МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СУБМИКРОННЫХ ОБЪЕКТОВ

А.А.Егоров

Экологический факультет, Российский университет дружбы народов, Подольское шоссе, 8/5, 113093, Москва, Россия

Приведен краткий обзор некоторых методов исследования субмикронных объектов. Основное внимание уделено неразрушающим методам оптического (лазерного) контроля микрообъектов.

В последние годы существует устойчивый интерес к разработке высокоточных оптических методов неразрушающего контроля объектов в биологии, медицине, экологии, микроэлектронике, лазерной оптике и других наукоемких, высокотехнологичных областях (см., например, литературу к данной работе). Это связано в первую очередь с высокой чувствительностью оптических методов, возможностью превышения дифракционного предела Аббе-Рэлея [1], а также с возможностью оперативного неинвазивного исследования микрообъектов не только биологического происхождения. В данной работе кратко рассмотрен ряд методов исследования субмикронных объектов.

Электронная микроскопия (ЭМ) — совокупность методов исследования с помощью электронных микроскопов микроструктуры объектов, их локального состава и т.д. — является одним из наиболее известных методов исследования [2, 3]. Электронные микроскопы подразделяют на три типа: просвечивающие, зеркальные и эмиссионные. Они могут использоваться в двух режимах: проекционном и растровом (ПЭМ и РЭМ). Латеральное разрешение (в плоскости объекта) ЭМ порядка атомных размеров (~1 Å) и менее. Наиболее распространенный метод исследования в указанных выше областях. Является принципиально деструктивным методом исследования *in vitro* [высокий вакуум — до 10^{-5} мм. рт. ст. ($\approx 10^{-8}$ бар или 10^{-2} Па); высокая энергия электронов, бомбардирующих образец — до 10^4 эВ ($\approx 2 \cdot 10^{-15}$ Дж)[1]; необходимость во многих случаях покрытия поверхности объекта слоем металла и др.]. В связи с этим электронная микроскопия существенно ограничивает во многих случаях возможности исследователя.

Туннельная сканирующая вакуумная микроскопия (ТСВМ, СТМ) предназначена для исследования поверхности твердых электропроводящих тел в вакууме, газе или жидкости [4]. Метод СТМ изобретен в 1982 г. Он основан на сканировании металлического острия над поверхностью образца на расстоянии ~5-10 Å. Регистрируемый туннельный ток (единицы наноампер) воспроизводит рельеф поверхности. Хотя этот прибор и работает по сравнению с электронной микроскопией при очень низких напряжениях (единицы вольт), но в остальном сохраняет недостатки обычной электронной микроскопии. Следует отметить, что, несмотря на эти ограничения метод СТМ явился серьезным прорывом в области разработки новых высокоразрешаю-

[1] Отметим, что величина энергии, необходимой для разрыва химических связей, удерживающих атом в его равновесном состоянии в пределах кристалла или молекулярной структуры, формирующей твердое тело, находится в пределах 1-10 эВ. Электронный луч с энергией ~10^5 эВ не проникает даже в самые маленькие живые микроорганизмы, поэтому используют пучки с энергией ~$(1\text{-}3) \cdot 10^6$ эВ. В этом случае при упругих столкновениях атомам может передаваться энергия в несколько эВ, что приводит к необратимым изменениям в химических связях образца.

щих методов исследования микрообъектов[2]. Разрешение сканирующих туннельных микроскопов по высоте достигает долей ангстрема, а латеральное разрешение единиц ангстрем, т.е. не уступает лучшим электронным микроскопам.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) расширила возможности метода СТМ, позволив контролировать не только металлизированные поверхности, но и объекты, не обладающие проводимостью за счет использования вместо металлической иглы плоской пружины. Межатомное притяжение изменяет деформацию пружины, измеряя которое можно зарегистрировать профиль поверхности. Атомно-силовой микроскоп может работать при обычных атмосферных условиях, но значительно хуже, чем в вакууме. Его разрешение примерно такое же, как у сканирующего туннельного микроскопа. Возможности методов СТМ и АСМ ограничены в основном контролем профиля поверхности объектов. При наблюдении поверхностей с нанометровой и ангстремной топологией рельефа здесь, как и в других высокоразрешающих методах контроля микрообъектов, возникает проблема адекватной интерпретации отклика прибора. В настоящее время нет единого подхода к решению этой проблемы.

