

# Interferenzmikroskopie Prinzip und Anwendungen

---



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
1. Grundlagen zur Interferenz des Lichtes	3
1.1. Interferenz	3
1.2. Kohärenz	3
1.3. Entstehung von Interferenzstreifen und Interferenzkontrast	3
2. Interferenzmikroskopie	5
2.1. Grundlagen	5
2.2. Shearing-Verfahren	5
2.3. Interphako-Verfahren	5
2.4. Besondere Hinweise zur Durchführung von Interferenzmessungen	6
2.4.1. Streifenmethode	6
2.4.2. Kompensationsmethode im Interferenzkontrast	7
2.4.3. Spalt- und Gitterbeleuchtung	7
2.4.4. Messungen mit der Halbschattenplatte	7
2.4.5. Bestimmung der Interferenzordnung	8
2.4.6. Messung kleiner lateraler Größen	8
3. Anwendungen	10
3.1. Durchlicht	10
3.1.1. Bestimmung von Dicke und Brechzahl mikroskopischer Objekte	10
3.1.2. Bestimmung der Trockenmasse biologischer Zellen	10
3.1.3. Bestimmung der Brechzahl von Flüssigkeiten	11
3.2. Auflicht	12
3.2.1. Vermessung technischer Oberflächen	12
3.2.2. Halbleitertechnik und Mikroelektronik	13
3.3. Messung kleiner lateraler Größen (Meßbeispiel zu 2.4.6.)	14
3.4. Anwendung zur Kontrastierung	14

## Interferenzmikroskopie, Prinzip und Anwendungen.

Die Lateralauflösung des Lichtmikroskops ist durch die Wellenlänge des Lichtes begrenzt. Sie liegt, je nach Objektivapertur, in der Größenordnung einer halben Wellenlänge bis zu mehreren Wellenlängen etwa zwischen 0,25 und 5  $\mu\text{m}$ . Die Tiefenauflösung eines normalen Durch- und Auflichtmikroskops liegt zwar in der gleichen Größenordnung, läßt sich aber ohne zusätzliche Hilfsmittel für Dicken- und Tiefenmessungen kaum ausnutzen. Das ist einmal präparatbedingt und hängt zum anderen vom mechanischen Aufbau des Mikroskops ab. Die Methode der Lichtinterferenzen ist in hervorragender Weise geeignet, diese Lücke auszufüllen und eine wesentliche Steigerung der Tiefenmeßgenauigkeit zu erreichen. Im Durchlicht können außerdem an kleinsten flüssigen oder festen Substanzmengen genaue Brechzahlbestimmungen durchgeführt werden. Als Maßeinheit dient bei allen Interferenzmessungen zunächst die Lichtwellenlänge selbst; Tiefenmeßgenauigkeiten von 0,05 bis 0,001  $\mu\text{m}$  werden von den modernen Interferenzmikroskopen ohne weiteres erreicht. Die Anwendungsbreite der Interferenzmikroskopie hat deshalb ständig zugenommen und ist weiter im Anwachsen begriffen.

Um das Verständnis der Wirkungsweise des Interferenzmikroskops zu vertiefen, seine Möglichkeiten voll ausschöpfen zu können und die Leistungsgrenzen zu erkennen, werden in der vorliegenden Druckschrift einige Hinweise über die theoretischen Grundlagen der Interferenzmikroskopie gegeben und einige Meßbeispiele etwas genauer behandelt.

# 1. Grundlagen zur Interferenz des Lichtes

## 1.1. Interferenz

Unter Interferenz des Lichtes versteht man die Überlagerung von mindestens zwei Lichtwellen, die mit einer Verstärkung oder Schwächung der Intensität verbunden ist. Dabei spielen zwei Begriffe, Amplitude und Phase (bzw. Phasendifferenz), die wichtigste Rolle. Nach der Darstellung einer Sinuswelle in Bild 1 gibt die Amplitude  $a_0$  die maximale Schwingungsweite an, deren Quadrat der Intensität proportional ist. Die momentane Auslenkung  $a = a_0 \sin \varphi$  aus der Nulllage wird durch die Phase oder den Phasenwinkel  $\varphi$  bestimmt. Der Abstand zweier benachbarter gleichsinniger Nulldurchgänge wird als die Wellenlänge  $\lambda$  bezeichnet und entspricht einer Phasendifferenz von  $360^\circ$ . Mit welcher Phasendifferenz zwei vom gleichen Lichtquellenpunkt ausgegangene Lichtwellen zusammentreffen, hängt von der Differenz der optischen Wege ab, die sie durchlaufen haben. Der optische Weg ist definiert als das Produkt aus dem geometrischen Weg  $d$  und der Brechzahl  $n$  des durchlaufenen Mediums. Durchlaufen die Lichtwellen nacheinander Bereiche unterschiedlicher Brechzahl, dann ist der optische Weg gleich der Summe der Produkte  $d_v n_v$  aus diesen einzelnen Bereichen  $v$ . Die Differenz der optischen Wege, auf die es bei der Interferenz in erster Linie ankommt, wird als Gangunterschied  $\Delta$  bezeichnet.

$$\Delta = \delta (d \cdot n) \quad (1)$$

$\delta (d \cdot n)$  ist die Differenz des Produktes aus geometrischem Weg (z. B. Objekt-dicke) und Brechzahl.

Ist der geometrische Weg für beide Lichtwellen gleich, dann wird daraus

$$\Delta = d \cdot \delta n \quad (1a)$$

und bei gleicher Brechzahl, aber unterschiedlichem geometrischem Weg

$$\Delta = n \cdot \delta d \quad (1b)$$

Der Gangunterschied wird manchmal auch als Anzahl von Wellenlängen angegeben und legt dann gleichzeitig die Interferenzordnung fest.

$$\Delta = \frac{d}{\lambda} \cdot \delta n \quad (1c)$$

oder 
$$\Delta = \frac{n}{\lambda} \cdot \delta d \quad (1d)$$

Durch Multiplikation des in Wellenlängen angegebenen Gangunterschieds mit dem Vollwinkel  $360^\circ$  ergibt sich die Phasendifferenz  $\varphi$ , z. B.

$$\varphi = \frac{d}{\lambda} \cdot \delta n \cdot 360^\circ \quad (2)$$

die auch als relative Phasendrehung bezeichnet wird.

Von der Phasendifferenz hängt es ab, ob Schwächung oder Verstärkung der interferierenden Lichtwellen eintritt. Jeder Phasendifferenz ist eine ganz bestimmte resultierende Amplitude und Intensität zugeordnet. Das wird in Bild 2 an fünf Beispielen der Interferenz zweier Wellen gleicher Amplitude mit den Phasendifferenzen  $0^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $160^\circ$  und  $180^\circ$ , bzw. den Gangunterschieden  $0$ ,  $1/6$ ,  $1/4$ ,  $4/9$  und  $1/2$  Wellenlängen dargestellt.

Besteht zwischen beiden Wellen nach Bild 2a eine Phasendifferenz von  $0^\circ$ ,  $360^\circ$  oder  $n \cdot 360^\circ$  ( $n =$  ganze Zahl), so tritt maximale Verstärkung, bei einer Phasendifferenz von  $180^\circ$  bzw.  $(2n-1) \cdot 180^\circ$  maximale Schwächung ein (Bild 2e). Die Intensität der resultierenden Welle entspricht im Fall a) der vierfachen Intensität der Einzelwelle und ist im Fall e) null. Für andere Phasendifferenzen sind alle dazwischenliegenden Intensitäten möglich.

## 1.2. Kohärenz

Obwohl die Ausführungen über die Grundlagen der Interferenz ganz allgemein für jede Art von Wellen gelten, wird man bei Einwirkung des von zwei verschiedenen Lichtquellen herrührenden Lichtes auf das gleiche Raum-

gebiet keine Interferenzerscheinungen wahrnehmen können. Das Licht muß folgende Bedingungen erfüllen, um interferenzfähig zu sein. Man spricht dann von kohärentem, bzw. partiell kohärentem Licht.

1. Die Lichtwellen müssen gleichzeitig in dem Raumgebiet wirken.
2. Es müssen über einen genügend großen Zeitraum (den Beobachtungszeitraum) konstante Phasenbeziehungen bestehen.
3. Die Wellenlänge muß gleich sein.
4. Die Wellen müssen in der gleichen Ebene schwingen.
5. Bei ausgedehnten Lichtquellen darf der Divergenzwinkel des emittierten Lichtes nicht zu groß sein.

Die einzelnen Punkte einer Lichtquelle senden das Licht nicht kontinuierlich aus, sondern strahlen in statistischer Folge kurzzeitige Lichtblitze ab. Daher sind die ersten beiden Kohärenzbedingungen nur zu erfüllen, wenn beide Wellen vom gleichen Punkt der gleichen Lichtquelle ausgegangen und ihre Gangunterschiede nicht zu groß sind. Gleichzeitig sind dann, ohne Verwendung von Filtern und Polarisatoren, auch die Bedingungen 3 und 4 erfüllt. Zur Erfüllung der 5. Kohärenzbedingung sind geeignete Blenden anzuordnen.

## 1.3. Entstehung von Interferenzstreifen und Interferenzkontrast

Führt man zwei kohärente Lichtbündel zusammen, die von zwei in einem kleinen Abstand  $a$  (Bild 3) voneinander entfernt liegenden eng begrenzten Bildern  $L_1$  und  $L_2$  der gleichen Lichtquelle herzurühren scheinen, so kann auf einem Schirm, der sich in einer gegenüber  $a$  großen Entfernung  $l$  von den Lichtquellenbildern befindet, ein System gerader Interferenzstreifen aufgefangen werden. Es erscheint im weißen Licht farbig, im monochromatischen

Licht hell-dunkel. Der Gangunterschied zwischen den von  $L_1$  und  $L_2$  ausgehenden Strahlen ändert sich von einem zum nächstbenachbarten Interferenzstreifen um eine Wellenlänge  $\lambda$ . Der Abstand  $b$  zweier Interferenzstreifen läßt sich berechnen nach

$$b = \frac{\lambda \cdot l}{a} \quad (3)$$

Ist einer der beiden interferierenden Wellenfronten nach Passieren eines Phasenobjektes (es bewirkt nur eine relative Änderung der Phase, aber nicht der Amplitude des hindurchgehenden Lichtes) ein örtlich begrenzter Gangunterschied aufgeprägt (Bild 4), so resultiert daraus am Ort des Objektbildes eine Streifenversetzung  $c$ , aus der die Größe des vom Objekt hervorgerufenen Gangunterschieds  $\Delta$  bestimmt werden kann.

$$\Delta = \frac{c}{b} \lambda \quad (4)$$

Macht man den Abstand  $a$  der Lichtquellenbilder in Bild 3 immer kleiner, so wird der Abstand  $b$  der Interferenzstreifen immer größer. Ist  $a = 0$ , d.h., sind beide Wellenfronten zueinander parallel, dann ist der Streifenabstand unendlich groß, und der gesamte Schirm erscheint, bis auf das Bild des Objekts, in einer einheitlichen Farbe oder Helligkeit. Diese kann durch Änderung der zwischen den Wellenfronten bestehenden Phasendifferenz  $\psi$  (Bild 5) verändert werden.

Um kontrastreiche Interferenzen zu erhalten, muß die Ausdehnung  $s$  der nutzbaren Lichtquelle in Richtung  $L_1$ - $L_2$  (Bild 3) so klein sein, daß sich die Gangunterschiede  $\Delta_1 = l_1 - l_2$  und  $\Delta'_2 = l'_1 - l'_2$  (Bild 6) um weniger als  $\lambda/4$  unterscheiden ( $\Delta_1 - \Delta'_2 < \lambda/4$ ). Diese Bedingung ist erfüllt, wenn die Lichtquelle oder ihr Bild spaltförmig begrenzt ist und die Breite

des Spaltbildes die Größe  $s = \frac{\lambda}{4} \cdot \frac{l}{a}$  nicht

überschreitet (a nach Bild 3). Wird diese sogenannte  $\lambda/4$ -Bedingung nicht eingehalten, dann verstärken sich an ein und derselben Stelle des Schirmes gewisse Strahlenteile, während sich andere abschwächen, so daß der Kontrast nachläßt.

## 2. Interferenzmikroskopie

### 2.1. Grundlagen

Das mikroskopische Bild entsteht nach der Abbeschen Theorie durch Interferenz des direkten Lichtes mit dem am Objekt gebeugten Licht. Die im Objekt herrschenden Amplituden- und Phasenbeziehungen werden dabei um so vollkommener wiedergegeben, je vollständiger die gebeugten Lichtanteile, d. h. je mehr Beugungsordnungen erfaßt werden. Eine Beugungsordnung allein kann keinerlei Informationen über das Objekt liefern.

Unter Interferenzmikroskopie im besonderen versteht man jedoch nicht die Interferenz verschiedener Beugungsordnungen, sondern die Überlagerung eines vollständigen mikroskopischen Bildes mit einem dazu kohärenten Untergrund, der strukturlos sein oder selbst Strukturen tragen kann. Das Interferenzmikroskop erzeugt von den schon in 1.3. genannten Phasenobjekten (Objekte ohne Absorption) kontrastreiche Bilder und erlaubt, diese auch in der dritten Dimension genau zu vermessen. Es muß also eine vom Objekt unabhängige Aufspaltung des Strahlenganges erfolgen, damit in der Zwischenbildebene die Objektwellenfront mit einer dazu kohärenten Referenzwellenfront zur Interferenz gelangen kann. Die Phasenobjekte unterscheiden sich von ihrer Umgebung nicht wie die sogenannten Amplitudenobjekte durch Farbe oder Helligkeit, sondern durch ihre Brechzahl oder Dicke. Das äußert sich in der Erzeugung eines Gangunterschiedes nach Formel (1) sowie nach den Bildern 4 und 5, der im Interferenzmikroskop vermessen wird.

Die zur Durchführung von Interferenzmessungen erforderliche Referenzwellenfront kann auf verschiedene Weise erzeugt werden. Das im Prinzip einfachste Verfahren besteht in der Aufspaltung des Strahlenganges vor und

die Wiedervereinigung hinter dem Objekt bzw. im Auflicht vor und nach Reflexion am Objekt bei vollständig getrennten Teilstrahlengängen. Die Referenzwellenfront ist also, wie in den Bildern 4 und 5 dargestellt, vom Objekt nicht beeinflußt worden.

### 2.2. Shearing-Verfahren

Die exakte technische Realisierung des letztgenannten Prinzips ist bei Verwendung stärkster Objektive recht schwierig und erfordert einen großen Aufwand. Außerdem ist eine solche Anordnung für Auflicht sehr erschütterungsempfindlich. Deshalb wird bei modernen Interferenzmikroskopen meist auf die vollständige Trennung von Objekt- und Referenzstrahlengang verzichtet oder die Strahltrennung erst hinter dem Objektiv, also abbildungsseitig vorgenommen. Dabei wird bevorzugt das Shearing-Verfahren (siehe Bild 7) verwendet. Der seitlich etwas verschobenen Referenzwelle sind ebenfalls die Objektstrukturen aufgeprägt, so daß von jedem Objekt ein Doppelbild entsteht. Je nach Abstand der beiden Einzelbilder sprechen wir von totaler (Bild 7a) oder differentieller (Bild 7b u. c) Bildaufspaltung.

