

Из экспериментальных результатов следует, что погрешность измерений, связанная с нестабильностью масштабного коэффициента в исследованном микроскопе, на среднесрочном отрезке времени оказывает наибольшее влияние на точность измерений линейных размеров при больших увеличениях. Однако влияние данной составляющей погрешности на суммарную погрешность измерений убывает с уменьшением увеличения микроскопа.

Результаты экспериментальной проверки предложенного способа свидетельствуют о том, что для исследованного микроскопа JEM-2100 влияние нестабильности масштабного коэффициента на погрешность измерений линейных размеров убывает с уменьшением увеличения микроскопа.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования МФТИ при поддержке Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 16.552.11.7022).

Литература

1. **Williams D. B., Carter C. B.** Transmission Electron Microscopy: A textbook for Materials Science. N. Y.: Springer, 2009.
2. **Filippov M. N. e. a.** Reference material for transmission electron microscope calibration // Meas. Sci. Technol. 2011. V. 22. N 9. P. 094014—094019.
3. **Бодунов Д. С. и др.** Стандартный образец для калибровки просвечивающих электронных микроскопов // Измерительная техника. 2012. № 10. С. 16—18; **Bodunov D. S. e. a.** Standard sample for calibration of transmission electron microscopes nanometrology // Measurement Techniques. 2012. V. 55. N 10. P. 1137—1140.

Дата принятия 15.11.2012 г.

ОПТИКО-ФИЗИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ

535.417:53.082.54

О латеральном разрешении интерференционного микроскопа

Г. Г. ЛЕВИН, Г. Н. ВИШНЯКОВ, Н. Н. МОИСЕЕВ, В. Л. МИНАЕВ

Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений, Москва, Россия, e-mail: moiseev@vniiofi.ru

Дано описание измерений пространственного разрешения (разрешающей способности) автоматизированного интерференционного микроскопа, созданного на основе микроинтерферометра Линника МИИ-4М. Проведено сравнение полученных результатов и аналогичных значений, рассчитанных для традиционных оптических изображений, описываемых теорией Аббе. Подтверждена возможность преодоления дифракционного предела разрешения при помощи интерференционного микроскопа.

Ключевые слова: интерференционный микроскоп, оптическое разрешение, фазовая ступенька.

The description of spatial resolution measurements of automated interference microscope based on Linnik microinterferometer MII-4M is given. A comparison of obtained results with similar values calculated for conventional optical images described by the Abbe theory is carried out. The possibility to overcome the diffraction limit of resolution by means of interference microscope is proved.

Key words: interference microscope, optical resolution, phase step.

Интерференционная (или фазовая) микроскопия — мощный метод проведения высокоточного трехмерного анализа структуры поверхности различных объектов, оптических параметров нанообъектов и тонких пленок, изготовленных из разных материалов, а также живых клеток. Современные фазовые микроскопы обладают в продольном (аксиальном) направлении чрезвычайно высоким разрешением, измеряемым долями нанометра. В поперечном (латеральном) направлении разрешение оценивается специалистами на уровне, характерном для традиционных оптических микроскопов, т. е. на уровне дифракционного предела Аббе.

Задача повышения латерального разрешения до преодоления дифракционного предела является одной из глав-

ных проблем современной оптической микроскопии, в том числе и фазовой. Данную задачу решают разными способами. Наибольший прогресс достигнут в разработке флуоресцентных оптических методов, часть из которых основана на оптической интерференции [1]. Эти методы позволяют из изображений с обычным разрешением восстанавливать изображения с наномасштабным разрешением, в основном, благодаря применению специальной математической обработки. Флуоресцентные методы широко используются в биологии для исследования внутриклеточных структур. В работе [2] предложен принципиально другой метод, позволяющий при помощи традиционного оптического микроскопа фиксировать наномасштабные изменения размеров объектов в результате измерения распределения поля, от-

раженного от объекта при его разном положении относительно фокусной плоскости микроскопа. В отличие от флуоресцентных этот метод не требует специальной подготовки объекта и использования красителей, но для его реализации нужна априорная информация о форме объекта и соответствующие ей карты электромагнитных полей на различном удалении от поверхности объекта. Данный метод, также как и большая часть флуоресцентных методов, требует больших временных затрат на обработку результатов измерений.

В ряде задач, таких как измерение и контроль смещений объекта на нанометровые расстояния, требуется проводить измерения практически в реальном времени. В [3, 4] отмечено, что критерий Рэля и радиус Эйри r_0 не являются адекватными характеристиками пространственного разрешения в фазовых изображениях, которые при определенных условиях могут иметь разрешение, превышающее традиционное рэлеевское. Измерения сферы из латекса диаметром 100 нм на когерентном фазовом микроскопе «Эйрискан» на длине волны 633 нм показали возможность получения значительного сверхразрешения. Полуширина производной в области перепада высот, выбранная в качестве критерия разрешения, достигала значений порядка 20 нм. Для получения такого результата требовались высокая точность фокусировки (порядка 30 нм) и большая числовая апертура объектива порядка 95. Данный результат достаточно интересен с практической точки зрения. Для его подтверждения и проверки поставлена задача проведения дополнительных измерений фазовых объектов другого типа. Так как в [4] указывается на принципиальное значение метода получения фазового изображения, то важно проверить возможность получения эффекта сверхразрешения другим методом, а именно пошаговым, по сравнению с предложенным в [3, 4].

В настоящей работе описаны экспериментальные исследования оптического разрешения фазовых изображений и приведены результаты измерений, подтверждающие возможность получения фазовых изображений с разрешением, превышающим рэлеевское.

Описание эксперимента. Оптическая схема установки приведена на рис. 1. Эксперимент проводили при помощи автоматизированного интерференционного микроскопа, созданного на базе микроинтерферометра Линника МИИ-4М (ЛОМО, С.-Петербург). Такой микроскоп позволяет получать фазовые изображения микрообъектов методом фазовых шагов [5]. Для реализации данного метода зеркало опорного канала микроскопа было закреплено на пьезоэлементе, который обеспечивал его дискретные перемещения вдоль оптической оси с шагом $\lambda/8$. Получаемые серии интерферограмм регистрировали видеокамерой Видеоскан 205 с числом пикселей 1392×1040 , размером матрицы $6,32 \times 4,76$ мм и обрабатывали на компьютере с использованием разработанной во ВНИИОФИ программы.

Для повышения латерального разрешения штатный объектив микроскопа с числовой апертурой $NA = 0,65$ был заменен на иммерсионный объектив АПО-МИ с увеличением $90\times$ и $NA = 1,25$. Видеокамеру установили в фотографический канал микроскопа МИИ-4М, в результате чего размеры линейного поля зрения удалось уменьшить до 16×12 мкм, а пиксела — до 11,5 нм.

В эксперименте ставилась задача исследовать зависимость латерального разрешения от соотношения длины вол-

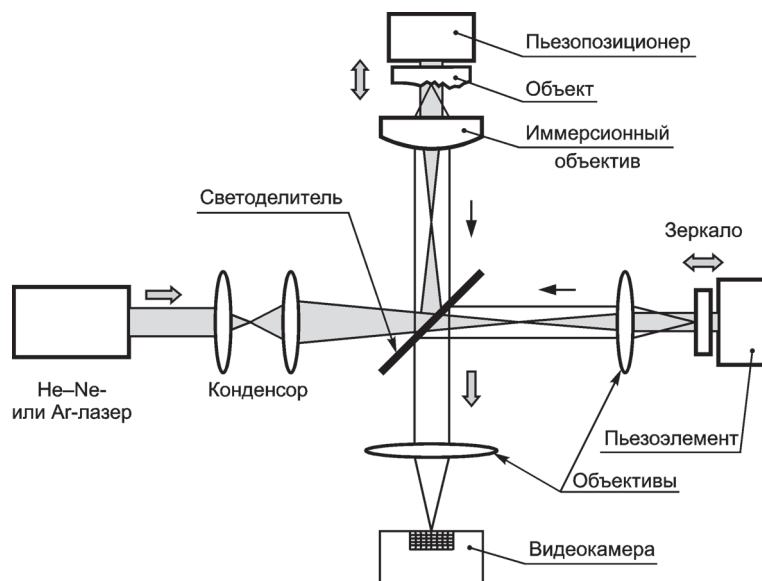


Рис. 1. Схема проведения эксперимента

ны оптического излучения и высоты ступеньки. Измерения проводили с применением He—Ne-лазера на длине волны 632,8 нм и Ar-лазера с длинами волн 458; 476; 488; 501; 514 нм. Объекты исследования — эталонные меры высоты ступеньки номинальной высотой $(179,4 \pm 2,0)$ нм и $(19,9 \pm 0,8)$ нм. Ступеньки сформированы методом травления в слое кварца и покрыты тонким слоем хрома. Для эксперимента важно, чтобы реальная форма ступеньки была близка к идеально прямоугольной. Сказать уверенно, что используемые ступеньки отвечают этому требованию в любом месте, нельзя, но предположить, что такие участки есть, можно. Полученные результаты подтверждают это.

Меры прикрепляли к специальному держателю, установленному на пьезоэлектрическое устройство трехкоординатного позиционирования (нанопозиционер) T-115 фирмы MAD City Lab Inc., расположенное на предметном столике микроскопа МИИ-4М. Держатель позволяет регулировать наклон меры относительно оптической оси предметного канала микроскопа, а нанопозиционер — дискретно перемещать меру вдоль оптической оси и в поперечном направлении.

Устройство T-115 обеспечивает нанометровую точность позиционирования и соответственно указанное ранее качество фокусировки. Однако у данного прибора возможен дрейф по любой из координат [6], что может привести к пропуску момента прохода через положение наилучшего фокуса. Во избежание этого объект наклоняли вдоль длинной оси ступеньки на угол, при котором координаты крайних точек ступеньки отличались на 300—700 нм, что существенно превосходило возможное значение дрейфа.

Методика измерений. Процесс измерений проходил следующим образом. Определяли диапазон фокусировки z_1-z_2 , в котором контраст интерференционных полос был достаточным для съемки фазового изображения. После этого регистрировали интерферограммы в одной из крайних точек этого диапазона. Затем при помощи нанопозиционера объект сдвигали на 300 нм вдоль оси Z, и снова регистри-

ровали фазовое изображение, и так до достижения следующей крайней точки диапазона фокусировки. Измерения проводили на указанных ранее нескольких длинах волн со ступеньками высотой 179,4 и 19,9 нм. В качестве иммерсионной жидкости использовали глицерин. В результате эффективная высота ступенек h увеличивалась в n раз ($n = 1,46$ — показатель преломления глицерина). Таким образом ступенька высотой 179,4 нм имела оптическую высоту 262 нм, а ступенька 19,9 нм — 29 нм. Также были проведены измерения со ступенькой 179,4 нм в отсутствие иммерсионной жидкости и в этом случае получены наиболее интересные результаты (таблица).

Минимальные значения полуширины производной δPr от изображения профиля ступеньки

Длина волны, нм	Высота ступеньки, нм			Полуширина производной по Эйри, нм
	при использовании иммерсионной жидкости		в отсутствие иммерсионной жидкости	
	29	262		
458	207	207	357	128
472	—	207	—	132
488	242	196	219	137
501	—	127	—	141
514	253	161	173	145
633	299	115	46	178

В ходе эксперимента измеряли профиль поверхности ступенек. Результатом каждого измерения было фазовое изображение прямоугольной ступеньки, пересчитанное в карту высот (топограмму). В соответствии с форматом ПЗС матрицы 1392×1040 пикселей и расположением ступеньки относительно осей матрицы из топограммы можно было получить 1392 поперечных профиля (сечения), вид которых определялся длиной волны, высотой ступеньки и, в общем, был далек от прямоугольной формы. Графики профиля фазового изображения $h(i)$ ступеньки высотой 179,4 нм, полученные на длине волны 633 нм при использовании иммер-

сионной жидкости и без нее, приведены на рис. 2, а, в, соответственно.

Массивы данных о фазовых изображениях обрабатывали при помощи программы MatCAD, в ходе которой выполнялись следующие действия: дифференцирование высоты профиля в зависимости от номера строки i (вычисление первой производной $p = \Delta h / \Delta i$); определение максимальных значений первой производной на каждом столбце j ; выбор максимальной производной из локальных максимумов и определение соответствующего ей номера столбца j_{\max} . Для j_{\max} строили зависимость $p(i)$ и вычисляли полуширину производной δPr .

В процессе обработки изображений можно было вручную выбирать произвольные точки и выполнять для них описанную процедуру, что позволяло дополнительно проверять выбранные программой точки и исключать те из них, которые не попадали в область перепада высот. Вид зависимости $p(i)$ для ступенек разной высоты показан на рис. 2, б, г.

Также во время обработки выполнялась операция усреднения, необходимая для снижения уровня шумов. Усреднение проводили вдоль строки по нескольким столбцам

$$\bar{p}_{i,j-k} = \sum_{j-k}^j p_{ij} / (k+1).$$

Такое усреднение может привести к искажению результата измерений, если ширина перепадов, представленных на усредняемых столбцах, сильно различается от столбца к столбцу, т. е. если форма ступеньки резко отличается от прямоугольной. В данном эксперименте физическое расстояние между соседними столбцами (и строками) равнялось 11,5 нм, следовательно при усреднении по десяти столбцам усреднялся участок длиной 115 нм. При таком малом значении весьма высока вероятность того, что форма ступеньки будет неизменной. Неидеальность формы ступеньки сильнее всего скажется при малых значениях полуширины производной, приводя к ее увеличению. Поэтому получение очень малых значений полуширины производной напрямую указывает на то, что на используемой мере есть участки с

прямоугольной формой ступеньки. После выполнения усреднения вдоль строки проводили сглаживание полученных усредненных профилей вдоль столбца (вдоль профиля).

Результаты измерений. Основные результаты измерений предельных значений оптического разрешения фазовых изображений приведены в таблице. Для ступеньки номинальной высотой 19,9 нм измерения проводили только с использованием иммерсионной жидкости, поскольку реализуемая эффективная оптическая высота 29 нм значительно меньше, чем $\lambda/4$ для любой длины волны оптического излучения видимого диапазона.

Для сравнения в таблице даны также значения пространственного разрешения, полученные для обычного микроскопа путем расчета полуширины первой производной от распределения освещенности в дифракционном изображении точки (внутри диска Эйри). Расчет проводили для реальных значений числовой апертуры NA и длины волны λ с использованием относительной функции освещенности (функции рассеяния точки) в отсутствие aberrаций [7]:

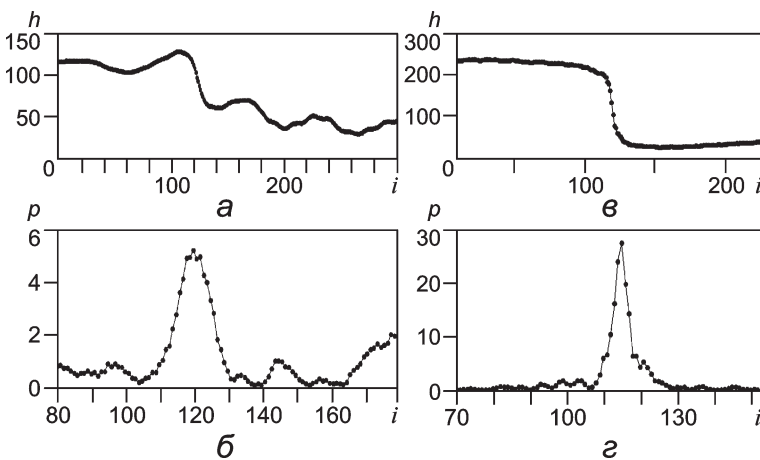


Рис. 2. Вид профиля фазового изображения h и первой производной p от профилей ступенек высотами 262 (а, б) и 179,4 нм (в, г) на длине волны 633 нм

$$E(W) = 4J_1^2(W)/W^2, \quad (1)$$

где J_1 — функция Бесселя 1-го рода 1-го порядка; $W = 2\pi NAx/\lambda$.

Как следует из таблицы, существует зависимость оптического разрешения от высоты ступеньки и длины волны. При этом для малой высоты ступеньки зависимость от длины волны такая же, как и для обычного изображения, т. е. при увеличении длины волны полуширина первой производной от профиля изображения также увеличивается. Однако, если высота ступеньки сравнима с $\lambda/4$, то вид зависимости становится другим: разрешение повышается при увеличении длины волны, при этом на длине волны 633 нм полуширина производной профиля фазового изображения становится меньше полуширины производной обычного изображения, т. е. преодолевается дифракционный предел разрешения. Это происходит как при использовании иммерсионного объектива в штатном режиме (эффективное значение высоты ступеньки 263 нм), так и без применения иммерсионной жидкости (высота ступеньки 179 нм).

Представим данные таблицы в виде графиков и получим зависимость предельного разрешения от соотношения $\lambda/(4h)$ (рис. 3). При приближении значения $\lambda/(4h)$ к единице полуширина производной δPr уменьшается (разрешение увеличивается), при удалении от единицы — увеличивается (разрешение соответственно ухудшается).

Выводы. Таким образом, в работе проведены измерения пространственного разрешения (разрешающей способности) фазового микроскопа, созданного на основе микроинтерферометра Линника МИИ-4М, методом фазовых шагов для восстановления фазы. Полученные результаты показали, что пространственное разрешение фазового микроскопа зависит не только от длины волны, но и от высоты фазовой ступеньки. Наилучшее разрешение получено на длине волны 633 нм для меры, имеющей номинальную высоту ступеньки 179,4 нм. Данные результаты подтверждают сделанный в [4] вывод, что критерий Рэлея и радиус Эйри не могут считаться адекватными характеристиками пространственного разрешения фазовых изображений. Кроме того, при определенных соотношениях между λ и h , а именно, если $\lambda/4 = h$, пространственное разрешение фазовых изображений значительно превосходит пространственное разрешение традиционных оптических изображений, ограниченное дифракционным пределом разрешения Аббе.

Отмечено, что результаты, полученные с использованием фазовых объектов в виде ступенек высоты, согласуются, в целом, с результатами из [4], где фазовыми объектами являются латексные сферы. Таким образом, явление, называемое в [4] сверхразрешением, наблюдается при исследовании различных фазовых объектов при выполнении определенного соотношения между длиной волны и дополнитель-

ным фазовым набегом. В связи с этим было бы целесообразным провести дополнительные измерения пространственного разрешения фазовых изображений с применением более широкой номенклатуры фазовых объектов, что позволило бы получить подробную зависимость разрешения от длины волны в области, где преодолевается дифракционный предел разрешения, и использовать ее для физического объяснения и практического применения наблюдающегося явления.

Работа проведена с применением оборудования Центра коллективного пользования ВНИИОФИ при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.552.11.7056).

Л и т е р а т у р а

1. Левин Г. Г., Моисеев Н. Н. Сверхразрешающая оптическая микроскопия живых объектов / Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина: Тез. лекций и докл. 2-й Междунар. шк. Моск. обл. М.: Изд-во МГУ им. М. В. Ломоносова, 2011. С. 39.
2. Ravikiran Attota, Thomas A. Germer, Richard M. Silver. Through-focus scanning-optical-microscope imaging method for nanoscale dimensional analysis // Opt. Lett. 2008. V. 33. N 17. P. 1990—1992.
3. Тычинский В. П. и др. Измерения субмикронных структур на лазерном фазовом микроскопе «Эйрискан» // Квантовая электроника. 1997. V. 24. № 8. С. 754—758.
4. Тычинский В. П. Сверхразрешение и сингулярности в фазовых изображениях // УФН. 2008. Т. 178. С. 1205—1214.
5. Минаев В. Л. Интерференционный микроскоп для измерения формы поверхности в микро- и нанодиапазонах // Метрология. 2012. № 7. С. 19—24.
6. Levin G. e. a. Definition of object near nanometer shifting by 2D optical path difference / Automation, Control and Information Technology: Proc. IASTED Intern. conf. 2010. V. 1. P. 282—286.
7. Скворцов Г. Е. и др. Микроскопы. Л.: Машиностроение, 1969.

Дата принятия 25.02.2013 г.

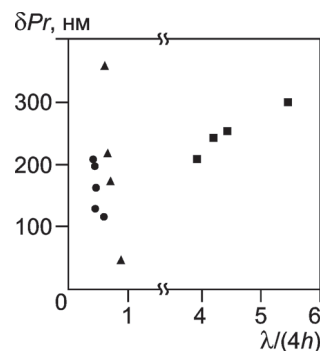


Рис. 3. Зависимость полуширины производной профиля фазовой прямоугольной ступеньки от соотношения λ и h :

●, ■, ▲ — соответственно $h = 263; 29; 179$ нм