

Вариант построения нового высококонтрастного микроскопа

В статье описан вариант новой конструкции высококонтрастного микроскопа для работы в области вакуумного ультрафиолетового диапазона (ВУФ) 10–200 нм, приведены варианты применения комплектующих оптико-электронных изделий, обеспечивающих его работоспособность, предлагается опытное и серийное производство нового высококонтрастного микроскопа на основе ВУФ-диапазона с использованием доступных промышленных решений оптических узлов и известных моделей осветителя ВУФ-диапазона, серийного КМОП-фотоприемника формата 12 Мп при небольших габаритах нового изделия.

**Александр Медведев
Александр Гринкевич
Дмитрий Соколов
Светлана Князева
Юрий Евстифеев**

Необходимость наблюдения и изучения мало-размерных объектов вывели на передовые позиции световую микроскопию.

Разрешающая способность человеческого глаза составляет лишь около 100 мкм, поэтому оптико-электронные приборы являются основным и практически незаменимым способом наблюдения в разных исследованиях.

Известно, что разрешающая способность находится в прямой зависимости от длины рабочей волны наблюдения. По критерию Рэля уменьшение длины волны λ является основным способом увеличения разрешающей способности микроскопов и фотолитографических систем. Согласно формуле Рэля, предел разрешения объектива микроскопа устанавливается величиной радиуса кружка Эри в пространстве предметов [1]:

$$\rho_{\text{э}} = \frac{0,61\lambda}{A}, \quad (1)$$

где λ — длина волны; A — числовая апертура объектива в пространстве предметов.

Максимальная разрешающая способность лучших световых микроскопов в зависимости от используемого источника света может достигать 0,2 мкм, тогда как предел «остроты зрения» стандартных световых микроскопов составляет порядка 1 мкм, поэтому они оптимальны для наблюдения бактерий, чьи размеры составляют десятые доли миллиметра.

При переходе к еще более мелким объектам, например, при решении задач, связанных с наблюдением и выявлением любых вирусов, размеры которых в тысячи раз меньше размеров бактерий, использование световых микроскопов приводит к нулевым результатам. Это связано с тем, что размеры вирусов меньше длины волны света, использованного в осветителях микроскопов. В этом случае целесообразно применение электронных микроскопов, разреша-

ющая способность которых достигает примерно 0,2 нм, поскольку длина их рабочей волны составляет сотые доли нм, а практическое разрешение — около 2–3 нм [2].

Применение электронных микроскопов не позволяет изучать «внутренности» живых клеток и наблюдать динамические изменения, характерные для живых систем. Изучению живых клеток в сканирующих электронных микроскопах также препятствуют огромные радиационные дозы, приводящие к разложению органических образцов под действием пучка электронов.

Одной из возможностей повышения разрешающей способности за счет уменьшения длины рабочей волны является применение новых электронных компонентов, а именно электронно-оптических преобразователей (ЭОП). При использовании фотокатодов, чувствительных к глубокому ультрафиолетовому (УФ) спектральному диапазону современных микроканальных пластин (МКП) с малым диаметром каналов и высококонтрастных экранов-люминофоров, можно построить оптико-электронный прибор для визуализации и изучения наноразмерных объектов.

Предприятия Зеленограда разработали экспериментальные образцы ЭОП поколения 2+ с одной микроканальной пластиной (МКП) и с фотокатодами на основе алмазоподобных соединений. Разрешающая способность таких ЭОП находится на уровне 45 лин/мм, а спектральный диапазон находится в интервале УФ-диапазона 150–250 нм.

Для расширения диапазона спектра в область до 20 нм и для повышения разрешающей способности до величин более 100 лин/мм создана более совершенная конструкция ЭОП, за основу которой была принята концепция «открытого входа» ЭОП, когда приемником УФ-излучения служит МКП.

Для того чтобы использовать ЭОП с «открытым входом» для фиксации изображений, в приборе должен быть обеспечен вакуум не хуже 10^{-5} мм рт. ст.