Totale Bildaufspaltung liegt vor, wenn, wie in Bild 7a, das verschobene Bild des zu untersuchenden Objektes getrennt neben dem unverschobenen liegt oder wenn bei großen Objekten die Bildaufspaltungsgröße ein Vielfaches der Auflösungsgrenze beträgt. Bei der differentiellen Bildaufspaltung liegt diese in der Größenordnung der Auflösungsgrenze, und ein Doppelbild ist noch nicht zu erkennen. Die totale Bildaufspaltung wird vorwiegend für Meßzwecke, die differentielle Bildaufspaltung zur Kontrastierung benutzt.

### 2.3. Interphako-Verfahren

Das Interphako-Verfahren ist ein neu in die mikroskopische Praxis eingeführtes und im AMPLIVAL interphako, PERAVAL interphako und EPIVAL interphako realisiertes Interferenzverfahren, das aus dem Phasenkontrastverfahren abgeleitet worden ist und direkt als quantitatives Phasenkontrastverfahren bezeichnet werden kann. Es geht von

der Tatsache aus, daß das direkte Licht allein keinerlei Strukturen vermitteln kann, es muß wenigstens ein Teil des gebeugten Lichtes mit zur Bildentstehung beitragen.

Zur Durchführung dieses Verfahrens wird der Strahlengang abbildungsseitig durch ein kleines Mach-Zehnder-Interferometer aufgespaltet. In dem einen Teilstrahlengang wird durch geeignete Blendenanordnungen das am Objekt gebeugte Licht zurückgehalten. Da auf diese Weise alle Objektstrukturen herausgefiltert werden, wird durch diesen Teilstrahlengang nur eine ebene Welle übertragen. Nach Wiedervereinigung der Teilstrahlen gelangt in der Bildebene (siehe Bild 5) die durch das Objekt deformierte Welle des einen Teilstrahlenganges mit der ebenen Welle des anderen Teilstrahlenganges zur Interferenz.

Im Gegensatz zum Shearing-Verfahren können im Interphako-Verfahren nur kleine Objekte vermessen werden, da nur bei kleinen Objekten in der Pupille eine genügend große räumliche Trennung von direktem und gebeugtem Licht vorliegt. Dadurch erst wird wie beim Phasenkontrast eine getrennte Beeinflussung beider Lichtanteile möglich. Für genaue Messungen darf deshalb die Objektgröße das 20fache der Auflösungsgrenze des verwendeten Objektivs nicht übersteigen. Für solche kleinen Objekte ist es aber, wegen seiner wesentlich besseren Bildqualität, dem Shearing-Verfahren eindeutig überlegen.



Die für eine bestimmte optische Anordnung noch zulässige Objektgröße ergibt sich aus dem in BEYER (1953) abgeleiteten  $\Gamma$ -Wert.

$$\Gamma = \frac{B \cdot k}{f'} \cdot \Delta R$$

$B$  = Radius eines kreisförmigen Objekts. Bei länglichen Objekten ist für  $2 B$  der kleinste Durchmesser einzusetzen.

$k$  = Wellenzahl  $\frac{2\pi}{\lambda}$

$f$  = wirksame Brennweite des abbildenden Systems.

$\Delta R$  = Breite der Ringblende im Interferometer.

Für genaue Messungen soll dieser  $\Gamma$ -Wert die Größe 1 nicht überschreiten. Durch entsprechende Objektivauswahl und die Möglichkeit, Ringblenden unterschiedlicher Breite zu verwenden, kann diese Forderung für einen relativ breiten Objektgrößenbereich verwirklicht werden.

In Bild 8 ist beispielsweise die maximal zulässige Objektgröße in Abhängigkeit von der Objektivvergrößerung und der verwendeten Ringblende für das AMPLIVAL interphako dargestellt. Bei größeren Objekten treten Meßfehler auf, die z.T. korrigiert werden können. Bei homogenen Phasenobjekten, d. h. solchen, die über ihren gesamten Bereich die gleiche Phasendrehung aufweisen, sind in Abhängigkeit vom  $\Gamma$ -Wert, der Objektphasendrehung und dem Ort der Messung innerhalb oder außerhalb des Objekts die in Bild 9 dargestellten Korrekturen anzubringen. Als Abszisse ist die Objektphasendrehung  $\varphi$  von  $0$  -  $180^\circ$  und als Ordinate die notwendige Korrektur  $\Delta\varphi$  aufgetragen. Als Parameterwert dient der  $\Gamma$ -Wert für verschiedene Objektorte. Die Strichart bezeichnet den  $\Gamma$ -Wert  $0,5$ ;  $1,0$  und  $2,5$ . Die an die Kurven geschriebenen Zahlen  $0$ ;  $0,5$ ;  $1,0$  und  $1,5$  sind die Abstände

des Meßpunktes von der Mitte eines kreisförmigen Objekts in Einheiten des Objektradius. Für anders gestaltete Objekte sind die Korrektionswerte sinngemäß (nebenstehende Erläuterung zur Größe  $B$ ) anzuwenden.

## 2.4. Besondere Hinweise zur Durchführung von Interferenzmessungen

Es werden grundsätzlich Gangunterschiede  $\Delta$  nach Formel (1) gemessen. Aus einer solchen Messung ist deshalb noch nicht zu erkennen, ob die Dicke  $d$ , die Brechzahl  $n$  oder beide von der Umgebung abweichen. Im Auflicht können außerdem noch Oberflächeneffekte den Meßwert verfälschen. Diese Unsicherheiten müssen durch geeignete zusätzliche Messungen oder Zusatzüberlegungen eliminiert oder wenigstens auf ein zulässiges Maß reduziert werden.

### 2.4.1. Streifenmethode

Wenn von Lichtinterferenzen die Rede ist, dann denkt man im allgemeinen zunächst an die Interferenzstreifen nach den Bildern 3, 4 und 13, weil diese die markanteste und anschaulichste Erscheinungsform der Lichtinterferenzen sind. Die Interferenzstreifenmethode wurde und wird auch heute noch vielfach für Gangunterschiedsmessungen eingesetzt. Sie ist unbedingt erforderlich, wenn man die Auswertung des Interferenzbildes in der Fotografie vornehmen will, und sehr nützlich, um sich einen schnellen Überblick über die Größenordnung der auftretenden Gangunterschiede zu verschaffen. Das Grundprinzip ist schon in Formel (4) und Bild 4 erläutert worden. Bei ebener Vergleichswellenfront, wie sie z. B. von den Interferenzmikroskopen mit getrenntem Objekt- und Vergleichsstrahlengang geliefert wird, tritt an jedem Objekt nach Bild 4 nur eine

einmalige Auslenkung der Interferenzstreifen ein, während beim Shearing-Verfahren mit totaler Bildaufspaltung nach Bild 13 die Interferenzstreifen an den beiden Teilbildern in entgegengesetzter Richtung ausgelenkt werden. Man mißt entweder direkt im mikroskopischen Bild oder in der Fotografie die Größe der durch das zu vermessende Objekt hervorgerufenen Streifenauslenkung  $c$  (Bild 4), dividiert diese durch den Abstand  $b$  zweier benachbarter Interferenzstreifen und multipliziert diesen Quotienten mit der Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Bei Beobachtung im weißen Licht ist für  $\lambda$  die Schwerpunktwellenlänge von  $550$  nm einzusetzen.

Bei Interferenzmikroskopen mit Meßkompensator, wie das Interphako-Mikroskop für Auf- oder Durchlicht, läßt sich der der Streifenauslenkung entsprechende Gangunterschied genauer mit Hilfe dieses Kompensators messen. Hierzu bringt man nacheinander durch Verdrehen der Meßtrommel einen Interferenzstreifen des zu vermessenden Objekts und den zugeordneten Streifen in seiner Umgebung mit einer in der Okularbildebene befindlichen Strichmarke zur Deckung. Die Differenz der an der Meßtrommel abgelesenen Skalenteile  $\Delta T$  multipliziert mit dem Eichfaktor  $K$  ergibt den durch das Objekt hervorgerufenen Gangunterschied  $\Delta$ .

$$\Delta = \Delta T \cdot K \quad (5)$$

Der genannte Eichfaktor  $K$  wird mit dem Gerät übergeben oder kann aus der Anzahl der Trommelteile für die Verschiebung der Interferenzstreifen um einen Streifenabstand leicht ermittelt werden.

Für sehr kleine Objekte ist die Streifenmethode nicht geeignet, weil dann im Objekt kein Interferenzstreifen zu erkennen ist. In solchen Fällen verwendet man die nachfolgend beschriebene

Kompensationsmethode im Interferenzkontrast, d. h. im streifenfreien Umfeld.

### 2.4.2. Kompensationsmethode im Interferenzkontrast

Moderne Interferenzmikroskope, die hohen Ansprüchen genügen sollen, sind mit einem schon in 2.4.1. erwähnten Meßkompensator ausgerüstet, der es gestattet, eine höhere Meßgenauigkeit als nach der direkten Streifenmethode zu erreichen. Diese Messungen lassen sich im monochromatischen und weißen Licht durchführen. Im monochromatischen Licht wird nach Bild 10 nacheinander das Objekt und die Umgebung auf größte Dunkelheit und im weißen Licht auf die gleiche empfindliche Farbe eingestellt. Bei letzterer handelt es sich um die zwischen Rot und Blau liegende Purpurfarbe, bei der eine sichtbare Änderung schon durch sehr kleine Gangunterschiedsänderungen bewirkt wird. Der Gangunterschied bestimmt sich dann nach Formel (5). Bei Shearing-Anordnungen, die zwei in der Qualität gleichwertige Bilder liefern, wie das bei der Interphako-Einrichtung im Auf- oder Durchlicht der Fall ist, kann man zur Erhöhung der Meßgenauigkeit in der angegebenen Weise auch von einem zum anderen Bild des gleichen Objekts messen.

Dabei ist stets darauf zu achten, daß der Übergang von der Dunkelstellung oder von der empfindlichen Farbe des einen Bildes zum anderen über die Dunkelstellung oder empfindliche Farbe der Umgebung geht und daß letztere in der Mitte der beiden erstgenannten liegt.

### 2.4.3. Spalt- und Gitterbeleuchtung

Bei Anwendung des Shearing-Verfahrens muß zur Sicherung eines guten Kontrastes die Beleuchtungsapertur in Aufspaltungsrichtung beschränkt wer-

den. Beim Interphako-Mikroskop geschieht das mit Hilfe von Beleuchtungsspalten (weißes und monochromatisches Licht) oder mit Hilfe von Beleuchtungsgittern (monochromatisches Licht). Zwischen der auf die Objektebene bezogenen Aufspaltungsgröße  $a$  und der Spaltbreite  $b$  muß die Bedingung

$$\frac{b \cdot a}{f} < \frac{\lambda}{4} \quad (6)$$

erfüllt sein.

$F$  = Kondensorbrennweite

$\lambda$  = Lichtwellenlänge

Um eine optimale Anpassung an unterschiedliche Bildaufspaltungen durchführen zu können, sind im Durchlicht ein verstellbarer und drehbarer Präzisionsspalt und im Auflicht einige auf einem Schieber angeordnete Spalte unterschiedlicher Breite vorgesehen. Die richtige Spalteinstellung läßt sich nach Umschalten auf Pupillenbeobachtung leicht kontrollieren, da im Shearing-Verfahren bei homogenem Feld in der Pupille Interferenzstreifen sichtbar sind, deren Abstand der Bildaufspaltungsgröße umgekehrt proportional ist. Der Spalt ist dann richtig eingestellt, wenn sein gleichzeitig sichtbares Bild parallel zu den Interferenzstreifen verläuft und nicht breiter ist als ein Viertel eines Interferenzstreifenabstandes.

Für das Arbeiten im monochromatischen Licht kann zur Erhöhung der Bildhelligkeit und der Bildqualität an Stelle des Beleuchtungsspaltes ein Beleuchtungsgitter verwendet werden, dessen Spaltbreite die Bedingung (6) und dessen Gitterkonstante  $d$  die folgende Bedingung (7) erfüllt.

$$\frac{d \cdot a}{f} = \lambda \quad (7)$$

In der Praxis bedeutet diese Bedingung, daß in der Austrittspupille die Abstände der Gitterspalte denen der gleichzeitig sichtbaren Interferenzstreifen entsprechen müssen. Je größer die

Bildaufspaltung  $a$  ist, um so kleiner muß die Gitterkonstante  $d$  sein. Mit der Wahl des Beleuchtungsgitters ist also die Bildaufspaltungsgröße fest vorgegeben. Deshalb sind Gitter mit unterschiedlicher Gitterkonstante vorgesehen. Die exakte Erfüllung der Bedingung (7) macht keine Schwierigkeiten, da die Bildaufspaltungsgröße  $a$  kontinuierlich veränderbar ist und deshalb der Gitterkonstante genau angepaßt werden kann.

### 2.4.4. Messungen mit der Halbschattenplatte

Wesentliche Meßerleichterungen und eine Erhöhung der Meßgenauigkeit ergeben sich bei Verwendung einer Halbschattenplatte, die (siehe Bild 11) im einfachsten Fall aus einer Phasenkante besteht, die die Begrenzungslinie zweier auf einer Glasplatte befindlicher Bereiche darstellt und die einen geringen relativen Gangunterschied erzeugen. Beim Interphako-Mikroskop wird eine solche Halbschattenplatte in die vor dem Interferometer gelegene Zwischenbildebene eingeschoben und so eingestellt, daß die Phasenkante durch das zu vermessende Objekt geht und somit Objekt und Umgebung in zwei Bereiche mit im allgemeinen unterschiedlicher Helligkeit teilt. Beim Shearing-Verfahren (Bild 12) wird dabei sowohl das Objektbild (schräger Phasenstreifen) als auch die Phasenkante um den gleichen Betrag aufgespaltet (waagerechter Streifen). Zur Durchführung der Messung wird nach Bild 12a und b mit Hilfe des Meßkompensator nacheinander der Aufspaltungsbereich der Phasenkante im Objekt und in der Umgebung in der Helligkeit auf die unmittelbare Nachbarschaft abgeglichen und aus der Differenz der an der Meßtrommel abgelesenen Skalenwerte, wie schon in 2.4.2. beschrieben, der durch

das Objekt hervorgerufene Gangunterschied bestimmt. Zur Verdoppelung der Meßgenauigkeit kann man auch in diesem Fall von einem zum anderen Teilbild (siehe Bild 12a und c) messen. Da stets im monochromatischen Licht gearbeitet werden muß, wird man die Verwendung des Beleuchtungsgitters bevorzugen.

