1...FE3 und ein Tiefpassfilter LP, wie es in der [Fig. 8B](#) dargestellt ist. Um die Intensität I_m ohne Fehlerkompensation zu bestimmen, wird ein digitales Tiefpassfilter verwendet. Zum Kompensieren des Fehlers während der Intensitätsmessung ist ein in vier Phasen empfindlicher (Lockin) Verstärker FE4 erforderlich. Bei digitaler Signalverarbeitung ist ein Analog-Digital-Wandler AD mit dem Analogausgang des Tiefpassfilters LP verbunden. Um Kompatibilität mit der Bildaufnahmeeinheit eines RLM mit Analogeingang zu bewahren, ist auch ein Digital-Analog-Wandler DA erforderlich. Als phasenempfindlicher (Lockin) Verstärker kann ein von KFKI (Budapest) hergestellter DPSD (digital Phase sensitive detector) verwendet werden, der zwei phasenempfindliche Verstärker in Doppelkonfiguration enthält.

[0062] Die Realisierung der obigen Bildaufnahmeverfahren wird deutlich unterstützt, wenn die verschiedenen Funktionen der Signalverarbeitungseinheit (SPU) (phasenempfindliche Verstärkung, Frequenzauswahl, Signalaufbereitung) steuerbar sind.

Dies wird mit einer einzelnen DPSD-Platine (KFKI, Budapest) bewerkstelligt, bei der es sich um ein auf niedriger Ebene programmierbares Bauteil handelt, das die folgenden Funktionen liefert. Das Eingangssignal kann mit irgendeinem periodischen, skalaren Signal multipliziert werden, bevor ein Mittelwert berechnet wird, was bedeutet, dass nicht nur die Amplitude eines Signals einer ausgewählten Frequenz in einem Differenzmodus gemessen werden kann – wie bei herkömmlichen phasenempfindlichen (Lockin) Verstärkern –, sondern dass es auch möglich ist, dies im Additionsmodus zu messen. Im Differenzmodus spricht das Ausgangssignal auf die Stärke des Eingangssignals mit einer Phase Φ verringert um die Stärke des Eingangssignals mit einer Phase $\Phi + \pi$ an. Das skalare Produkt der zwei Funktionen ist allgemein $P = \int f_1(t) \cdot f_2(t)$. Die Multiplizierfunktion für den Additionsmodus ist in der [Fig. 10B](#) dargestellt, und die Multiplizierfunktion für den Differenzmodus ist in der [Fig. 10C](#) dargestellt.

[0063] Die Werte des Stokes-Vektors werden so bestimmt, wie es unten beschrieben ist:

I, Intensität: das Signal I_m des Tiefpassfilters LP, das mit dem Signal $(I_1 + I_2 + 2I_m)$ des phasenempfindlichen (Lockin) Verstärkers FE4 kompensiert ist, der im Additionsmodus des RLM **43** oder **44** mit einer Frequenz $2f$ arbeitet.

Q, linear polarisierte Komponente entsprechend 0° – 90° : Signal des FE1, der im Differenzmodus des RLM **44** bei einer Frequenz $2f$ arbeitet.

U, linear polarisierte Komponente entsprechend $\pm 45^\circ$: Signal des FE2, der im Differenzmodus des RLM **43** bei einer Frequenz $2f$ arbeitet.

V, zirkular polarisierte Komponente entsprechend: Signal des FE3, der im Differenzmodus des RLM **43** oder **44** bei einer Frequenz f arbeitet.

[0064] Die gemessenen Werte können – nach dem Aufbereiten – an einen geeigneten Eingang der Bildaufnahmeinheit (Videosignalverarbeitungsplatte) des RLM geliefert werden, um die Polarisationsdifferenz(DP)werte als Bild, ähnlich dem Intensitätsbild beim "herkömmlichen" Modus anzuzeigen.

[0065] Gemäß einer anderen Erscheinungsform der Erfindung können auch die Synchronisiersignale zum Durchrastern der Pixel in den Richtungen x und y direkt durch eine geeignete Bildverarbeitungsschaltung ([Fig. 7](#)) verwendet werden. Infolge dessen ist es möglich, die Bildverarbeitung unabhängig von derjenigen des RLM auszuführen, während die Kompatibilität beim Speichern der angezeigten Bilder mit den RLM-Bildern aufrechterhalten werden kann. Der Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zur Messung gemäß der [Fig. 4](#) besteht darin, dass zur Messung nur ein Erfassungskanal erforderlich ist und dass nach der Neuordnung der Detektor als externen Einheit verwendet werden kann. Das Polarisationsbild kann ohne weitere Verwendung des RLM erhalten werden,

und so ist dies von dessen Hardware- und Softwareeigenschaften unabhängig.