Повышение разрешающей способности до значений $\sim 120\text{--}150$ лин/мм обеспечивается использованием катодолуминофора с размером зерна около 1 мкм. Спектральная чувствительность в этом случае определяется МКП— «чистые» МКП (без дополнительных покрытий) обеспечивают спектральный диапазон чувствительности 10–150 нм с квантовой эффективностью на длине волны ~ 20 нм не хуже 80% [3].

Вариант конструкции ЭОП с «открытым» входом представлен на рис. 1.

УФ ЭОП содержит узел вакуум-плотного крепления с корпусом прибора, базовый корпус (аналогичный корпусу ЭОП поколения 2+ типа ЭПМ-70Г), МКП и катодолуминесцентный экран (катодолуминофор с размером зерна около 1 мкм, полученный методом «отмучивания»), нанесенный на стеклянную линзу с плоским входом и выходом.

В ЭОП расстояние между МКП и катодолуминесцентным экраном равно 0,5 мм, а напряжение питания ЭОП — 5 кВ.

Достигнутые качественные показатели УФ ЭОП имеют следующие значения:

- коэффициент усиления по току: 500–1000;
- расчетные значения разрешающей способности, не менее:
 - 150 лин/мм при МКП с диаметром каналов 4 мкм,
 - 200 лин/мм при диаметре каналов 3 мкм.

Создание такого электронно-оптического компонента раскрывает широкие возможности для построения приборов, предназначенных для изучения наноразмерных объектов. Таким прибором может стать оптико-электронный прибор в варианте конструкции микроскопа с использованием УФ ЭОП.

Основу конструкции составляет весьма актуальная передовая разработка РАН, использующая спектральную область мягкого рентгеновского (МР) излучения, длины волн которой находятся в диапазоне 0,3–10 нм, и сцинтиллятор для визуализации изображения [4].

В этом диапазоне особый интерес представляет участок длин волн 2,3–4,4 нм из-за особенностей взаимодействия мягкого рентгеновского излучения с веществом, которое имеет название «окно прозрачности воды».

Большая глубина проникновения излучения в воду и сильное по сравнению с рассеянием поглощение излучения белком в диапазоне «окна прозрачности воды» [5], позволяют изучать «живые» водосодержащие органические клетки, а малая длина волны— получить разрешение в изображении двумерного образца на уровне нескольких десятков нанометров.

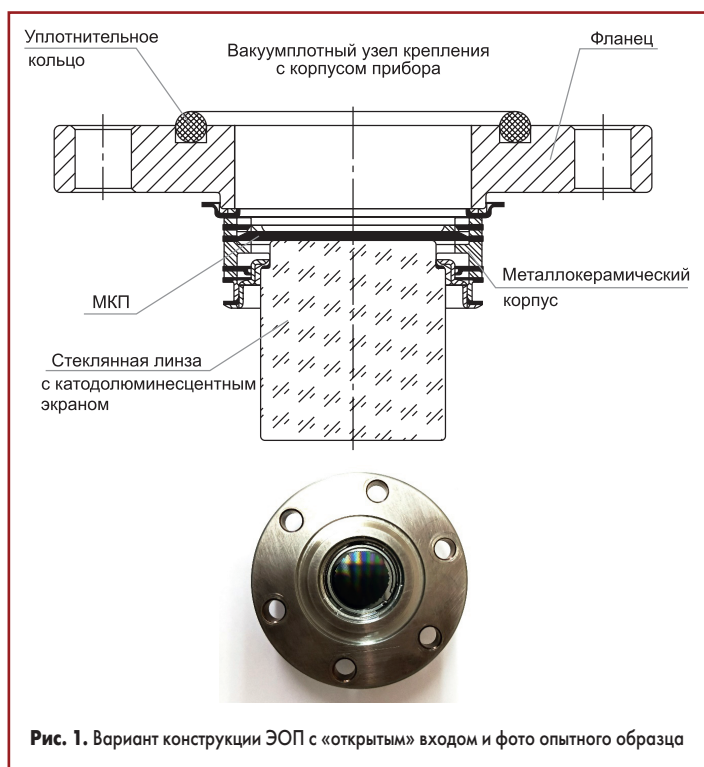


Рис. 1. Вариант конструкции ЭОП с «открытым» входом и фото опытного образца

Основу разработки РАН составляет светосильный асферический зеркальный объектив Шварцшильда с числовой апертурой $A = 0,3$ и с расчетной длиной волны 3,37 нм, что позволило продвинуться в область разрешений менее 60 нм (рис. 2).