Beim Interphako-Verfahren wird an Stelle der einfachen Phasenkante ein Phasesteg, also zwei eng benachbarte Phasenkanten verwendet; die Messung wird auf die gleiche Weise, wie eben beschrieben, durchgeführt.

#### 2.4.5. Bestimmung der Interferenzordnung

Obwohl der wichtigste Anwendungsbereich der quantitativen Interferenzmikroskopie die Vermessung kleiner Gangunterschiede ( $< \lambda/2$ ) ist, treten jedoch häufig auch größere Gangunterschiede auf. Dann sind zu ihrer Bestimmung zusätzliche Überlegungen erforderlich, denn im monochromatischen Licht, das bei Interferenzmessungen bevorzugt wird, sind die Interferenzstreifen der verschiedenen Interferenzordnungen nicht zu unterscheiden. Bei größeren Gangunterschieden ( $> \lambda/2$ ) ist deshalb eine sichere Zuordnung der Interferenzstreifen von Objekt und Umgebung im monochromatischen Licht nur möglich, wenn sie sich kontinuierlich durch das Objekt hindurch verfolgen lassen oder sich auf andere Weise die Größenordnung des Gangunterschieds abschätzen läßt. Ist das aber, wie bei plötzlicher starker Brechzahl- oder Dickenänderung nicht der Fall, dann muß zur Bestimmung der Interferenzordnung im weißen Licht gearbeitet werden. Hier sind die niedrigen Interferenzordnungen (siehe Bild 13) durch ihren Farbverlauf „markiert“, so daß eine Zuordnung der Interferenzstreifen im Objekt zur Um-

gebung auch in diesem Fall möglich wird. Am besten ist der Streifen nullter Ordnung (neutrales Weiß) zu erkennen. Sind keine Dispersionsunterschiede zwischen Objekt und Umgebung vorhanden, dann ändert sich die Interferenzfarbe symmetrisch zum Streifen nullter Ordnung.

Bei kleinen Objekten, wo die Interferenzstreifenmethode nicht anwendbar ist, wird zur Bestimmung der Interferenzordnung die entsprechende Farbfolge in Objekt und Umgebung herangezogen, die bei Betätigung des Phasenschiebers nacheinander erscheint.

Man ermittelt also zunächst im weißen Licht, entweder mit Hilfe des Meßkompensators oder durch Abstandsmessung im Zwischenbild den Abstand zwischen der nullten Ordnung im Objekt und in der Umgebung, bestimmt dann im monochromatischen Licht die in diesem Abstand gelegene Anzahl der ganzen Interferenzstreifenabstände bzw. Interferenzordnungen ( $n$ ) und mißt den restlichen Gangunterschied in Bruchteilen von Wellenlängen, z. B. bei Anwendung der Streifenmethode nach Formel (4). Auf diese Weise erhält man den gesamten Gangunterschied

$$\Delta = n \cdot \lambda + \frac{c}{b} \cdot \lambda \quad (8)$$

Allerdings versagt diese Methode zur Bestimmung der Interferenzordnung, wenn die zur Interferenz gelangenden Strahlen im Objektbereich größere Wege (mehrere Wellenlängen) Materialien mit stark unterschiedlicher Dispersion durchlaufen. Dann ist der scheinbar neutrale Streifen, wenn überhaupt ein solcher festzustellen ist, nicht mehr der Streifen nullter Ordnung, und es können bei der so vorgenommenen Zuordnung Fehler bis zu einigen Wellenlängen auftreten. Das kann in Extremfällen bei dicken Objekten

im Durchlicht schon der Fall sein, wenn für eine Wellenlänge die optischen Wege gleich sind. Ein Kriterium dafür, wann störende Farbverfälschungen durch Dispersionsunterschiede auftreten sind, ist der starke Unterschied der Farbfolge im Objekt und in der Umgebung, insbesondere die Unsymmetrie zum scheinbar farblosen, neutralen Streifen im Objekt, wenn in der Umgebung eine solche Symmetrie vorhanden ist. In der praktischen Arbeit wird man jedoch häufig die mit der Bestimmung der Interferenzordnung verbundenen Schwierigkeiten durch geeignete Präparation oder anderweitige Abschätzung des zu erwartenden Gangunterschiedes umgehen können.

#### 2.4.6. Messung kleiner lateraler Größen

Diese Meßmethode zur Messung kleiner in der Objektebene gelegener Größen ist nur mit solchen Shearing-Interferenzmikroskopen durchführbar, die, wie das Interphako-Mikroskop, die Größe der Bildaufspaltung kontinuierlich zu verändern gestatten. Es handelt sich hierbei nicht um eine direkte Interferenzmessung am Objekt, sondern um die mittelbare Anwendung der Interferenzmethode.

In 2.4.3. ist schon darauf hingewiesen worden, daß beim Shearing-Verfahren mit homogenem Feld in der Pupille Interferenzstreifen entstehen, deren Abstände  $d$  der Bildaufspaltungsgröße  $a$  umgekehrt proportional sind. Es besteht die Beziehung

$$a = \frac{C \cdot \lambda}{d \cdot \beta' \cdot 546} \quad (9)$$

$\beta'$  = Abbildungsmaßstab des letzten Zwischenbildes, der etwa dem 1,25fachen der Objektivvergrößerung bzw. des Objektivabbildungsmaßstabes entspricht.



C = dimensionslose Gerätekonstante von etwa 164, deren genauer Wert durch Eichung bestimmt werden kann.

Setzt man für  $\lambda$  die Anzahl der nm und für d die Anzahl der mm ein, dann ergibt sich eine Zahl, die die Größe a in  $\mu\text{m}$  angibt. Zur Durchführung einer solchen Messung wird die zu messende Größe, z. B. die Objektbreite a (siehe Bild 14), in Aufspaltungsrichtung gedreht und im monochromatischen Licht eine solche Aufspaltung eingestellt, daß sich die beiden Objektbilder gerade berühren, so daß die Aufspaltungsgröße der Objektbreite a entspricht. Dabei wird mit Interferenzfilter oder Spektrallampe und voller Beleuchtungsapertur gearbeitet. Nach Einschalten einer Bertrand-Linse wird mit Hilfe einer Okularmeßplatte oder eines Meßschraubenokulars der Interferenzstreifenabstand d in der Pupille gemessen und nach Formel (9) die Objektbreite a berechnet. Für die praktische Arbeit läßt sich Formel (9)

vereinfachen, indem man  $\frac{C \cdot \lambda}{d \cdot 546}$  zu einer Konstante K' zusammenfaßt und die Beziehung

$$a = \frac{K'}{d} \quad (9a)$$

erhält.

Um in der Pupille kontrastreiche Interferenzstreifen zu erhalten, empfiehlt es sich, vorher bei eingengter Beleuchtungsapertur in der Zwischenbildebene ein homogenes Interferenzfeld einzustellen. Im weiteren Verlauf der Arbeiten, insbesondere bei Einstellung stark unterschiedlicher Aufspaltungsgrößen, genügt zur optimalen Einstellung eine geringe Korrektur an den Einstellknöpfen für die Kompensationsplatten.

Der Vorteil dieser Meßmethode besteht besonders darin, daß zur eigentlichen Messung gleichartige und in der

gleichen Ebene liegende Objektkanten aneinandergelegt und auch bei sehr kleinen Objekten hohe Meßgenauigkeiten erzielt werden, da in diesem Fall der Interferenzstreifenabstand in der Pupille besonders groß ist.

Da die Konstanz der Größe C in Formel (9) bzw. K' in Formel (9a) für einen relativ großen Aufspaltungsbereich gewährleistet ist, kann die Eichung mit einem größeren Objekt, z.B. einer Objektmeßplatte erfolgen (s. 3.3.). Es wurden noch Größen gemessen, die beträchtlich unterhalb der Auflösungsgrenze lagen. Die Reproduzierbarkeit der Messungen betrug, nahezu unabhängig von der Meßgröße, etwa  $0,02 \mu\text{m}$ .

# 3. Anwendungen

## 3.1. Durchlicht

### 3.1.1. Bestimmung von Dicke und Brechzahl mikroskopischer Objekte

Bei Objekten, die sich in zwei Medien unterschiedlicher Brechzahl, von denen eines auch Luft sein kann, einbetten lassen, ohne sich dabei selbst zu verändern, kann man durch zwei Messungen in solchen unterschiedlichen Medien sowohl Dicke als auch Brechzahl des Objekts bestimmen. Bezeichnen wir die Brechzahl des Objekts der Dicke  $d$  mit  $n_0$  und die der beiden Einbettungsmittel mit  $n_1$  und  $n_2$ , dann ist nach Formel (1a)

$$\begin{aligned} \Delta_1 &= d(n_0 - n_1) \\ \Delta_2 &= d(n_0 - n_2) \end{aligned} \quad (10)$$

$$\Rightarrow \Delta_1 - \Delta_2 = d(n_2 - n_1)$$

$$\Rightarrow d = \frac{\Delta_1 - \Delta_2}{n_2 - n_1} \quad (11)$$

und durch Einsetzen von (11) in eine der beiden Formeln für  $\Delta_1$  oder  $\Delta_2$  erhält man

$$n_0 = \frac{\Delta_1 \cdot n_2 - \Delta_2 \cdot n_1}{\Delta_1 - \Delta_2} \quad (12)$$

Ist  $\delta\Delta$  der Fehler der Einzelmessung und wird der Fehler in der Bestimmung von  $n_1$  und  $n_2$  vernachlässigt, dann ist nach der üblichen Fehlerrechnung der Maximalfehler für  $d$  und  $n_0$

$$\delta d = \pm \frac{2\delta\Delta}{n_2 - n_1} \quad (11a)$$

$$\delta n_0 = \pm \frac{|\Delta_1 n_1| + |\Delta_2 n_2|}{(\Delta_1 - \Delta_2)^2} \cdot \delta\Delta \quad (12a)$$

Der wirklich auftretende Fehler ist immer kleiner und kann durch mehrfache Wiederholung der Messungen und Mittelwertbildung weiter verkleinert werden.

Vielfach sind die Brechzahlen  $n_1$  und  $n_2$  der verwendeten Einbettungsmittel (z. B. Luft und Wasser) bekannt, andernfalls müssen sie in einem Refraktometer, z. B. nach 3.1.3. bestimmt werden.

Bei bekannter Brechzahl bzw. bekannter Dicke des Objekts ist nur eine Messung erforderlich; so ergibt sich an Stelle der Formeln (11) und (12)

$$d = \frac{\Delta_1}{n_0 - n_1} \quad (13)$$

$$n_0 = n_1 + \frac{\Delta_1}{d} \quad (14)$$

Zur Bestimmung der Brechzahl allein kann, auch bei unbekannter Objekt-dicke, die Immersionsmethode verwendet werden. Dazu wird die Brechzahl  $n_1$  des aus zwei mischbaren Flüssigkeiten unterschiedlicher Brechzahl bestehenden Einbettungsmittels so lange variiert, bis das Objekt im Interferenzbild verschwindet. Dann ist

$$\Delta_1 = d(n_0 - n_1) = 0 \text{ also } n_0 = n_1,$$

und durch Messung von  $n_1$  erhält man die Brechzahl des Objekts  $n_0$ .

#### Meßbeispiel zu 3.1.1.:

Zu bestimmen ist Dicke und Brechzahl eines nichtabsorbierenden Glasteilchens. Es wird einmal in Luft ( $n_1 = 1,0000$ ) und einmal in Wasser ( $n_2 = 1,3330$ ) gemessen.

Die gemessenen Gangunterschiede sind

$$\begin{aligned} \Delta_1 &= 3,075 \mu\text{m} \\ \Delta_2 &= 1,193 \mu\text{m} \end{aligned}$$

Nach Formel (11) ergibt sich die Dicke zu

$$\begin{aligned} d &= \frac{3,075 - 1,193}{1,3330 - 1,0000} = \frac{1,882}{0,3330} \\ &= 5,652 \mu\text{m} \end{aligned}$$

und die Brechzahl nach Formel (12)

$$\begin{aligned} n_0 &= \frac{3,075 \cdot 1,3330 - 1,193 \cdot 1,0000}{3,075 - 1,193} \\ &= \frac{4,099 - 1,193}{1,882} = \frac{2,906}{1,882} = 1,5441 \end{aligned}$$

Wird für die Einzelmessung des Gangunterschiedes ein Meßfehler von  $\lambda/250 \approx 0,002 \mu\text{m}$  angenommen, dann ist der Maximalfehler nach (11a) und (12a)

$$\begin{aligned} \delta d &= \frac{0,004}{0,333} = 0,012 \mu\text{m} \\ \delta n_0 &= \frac{3,075 + 1,193 \cdot 1,333}{1,882^2} = 0,002 \\ &= 0,0026 \end{aligned}$$

und es wird

$$d = 5,652 \pm 0,012 \mu\text{m}$$

$$n_0 = 1,5441 \pm 0,0026$$

### 3.1.2. Bestimmung der Trockenmasse biologischer Zellen

Der Inhalt einer biologischen Zelle kann aufgefaßt werden als eine wäßrige Lösung verschiedener Substanzen, überwiegend Proteinen und Nukleinsäuren, deren Konzentration und Verteilung von entscheidender Bedeutung für die Funktion der Zelle ist. Deshalb liegt die Hauptarbeitsrichtung der Interferenzmikroskopie in der Biologie und Medizin in der Bestimmung der Trockensubstanz lebender und fixierter Zellen. Es besteht eine eindeutige Beziehung zwischen der Konzentration der in einer lebenden Zelle gelösten Trockensubstanz und der Brechzahl der Lösung, die durch die Formel (15) dargestellt wird.

$$n = n_w + \alpha \cdot C \quad (15)$$

$n$  = Brechzahl der Lösung

$n_w$  = Brechzahl des Lösungsmittels, i. a. Wasser

$C$  = Konzentration der gelösten Substanz in g/100 ml

$\alpha$  = spezifisches Brechungsinkrement in 100 ml/g, das ist die Zunahme der Brechzahl der

Lösung, wenn sich die Konzentration um 1 g/100 ml erhöht,

$\alpha$  liegt für die in einer Zelle überwiegend gelösten Substanzen in der Größenordnung von 0,0018 ml/g. Für  $\alpha$

wird häufig der hundertfache Betrag eingesetzt und mit  $\chi$  bezeichnet.

$\chi = 100 \cdot \alpha$  in  $\text{cm}^3/\text{g}$

Dann ist die Konzentration  $C$  in  $\text{g}/\text{cm}^3$  einzusetzen.