[0066] Die [Fig. 6](#) zeigt andere Typen der Polarisationszustand-Einstelleinheit, die in Kombination mit der Anordnung der [Fig. 5](#) für die Möglichkeit sorgen, alle Elemente der Müller-Matrix im Transmissionsmodus unter Verwendung verschiedener bekannter Polarisationszustände des Beleuchtungslichts zu bestimmen. Zu diesem Zweck wird die Konfiguration der [Fig. 5](#) hinter der Probe (hinter dem Spiegel **4** in der [Fig. 2](#)) positioniert. Die Elemente der Müller-Matrix werden gemäß der Erfindung durch ein Verfahren bestimmt, zu dem der Schritt gehört, den Polarisationszustand des beleuchteten Laserlichts in vier Schritten (depolarisiert, linear polarisiert mit 0 (oder 90 Grad), linear polarisiert mit $+45$ (oder -45 Grad) sowie zirkular polarisiert) zu ändern, während die Stokes-Parameter (I, Q, U, V) in jedem dieser vier Zustände bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird eine Polarisationszustand-Einstelleinheit **2A–2D** mit einem Depolarisator **51**, einem Linear- oder Zirkularpolarisator **52**, **53** und einem optischen Phasenverzögerer **54** oder eine beliebige Kombination hiervon verwendet. In den [Fig. 6A–Fig. 6D](#) sind vier verschiedene Polarisationszustand-Einstelleinheiten **2A–2D** dargestellt, die Laserlicht mit verschiedenen, jedoch zeitlich konstanten Polarisationszuständen erzeugen. Die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2a** verfügt über einen Depolarisator **51** zum Depolarisieren des Laserlichts, das polarisiert sein könnte, wobei sie die getestete Probe mit depolarisiertem Laserlicht beleuchtet. Die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2b** verfügt über einen Polarisator **52**, der, wie erforderlich, ein Linear- oder Zirkularpolarisator sein kann. Die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2b** beleuchtet die getestete Probe mit linear oder zirkular polarisiertem Laserlicht, und sie kann dann verwendet werden, wenn das Laserlicht ursprünglich depolarisiert war. Die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2c** verfügt über einen Linearpolarisator **53** und einen Phasenverzögerer **54** hinter diesem, um die getestete Probe mit zirkular polarisiertem Laserlicht zu beleuchten, und sie kann dann verwendet werden, wenn das Laserlicht ursprünglich depolarisiert war. Die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2d** verfügt über einen Depolarisator **51** und einen Polarisator **52** hinter diesem. Der Polarisator **52** kann, wie erforderlich, ein Linear- oder ein Zirkularpolarisator sein. Die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2d** beleuchtet die getestete Probe mit linear oder zirkular polarisiertem Laserlicht, und sie kann dann verwendet werden, wenn das Laserlicht ursprünglich polarisiert war.

[0067] Die [Fig. 9](#) zeigt eine weitere Konfiguration gemäß der Erfindung zum Messen des bei Fluoreszenz erfassten linearen Dichroismus (FDLD) und des bei Fluoreszenz erfassten zirkularen Dichroismus (FDGD). Zu diesem Zweck verfügt die Polarisationszustand-Einstelleinheit **2** über einen Linearpolarisa-

tor **81** und einen Photoelastizitätsmodulator **82** hinter diesem. Wenn die Laserlichtquelle **1** linear polarisiertes Laserlicht liefert, kann der Linearpolarisator **81** weggelassen werden. Bei dieser Anordnung kann das Anregen Laserlicht so moduliert werden, dass verschiedene Polarisationszustände erhalten werden. Der Pfad des Lumineszenzlichts muss im RLM nicht geändert werden. Dies sorgt für eine einfachere Anordnung als sie aus der [Fig. 1](#) erkennbar ist. Dieselben Elementen mit derselben Funktion und mit denselben Bezugszeichen markiert, wie sie in der [Fig. 1](#) verwendet sind. Die Signalverarbeitung erfolgt durch ein Demodulationsverfahren, ähnlich dem oben beschriebenen Verfahren. Der FDLD-Wert wird bei einer Frequenz $2f$ gemessen und der FDGD-Wert wird bei einer Frequenz f gemessen, und die Bildverarbeitung ist ebenfalls dieselbe, wie sie oben detailliert beschrieben ist.

[0068] Gemäß der Erfindung kann auch Laserlicht hoher Leistung, das eine räumliche und/oder zeitliche Intensitätskonzentration ermöglicht, zum Beleuchten der Probe sowie dazu verwendet werden, praktisch gleichzeitig eine Zwei- oder Mehrphotonenanregung in den Molekülen der Probe zu verursachen. Unter Verwendung der bekannten Tatsache, dass Zweiphotonenanregung mit dem Quadrat des Abstands vom Brennpunkt abfällt, wird eine dramatische Verringerung der Hintergrundfluoreszenz erzielt, und so ist die erzielbare räumliche Auflösung wesentlich verbessert, während nachteilige Auswirkungen des Laserlichts minimiert werden können.

[0069] Der genaue Wert der Intensität $I = I_1 + I_2$ kann mit den herkömmlichen Verfahren unter Verwendung eines Tiefpassfilters nicht bestimmt werden. Der Grund für den Fehler sowie ein Korrekturverfahren gemäß der Erfindung werden in Verbindung mit der [Fig. 10](#) detailliert beschrieben. Die [Fig. 10A](#) zeigt die Variation der Breite d des Photoelastizitätsmodulators (PEM) auf Grund einer sich sinusförmig ändernden Steuerspannung als Funktion der Zeit. Wie es aus der [Fig. 10A](#) erkennbar ist, variieren auch die Breiten des durch eine sinusförmige Wechselspannung gesteuerten PEM sinusförmig entsprechend $d = d_0 + A \cdot \sin(2\pi f t)$. In einem geordneten Zustand ohne jede Anregung des PEM ändert sich der Polarisationszustand des durch ihn laufenden Lichts nicht. Bei $A = \lambda/2$ dreht der PEM die Polarisationssebene des einfallenden Lichts in den Zuständen maximaler oder minimaler Breite $d_0 + A$ oder $d_0 - A$ um 90° . Die [Fig. 10D](#) zeigt den Intensitätswert, wie er durch einen Detektor hinter einem Analysator für lineare Polarisation gemessen wird, als Funktion der Zeit, wobei die Steuerung des PEM identisch mit der aus der [Fig. 10A](#) erkennbaren ist. Der Analysator wird so eingestellt, dass er über eine optische Achse parallel zur Polarisationssebene des linear polarisierten Lichts verfügt, das durch einen nicht angeregten PEM läuft. Diese Anordnung sorgt