В лазерно-плазменный источник на основе углеродосодержащей газовой струи попадает сфокусированный лазерный импульс. Полученная плазма светит в широком спектре, из которого коллектор с многослойным Cr/Sc-покрытием отражает на образец выбранную длину волны 3,37 нм. В качестве рабочего газа можно использовать этанол с яркой спектральной линией пятикратно ионизованного углерода C-VI или аргон с яркими линиями Ag-V и Ag-VIII. Изображение образца строится на сцинтилляторе с помощью зеркального объектива Шварцшильда с увеличением в 46 раз. Сцинтиллятор преобразует мягкое рентгеновское излучение в видимый свет. Изображение на сцинтилляторе переносится линзовым объективом на ПЗС-матрицу с размером пикселя 3,45 мкм.

Особенностью микроскопа является асферический объектив, в котором из-за малой длины волны 3,75 нм при его изготовлении необходимо выполнить достаточно жесткие требования к абберациям на уровне порядка 1 нм, а к шероховатости поверхностей зеркал — на уровне 0,2 нм.

За счет асферизации 6-го порядка первичного зеркала объектива Шварцшильда были получены следующие величины разрешения в зависимости от величины линейного поля зрения:

- 8 нм с контрастом 30% в поле зрения 10 мкм;
- 36 нм с контрастом 90% в поле зрения 40 мкм;
- 76 нм с контрастом 97% в поле зрения 100 мкм.

Создание оптико-электронного микроскопа на этой основе с использованием УФ ЭОП будет иметь ряд особенностей.

Разрешающую способность такого микроскопа достаточно обеспечить на уровне 90 нм, а в качестве рабочего спектра целесообразно выбрать спектральную область вакуумного ультрафиолетового диапазона (ВУФ) 10–50 нм. Тогда, исходя из расчетной длины волны $\lambda = 30$ нм и числовой апертуры объектива A равной 0,4, в соответствии с формулой (1) ожидаемое разрешение составит $r_0 = 45,75$ нм. Соответственно, упрощаются требования к изготовлению зеркальной оптики объектива, а также появляется возможность ограничиться использованием простых сферических поверхностей в сочетании с новым типом высоко-