Wird die Zelle in ein Einbettungsmittel der Brechzahl  $n_E$  eingebettet, dann ergibt sich der Gangunterschied aus einer der Formeln (10) und der Formel (15), indem man für  $n_o=n$ , für  $n_1 = n_E$  und für  $\alpha = \chi$  einsetzt.  $\Delta = d(n-n_E) = d [(n_w-n_E)+\chi \cdot C]$  (16) und für die Konzentration der Trockensubstanz

$$C = \frac{\Delta}{\chi \cdot d} + \frac{n_w - n_E}{\chi} \quad [\text{g/cm}^3] \quad (17)$$

Da lebende Objekte normalerweise in einem wäßrigen Milieu, z. B. physiologischer Kochsalzlösung, eingebettet sind, dessen Brechzahl sich nur wenig von der des Wassers unterscheidet, kann das zweite Glied i. a. vernachlässigt werden. Unter diesen Bedingungen erhält man die am meisten verwendete, vereinfachte Formel für die Konzentration der Trockensubstanz

$$C = \frac{\Delta}{\chi \cdot d} \quad [\text{g/cm}^3] \quad (17)$$

für die Trockensubstanz pro Flächeneinheit

$$A = \frac{\Delta}{\chi} \quad [\text{g/cm}^3] \quad (19)$$

und für die gesamte Trockenmasse

$$M = \frac{\Delta \cdot F}{\chi} \quad [\text{g}] \quad (20)$$

Dabei ist  $\Delta$  und  $d$  in cm und die vom zu vermessenden Objekt eingenommene Fläche  $F$  in  $\text{cm}^2$  einzusetzen.

Bei fixierten Schnitten wird der Zelle normalerweise das Wasser entzogen und das Einbettungsmittel dringt in die Zelle ein. Die in ihr vorhandene Trockensubstanz liegt dann in ungelöster Form vor, und das spezifische Brechungsincrement ist durch den

Ausdruck  $\frac{n_M - n_E}{\rho}$  zu ersetzen.

$n_M = \text{Brechzahl}$  \ der ungelösten  
 $\rho = \text{Dichte}$  \ Trockensubstanz.

Für diesen Fall erhält man

$$A = \frac{\Delta \cdot \rho}{n_M - n_E} \quad [\text{g/cm}^3] \quad (19a)$$

$$M = \frac{\Delta \cdot \rho \cdot F}{n_M - n_E} \quad [\text{g}] \quad (20a)$$

Eine Angabe von  $C$  ist unter diesen Bedingungen nicht sinnvoll.

Bei Anwendung der Formeln

(19a)

und (20a) müssen  $n_M$ ,  $n_E$  und  $\rho$  bzw.

der Ausdruck  $\frac{n_M - n_E}{\rho}$  bekannt sein.

Umgebung:	69,5	68,5	68	69	67	Mittelwert
Kern:	52	51	51,5	52	51	
	17,5	17,5	16,5	17	16	16,8

Die Skalen konstante wurde zu 5,000 nm bestimmt. Damit ergibt sich ein gemessener Gangunterschied von

$$\Delta = 16,8 \cdot 5 = 84 \text{ nm} = 0,84 \cdot 10^{-5} \text{ cm}$$

Unter Vernachlässigung des Korrekturgliedes in (17) ergibt sich nach (20) mit  $\chi = 0,18 \text{ cm}^3/\text{g}$  und  $F = 3,5 \cdot 6 = 21 \text{ } \mu\text{m}^2 = 2,1 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2$  die Trockenmasse des Kernes

$$M = \frac{0,84 \cdot 10^{-5} \cdot 2,1 \cdot 10^{-7}}{0,18} \text{ g} = 9,8 \cdot 10^{-12} \text{ g}$$

Formel (20) gilt jedoch exakt nur für zylindrische Objekte. Da aber der Zellkern besser durch ein Ellipsoid angenähert wird, dessen Volumen sich zu dem des Zylinders mit gleichem Querschnitt und gleicher Höhe wie 2:3 verhält, wird in der Praxis der nach (20) erhaltene Massenwert noch mit dem Faktor 2/3 multipliziert.

Man erhält somit

$$M_{\text{Kern}} = \frac{2}{3} \cdot 9,8 \cdot 10^{-12} \text{ g} = 6,6 \cdot 10^{-12} \text{ g}$$

Hinsichtlich der weiteren zu erwartenden systematischen Fehler und ihrer Korrekturmöglichkeiten muß auf das einschlägige Schrifttum verwiesen werden.

### Meßbeispiel zu 3.1.2.

Bestimmung der Trockenmasse eines Kernes in der lebenden Zelle einer Pilzhyphe.

Wegen der Kleinheit des Kernes (etwa  $3,5 \cdot 6 \text{ } \mu\text{m}$ ) erfolgt die Messung im Interphako-Verfahren unter Benutzung des Planachromaten HI 100x/1,30 und Verwendung des kleinen Blendenringes.

Es wurden jeweils 5 Messungen im Kern und im Umfeld durchgeführt und folgende Meßwerte in Skalenteilen erhalten:

### 3.1.3. Bestimmung der Brechzahl von Flüssigkeiten

Die Grundlage bildet eine der beiden Formeln (10). Prinzipiell läßt sich daraus z. B. die Brechzahl  $n$  der Einbettungsflüssigkeit bestimmen, wenn Dicke  $d$  und Brechzahl  $n_o$  des eingebetteten Objekts bekannt sind. Es ist

$$n = n_o - \frac{\Delta}{d} \quad (21)$$

Für  $n > n_o$  hat  $\Delta$  negatives und für  $n < n_o$  positives Vorzeichen.

Zur Erreichung einer hohen Meßgenauigkeit muß mit möglichst großen Gangunterschieden, d. h. in höheren Interferenzordnungen gearbeitet werden. Das ist für ein beliebiges Objekt umständlich. Die größte Schwierigkeit besteht in der Zuordnung der Interferenzstreifen, die bei einem ungünstigen Objekt nur im weißen Licht durchgeführt werden kann und bei größeren Dispersionsunterschieden zwischen Objekt und Flüssigkeit nicht eindeutig ist. Es ist deshalb zweckmäßig, ein besonders gestaltetes Objekt zu verwenden, in dem man die Interferenzstreifen direkt verfolgen und damit die Zuord-

nung auch im monochromatischen Licht durchführen kann. Dafür hat sich ein als Mikroskoprefraktometer bezeichneter Objektträger mit gerader, trapezförmiger Nut (siehe Bild 15) besonders bewährt.

Beim Einstellen von Interferenzstreifen im Feld und Anwendung des Shearing-Verfahrens mit totaler Bildaufspaltung ergibt sich der in Bild 16 dargestellte Streifenverlauf. Aus dem Interferenzstreifenabstand  $b$  und der Streifenauslenkung  $c$  ergibt sich der Gangunterschied

$$\Delta = \frac{c}{b} \cdot \lambda$$

und nach Formel (21) die Brechzahl  $n_D$  der in der Nut befindlichen Flüssigkeit

$$n_D = n_0 - \frac{c}{b} \cdot \frac{\lambda}{d} \quad (21a)$$

Die Brechzahl des Trägerglases  $n_0$  wird im Werk für 4 verschiedene Wellenlängen gemessen und ebenfalls die Nuttiefe  $d$  bestimmt. Jedem Mikroskoprefraktometer werden diese gemessenen Werte beigegeben; sie können aber auch vom Anwender selbst nach 3.1.1., Formeln (11) und (12), bestimmt werden. Mit einer Nuttiefe von 10 bis 20  $\mu\text{m}$  sind Meßgenauigkeiten von 0,0001 bis 0,0002 zu erreichen. Dazu reicht eine Flüssigkeitsmenge von  $10^{-8}$  g aus.

### Meßbeispiel zu 3.1.3.

Bestimmung der Brechzahl  $n_D$  (für  $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) von Wasser.

Die Brechzahl des Trägerglases war mit  $n_{0D} = 1,51228$  und die Nuttiefe mit  $d = 10,519 \mu\text{m}$  angegeben. Es wurden jeweils 10 Messungen unter Verwendung eines Interferenzfilters für 589 nm Wellenlänge durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

a) bei direkter Ausmessung der Streifenauslenkung im Feld, z. B. mit Hilfe einer Okularmeßplatte oder eines Meßschraubenokulars, erhält man nach Formel (21a) mit  $b = 27,06$ ;  $c = 87,18$  (in beliebigen Einheiten in der Bildebene gemessen)

$$n_D = 1,51228 - \frac{87,18}{27,06} \cdot \frac{0,589}{10,519} = 1,51228 - 0,18040 = 1,33188$$

$b$  läßt sich durch Messung über mehrere Streifenabstände relativ genau bestimmen, weshalb ein auftretender Meßfehler vorwiegend aus der Meßungenauigkeit von  $c$  resultiert ( $\delta c$ ). Sie beträgt in diesem Fall etwa 1/50 Streifenabstand =  $b/50 \approx 0,54$ . Damit wird der zu erwartende Maximalfehler

$$\delta n_D = \frac{\delta c}{b} \cdot \frac{\lambda}{d} = \frac{0,54}{27,06} \cdot \frac{0,589}{10,519} = 0,0011$$

und man erhält

$$n_D = 1,3319 \pm 0,0011$$

b) Ausmessen der Streifenauslenkung mit einem Meßkompensator und Berechnung der Brechzahl nach Formel (21).

Es wird von einem zum anderen Teilbild also in Bild 16 die doppelte Streifenauslenkung und damit der doppelte Gangunterschied  $2\Delta$  gemessen,  $a_1$  und  $a_2$  sind die an der Meßtrommel abgelesenen Skalenteile

$a_1$	$a_2$	$2\Delta$	$2\delta\Delta$	$(2\delta\Delta)^2$
54,6	788,1	733,5	+0,73	0,5329
55,2	788,3	733,1	+0,33	0,1089
53,0	786,5	733,5	+0,73	0,5329
41,7	773,5	731,8	-0,97	0,9409
28,4	761,5	733,1	+0,33	0,1089
45,0	777,0	732,0	-0,77	0,5929
43,0	775,8	732,8	+0,03	0,0009
60,0	791,9	731,9	-0,87	0,7569
41,8	775,1	733,3	+0,53	0,2809
56,3	789,0	732,7	-0,07	0,0049
		732,77		3,8610

$$\bar{\Delta} (\text{Skt}) = \frac{a_2 - a_1}{2} = 366,385 \text{ Skt}$$

1 Skt wurde zu 5,152 nm bestimmt, also erhält man

$$\bar{\Delta} = 366,385 \cdot 5,152 = 1887,6 \text{ nm}$$

$$n_D = 1,51228 - \frac{1,8876}{10,519} = 1,51228 - 0,17944 = 1,33284$$

Die Meßunsicherheit für die Einzelmessung beträgt in diesem Fall

$$\frac{\lambda}{250} \approx 2,4 \text{ nm}$$

Daraus resultiert ein Maximalfehler

$$\delta n_D = \frac{0,0024}{10,519} = 0,00022$$

Zum Bestimmen der auf den Mittelwert bezogenen Meßunsicherheit wird der mittlere quadratische Fehler von  $\bar{\Delta}$  nach

$$\delta \bar{\Delta} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\sum (2\delta\Delta)^2}{n(n-1)}}$$

( $n =$  Anzahl der Meßwerte) berechnet.

$$\delta \bar{\Delta} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{3,8610}{90}} = \frac{1}{2} \sqrt{0,0429} = 0,1036 \text{ Sk}$$

$$\delta \bar{\Delta} = 0,1036 \cdot 5,152 = 0,534 \text{ nm}$$

Damit ergibt sich für

$$\delta n_D = \frac{0,000534}{10,519} = 0,0000$$

## 3.2. Auf licht

### 3.2.1. Vermessung technischer Oberflächen

Bei der Vermessung technischer Oberflächen interessiert in erster Linie die Rauhtiefe. Sie ist eine wichtige Aussage über den Bearbeitungszustand. Die

Rauhtiefe R ist (siehe Bild 17a) als die größte im Mikrobereich der Oberfläche auftretende Höhendifferenz definiert. Grundlage zur Vermessung und Auswertung der Meßergebnisse bietet auch hier die Formel (1), insbesondere (1 b), wobei  $\delta d$  durch die doppelte Rauhtiefe 2R oder allgemeiner durch die doppelte Höhendifferenz 2h ersetzt wird.

$$\Delta = n \cdot 2h \text{ oder } \Delta = n \cdot 2R \quad (22a)$$

Ist die Probenoberfläche nicht eingebettet und wird mit einem Trockenobjektiv gearbeitet, dann ist  $n = 1$  zu setzen

$$\Delta = 2h \text{ oder } \Delta = 2R \quad (22b)$$

und die Höhendifferenz ist gleich dem halben Gangunterschied

$$h = \frac{\Delta}{2} \text{ oder } R = \frac{\Delta}{2} \quad (22c)$$

so daß der Abstand zweier benachbarter Interferenzstreifen einer Höhendifferenz von  $\lambda/2$  entspricht.

Nach Formel (22c) und Bild 17b erhält man somit für die Rauhtiefe

$$R = \frac{a_1 + a_2}{b} \cdot \frac{\lambda}{2}$$

und mit den aus dem Bildbeispiel in Bild 17b zu entnehmenden Zahlenwerten für  $\lambda = 589 \text{ nm}$

$$R = \frac{9,1 + 8,9}{22,4} \cdot \frac{0,589}{2} = 0,250 \text{ } \mu\text{m}$$

Bei unregelmäßiger Oberflächenstruktur und großen Rauhtiefen läßt sich der Interferenzstreifenverlauf oft nicht mehr mit Sicherheit erkennen, so daß eine direkte Messung nicht durchführbar ist. In solchen Fällen läßt sich der Meßbereich auf Kosten der Meßgenauigkeit durch Anwendung der Lackabzugmethode beliebig erweitern. Der von der zu untersuchenden Oberfläche

angefertigte Lackabzug wird in ein Medium geeigneter Brechzahl eingebettet und im Durchlicht beobachtet. Auf diese Weise kann in Formel (1a) die Brechzahldifferenz ( $\delta n$ ) zwischen Einbettungsmedium und Lackabzug und damit auch der Gangunterschied so klein gehalten werden, daß die Interferenzstreifen mit Sicherheit verfolgt werden können (Bild 18a und b). Hinsichtlich weiterer Einzelheiten wird auf das Schrifttum verwiesen.

### 3.2.2. Halbleitertechnik und Mikroelektronik

Die Halbleiterbauelemente stellen im allgemeinen für die Interferenzmikroskopie günstige Untersuchungsobjekte dar. Sie sind innerhalb eines Elements flächenhaft homogen, also kaum strukturiert und haben ein ausreichendes Reflexionsvermögen, so daß mit einem leistungsfähigen Gerät in günstigen Fällen Meßgenauigkeiten von 1 nm ohne weiteres erreichbar sind.

In der Halbleitertechnik treten vorwiegend kleine Schichtdicken auf. Schichtdicken über 1/4 Wellenlänge rufen im Auflicht einen Gangunterschied größer als 1/2 Wellenlänge hervor, so daß die interferenzmikroskopische Untersuchung eines unbekanntes Objekts stets mit der Bestimmung der Interferenzordnung nach 2.4.5. beginnen muß. Daran schließt sich die genaue Messung des Gangunterschieds im weißen oder monochromatischen Licht an. Bei kleinen Elementen wird man die Kompensatormethode im homogenen Feld bevorzugen, in vielen Fällen ist sie die allein brauchbare Methode.