in jeder Position d_0 für die Maximalintensität I . In den Positionen $d_0 + A$ und $d_0 - A$ verläuft die Polarisationssebene des linear polarisierten Lichts orthogonal zur optischen Achse des Analysators, weswegen die durch den Detektor gemessene Intensität I_1 minimal ist. Da die Intensitätsfunktion nicht-sinusförmig ist, liefert die durch das digitale Tiefpassfilter abgetrennte Gleichspannungskomponente nicht die Intensität $I_v = (I_1 + I_2)/2$ sondern I_m . Unter Verwendung des in vier Phasen empfindlichen Verstärkers FE4 im Additionsmodus kann $S_+ = I_1 + I_2 - 2I_m$ erhalten werden. Da I_m bereits bestimmt wurde, kann der kompensierte Intensitätswert entsprechend der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$I = I_1 + I_2 = S_+ + 2I_m$$

[0070] Dieses Verfahren zum Kompensieren des Fehlers der gemessenen Intensität zeigt im Vergleich zu früheren Veröffentlichungen für Messungen des makroskopischen Dichroismus den Vorteil, dass es keinerlei Beschränkung der Modulationstiefe erfordert, weswegen es für eine genauere Kompensation sorgt.

[0071] Die systematischen Fehler der DP-Messungen auf Grund der verschiedenen optischen Elemente, die den Polarisationszustand beeinflussen, können durch Korrekturverfahren kompensiert werden, die während der digitalen Signalverarbeitung ausgeführt werden können.

[0072] Bei Intensitätsmodulation des Anregungs(Beleuchtungs)lichts kann die Photosektion weggelassen werden und das Signal-Rauschsignal-Verhältnis kann verbessert werden.

[0073] Das bei einem RLM verwendete Laserlicht ist typischerweise polarisiert. Da die Absorption und die Emission vom Polarisationszustand des Beleuchtungslichts abhängen, kann das von einer Probe erhaltene Bild abhängig vom Polarisationszustand des verwendeten Lichts variieren. Bei RLM-Bildern erzeugt dies unerwünschte Überbelichtungen oder Unterbelichtungen oder sogar ein Verschwinden von Einzelheiten. Dies ist bei anisotropen Proben extrem deutlich. Dieser Effekt kann dadurch beseitigt werden, dass in der Polarisationszustand-Einstelleinheit ein Depolarisator verwendet wird, wie es in der [Fig. 6A](#) vorgeschlagen ist. Dies kann auch bei Transmission, Fluoreszenz oder Reflexion verwendet werden. Ein im anregenden/beleuchtenden Lichtstrahl positionierter passiver Depolarisator kann jedoch zu Inhomogenitäten auf mikroskopischem Niveau führen, und das Ausgangsergebnis ist ebenfalls in vielen Fällen nicht zufriedenstellend.

[0074] Ähnlich dem bei FDLD/FDGD-Messungen verwendeten Verfahren kann ein PEM dazu verwendet werden, den Polarisationszustand des Beleuch-

tungslichts zeitlich zu variieren, anstatt dass ein Depolarisator verwendet wird. Nach einem geeigneten Durchlass oder Mittelungsverfahren für das Detektorsignal kann die Photosektion weggelassen werden, ohne dass irgendein störender Nebeneffekt auftreten würde, da das Beleuchtungs(Anregungs)licht während der Zeit, in der das Laserlicht auf einen Punkt fokussiert wird und die Mittelung erfolgt, alle Polarisationsrichtungen enthält.

[0075] Das Verfahren zum Modulieren und Demodulieren kann auch zum Verbessern des Signal-Rauschsignal-Verhältnisses verwendet werden, wenn keine Polarisationsmessungen ausgeführt werden. Zu diesem Zweck verfügt der Polarisationszustandsgenerator über einen Photoelastizitätsmodulator (PEM), der zwischen zwei passiven Linearpolarisatoren mit zueinander parallelen oder orthogonalen Polarisations Ebenen positioniert ist, wobei seine optische Achse auf 45 Grad in Bezug auf die passiven Linearpolarisatoren eingestellt ist. Auch kann, falls erforderlich, ein Depolarisator hinter dem zweiten Linearpolarisator verwendet werden. Diese Anordnung sorgt für eine sich sinusförmig ändernde Intensität mit einer Frequenz $2f$ in Bezug auf die Frequenz f des PEM. Die Demodulation kann mit einem einzelnen phasenempfindlichen (Lockin) Verstärker bei der Frequenz $2f$ ausgeführt werden. Wenn die Laserlichtquelle verzerrungsfreies, linear polarisiertes Laserlicht liefert, kann der Linearpolarisator auf der Seite der Laserlichtquelle weggelassen werden. Wenn die Photosektion die Messungen nicht nachteilig beeinflusst, oder wenn die Kompensation in einem dynamischen Modus ausgeführt wird, wie oben beschrieben, kann auch der Depolarisator weggelassen werden. Dieses Verfahren zum Verbessern des Signal-Rauschsignal-Verhältnisses zeigt den Vorteil im Vergleich zu anderen Verfahren unter Verwendung von Modulationsfrequenzen hoher Intensität, dass die FDLD- und die FDCL-Messungen und die Kompensation der Photosektion mit denselben Komponenten ausgeführt werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren für die Festlegung der Differential-Polarisationsgrößen des vom Prüfmateriale ausgestrahlten, zurückgeworfenen oder übermittelten Lichts mithilfe eines Laserstrahlenabtastmikroskops, einschließlich:

- Beleuchtung des Prüfmateriale Punkt für Punkt mit einem Laserstrahl, dessen Polarisationszustand bekannt und einstellbar oder abänderbar ist;
- Empfang des Lichts, das aus den beleuchteten Punkten des Materials (5) eintrifft und dessen Polarisationszustand vom Material (5) beeinflusst wurde oder dem Polarisationszustand des vom Material (5) ausgestrahlten Lichts entspricht;
- Messung der Intensität von zwei orthogonalen Polarisationskomponenten des Lichts, das aus den be-

leuchteten Punkten des Materials im Wesentlichen zur gleichen Zeit eintrifft, und Zuordnung eines Signals zu jedem gemessenen Intensitätswert: sowie

- Erzeugung eines Differentialsignals aus den zwei gemessenen Intensitätssignalen, um einen repräsentativen Differentialwert für den entsprechenden Bildpunkt des Materials (5) zu bekommen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei der Intensitätsunterschied der orthogonalen Polarisationskomponenten entweder auf Grund der Werte $1, I_1 + I_2, I_1 + 2I_2$, oder auf Grund eines anderen beliebigen, einem Elementen des Mueller-Matrix zugeordneten Wertes aufgeteilt und durch Messung oder Kalkulation festgestellt wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei der Lichtstrahl auf Grund des Polarisationszustandes oder eines vorher festgelegten Leuchtintensitätsprozents in zwei verschiedene Strahlen gespalten wird, und in jedem gespaltenen Lichtstrahl nur die Intensität von einem einzigen Polarisationskomponenten gemessen wird.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, wobei der Phasenunterschied zwischen den Polarisationskomponenten des aus dem Material eintreffenden Lichtstrahls gemäß einer Funktion mit vorher festgestellter Frequenz und Form zwischen zwei Endpositionen periodisch geändert wird, und danach die Polarisationskomponenten mit demselben Analysator gemessen werden.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei der Phasenunterschied zwischen den Polarisationskomponenten des aus dem Material eintreffenden Lichtstrahls gemäß einer Sinusfunktion zwischen zwei Endpositionen periodisch geändert wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 4 oder 5, wobei – im Anschluss an die Änderung des Phasenunterschieds zwischen den Polarisationskomponenten des aus dem Material eintreffenden Lichtstrahls – der Lichtstrahl nach festgelegten Wellenlängen gespalten wird, und an den gespaltenen Lichtstrahlen gleichzeitig Messungen vorgenommen werden, wobei die Messfehler nach Bedarf kompensiert werden.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei die Phase zwischen den Polarisationskomponenten des aus dem Material eintreffenden Lichtstrahls gemäß einer Funktion mit vorher festgestellter Frequenz und Form zwischen zwei Endpositionen periodisch geändert wird, und die FDLC- und FDCL-Werte durch periodische Messung der Intensität des aus dem Material emittierten Lichts mit vorbestimmter Frequenz ($2f$ und t) und Phase festgestellt werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, wobei der Phasenunterschied zwischen den Polarisationskompo-

nenten des beleuchtenden Laserstrahls gemäß einer Sinusfunktion zwischen zwei Endpositionen periodisch geändert wird.

9. Verfahren gemäß Ansprüchen 1–8, einschließlich eines Schrittes für die Auswahl der Lichtkomponente, die aus dem Fokalkpunkt des Laserlichts an der Materialprobe empfangen wird, und den Ausschluss der Lichtkomponenten, die nicht aus dem Fokalkpunkt kommen.

10. Verfahren gemäß Ansprüchen 1–8, wobei zur Beleuchtung der Probe ein in Raum und Zeit konzentrierter Laserstrahl benutzt wird, der eine 2- oder Mehr-Photon-Erregung der Molekülen in der Probe herbeiführt.

11. Verfahren gemäß Ansprüchen 4–6, einschließlich der Festlegung der Stokes-Parameter (I, Q, U, V) mindestens in einem der Lichtstrahle des Mikroskops.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, einschließlich der Festlegung der Elementen des Mueller-Matrix in einem übermittelten Laserstrahl vom Mikroskop mithilfe der Änderung des Polarisationszustandes des beleuchtenden Laserlichts in vier Schritten (depolarisiert, linear polarisiert an 0 (oder 90) Grad, linear polarisiert an +45 (oder –45) Grad, und zirkular polarisiert), und die Festlegung der Stokes-Parameter (I, Q, U, V) in jedem der vier genannten Zuständen.