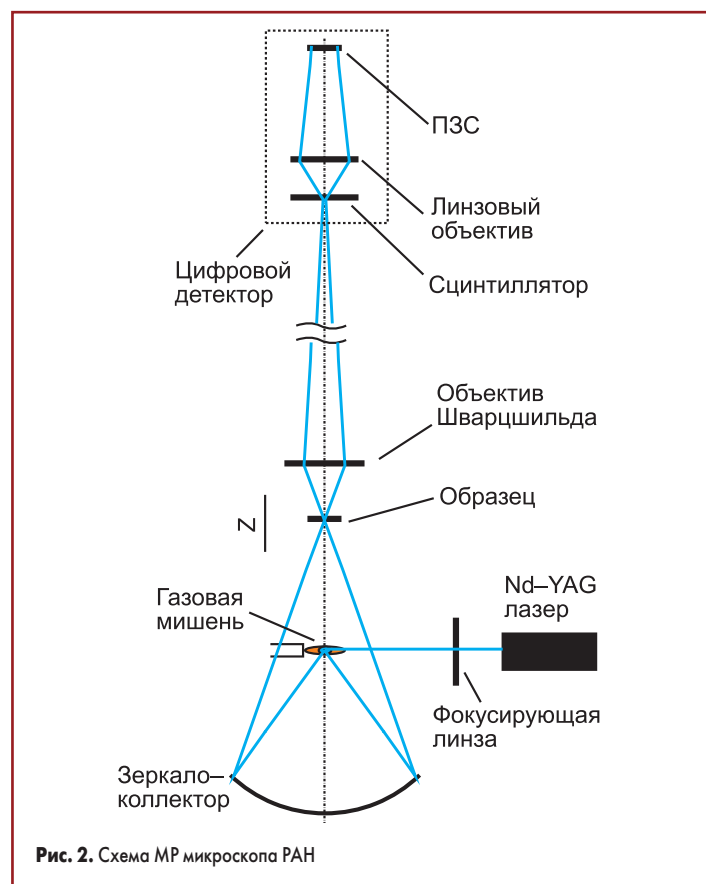


Рис. 2. Схема МР микроскопа РАН

разрешающего (не менее 150 лин/мм) электронно-оптического преобразователя (ЭОП) ВУФ-диапазона.

Схема варианта высокоразрешающего ВУФ-микроскопа представлена на рис. 3.

Изображение предмета с предметной поверхности 1 переносится в плоскость фотокатода электронно-оптического преобразователя 5 с помощью зеркального объектива I. Особенностью оптического расчета является форма предметной плоскости с вогнутой поверхностью с радиусом кривизны $R1=6,053$ мм.

Такой вариант исполнения зеркального объектива ВУФ микроскопа имеет следующие параметры:

- линейное увеличение: 67 крат;
- линейное поле зрения: 0,26 мм;
- числовая апертура объектива: 0,4;
- расчетная длина волны: 30 нм;
- теоретическая разрешающая способность: 45,75 нм;
- диаметр фотокатода ЭОП: 17,5 мм;
- разрешающая способность ЭОП: 150 лин/мм;
- длина по оптической оси от предмета до фотокатода ЭОП: 407,3 мм.

Зеркальные поверхности выпуклого 3 и вогнутого 4 сферических зеркал могут быть выполнены в варианте с многослойным покрытием Mo-Si на кварцевом стекле (плавленый кварц КУ-1), отработанным для ВУФ-диапазона в технике электронной литографии и в вакуумной ультрафиолетовой астрономии.

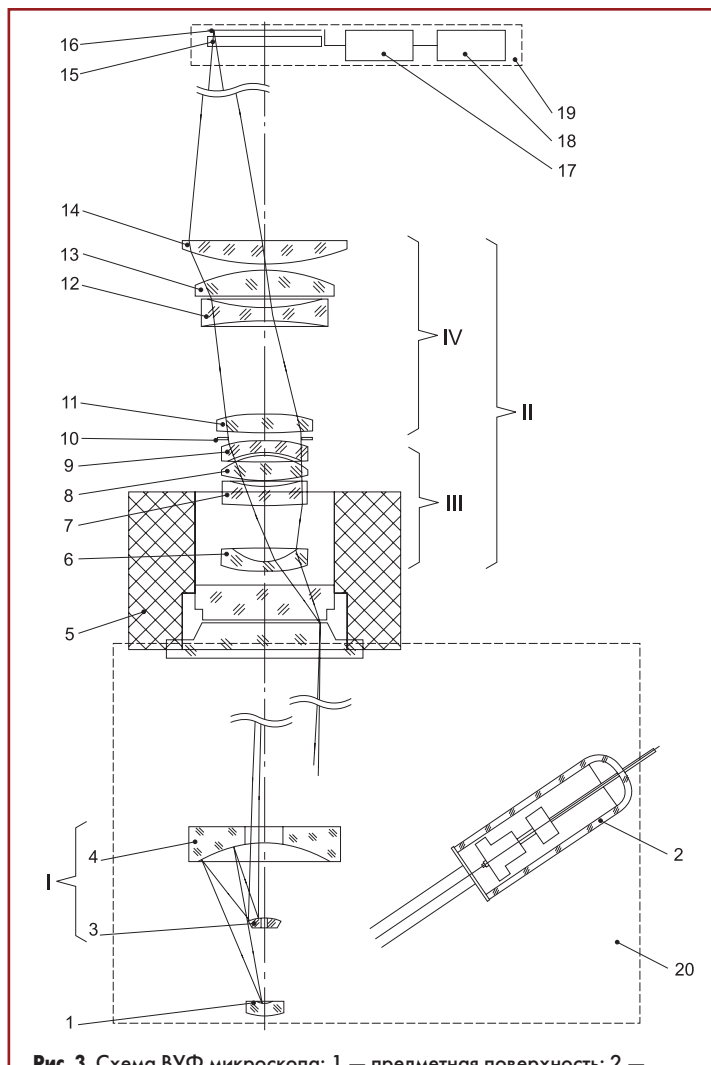


Рис. 3. Схема ВУФ микроскопа: 1 — предметная поверхность; 2 — система подсветки; I — зеркальный объектив I из вторичного выпуклого сферического зеркала 3 и главного вогнутого сферического зеркала 4; 5 — ЭОП; II — 2-й объектив, состоящий из компонентов III и IV; 15 — защитное стекло матричного фотоприемника 16; электронный блок 17; монитор 18 телевизионного канала 19; компонент III состоит из оптических элементов 6–9 и апертурной диафрагмы 10; компонент IV — из оптических элементов 11–14; а элементы 1–4 и входное окно ЭОП заключены в вакуумный объем 20.

Качество изображения в плоскости фотоприемника представлено диаграммами пятен рассеяния (рис. 4). Сравнение с размерами диска Эйри свидетельствует о высоком качестве изображения, близкого к дифракционному.

В качестве системы подсветки 2 можно использовать спектральные лампы тлеющего разряда типа ЛГВМ-0,5 с наполнением смесью гелия и водорода, серийно выпускаемые Государственным оптическим институтом им. С. И. Вавилова. Особенностью ламп является наличие окна из фтористого магния, вакуум-плотно припаянное к стеклу, и они рекомендованы ГОСТ Р 25645.338-96 для области спектра 10–200 нм (рис. 5)

Конструктивные параметры лампы приведены в таблице 1.

Для работы в области длин волн короче 105 нм в качестве варианта исполнения входного окна ЛГВМ-0,5 можно использовать тонкие полимерные пленки, помещенные на мелкую сетку.

В качестве источника подсветки также может служить источник спонтанного излучения, использующий газоразрядную плазму в керамическом капилляре. Это источник мягкого рентгеновского и ВУФ-излучения в спектральном диапазоне от ~3 до 40 нм, разработанный в Физическом институте им. П.Н. Лебедева для практических применений, в том числе в проекционной ВУФ-литографии [6].

Вариант ЭОП 5 (рис. 3) разработан НИУ МИЭТ, передан в ПАО «Ростовский оптико-механический завод» и готов к освоению в совместном производстве нового высокоразрешающего микроскопа.

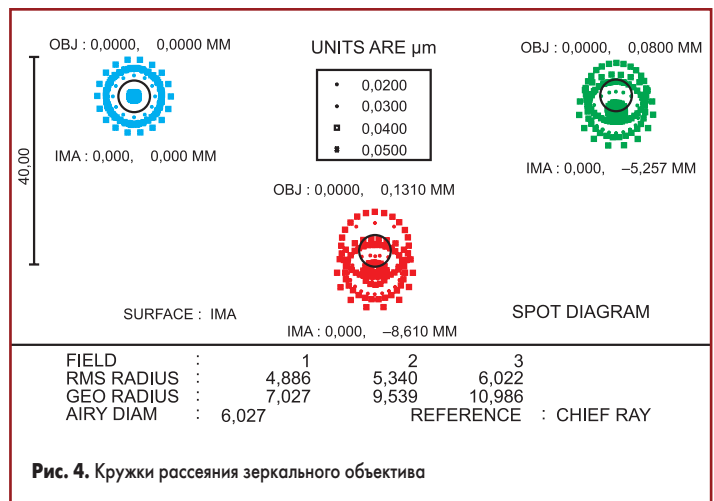


Рис. 4. Кружки рассеяния зеркального объектива

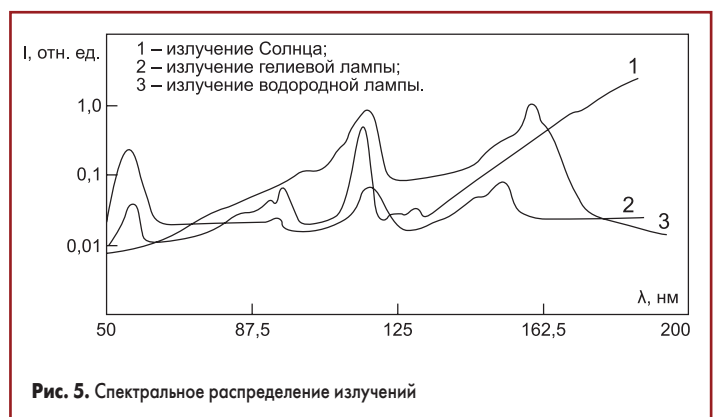


Рис. 5. Спектральное распределение излучений

Таблица 1. Конструктивные параметры ЛГВМ-0,5

Параметр	Значение
Мощность излучения в ВУФ диапазоне, мВт	~1
Мощность излучения в ВУФ диапазоне, квант/с	~10 ¹⁴
Диаметр апертуры (размер зоны свечения), мм	2,5
Габаритные размеры, мм	Ø10×30
Напряжение питания, В	300–350
Рабочий ток, мА	1–2
Срок службы, ч	500

Таблица 2. Конструктивные параметры ЭОП

Параметр	Значение
Спектральный диапазон чувствительности, нм	20–200
Диаметр, мм	
Квантовая эффективность в диапазоне 20–200 нм, %	≥ 5
Коэффициент преобразования	≥ 1000
Цвет свечения люминофора	желто-зеленый
Разрешающая способность, лин/мм	≥ 150
Габаритные размеры, мм	Ø43,1×30,4
Напряжение питания, В	2,8
Ток потребления, мА	≤ 20
Время непрерывной работы, ч	3000

Конструктивные параметры ультрафиолетового варианта исполнения ЭОП приведены в таблице 2.

Изображение экрана ЭОП 5 (рис. 3) переносится в плоскость матричного фотоприемника 16 телевизионного канала 19 с помощью проекционного объектива II. Для обеспечения линейного разрешения зеркального объектива микроскопа ρ_z , равного ~46 нм, линейные увеличения проекционного объектива для ЭОП $V_{об}$ и телевизионного канала $V_{пос}$ при известном размере пикселя $d_{фп}$ КМОП фотоприемника должны быть связаны следующим соотношением (2):

$$V_{пос} = \frac{d_{фп}}{\rho_z \cdot V_{об}}. \quad (2)$$

При размере пикселя $d_{фп} = 5,5$ мкм, линейной разрешающей способности оптической системы зеркального объектива микроскопа 0,046 мкм и линейном увеличении (масштабе) зеркального объектива микроскопа минус 67 крат значение линейного увеличения проекционного объектива $V_{пос}$ должно быть равным 1,785 крат.

При полученном линейном увеличении объектива II общая длина оптической системы от люминофора экрана ЭОП 5 до чувствительной площадки матричного фотоприемника 16 составляет 109,2 мм.

В качестве матричного фотоприемника 16 используется фотоприемник в формате 12 Мп, имеющий обозначение CMV12000. Фотоприемник разработан предприятием CMOSIS и производителем полупроводниковой продукции Tower Jazz. В настоящее время он производится на предприятии Fab-2 и характеризуется шагом пикселей 5,5×5,5 мкм с разрешением активной области 4096×3072 пикс, позволяя выполнять считывание данных со скоростью 300 кадр/с.

Учитывая особенность спектрального диапазона вакуумной ультрафиолетовой области спектра, заключающуюся в резком возрастании поглощения в воздухе излучения с длинами волн 20–40 нм, часть оптической системы заключена в вакуумный объем 20.

Создание вакуума является наиболее простым методом обеспечения работы в ВУФ-области спектра, качественной оценкой которого является поглощение половины общей энергии источника света. Обычно это реализуется на пути длиной около 1 м при остаточном давлении порядка 10^{-2} Па, соответствующем среднему вакууму. Заметим, что это намного меньше, чем давление 10^{-5} – 10^{-6} Па, соответствующее высокому вакууму, требующемуся для электронных микроскопов.

Еще одним возможным вариантом обеспечения работы в ВУФ-области является наполнение приборов прозрачным газом, например аргоном или гелием, но такой метод используется редко.

Рассмотренный вариант построения высокоразрешающего микроскопа на основе ЭОП ВУФ-диапазона с использованием доступных промышленных решений оптических узлов и известных моделей осветителя ВУФ-диапазона, а также серийного КМОП-фотоприемника формата 12 Мп обеспечивает небольшие габаритные размеры изделия составляет около 522,5 мм.

В рассмотренной конструкции поле зрения микроскопа равно 0,29 мм, а размер одного пикселя фотоприемника соответствует размеру x на объекте, определяемому по формуле (3):

$$x = \frac{d_{фп}}{V_{об} \cdot V_{эоп} \cdot V_{пос}}. \quad (3)$$

При линейном увеличении ЭОП $V_{эоп}$ равном 1 крат один пиксель фотоприемника занимает на предметной поверхности 45,98 нм, позволяя различать полосы шириной 46 нм, тогда как период полос (2 пикс фотоприемника) составит ~92 нм.

Теоретически достижимая разрешающая способность зеркального объектива показывает возможность различения периода полос до уровня ~46 нм, что обеспечивается ростом увеличения зеркального объектива за счет уменьшения поля зрения микроскопа и соответствующего увеличения габаритной длины. Узлы проекционного объектива и КМОП-фотоприемника допускают разные варианты исполнения, учитывая достаточно широкую номенклатуру КМОП-фотоприемников на современном рынке.

Таким образом, кооперация МИЭТ и ПАО «Ростовский оптико-механический завод» может организовать опытное и серийное производство нового высокоразрешающего микроскопа на основе ЭОП ВУФ-диапазона с использованием доступных промышленных решений оптических узлов и известных моделей осветителя ВУФ-диапазона, серийного КМОП-фотоприемника формата 12 Мп при небольших габаритах изделия и соответствующей финансовой поддержке.

Новый российский микроскоп может применяться в микроэлектронике, медицине, микробиологии, дефектоскопии и в разных предметных областях для разработки новых материалов и методик диагностики, заменит зарубежные дорогие микроскопы, позволит создать новые технологии и новые материалы.

Литература

1. Панов В. А., Андреев Л. Н. Оптика микроскопов. Расчет и проектирование. Л., Машиностроение, 1976.
2. Мельников В. Л., Митрофанова Н. Н., Мельников Л. В. Методы изучения морфологии микроорганизмов. Учебн. пос. Пенза, Изд-во ПГУ, 2014.
3. Куклев С. В., Соколов Д. С., Зайдель И. Н. Электронно-оптические преобразователи. М.: Машиностроение, 2004.
4. Малышев И. В. Зеркальные системы на основе асферических поверхностей высоких порядков для мягкого рентгеновского и вакуумного ультрафиолетового диапазонов длин волн. Диссертация на соискание ученой степени к. ф.-м. н. Нижний Новгород, 2019.
5. Kirz J., Jacobsen C., Howells M. Soft X-ray microscopes and their biological applications // Q. Rev. Biophys. 1995. Vol. 28. No. 1.
6. Собельман И. И., Шевелько А. П., Якушев О. Ф., Найт Л. В., Турли Р. С. Интенсивный источник ВУФ излучения на основе плазмы капиллярного разряда // Квантовая электроника. 2003. Т. 33. № 1.