Bei der Dickenbestimmung durchsichtiger Schichten auf undurchsichtiger Unterlage, wie z. B.  $\text{SiO}_2$  auf Sili-

zium, ist die Bestimmung der Interferenzordnung schon etwas problematischer. Sind diese Schichten eine oder mehrere Wellenlängen dick, dann kann die Zuordnung der Interferenzstreifen durch Dispersionserscheinungen mit der daraus resultierenden Umfärbung der Interferenzstreifen gestört werden. In solchen Fällen kann man sich mit der in 3.2.1. erwähnten Lackabzugmethode weiterhelfen, oder man bedampft (siehe Bild 19) einen genügend großen Teil des Objekts mit einer gut reflektierenden Metallschicht. Auf diese Weise kann ohne Schwierigkeiten die Schichtdicke und daraus Brechzahl und Interferenzordnung für eine beliebige Wellenlänge bestimmt werden. Freilich ist die letztgenannte Methode nur für Grundsatzuntersuchungen und für Eichzwecke brauchbar, d. h., wenn es sich um Testobjekte handelt oder solche, die von einer Anzahl gleicher oder ähnlicher Objekte abgezweigt oder direkt für diesen Zweck präpariert wurden, um aus solchen Messungen verallgemeinerungsfähige und auf andere Objekte übertragbare Aussagen zu erhalten.

Werden besonders hohe Meßgenauigkeiten gefordert, dann ist noch der bei der Reflexion auftretende materialabhängige Phasensprung zu berücksichtigen, wenn es sich um unterschiedliche Materialien handelt. Bei dünnen Schichten gilt das unter Umständen auch schon für solche gleichen Materials unterschiedlicher Dicke. Er hängt außerdem vom Einfallswinkel ab. Wir setzen deshalb in folgendem senkrechten Lichteinfall voraus.

Für alle Nichtleiter, wie z. B. Glas, ist der Phasensprung  $180^\circ$ ; er weicht für Halbleiter, z. B. Silizium, nur wenig von  $180^\circ$  ab und beträgt im Extremfall (Kupfer, kompaktes Material)  $140^\circ$ . Ist  $\square$  die Größe des Phasensprungs in Grad oder als Änderung des Gang-

Unterschieds ausgedrückt, dann ist Formel (22b) durch die Differenz des Phasensprunges  $\Delta_i$  zu ergänzen:

$$\Delta = 2h + \Delta a = 2h + (\Delta_2 - \Delta_1) \quad (23)$$

Daraus ergibt sich die Schichtdicke

$$h = \frac{\Delta}{2} - \frac{\Delta_2 - \Delta_1}{2} \quad (24)$$

Bei der Schichtdickenbestimmung geht also die halbe Differenz der Phasensprünge ein.

Für den Extremfall Kupfer auf Glas ( $\gamma_K = 140^\circ$ ,  $\gamma_G = 180^\circ$ ) sind das

$$\frac{1}{2} \Delta_{K,Gl} = 20^\circ \approx \frac{\lambda}{18} \approx 30 \text{ nm}$$

für Gold auf Silizium mit  $\gamma_G = 142,5^\circ$ ,  $\gamma_S = 177^\circ$

$$\frac{1}{2} \Delta_{G,S} = 17,25^\circ \approx \frac{17,25}{360} \cdot \lambda \approx 26 \text{ nm}$$

für Chrom auf Silizium mit  $\gamma_C = 165^\circ$

$$\frac{1}{2} \Delta_{C,S} = 6^\circ \approx \frac{\lambda}{60} \approx 9 \text{ nm}$$

Für die Kombination von Halbleitern wird die Differenz der Phasensprünge noch kleiner und kann deshalb im allgemeinen vernachlässigt werden. Man ersieht daraus, daß die Differenz der Phasensprünge bei genauen Messungen und sehr unterschiedlichem Material wohl zu berücksichtigen ist, aber auch nicht überbewertet werden darf, da sie bei vielen Meßproblemen innerhalb der zu fordernden Meßgenauigkeit liegt und deshalb unberücksichtigt bleiben kann.

### Meßbeispiel zu 3.2.2.

Bestimmung des Phasensprunges eines aufgedampften Goldstreifens. Der Goldstreifen wurde nach Bild 19 präpariert und der Gangunterschied im nicht überdampften und überdampften Bereich gemessen. Es ergab sich

$$\begin{aligned} \Delta_2 &= 232 \text{ nm} \\ \Delta_1 &= 183 \text{ nm} \end{aligned}$$

Daraus ergibt sich eine Dicke des Goldstreifens von

$$h = \frac{\Delta_2}{2} = 116 \text{ nm}$$

und der der Differenz des Phasensprungs entsprechende Gangunterschied

$\Delta^* = \Delta_2 - \Delta_1 = 232 - 183 = 49 \text{ nm}$ , was einer Differenz des Phasensprungs von  $\frac{49}{550} \cdot 360^\circ = 32^\circ$  entspricht.

Ohne Berücksichtigung der Phasensprünge würde sich also ein Fehler in der Dickenbestimmung von 24,5 nm ergeben.

### 3.3. Messung kleiner lateraler Größen (Meßbeispiel zu 2.4.6.)

Die Messung kleiner lateraler Größen ist in fast allen Bereichen der mikroskopischen Praxis sowohl im Auf- als auch im Durchlicht von großer Bedeutung. Die praktische Anwendung soll noch einmal an einem Meßbeispiel aus der Halbleitertechnik demonstriert werden.

Bild 20a zeigt einen Flächentransistor auf einer Siliziumscheibe und Bild 20b die gleiche Objektstelle im Shearing-Verfahren mit einer Bildaufspaltung, deren Größe der Breite des zu vermessenden kleinsten Halbleiterelements entspricht.

Bei Verwendung des EPIVAL Interphako mit dem planachromatischen Objektiv 12,5x/0,25 und eines Interferenzfilters für die Wellenlänge von 574 nm erhält man in der Pupille das in Bild 21 dargestellte Interferenzstreifen-system. Aus dem Interferenzstreifenabstand  $d$  kann nach Formel (9a) die Elementbreite  $a$  bestimmt werden.

$$a = \frac{K'}{d} \quad (9a)$$

Die Konstante  $K'$  läßt sich leicht unter Verwendung einer Objektmeßplatte bestimmen. Hierzu wird das Bild der Objektmeßplatte nach Bild 22 um einen Strichabstand von 0,01 mm aufgespaltet ( $a_0$ ) und im mittleren Bereich der Pupille (siehe Bild 23) der Abstand zweier benachbarter Interferenzstreifen ( $d_0$ ) gemessen. Die Messung erfolgt in Bild 23 mit Hilfe einer Okularmeßplatte mit einem Strichabstand von 0,1 mm und man erhält für  $d_0 = 0,84 \text{ mm}$ . Zur Steigerung der Meßgenauigkeit kann aber auch ein Meßschraubenokular verwendet werden.

Aus (8a) ergibt sich dann

$$K' = a_0 \cdot d_0 = 0,01 \text{ mm} \cdot 0,84 \text{ mm} = 8,4 \mu\text{m} \cdot \text{mm}$$

$$\text{und } a = \frac{8,4}{d}$$

Man erhält die Elementbreite  $a$  in  $\mu\text{m}$ , wenn man  $d$  in mm einsetzt. Da in Bild 21 der Interferenzstreifenabstand  $d = 1,63 \text{ mm}$  beträgt, ergibt sich daraus eine Elementbreite von

$$a = \frac{8,4}{1,63} = 5,15 \mu\text{m}$$

Bei mehrfacher Wiederholung der gleichen Messung beträgt die Streubreite  $\pm 0,02 \mu\text{m}$ .

$$a = 5,15 \pm 0,02 \mu\text{m}$$

ist also auf diese Weise mit einem Maximalfehler von  $0,02 \mu\text{m}$  bestimmt worden. Der sich durch Mittelwertbildung ergebende wahrscheinliche Fehler ist natürlich noch wesentlich kleiner.

### 3.4. Anwendung zur Kontrastierung

Schließlich sei noch erwähnt, daß interferenzmikroskopische Anordnungen neuerdings in verstärktem Maße zur Kontrastierung von Phasenobjekten eingesetzt werden. Für diesen Zweck



wird bevorzugt das Shearing-Verfahren mit differentieller Bildaufspaltung verwendet. Solche speziellen Interferenzkontrasteinrichtungen, mit denen nur in sehr beschränktem Maße quantitative Untersuchungen durchgeführt werden können, arbeiten vorwiegend nach dem Polarisationsprinzip. Im Gegensatz dazu erlaubt die Interphako-Anordnung im Auf- oder Durchlicht, neben den quantitativen Interferenzmessungen, die Durchführung des Interferenzkontrasts nach dem Shearing-Verfahren mit differentieller Bildaufspaltung und dem Interphakoverfahren, beides im natürlichen Licht.

Die Bilder 24 bis 27 zeigen Beispiele der interferenzmikroskopischen Kontrastierung von Phasenobjekten.

## Schrifttum

- Barer, R., und S. Joseph:** Refractometry of Living Cells. Part I. Basic Principles. Part II. The Immersion Medium. Part III. Technical and Optical Methods. Quart. J. microsc. Sci. 95 (1954) 399-423  
96 (1955) 1-27 u. 423-447.
- Barer, R.:** Phase Contrast and Interference Microscopy in Cytology. In Oster-Pollister: Physical Techniques in Biological Research. Bd. IM Cells and Tissues. Acad. Press New York 1966.
- Beneke, G.:** Application of Interference Microscopy to Biological Material. In G. L. Wied: Introduction to Quantitative Cytochemistry. Academic Press, New York and London 1966 S. 63-92.
- Beyer, H.:** Auflicht-Interferenzmikroskop EPIVAL interphako Jenaer Rdsch. 16(1971) 82-88 Messe-Sonderheft.
- Beyer, H.:** Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig 1974.
- Beyer, H.:** Interferenzmikroskopie (Durchlicht). In „Handbuch der Mikroskopie“, VEB Verlag Technik Berlin 1973
- Beyer, H.:** Interferenzmikroskopie (Auflicht) In „Handbuch der Mikroskopie“, VEB Verlag Technik Berlin 1973.
- Beyer, H., und G. Schöppe:** Interferenzeinrichtung für Durchlichtmikroskopie Jenaer Rdsch. 10 (1965) 99-105.
- Chayen, J.:** Interference Microscopy In "In Vivo Techniques in Histology". Ed. by G. H. Bourne. The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1967 S. 40-68.
- Davies, H. G.:** The Determination of Mass and Concentration by Microscope Interferometry. In "Gen. Cytochem. Meth." 1 (1958) 55-161. Ed. by J. F. Danielli. Acad. Press New York 1958.
- Francon, M.:** Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie G. Braun, Karlsruhe 1967.
- Haie, J. HL:** The Interference Microscope in Biological Research. Livingston Ltd. Edinburg u. London 1958.
- Hoffmann, R., und L. Gross:** Reflected-light differential-interference microscopy: principles, use and image interpretation. J. of Microscopy 91 (1970) 149-172.
- Illig, W.:** Oberflächenprüfung mit dem Interferenzmikroskop Z. Metalloberfläche A 7 (1953) 93-104.
- Kohaut, A.:** Das Interferenzmikroskop, ein vielseitiges Meßgerät Z. f. angew. Physik 4 (1948) 165-173.
- Kraus, H., und W. Sandritter:** Interferenzmikroskopische und cytophotometrische Untersuchungen zur Analyse von Zellkernen. I. Versuche zur Bestimmung der Globulinfraktion. II. Versuche zur Bestimmung von DNS, Histonen und des Desoxyribonukleoproteins Histochem. 15 (1968) 99-139.
- Krug, W., J. Rienitz und G. Schulz:** Beiträge zur Interferenzmikroskopie Akademie-Verlag Berlin 1961.
- Nomarski, G., und A. R. Weill:** Application a la metallographie

des methodes interferentielles  
à deux ondes polarizees  
Rev. de Metallurgie 50 (1955)  
121-134.

**Osterberg, H.:** Phase and Inter-  
ference Microscopy.  
In G. Oster und A. W. Pollister:  
Physical Techniques in  
Biological Research Bd. I.  
Optical Techniques. Acad.  
Press New York 1955 S. 377-437.

**Padawer, J.:** The Nomarski inter-  
ference contrast microscope.  
An experimental basis for  
image Interpretation.  
J. Roy. Micr. Soc. 88 (1968)  
305-349.

**Rosenberg, G. W.:** Interferenzmi-  
kroskopie (russ.). Fortschritte  
der physikalischen Wissenschaften  
5(1953) 271-300.

**Ross, K. F. A.:** Phase Contrast and  
Interference Microscopy for  
Cell Biologist Edward Arnold  
Ltd., London 1967.

**Sandritter, W., H. G. Schiemer,  
und W. Alt:** Das Interferenz-  
mikroskop im Dienste der  
Cytologie und Krebsforschung.  
Klin. Wschr. 12 (1960) 590-595.

**Sandritter, W., H. G. Schiemer,  
W. Alt, P. Müller,  
E. Behrouzi:**  
Histochemie von Sputumzellen.  
III. Interferenzmikroskopische  
Trockengewichtsbestimmungen.  
Frankf. Z. f. Path. 69(1958)  
167-193.

**Sandritter, W., H. G. Schiemer  
H. Kraus u. U. Dörrien:** Inter-  
ferenzmikroskopische Untersu-  
chungen über das Wachstum von  
Einzelzellen (Hela-Zellen) in  
der Gewebekultur.  
Frankf. Z. f. Path. 70 (1960)  
271-299.

**Schiemer, H. G., W. Alt und  
W. Sandritter:** Zur Methodik  
der Trockengewichtsbestim-

mungen mit dem Bakerschen  
Interferenzmikroskop  
Acta Histochem. 4(1957)  
325-360.

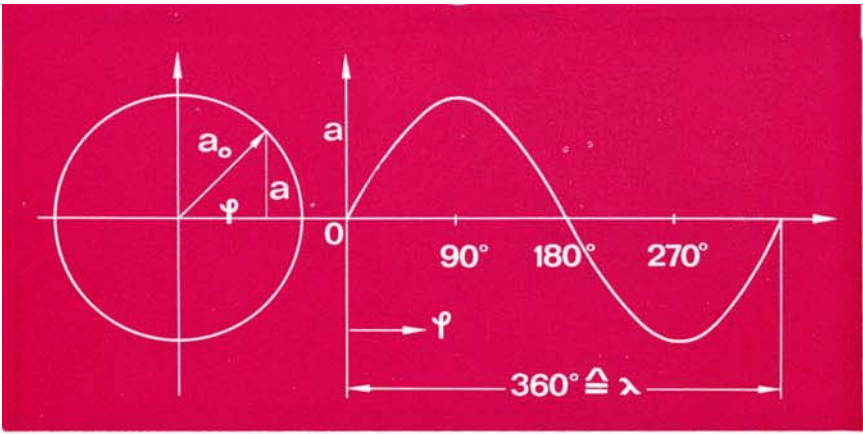
**Sini, G. P.:** Microscopia Inter-  
ferenziale.  
Fondazio „Giorgio Ronchi“  
Florenz 1968.