13. Apparat für die Festlegung der Differential-Polarisationsgrößen des vom Prüfmaterialausgestrahlten, zurückgeworfenen oder übermittelten Lichts mithilfe eines Laserstrahlenabtastmikroskops, bestehend aus folgenden Teilen:

- einer Laserlichtquelle (i) zur Erzeugung des Laserlichtstrahls, der Punkt für Punkt das Prüfmaterial oder die Probe (5) beleuchtet;
- einem Polarisationszustand-Generator, platziert zwischen der Laserlichtquelle (1) und dem/der Prüfmaterial/Probe (5) zur Erzeugung eines Strahls mit bekanntem und einstellbarem/abänderbarem Polarisationszustand;
- einem Detektor (16, 17, 27, 37, 47) zur Feststellung der Intensität des Lichts, dessen Polarisationszustand von der Probe (5) modifiziert wurde, oder zur Feststellung der Intensität des Lichts, das die Probe (5) ausstrahlt, und der Detektor dieses Licht empfängt;
- einem Gerät für die räumliche und zeitliche Separation der orthogonalen Polarisationskomponenten, eingesetzt zwischen der Probe (5) und dem Detektor (16, 17, 27, 37, 47)
- einer Verarbeitungsanlage (18, 28, 38, 48) für die Festlegung der Intensität von zwei orthogonalen Polarisationskomponenten und die Erzeugung eines Intensitätsunterschieds zwischen diesen Polarisationskomponenten um eine Differential-Polarisationsgrö-

ße, die den entsprechenden Bildpunkt des/der Prüfmaterials/Probe (5) repräsentiert, zu bekommen, angeschlossen an den Ausgang des Detektors (16, 17, 27, 37, 47).

14. Apparat nach Anspruch 13, einschließlich einer optischen Einheit (8) zur räumlichen Spaltung der Polarisationskomponenten gemäß ihrem Polarisationszustand oder gemäß einem vorher festgestellten Prozent der Intensität, platziert im aus der Probe (5) eintreffenden Lichtstrahl, eines Detektors (16, 17), platziert im Wege der aufgespaltenen Lichtstrahlen, eines Analysators (12, 13) vor dem Detektor (16, 17), um eine der Polarisationskomponenten in den Lichtstrahlen, die gemäß einem vorher festgestellten Prozent der Intensität gespalten wurden, selektiv zu übermitteln.

15. Apparat nach Anspruch 13, einschließlich eines ersten Polarisationsmodulators (23) zur Spaltung der Polarisationskomponenten in Zeit, platziert im aus der Probe (5) eintreffenden Lichtstrahl, und eines passiven Polarisationsanalysators (25) vor dem Detektor (27).

16. Apparat nach Anspruch 15, einschließlich mindestens eines selektiven Wellenlänge-Strahlspalters (33) zwischen dem passiven Polarisationsanalysator (32) und dem Detektor (37), sowie weiterer Detektoren (37) in den Lichtstrahlen, die vom Wellenlänge-Strahlspalter (33) aufgeteilt wurden.

17. Apparat nach Anspruch 13 mit einer Polarisationszustand-Einstellvorrichtung (2), die aus einer passiven Polarisationsoptikeinheit (81) und einem Polarisationsmodulator (82) besteht.

18. Apparat nach Ansprüchen 13–17, einschließlich einer Aperturblende (10, 11, 21, 35) im aus der Probe (5) kommenden Lichtstrahl, um die auf die Probe fokussierte Lichtkomponente herauszufiltern.

19. Apparat nach Ansprüchen 13–17, einschließlich einer Laserlichtquelle (1) mit in Raum bzw. in Zeit konzentriertem Laserlicht zur 2- oder Mehr-Photon-Erregung der Molekülen in der Probe.

20. Apparat nach Anspruch 15, einschließlich eines zweiten Polarisationsmodulators (44), platziert zwischen dem ersten Polarisationsmodulator (43) und dem passiven Polarisationsanalysator (45), wobei der zweite Polarisationsmodulator (44) eine optische Achse hat, die um 45Grad im Verhältnis zu der optischen Achse des ersten Polarisationsmodulators (43) gedreht ist.

21. Apparat nach Anspruch 20, mit einer Polarisationszustand-Einstellvorrichtung (2a–2d), die aus Depolarisator (51), einem Linearpolarisator (52, 53) oder einem Zirkularpolarisator (52) und einem opti-

schen Phasenverzögerer (54), oder einer beliebigen Kombination von diesen besteht.

tektors (17) angeschlossen.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

22. Apparat nach Ansprüchen 13–20, mit einer Polarisationszustand-Einstellvorrichtung (2), einschließlich eines photoelastischen Modulators (PEM), der zwischen zwei passiven Linearpolarisatoren mit parallelen oder senkrechten Polarisationsbenen positioniert ist, und die optische Achse des photoelastischen Modulators (PEM) um 45 Grad im Verhältnis zu den passiven Linearpolarisatoren eingestellt ist, einschließlich auch eines Depolarisators hinter dem zweiten Linearpolarisator.

23. Apparat nach Ansprüchen 13–21 dadurch gekennzeichnet, dass die Signalverarbeitungseinheit (18, 28, 38, 48) an den Ausgang des Detektors oder der Detektoren (16, 17, 27, 37, 47) angeschlossen ist.

24. Apparat nach Anspruch 22 dadurch gekennzeichnet, dass die Signalverarbeitungseinheit (JFE) aus mindestens einem phasenempfindlichen Verstärker (FE, FE1 ... FE4), einem Tiefpass-Filter (LP), einem Analog-Digital-Wandler (AD) und einem Digital-Analog-Wandler (DA) besteht.

25. Apparat für die Festlegung der Differential-Polarisationsgrößen, einschließlich des fluoreszenzdetektierten Linear- und Zirkulardichroismus (FDLD, FDGD) des vom Prüfmaterial ausgestrahlten, zurückgeworfenen oder übermittelten Lichts mithilfe eines Laserstrahlenabtastmikroskops mit einem Polarisationszustand-Generator (2), bestehend aus folgenden Teilen:

- einer Laserlichtquelle (1) zur Erzeugung des Laserlichtstrahles, der Punkt für Punkt das Prüfmaterial oder die Probe (5) beleuchtet;
- einer passiven Polarisationsoptik-Komponente (81) und einem Polarisationsmodulator (82) zwischen der Laserlichtquelle (1) und dem/der Prüfmaterial/Probe (5), um polarisiertes Laserlicht mit modulierter Polarisationsrichtung, die zwischen orthogonalen Polarisationszuständen wandelt, zu erzeugen;
- einem Detektor (17) zur Festlegung der Intensität des Lichts, dessen Polarisationszustand von der Probe (5) modifiziert wurde, oder der Intensität des Lichts mit dem Polarisationszustand vom Licht, das die Probe (5) ausstrahlt, verbunden mit den Polarisationskomponenten des Lichts, die das Material oder die Probe (5) beleuchtet, im von der Probe zurückgeworfenen oder ausgestrahlten Laserlicht positioniert;
- einer Verarbeitungsanlage (18) für die Festlegung der Intensität von zwei orthogonalen Polarisationskomponenten und die Erzeugung eines Intensitätsunterschieds zwischen diesen Polarisationskomponenten um eine Differential-Polarisationsgröße, die den entsprechenden Bildpunkt des Materials (5) repräsentiert, zu bekommen, an den Ausgang des De-

Anhängende Zeichnungen

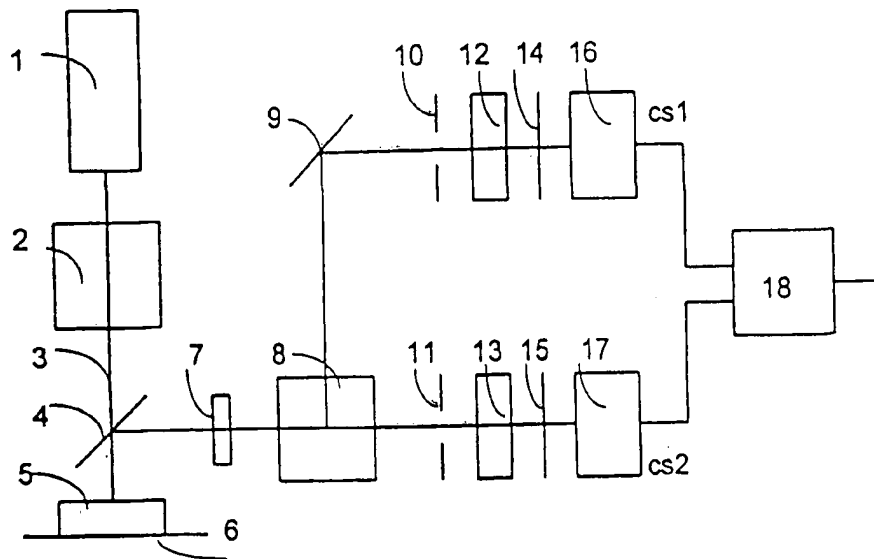


FIG. 1

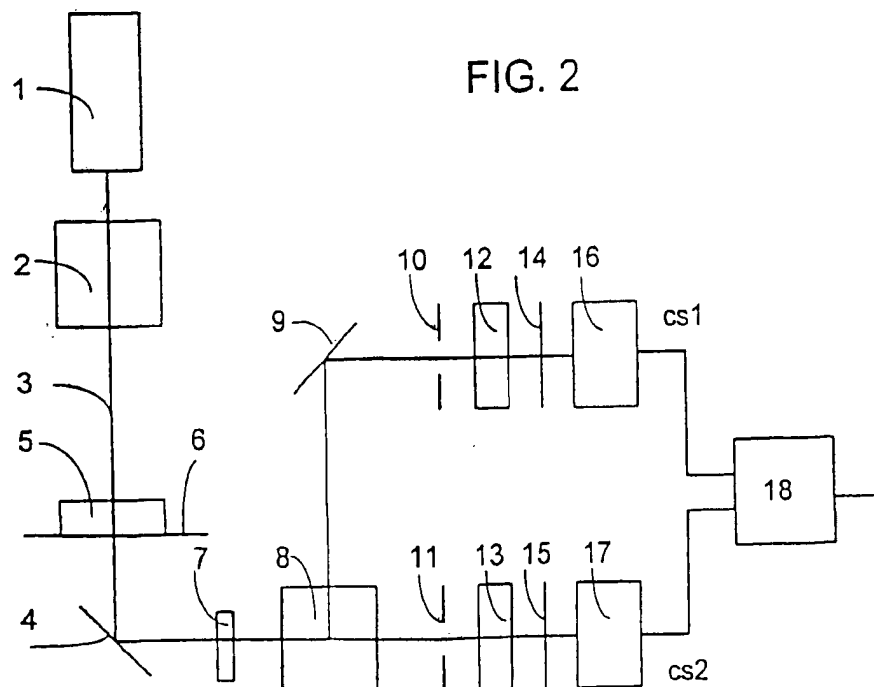


FIG. 2

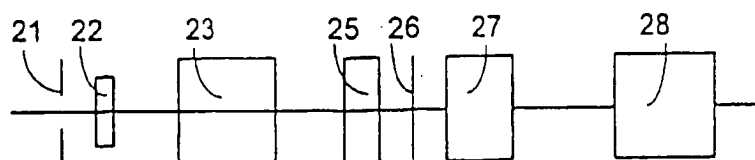


FIG. 3

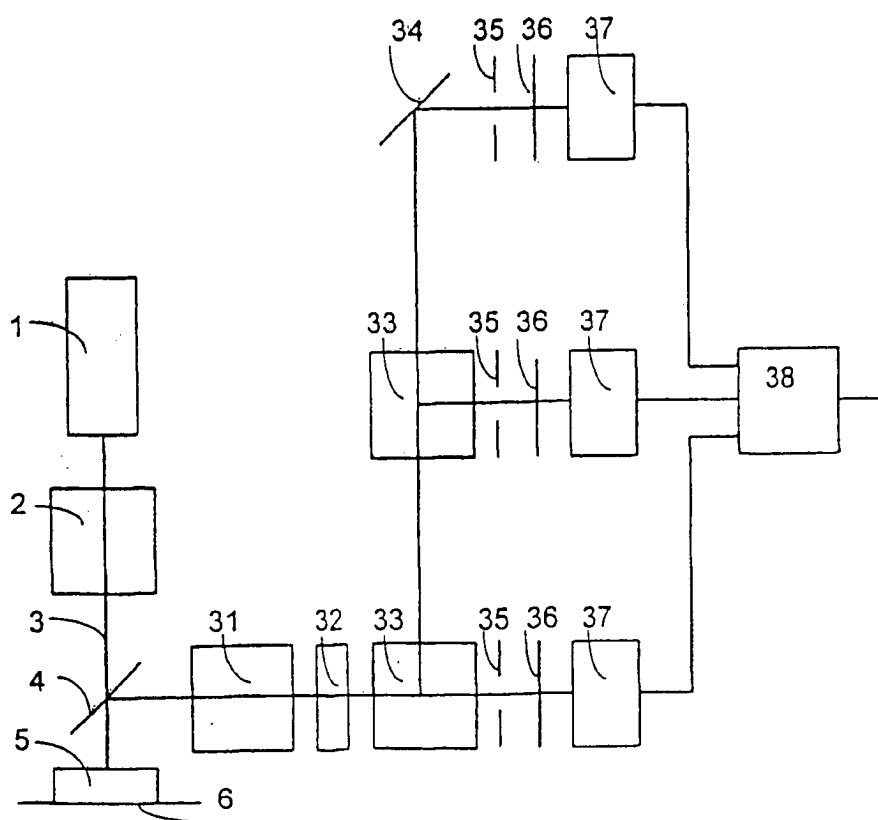


FIG. 4

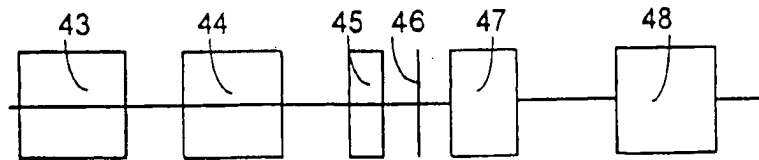


FIG. 5

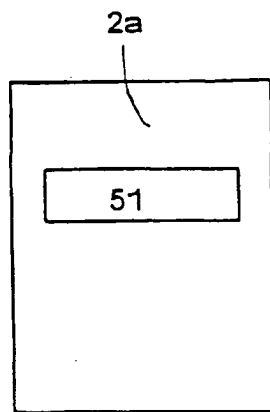


FIG. 6A

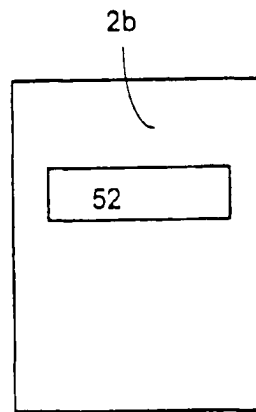


FIG. 6B

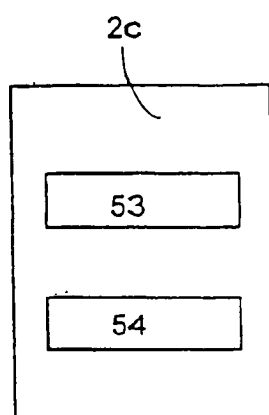


FIG. 6C

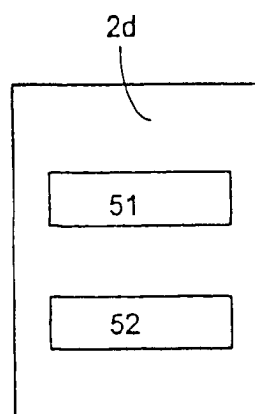


FIG. 6D

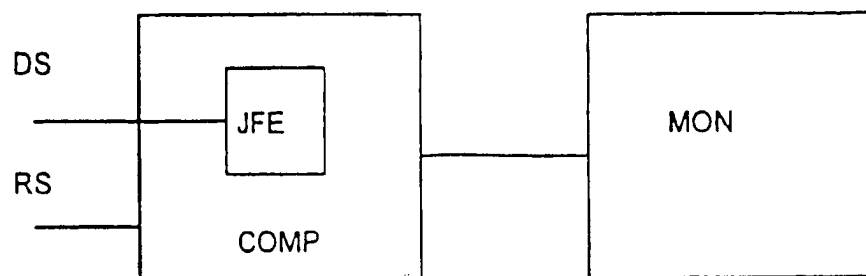


FIG. 7

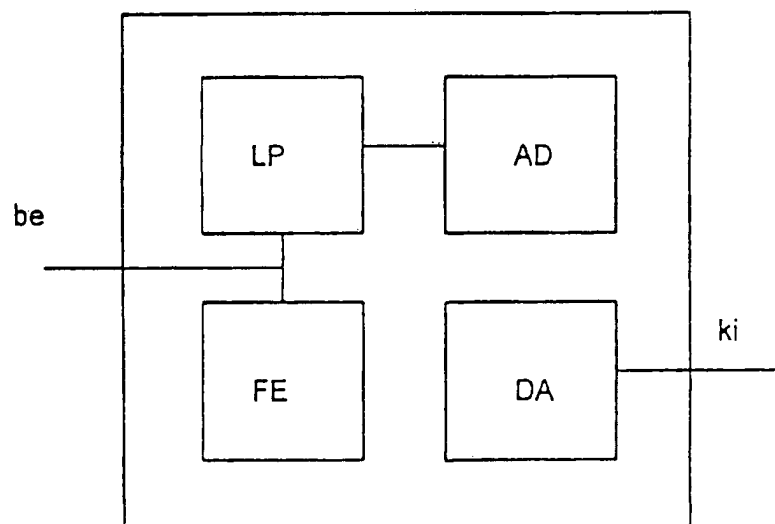


FIG. 8A

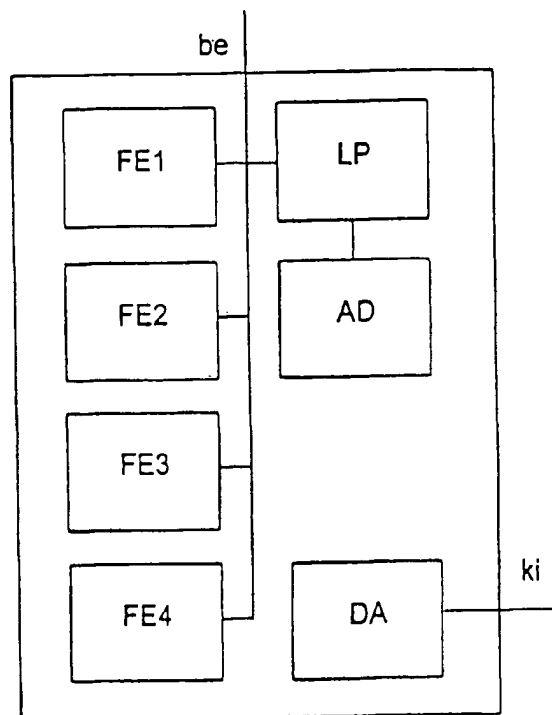


FIG. 8B

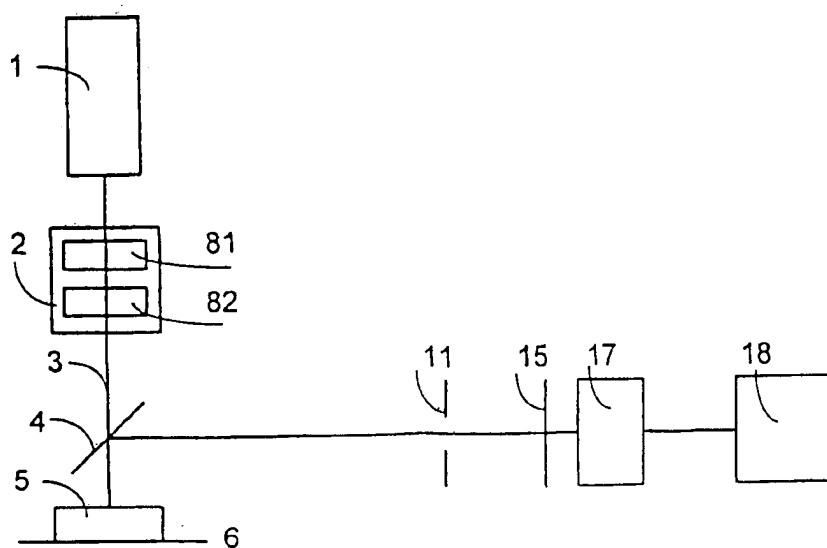


FIG. 9