Классическая **оптическая микроскопия (ОМ)** — совокупность методов наблюдения и исследования с помощью оптических микроскопов — является наряду с электронной микроскопией наиболее распространенным методом исследования микрообъектов [5]. Различают следующие методы ОМ: светлого и темного поля, метод фазового контраста, метод интерференционного контраста, поляризационная микроскопия, люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия, УФ- и ИК-микроскопия, метод ультрамикроскопии и др. Лучшие оптические микроскопы таких, например, ведущих фирм, как JENOptik (Германия), ZYGO и WYCO (США) и ЛОМО (Россия) имеют латеральное разрешение порядка длины волны λ, т.е. близко к дифракционному пределу (латерального) разрешения Аббе-Рэлея $\lambda/(2NA)$, где NA — числовая апертура микроскопа. В последние годы в оптике достигнут предел — $NA \approx 1$ — и дальнейшее повышение числовой апертуры, а соответственно и латерального разрешения возможно либо за счет применения иммерсии, либо за счет компьютерной обработки отклика микроскопа. В последнем случае повышение разрешения, т.е. достижение сверхразрешения требует разработки адекватных физических моделей микрообъектов, позволяющих правильно интерпретировать отклики микроскопа.

Конфокальная оптическая сканирующая микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) также является одним из перспективных направлений развития оптической микроскопии [6]. Принцип работы КЛСМ, как и других сканирующих микроскопов, основан на последовательном сканировании исследуемого объекта лазерным лучом с размерами $\sim\lambda$. Развертка изображения производится либо путем сканирования лазерного луча по неподвижному объекту, либо за счет сканирования столика с объектом под неподвижным лучом. В основе принципа работы КЛСМ лежит оптическое сопряжение плоскостей фокусировки лазерного зонда и точечного фотоприемника. В этом случае излучение от деталей объекта, лежащих вне фокальной плоскости, где фокусируется лазерный луч, оказывается в плоскости конфокальной точечной диафрагмы фотоприемника расфокусированным

[2] Разработчики метода ТСВМ (Binnig G., Rohrer H.) и первого такого микроскопа получили за эту работу Нобелевскую премию по физике за 1986 г.

и практически не попадает на приемник и не дает вклада в полезный сигнал микроскопа. Поэтому на изображении воспроизводятся только те детали объекта, которые расположены в фокальной плоскости объектива.

Оптическая гетеродинная профилометрия и микроскопия (ОГМ) сочетают в себе возможности методов классической оптической микроскопии и метода радиотехнического гетеродинирования. Гетеродинная сканирующая микроскопия позволила преодолеть дифракционный предел, как аппаратными методами, так и с помощью дополнительной компьютерной обработки отклика микроскопа. В последнем случае удалось достичь латерального разрешения ~λ/10 и более. Разрешение метода по высоте ~0,1 Å. Метод когерентной ОГМ требует построения достаточно сложных физико-математических моделей формирования отклика микроскопа на субмикронные объекты и разработки эффективных методов его компьютерной обработки. Частично эти проблемы решены в дифференциальной ОГМ [7-9].

Ближнепольная микроскопия, ближнепольная сканирующая оптическая микроскопия, ближнепольная растровая оптическая микроскопия (БСОМ, БРОМ и ряд других модификаций) основана на измерении нанометровым зондом распределения интенсивности рассеянного объектом излучения в ближней зоне, т.е. на расстояниях меньше λ от объекта [10, 11]. Метод позволил достичь в оптическом диапазоне латерального разрешения ~λ/20 и более[3]. Разрешение по высоте в лучших приборах этого типа также достаточно высоко — до нескольких нанометров и лучше. Этот метод имеет те же ограничения и проблемы интерпретации отклика, что и вышерассмотренные методы.

Волноводная оптическая микроскопия (ВОМ) основана на использовании явления волноводного освещения исследуемого объекта, то есть освещения объекта, находящегося в жидкостном волноводном слое, светом направляемой волноводной моды [12-16]. При исследовании ансамбля микрообъектов с близкими параметрами часто продуктивным оказывается статистический подход, при котором определяются характеристики и параметры, характеризующие свойства ансамбля в целом. В этом случае удается описать и свойства одиночного микрообъекта из ансамбля, хотя и в усредненном виде. Такой подход может позволить получить ряд новых сведений об исследуемых микрообъектах, недоступных при анализе другими методами. Естественно, что эти данные не могут полностью заменить результаты наблюдения с помощью классического оптического микроскопа — их следует рассматривать как необходимое дополнение к последним. Метод ВОМ позволяет достичь разрешения по интервалам корреляции (характерный латеральный размер микрообъектов) ~λ/20. Это эквивалентно превышению классического дифракционного предела разрешения Аббе-Рэлея в ~10 раз (теоретические оценки показали, что предельное разрешение метода ВОМ составляет: по высоте — до 0,1 Å; латеральное — с дополнительной математической обработкой — до ~λ/50)[4].

---

[3] Для биологов и медиков представляет интерес возможность обнаружения с помощью БРОМ молекулярного размера (и менее) люминесцентных меток, обладающих избирательной способностью к сцеплению с различными элементами внутриклеточной структуры или участками ДНК.

[4] При исследовании оптически прозрачных неоднородных микрообъектов (не биологических или биологических) среднеквадратичное отклонение показателя преломления от среднего значения может быть определено с точностью ~10^{-5}-10^{-7}, а соответствующий интервал корреляции — с точностью ≈ λ/30.

Необходимо отметить, что большинство из этих приборов, как правило, требует компьютеризованного управления всем процессом проведения измерений, не говоря уже о необходимости компьютерной обработки полученных оцифрованных «изображений» микрообъектов[5].

Кроме рассмотренных здесь очень кратко методов наблюдения микрообъектов, следует отметить также следующие методы: интерферометрия, эллипсометрия, голография, механическая (контактная) профилометрия, дифрактометрия, различные методы однократного рассеяния, ультразвуковая микроскопия и т.д. В таблице приведен в произвольном порядке ряд методов исследования и контроля микрообъектов и их некоторые характеристики (данные автора).

Таблица

Методы исследования субмикронных объектов

№ п/п	Методы контроля	Разрешение по высоте	Латеральное разрешение	Контакт с поверхностью	Базовая длина поверхности
1	Оптическая микроскопия	~ 1 мкм	~ 1 мкм	нет*	~ 1-10 мм
2	Электронная микроскопия	~ 10 Å	~ 0.1 Å	да	~ 1-100 мкм
3	Интерферометрия (классическая)	~ 0,01 мкм	~ 1 мкм	да*	~ 1 мм
4	Контактная профилометрия	~ 1 Å	~ 0.1 мкм	да	~ 1 мм
5	Методы однократного рассеяния и дифракции	~ 20 Å	~ 1 мкм	нет*	~ 50-100 мкм
6	Конфокальная сканирующая микроскопия	~ 20-100 Å	~ 0.3-1 мкм	нет	~ 10-100 мкм
7	Ближнепольная микроскопия	~ 1-5 Å	~ 0.01 мкм	нет	~ 1-10 мкм
8	Гетеродинная оптическая профилометрия-микроскопия	~ 1-10 Å	~ 0,1 мкм	нет	~ 10-100 мкм
9	Сканирующая туннельная электронная и атомно-силовая микроскопия	~ 0,01 Å	~ 1 Å	нет*	~ 1-10 мкм
10	Ультразвуковая микроскопия	~ 0,1 мкм	~ 5 мкм	да	~ 1-10 мм
11	Микроскопия поверхностных электромагнитных волн	~ 10 Å	~ 0,5 мкм	да	~ 100-500 мкм
12	Волноводная оптическая микроскопия	~ 1 Å	~ 0,01 мкм	да	~ 0,05-1 мм
13	Эллипсометрия	~ 20-50 Å	~ 1 мкм	нет*	~ 50-200 мкм

* — не во всех случаях.

Анализ современного развития методов исследования субмикронных объектов показал, что наиболее перспективным направлением является разработка оптических методов неразрушающего контроля микрообъектов в биологии, медицине, экологии, и других наукоемких, высокотехнологичных областях.

[5] Для обработки «изображений» субмикронных объектов требуются компьютеры не хуже Пентиум 366/32 Мб/8 Гб/SVGA 16 Мб.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Тычинский В.П.* Микроскопия субволновых структур // УФН. — 1996. — Т. 166. — №11. — С. 1219-1229.
2. *Киселев Н.А.* Электронная микроскопия биологических макромолекул. — М.: Наука, 1965.
3. *Вилли К., Детье В.* Биология (Биологические процессы и законы). — М.: Мир, 1974. — 823 с.
4. *Binnig G., Rohrer H., Gerber C., Weibel E.* // Phys. Rev. Lett. — 1983. — Vol. 50. — P. 120.; *Куейт Ф.* Вакуумное туннелирование: новая методика в микроскопии / В сб.: Физика за рубежом. — М.: Мир, 1988. — С. 93-111.
5. *Апенко М.И., Дубовик А.С.* Прикладная оптика. — М.: Наука, 1982. — 352 с.
6. *Ченцов Ю.В.* Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в биологии и медицине // Оптический журнал. — 1994. — №12. — С. 18-23.
7. *Баранов Д.В., Егоров А.А., Золотов Е.М., Свидзинский К.К.* Восстановление профиля микрообъекта в гетеродинном дифференциальном микроскопе // Оптика и спектр. — 1997. — Т. 83. — №3. — С. 516-527.
8. *Баранов Д.В., Егоров А.А., Золотов Е.М., Свидзинский К.К.* Формирование отображения микроступенчатого профиля в гетеродинном дифференциально-фазовом микроскопе // Квантовая электроника. — 1996. — Т. 23. — №4. — С. 368-372.
9. *Baranov D.V., Egorov A.A., Zolotov E.M., Svidzinsky K.K.* Step-height and step-transition measurements with heterodyne differential interferometer // Proc. SPIE. — 1999. — Vol. 3736. — P. 426-429.
10. *Silva T.J., Schultz S., Weller D.* Scanning near-field optical microscope for the imaging of magnetic domains in optically opaque materials // Appl. Phys. Lett. — 1994. — Vol. 65. — №6. — P. 658-660.
11. *Zenhausern F., O'Boile M.P., Wickramasinghe H.K.* Apertureless near-field optical microscope // Appl. Phys. Lett. — 1994. — Vol. 65. — №13. — P. 1623-1625.
12. *Egorov A.A.* Theory of waveguide optical microscopy // Laser Physics. — 1998. — Vol. 8. — №2. — P. 536-540.
13. *Yegorov A.A.* Optimization of characteristics and parameters of waveguide optical microscope // Laser Physics. — 1999. — Vol. 9. — №2. — P. 542-547.
14. *Егоров А.А.* Определение параметров статистического ансамбля микрообъектов в волноводном оптическом микроскопе // Изв. РАН. Серия Физическая. — 1999. — Т. 63. — №6. — С. 1125-1131.
15. *Egorov A.A.* Determination of parameters of statistical ensemble of microobjects in waveguide optical microscope // Proc. SPIE. — 1999. — Vol. 3736. — P. 375-384.
16. *Егоров А.А.* Определение характеристик и параметров статистической неровности поверхности в волноводном оптическом микроскопе (компьютерное моделирование) // Вестник РУДН. Сер. «Физика». — 1999. — №7. — Вып. 1. — С. 35-40.

METHODS OF INVESTIGATION OF SUBMICRON OBJECTS

A.A.Yegorov

Ecological Faculty, Peoples' Friendship Russian University,
Podolskoye shosse, 8/5, 113093, Moscow, Russia

A brief review of some methods of investigation of submicron objects is presented. The basic attention is being given to the non-destructive optical (laser's) methods of control of microobjects.