**Tolansky, S.:** Microstructures of  
surfaces using interferometry.  
Edward Arnold Ltd.  
London 1968.

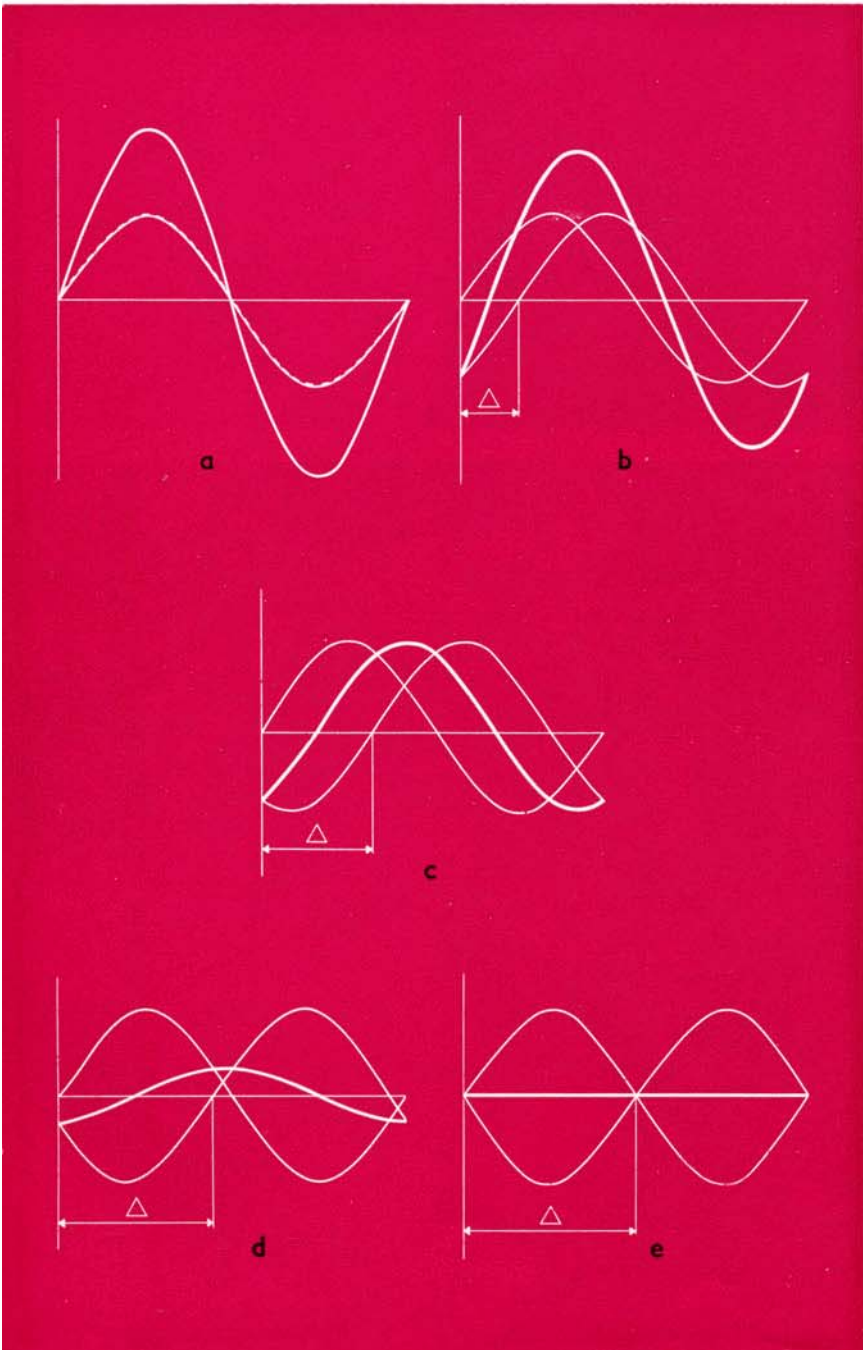
**Zehender, E.:** Ein Interferenz-  
verfahren zur Untersuchung  
rauer Oberflächen Z. VDI 94  
(1952) 456-458.

## Bildunterschriften

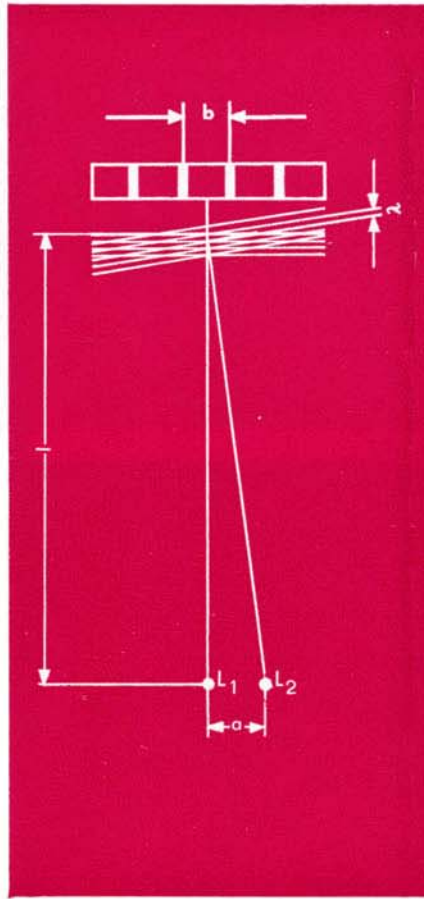
- Bild 1.** Darstellung einer Sinuswelle
- Bild 2.** Interferenz zweier Wellen mit verschiedenem Gangunterschied im Bereich von 0 bis  $\lambda/2$
- Bild 3.** Entstehung von Interferenzstreifen
- Bild 4.** Verschiebung der Interferenzstreifen durch ein Phasenobjekt
- Bild 5.** Zur Deutung der Entstehung von Phasendifferenzen bei ebener und zur Objektwelle paralleler Vergleichswelle
- Bild 6.** Zur Erläuterung der  $\lambda/4$ -Bedingung
- Bild 7.** a) Zur Deutung der Entstehung von Phasendifferenzen zwischen den interferierenden Wellen beim Shearing-Verfahren mit totaler Bildaufspaltung  
b u. c) Zur Erläuterung der differentiellen Bildaufspaltung
- Bild 8.** Mögliche Objektgrößen in Abhängigkeit vom  $\Gamma$ -Wert für die Objektive der Planachromatserie 160/0,17
- Bild 9.** Deformation der Vergleichswellenfront in Abhängigkeit von der Objektphasendrehung und dem  $\Gamma$ -Wert
- Bild 10.** Phasenstreifen im Shearing-Verfahren mit totaler Bildaufspaltung  
a) eines )  
der beiden ) auf größte  
Bilder ) Dunkelheit  
b) Um- ) eingestellt  
gebung )
- Bild 11.** Halbschattenplatte mit gerader Phasenkante
- Bild 12.** Phasenstreifen von Bild 10 mit Halbschattenplatte  
a) eines )  
der beiden )  
Teilbilder ) zur Halb-  
b) Um- ) schatten-  
gebung ) platte ab-  
c) das an- ) geglichen  
dere Teilbild )
- Bild 13.** Farbiges Interferenzstreifen-system durch Phasenobjekt ausgelenkt.  $M = 550 : 1$
- Bild 14.** Zur Messung kleiner lateraler Größen  
a) Flächenelement der Breite a  
b) Bildaufspaltung um die Breite a  
c) Das zu b) gehörige in der Pupille sichtbare Interferenzstreifen-system mit dem Streifenabstand d
- Bild 15.** Schematische Darstellung des Mikroskoprefraktometers
- Bild 16.** Interferenzstreifenverlauf im Mikroskoprefraktometer.  $M = 200$ fach
- Bild 17.** Definition und Bestimmung der Rauhtiefe
- Bild 18.** Lackabzug eines vergoldeten Transistorensockels nach Bild 24 in Luft bei Verwendung von weißem Licht in Wasser eingebettet bei Verwendung von monochromatischem Licht
- Bild 19.** Zur Methode der teilweisen Bedampfung eines Auflichtobjektes
- Bild 20.** Flächentransistor auf Siliziumscheibe.  $M = 160:1$   
a) ohne Bildaufspaltung  
b) Bildaufspaltung um die Breite des kleinsten Flächenelements
- Bild 21.** Das zu Bild 20b gehörige Interferenzstreifen-system in der Pupille
- Bild 22.** Bild einer Objektmeßplatte, um einen Strichabstand = 0,01 mm aufgespaltet
- Bild 23.** Zu Bild 22 gehöriges Interferenzstreifen-system in der Pupille
- Bild 24.** Oberfläche des Transistorensockels von Bild 18 im differentiellen Interferenzkontrast.  $M = 200:1$
- Bild 25.** Ätzfiguren in einem Kalialaunkristall im diff. Interferenzkontrast.  $M = 125 : 1$
- Bild 26.** Kopf einer Milbe im diff. Interferenzkontrast.  $M = 320 : 1$
- Bild 27.** Darmquerschnitt eines Bachneunauges im Interphako-Verfahren.  $M = 200:1$



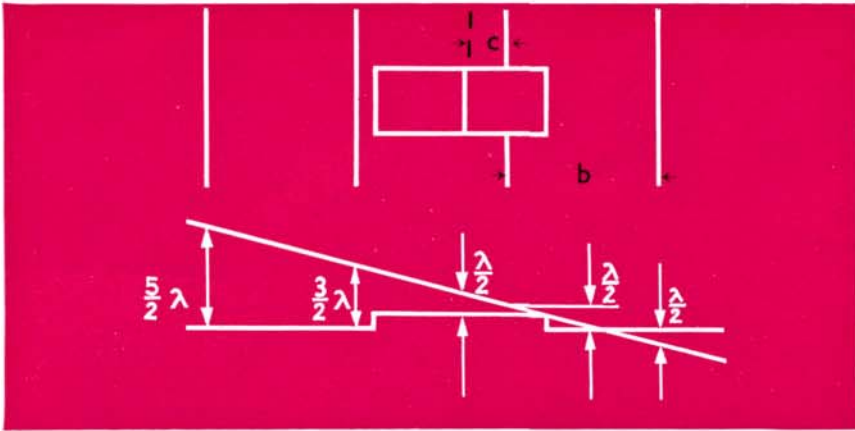
1



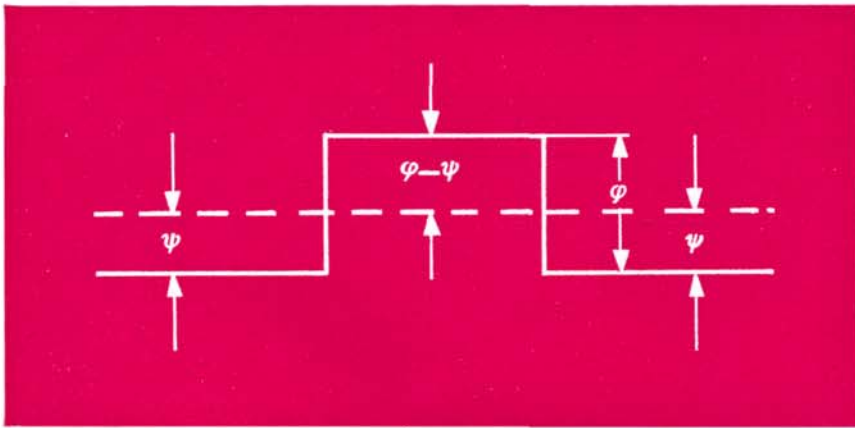
2



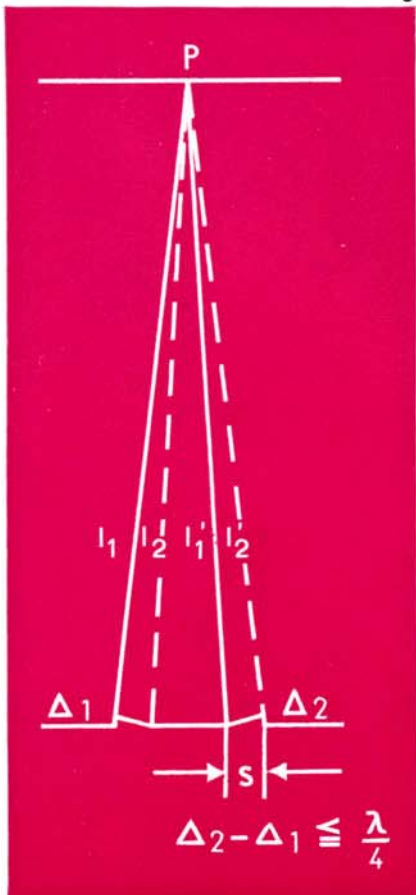
3



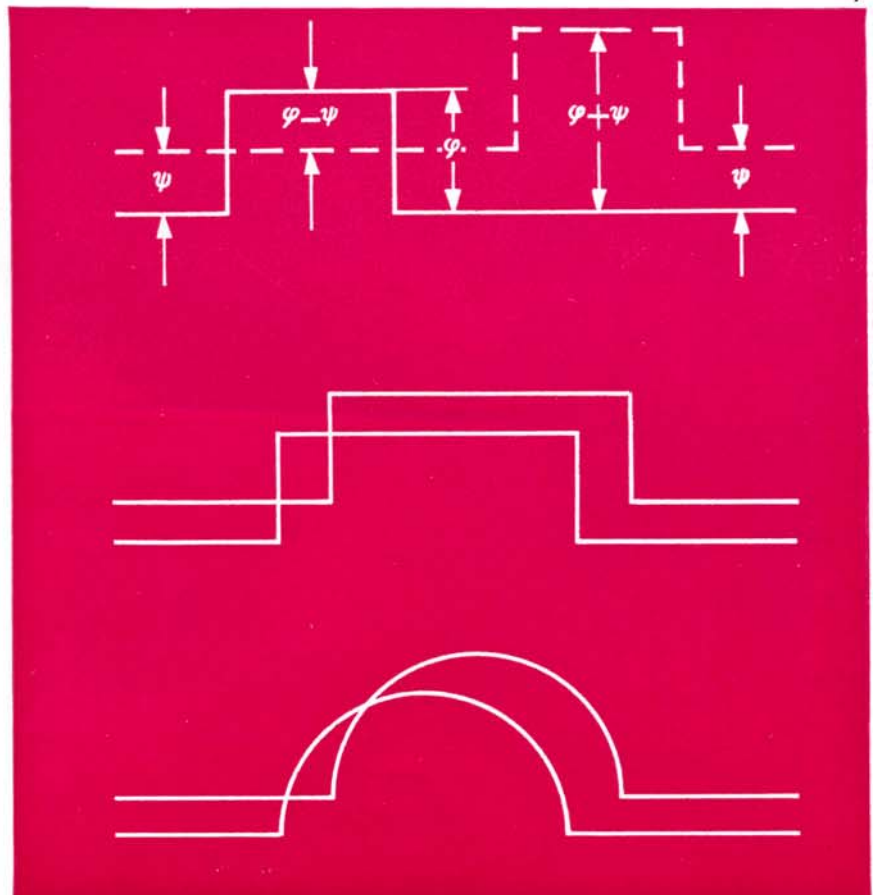
4



5

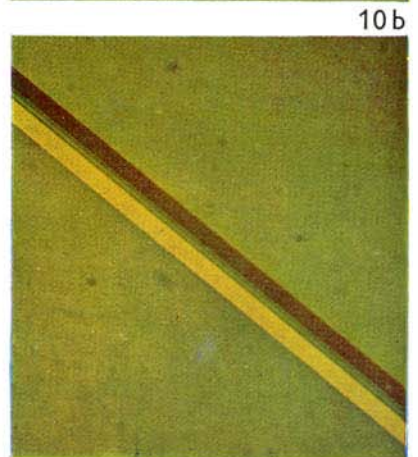
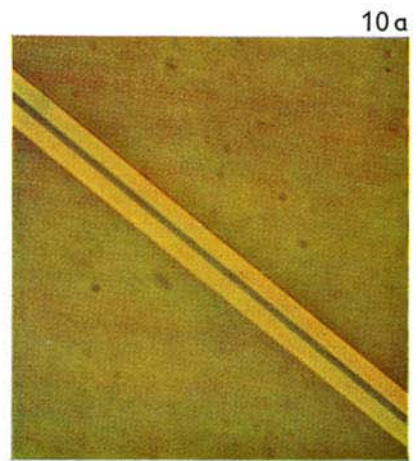
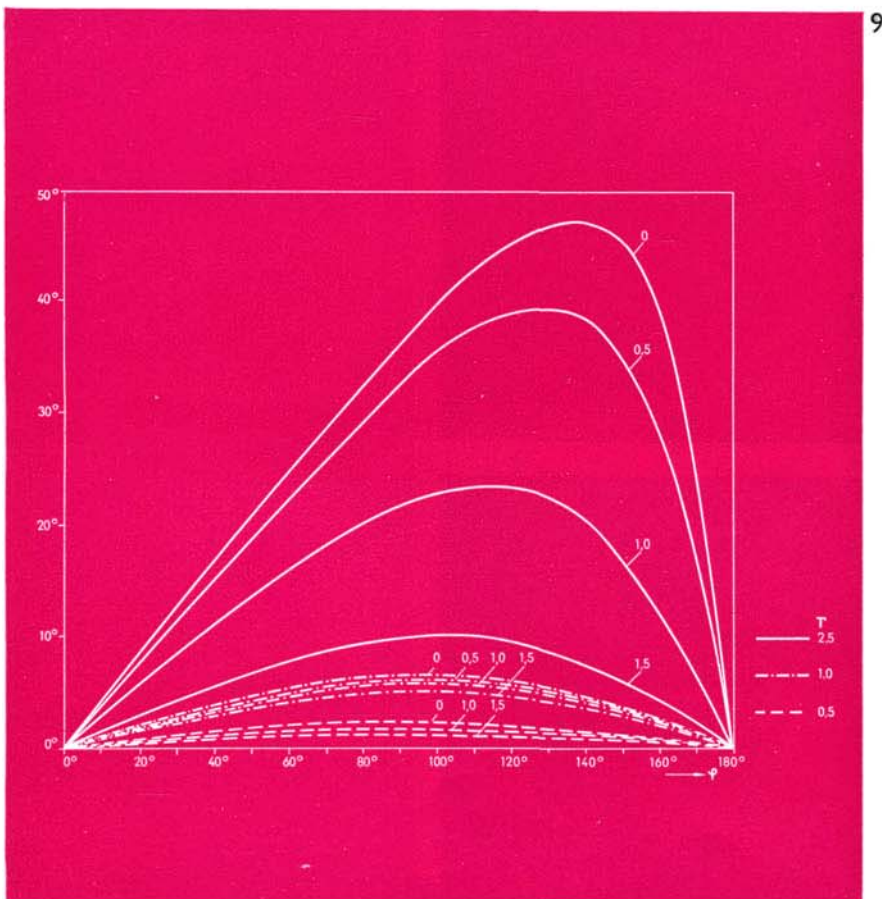
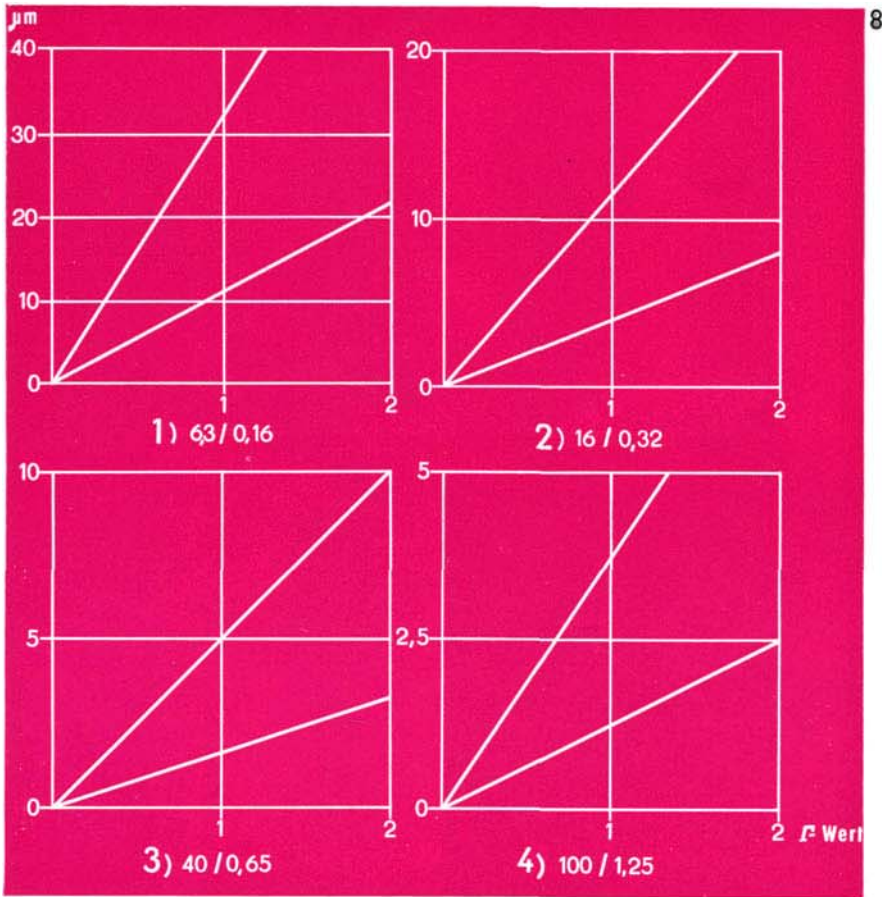


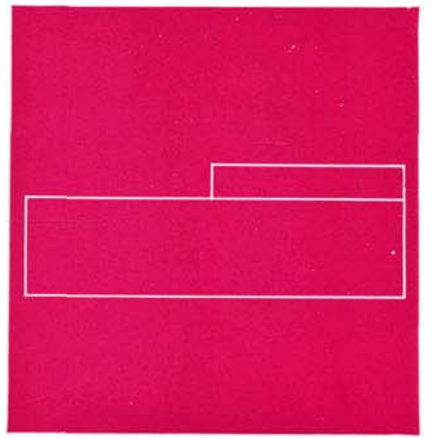
6



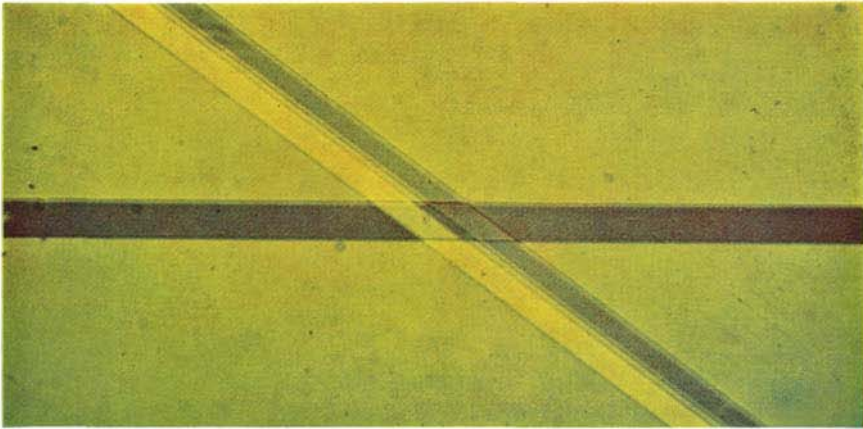
7



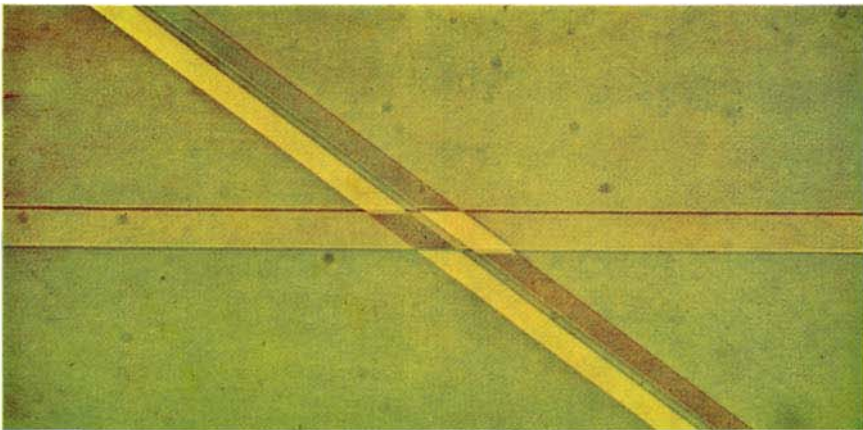




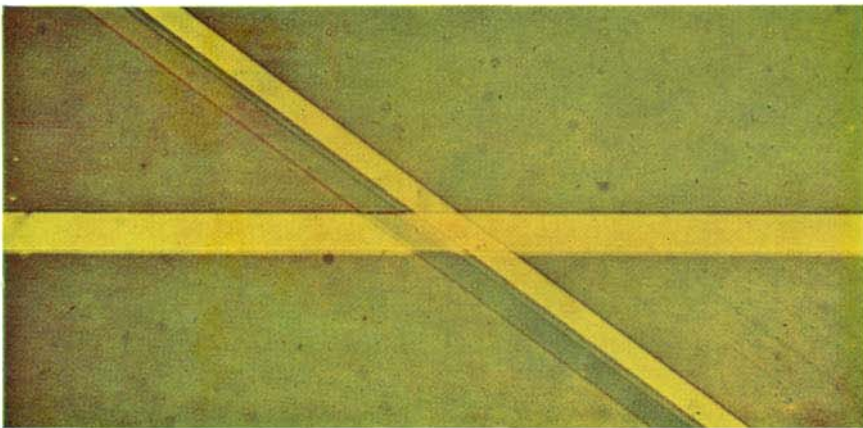
11



12a

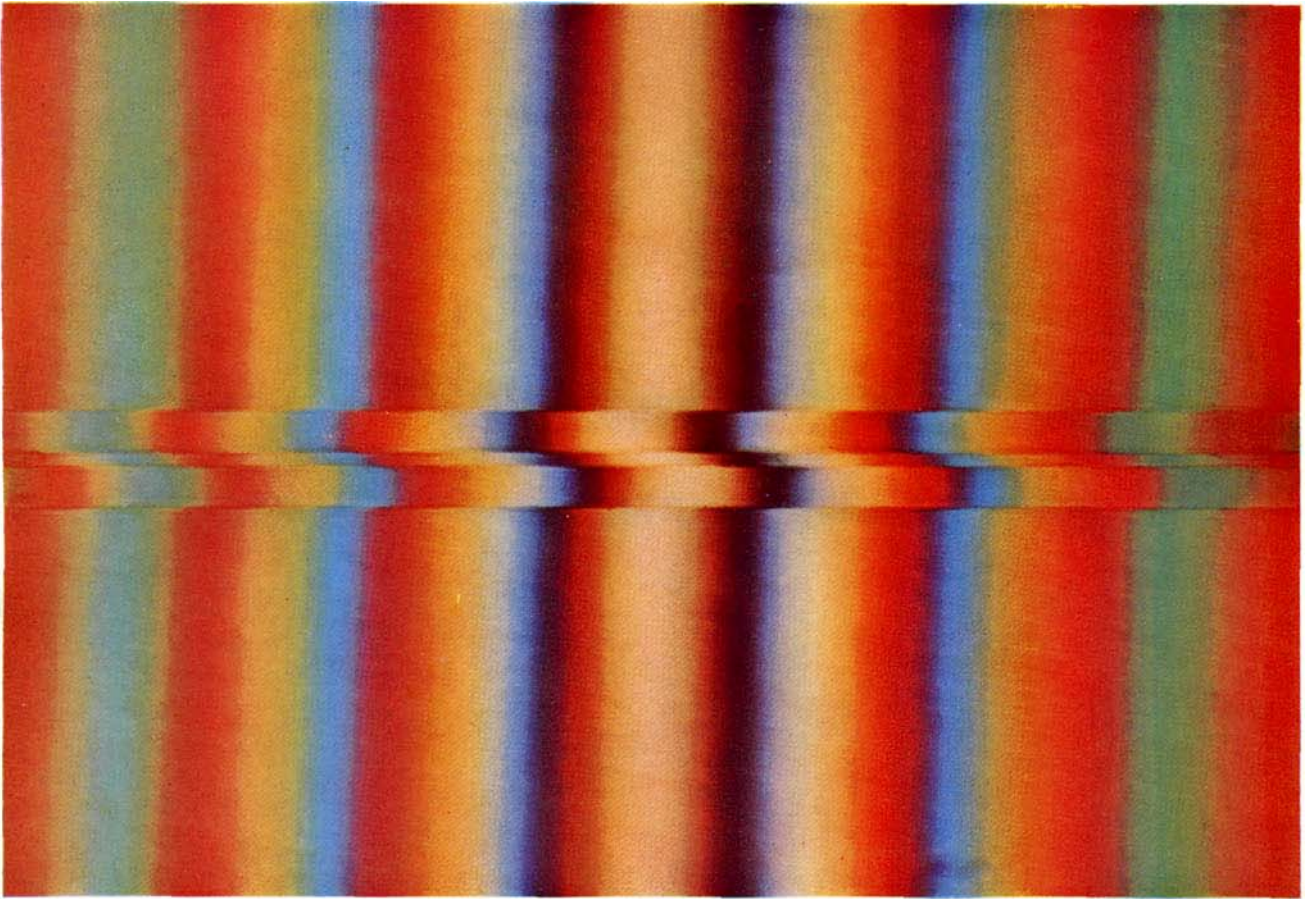


12b

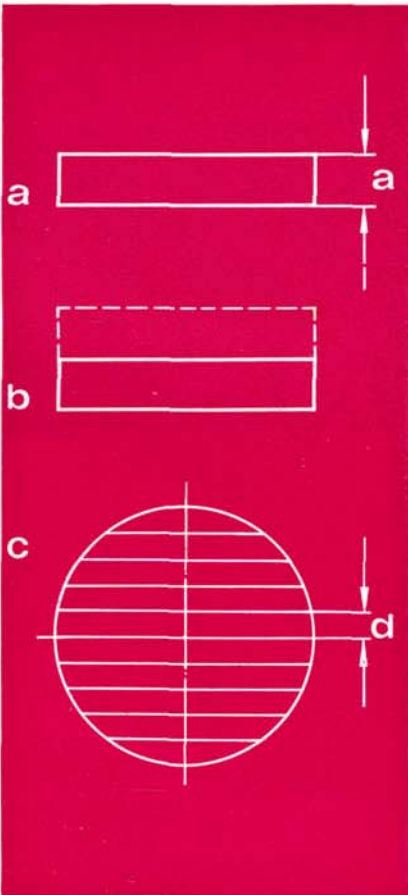


12c





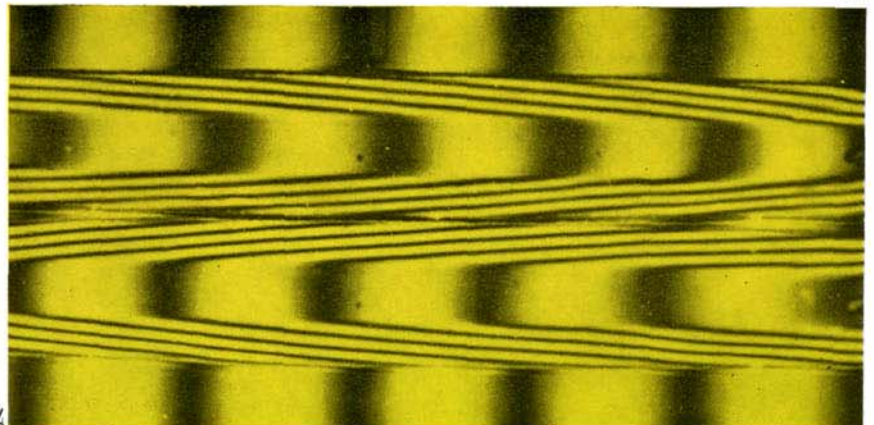
13



14



15

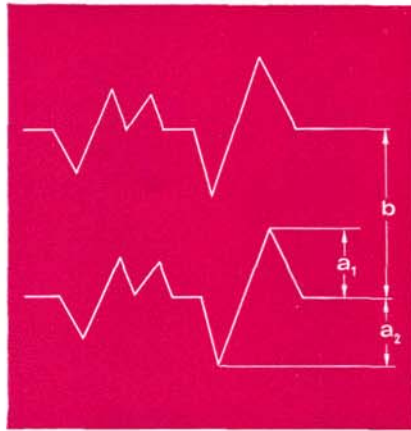


16

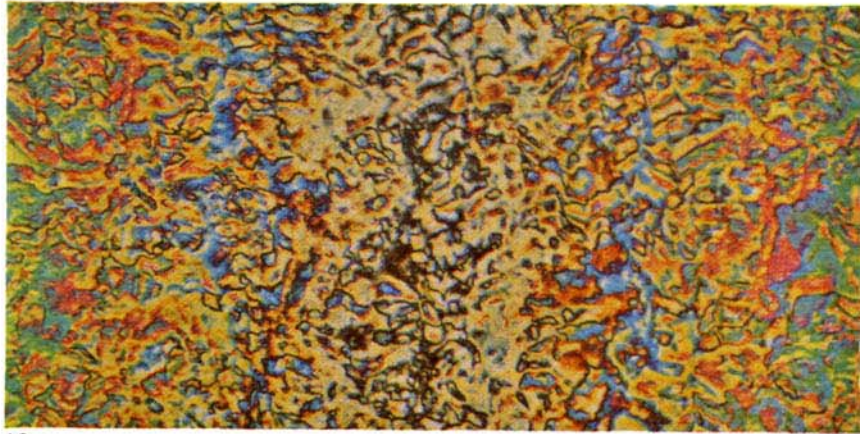




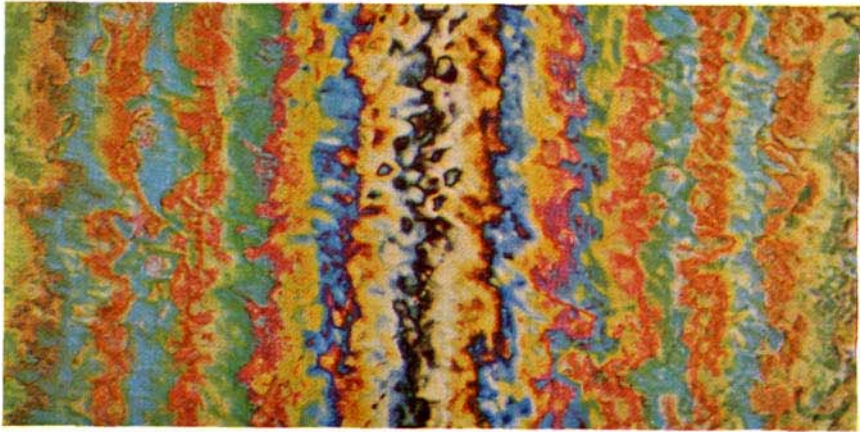
17 a



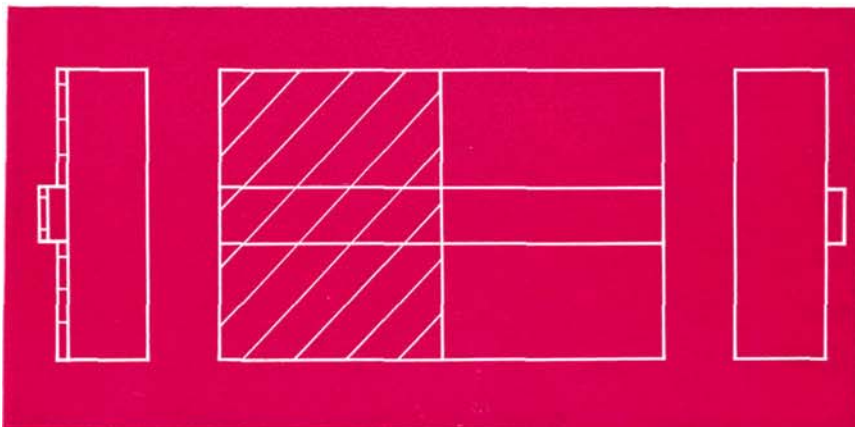
17 b



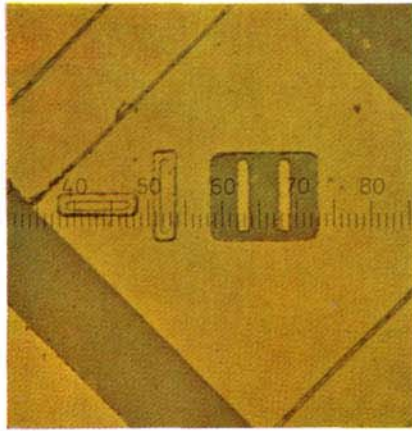
18 a



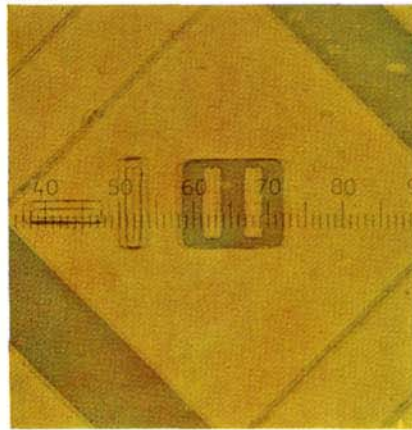
18 b



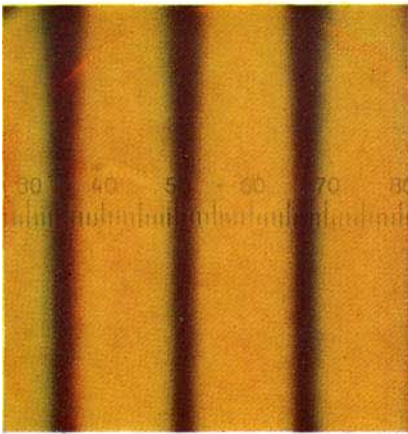
19



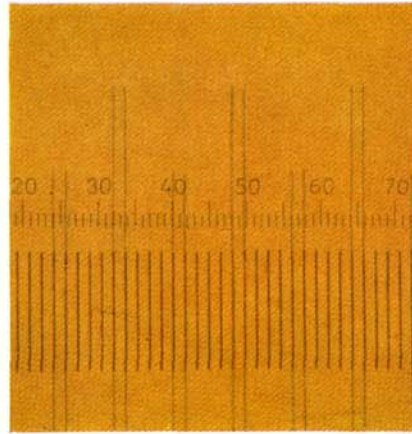
20 a



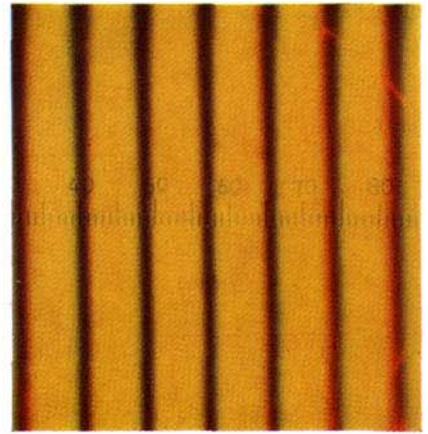
20 b



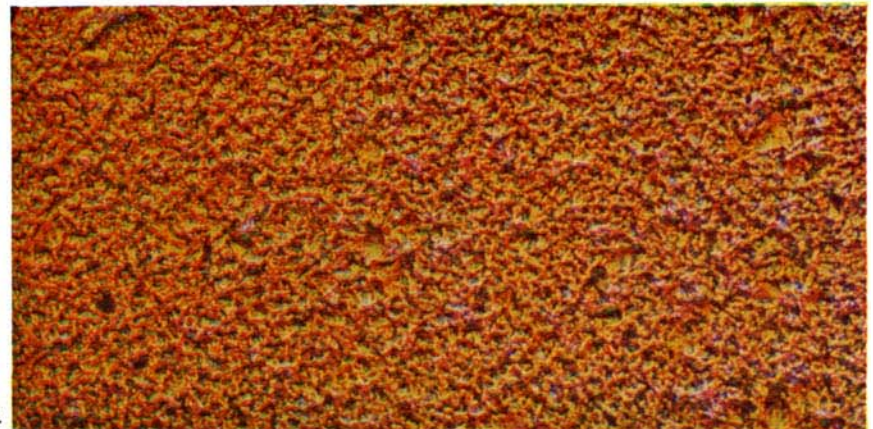
21



22



23

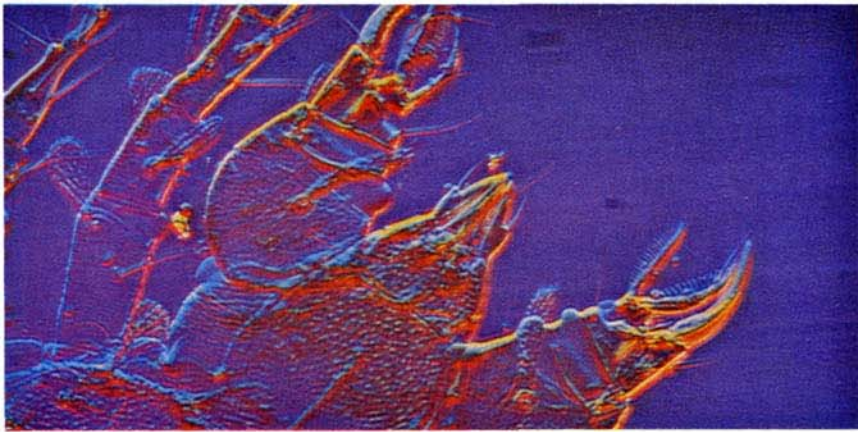


24





25

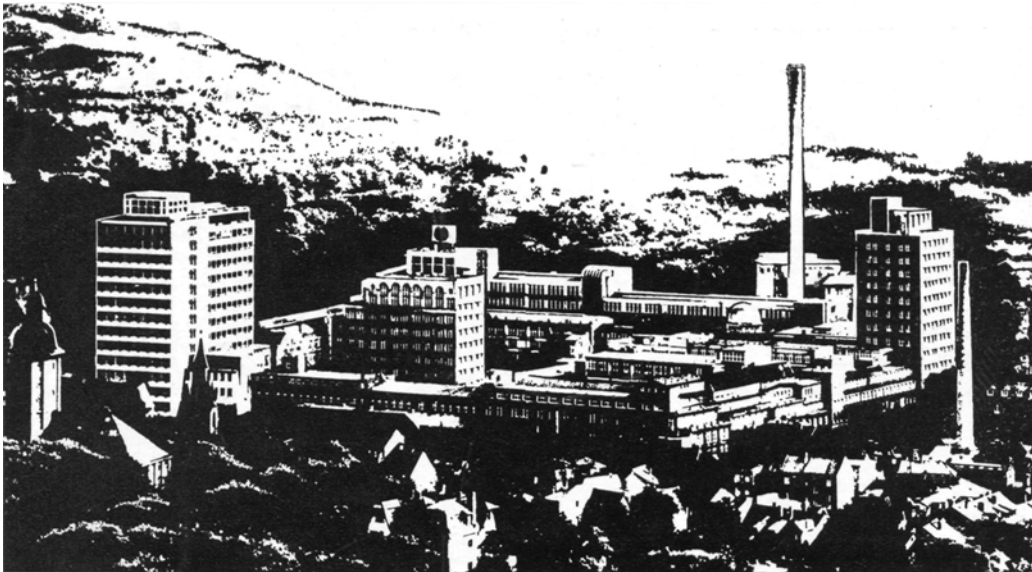


26



27





## VEB Carl Zeiss JENA

Deutsche Demokratische Republik



Durch ständige Weiterentwicklung unserer Erzeugnisse können Abweichungen von den Bildern und dem Text dieser Druckschrift auftreten. Die Wiedergabe - auch auszugsweise - ist nur mit unserer Genehmigung gestattet. Das Recht der Übersetzung behalten wir uns vor. Für Veröffentlichungen stellen wir Reproduktionen der Bilder, soweit vorhanden, gern zur Verfügung.

Abteilung Mikroskope  
Fernsprecher: Jena 83 0  
Fernschreiber: Jena 058 8622  
Druckschriften Nr. 30-A305-1

Vertretung: