МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛОВ

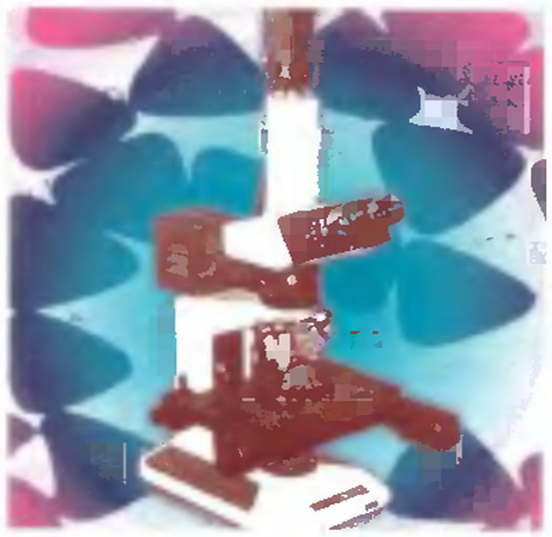
Материаловедение и технология материалов

VI ◆ 13

Методы материалов и технологий

Э.Р. КЛАРК,
К.Н. ЭБЕРХАРДТ

Микроскопические методы исследования материалов



ТЕХНОСФЕРА

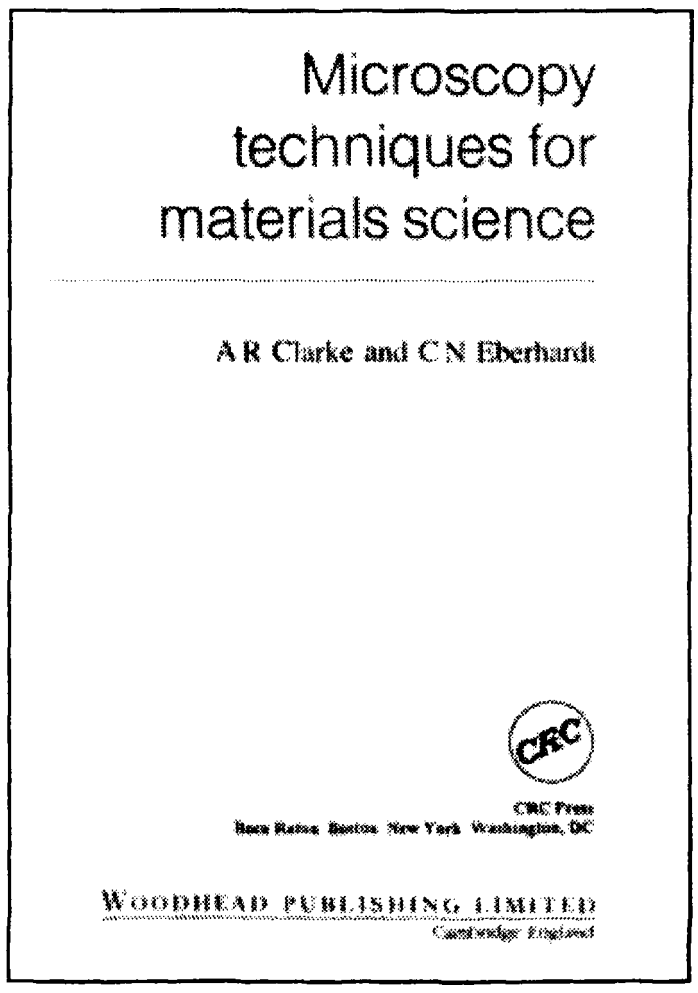
Издание осуществлено при финансовой поддержке
Российского Фонда Фундаментальных Исследований
По проекту № 07-03-07015-д

Кларк Эшли Р., Эберхардт Колин Н.
Микроскопические методы исследования материалов
Москва:
Техносфера, 2007. – 376с. ISBN 978-5-94836-121-5

За последние десятилетия в области материаловедения был совершен огромный скачок вперед. Одновременно очень быстро развивались и оптические методы исследования материалов. В компьютерной микроскопии произошли столь значительные изменения, что появилась потребность в книге, описывающей возможности новейших оптических микроскопов, используемых для исследования конструкционных материалов.

В книге рассматриваются основы оптической микроскопии, описываются методы оптических исследований, как классические (методы темного поля и интерференционная микроскопия), так и новейшие, а также неоптические – например, акустические и рентгеновские. Рассматривается построение двумерного изображения на основе трехмерного массива данных и методы преобразования цифрового изображения на компьютере, изучается работа конфокального лазерного сканирующего микроскопа, приводятся примеры трехмерной реконструкции структуры композитов.

Книга будет полезна ученым, специалистам в области материаловедения, аспирантам.



© 2002, Woodhead Publishing Limited
© 2007, ЗАО "РИЦ "Техносфера", перевод на русский язык,
оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-121-5
ISBN 1-85573-587-3 (англ.)

Содержание

Часть I. Основные принципы.....15

Глава 1. Взаимодействие электромагнитного излучения с материалом.....15

1.1. Введение.....15

1.1.1. Технология – структура – свойства.....16

1.1.2. Оптические и неоптические методы.....17

1.1.3. Возможности автоматизированных микроскопов.....18

1.1.4. Моделирование и визуализация трехмерных объектов.....20

1.2. Характеристики электромагнитного излучения.....21

1.2.1. Математическое моделирование и физическая реальность.....21

1.2.2. Электромагнитная волна.....22

1.2.3. Показатель преломления.....25

1.2.4. Групповая скорость.....29

1.2.5. Поляризация.....30

1.2.6. Поляризаторы и пластинки в четверть длины волны.....32

1.3. Распространение световых волн.....34

1.3.1. Отражение света от плоских поверхностей.....34

1.3.2. Влияние угла падения на коэффициент отражения.....36

1.3.3. Отражение от неплоских поверхностей.....37

1.3.4. Интерференция волн....38
1.3.5. Светофильтры....42
1.3.6. Дифракция....44
1.3.7. Поглощение света....46
1.3.8. Квантовая механика и теория Бора....49
1.3.9. Источники электромагнитного излучения....53
1.4. Конструкция микроскопа....55
1.4.1. Линзы....55
1.4.2. Микроскоп....60
1.4.3. Аберрация....64
1.4.4. Оптический микроскоп проходящего света....71
1.4.5. Оптический микроскоп отраженного света....72
1.4.6. Флуоресцентный микроскоп....73
1.4.7. Методы темного поля, фазового контраста и интерференционная микроскопия....74
1.4.8. Поляризационный микроскоп....78
1.5. Фотоника....79
1.5.1. Магнитооптические и электрооптические материалы....79
1.5.2. Оптические свойства линзы....82
1.5.3. Оптоэлектронные нейронные сети....85
1.5.4. Будущее компьютерной оптической микроскопии....87
1.6. Литература....89

1.7. Дополнительная литература.....89

Глава 2. Цифровое изображение и его обработка.....90

2.1. Введение.....90

2.2. Цифровая информация.....91

2.2.1. Числовые коды.....91

2.2.2. Кодирование текста.....92

2.2.3. Кодированные процессы и действия.....93

2.3. История развития вычислительных методов 95

2.3.1. Транзистор.....95

2.3.3. Motorola 6802.....100

2.3.2 История развития микропроцессоров.....100

2.3.4. Измерительные системы Vela и LabView.....102

2.3.5. Связь языка программирования с электроникой.....104

2.3.6. Транспьютер T800 фирмы INMOS.....104

2.3.7. Сигнальный процессор (DSP).....107

2.3.8. Корреляция и свертка.....110

2.3.9. Прогноз вычислительных возможностей.....110

2.4. ПЗС-матрицы.....111

2.4.1. Спектральные характеристики.....113

2.4.2. Температура эксплуатации.....114

2.4.3. Спектральное и пространственное разрешение.....115

2.4.4. Диапазон измерений и увеличение....116

2.5. Оцифровка и АЦП-устройства....116

2.5.1. Медленное сканирование в режиме реального времени....119
2.5.2. Ошибки, обусловленные дискретностью сигнала....119
2.5.3. Значения времени выборки....120
2.5.4. Теорема Котельникова о частоте съема информации....121
2.5.5. Видеокарты C80 и «Genesis» 122

2.6. Цифровое изображение....125

2.6.1. Структура цифрового изображения....125
2.6.2. Анализ изображения....128
2.6.3. Преобразование изображения....129

2.7. Хранение и редактирование изображений....130

2.7.1. Структура файлов данных....130
2.7.2. Формат изображения....132
2.7.3. Сжатие без потери качества....134
2.7.4. Сжатие с потерей информации....134

2.8. Преобразовавние изображения....134

2.8.1. Коррекция изображения....135
2.8.2. Преобразование распределения интенсивности....138
2.8.3. Пространственные фильтры....140
2.8.4. Частотный фильтр....141

2.8.5. Преобразование Хоуга.....143
2.8.6. Выделение областей.....148
2.8.7. Характеризация и классификация.....151

2.9. Ошибки и стереология.....151

2.10. Литература.....154

Часть II. Микроскопия отраженного света и конфокальная растровая лазерная микроскопия.....155

Глава 3. Микроскопия отраженного света 155

3.1. Введение.....155

3.1.1. Подготовка образца.....158
3.1.2. Микроскоп Olympus BH2.....160
3.1.3. Измерения на единичном кадре.....162

3.2. Автоматизированная микроскопия крупных областей.....169

3.2.1. Введение.....169
3.2.2. Система на основе транспьютеров.....172
3.2.3. Калибровка поля зрения.....173
3.2.4. Определение ориентации волокна.....176
3.2.5. Волокна необычной формы.....181

3.3. Ориентация волокон в композитах, полученных литьем под давлением...185

3.3.1. Краткое описание.....185

3.3.2. Введение.....186
3.3.3. Автоматизированная система определения ориентации волокон.....189
3.3.4. Стереология.....191
3.3.5. Разделение касающихся волокон.....191
3.3.6. Характеристики степени ориентации волокон.....193
3.3.7. Анализ процесса многократной инжекции расплава.....194
3.3.8. Заключительные замечания.....196
3.4. Измерение длины волокон.....196
3.4.1. Краткое описание.....196
3.4.2. Введение.....197
3.4.3. Области детекции.....198
3.4.4. Метод.....200
3.4.5. Результаты.....202
3.5. Последние достижения.....202
3.5.1. Последовательные 2D-сечения.....202
3.5.2. Изучение трехмерной структуры композита.....206
3.6. Литература.....207
Глава 4. 3D конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.....211
4.1. Принципы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.....211
4.1.1. Первые конфокальные микроскопы.....211
4.1.2. Оптика конфокального микроскопа.....215

4.2. Современные конфокальные микроскопы.....218

4.2.1. Конфокальный микроскоп Biorad MRC 500.....219
4.2.2. Конфокальный микроскоп «Одиссей» фирмы Норан.....220

4.3. Оптические сечения.....222

4.3.1. Влияние диафрагмы.....223
4.3.2. Показатель преломления и проблема глубины.....225
4.3.3. Максимальная глубина проникновения.....228
4.3.4. Уменьшение интенсивности света в образце.....228
4.3.5. Интерпретация данных.....230

4.4. Проблемы калибровки.....230

4.4.1. Коррекция неравномерности освещенности.....230
4.4.2. Геометрическая коррекция.....232
4.4.3. Z-калибровка.....234

4.5. Способы построения изображения.....235

4.5.1. Работа в отраженном и флуоресцентном свете.....235
4.5.2. Представление трехмерной структуры.....238
4.5.3. Методы получения тонких оптических сечений.....241
4.5.4. Исследование поверхности.....241
4.5.5. Автофокусировка микроскопа.....245

4.6. Анализ тонких пленок, наполненных частицами.....246

4.6.1. Краткое описание.....246

4.6.2. Полимерные пленки.....247
4.6.3. Стереологический анализ частиц.....248
4.6.4. Анализ частиц методом конфокальной микроскопии.....249
4.6.5. Методы измерения объема.....250
4.6.6. Эксперимент.....254
4.6.7. Результаты и выводы.....255
4.7. Исследование волнистости волокон.....256
4.7.1. Краткое описание.....256
4.7.2. Введение.....257
4.7.3. Изучение однонаправленных композитов методом конфокальной микроскопии.....260
4.7.4. Изучение формы волокон.....262
4.7.5. Анализ многослойных композитов.....264
4.7.6. Изучение волнистости волокон.....267
4.7.7. Заключение.....273
4.8. Перспектива развития конфокальной микроскопии.....273
4.9. Литература.....274
Часть III. Дополнительные микроскопические методы.....278
Глава 5. Дополнительные оптические и электромагнитные методы исследования...278
5.1. Введение.....278

5.2. Рамановская микроскопия.....280

5.2.1. Раманскоп.....282

5.2.2. Дополнительные методы, связанные с эффектом комбинационного рассеяния.....284

5.3. Растровая атомно-силовая микроскопия и микроскопия ближнего поля.287

5.3.1. Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ).....290

5.3.2. Атомно-силовой микроскоп (АСМ).....291

5.3.3. Сканирующая микроскопия ближнего поля.....292

5.4. Дополнительные оптические и электромагнитные методы.....294

5.4.1. Термография и метод Фурье-анализа инфракрасного света (FTIR)..294

5.4.2. Флуоресцентная микроскопия (FLIM).....298

5.4.3. Программируемый матричный микроскоп (ПММ) с двойным оптическим путем.....300

5.4.4. Когерентная оптическая томография.....301

5.5. Рентгеновская микроскопия, томография и микротомография.....304

5.5.1. Микроскопы, использующие мягкое рентгеновское излучение.....304

5.5.2. Рентгеновская микрорадиография.....307

5.6. Рентгеновская микротомография волокнистых материалов.....308

5.6.1. Краткое описание.....308

5.6.2. Введение.....308

5.6.3. Рентгеновская компьютерная томография.....310
5.6.4. Качество изображения. Артефакты и разрешение.....311
5.6.5. Текстильные и композиционные волокнистые материалы.....313
5.6.6. Микротомография волокнистых структур.....315
5.6.7. Автоматизированный анализ формы волокон.....316
5.6.8. Выводы.....320
5.7. Литература.....321

Глава 6. Другие микроскопические методы.....327

6.1. Растровая и просвечивающая электронная микроскопия 329

6.1.1. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия и Оже-спектроскопия.....334
6.1.2. Спектроскопия отраженных электронов и спектроскопия энергопотерь электронов.....335

6.2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).....338

6.2.1. Основные принципы ЯМР.....338
6.2.2. Практические соображения.....339
6.2.3. Применение ЯМР в материаловедении.....341

6.3. Ультразвуковая и сканирующая акустическая микроскопия.....341

6.3.1. Введение.....342
6.3.2. Сканирующая акустическая микроскопия.....343
6.3.3. Сканирующие системы, измеряющие время распространения ультразвука.....344

6.4. Ультразвуковая трехмерная картография констант упругости композиционных материалов.....345

6.4.1. Введение.....345

6.4.2. Методология.....348

6.4.3. Исследование полиметилметакрилата.....353

6.4.4. Углепластики, армированные непрерывными волокнами.....357

6.4.5. Стеклопластик, полученный методом литья под давлением.....358

6.4.6. Выводы.....362

6.5. Заключение.....366

6.6. Литература.....368

Благодарности

Мне посчастливилось быть научным руководителем нескольких очень талантливых людей, благодаря которым было написано программное обеспечение и выполнена исследовательская работа, описанная в этой книге. Я в большом долгу перед аспирантами, работавшими со мной в последние 12 лет: перед д-ром Ником Дэвидсоном за развитие 2D-системы анализа изображения, д-ром Джефом Аркэнхольдом за его работу на конфокальной системе Biorad MRC500, д-ром Майком Эндерби за автоматизацию ультразвуковой установки и особенно – перед моим соавтором д-ром Колином Эберхардтом за развитие конфокальной системы «Одиссеей» и развитие метода рентгеновской микротомографии. Я также хочу поблагодарить моих сегодняшних аспирантов: Эндрю Шварца, который помог исправить часть рисунков и снял на цифровую камеру некоторое оборудование, а также Мэта Харпера за его вклад в исследование 3D-констант упругости композитов на ультразвуковой установке.

Я благодарен Нишанту Гопинатану и д-ру Джиа из Института элементарных частиц за рентгеновскую микротомографию наших образцов, а также профессору Ришарду Пирцу из Института механики Ольборгского университета за многолетнее плодотворное сотрудничество, обмен аспирантами и использование установки Skyscan.

Специальную благодарность я выражаю нашим коллегам из полимерной группы Университета Лидса: д-ру Алану Дакетту, д-ру Питеру Хайну и профессору Иану Уорду, которые имеют большой опыт измерения и моделирования армированных волокнистых композитов. Наше взаимодействие с ними за эти годы дало много полезных результатов, и я обязан д-ру Дакетту тем, что он более 13 лет назад подал мне идею заняться волокнистыми композитами.

Нам очень помогла финансовая поддержка профессора Пауля Куртиса (DERA, Фармборо) за предоставление исследовательских грантов, а также помощь наших невидимых спонсоров в Брюсселе, финансировавших работу в рамках британо-европейской исследовательской программы.

Наконец, я благодарен Гвен Джоунс, Патрисии Моррисон и Стюарту Макфарлэйн за помощь в выполнении работ.

Эшли Кларк, сентябрь 2002 г.

Часть I

Основные принципы

Глава 1

Взаимодействие электромагнитного излучения с материалом

1.1. Введение

На первый взгляд кажется, что для использования оптического микроскопа не нужно читать специальных книг. Однако скорость развития современной техники (вычислительной и приборной) столь высока, что, как нам кажется, имеется потребность в книге, описывающей аппаратуру и возможности новейших оптических микроскопов, используемых для исследования конструкционных материалов.

Роль микроскописта состоит в изучении и интерпретации двумерной или трехмерной структуры образца. При изучении нового образца микроскопист должен выполнить следующие действия:

- выбрать оптический микроскоп;
- разрезать образец и подготовить его поверхность (возможно, отполировать ее);
- проанализировать особенности двумерного (2D) изображения;
- вычислить параметры, которые соответствуют этим особенностям в трехмерном образце.

Что может быть проще? Однако при более внимательном рассмотрении каждого из этих действий начинают выявляться проблемы. Во-первых, имеется несколько возможностей решения каждого из этих вопросов. Поэтому микроскопист должен иметь ясное представление, какие измерения наиболее адекватно отвечают поставленным целям. Рассмотрим задачу определения размера особенностей. Ее решение выходит за пределы микроскопического анализа и зависит от специфики исследуемого материала. Еще одним вопросом является выбор плоскости сечения образца. Если материал гомогенен и изотропен, выбор сечения непринципиален. Однако при наличии анизотропии (например, в армированном волокнистом композите) выбор сечения очень важен. Отметим, что при подготовке поверхности

простой полировки может оказаться недостаточно. Например, могут потребоваться травление или напыление! Наконец, одно дело – интерпретировать плоское сечение образца, а другое – описать трехмерный объект без сползания в сложные математические вычисления. Еще один вопрос состоит в том, сколько нужно данных для получения статистически достоверного результата?

Цель этой книги состоит в обучении практическому использованию микроскопа, а не в описании сложной математики, на которой он основан. Книга разделена на три части, каждая из которых состоит из двух глав.

Часть I ориентирована на новичков в микроскопии и обработке компьютерных изображений. Более опытные читатели могут ее опустить. В первой главе обсуждаются принципы распространения электромагнитного излучения, его взаимодействие с материалом, а также основные проблемы оптической микроскопии. Однако и опытные читатели могут найти в ней некоторые темы, заслуживающие внимания. В главе 2 описано развитие электроники, приведшее к созданию микропроцессора и появлению цифрового изображения. В ней рассмотрено, как компьютер строит цифровое изображение, и обсуждаются способы его преобразования.

Часть II состоит из двух глав, в которых рассмотрены два стандартных метода оптической микроскопии. В главе 3 описан оптический микроскоп отраженного света и даны примеры его применения для изучения волокнистых композиционных материалов. В главе 4 рассмотрен конфокальный сканирующий лазерный микроскоп (КСЛМ). В ней рассмотрены примеры реконструкции трехмерной структуры материала, в том числе образцов с тонким покрытием. Приведенные в части II примеры использования КСЛМ основаны на идеях части I. Здесь же описан выбор программного обеспечения для анализа и интерпретации полученной информации.

В части III рассмотрены менее известные (в основном оптические) методы исследования материалов. В главе 5 описаны новые оптические методы, появившиеся в самое последнее время. Наконец, в главе 6 дан обзор акустических и других методов исследования материалов.

Преимуществом компьютерной микроскопии является возможность быстрого измерения параметров трехмерной структуры материалов. Эта книга иллюстрирует современные методы измерений и указывает путь развития оптической микроскопии.

Книга начинается с описания физических основ распространения света в веществе. Однако, дорогой читатель, если Вы нетерпеливы и желаете пропустить часть I, краткий обзор основных вопросов двух первых глав дан в следующих трех параграфах.

1.1.1. Технология – структура – свойства

При постановке исследования одной из самых трудных задач является определение необходимого объема работы. Важнейшая задача микроскописта состоит в исследовании стабильности технологии производства детали, которая должна нести требуемые нагрузки. По существу, это является контролем качества технологического процесса. Размеры детали могут варьироваться в пределах от нескольких сантиметров до многих метров, а в последнее время появились и мелкие детали нанометрового масштаба (10^{-9} м). Диапазон исследований теперь охватывает нано-, микро- и мезоуровни, как показано на рис. 1.1.

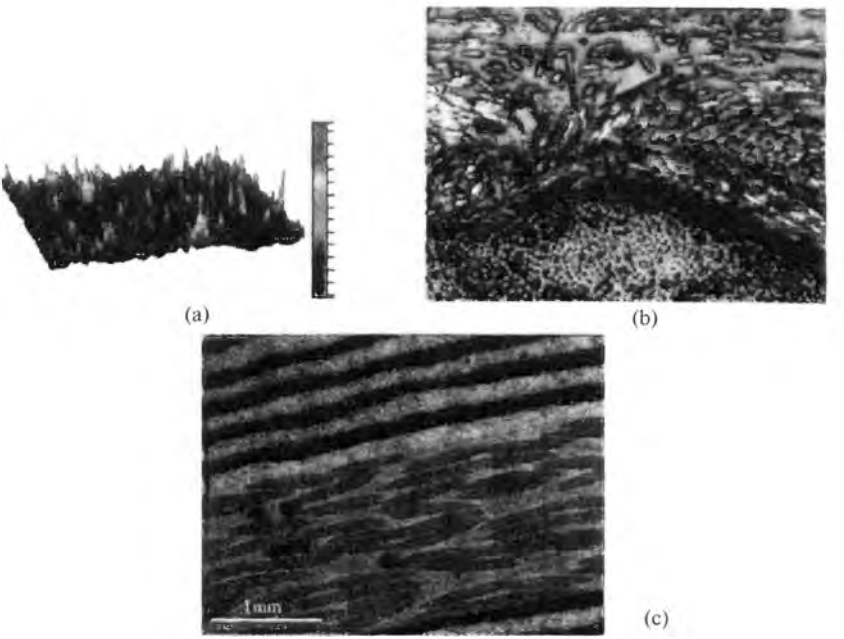


Рис. 1.1. (a) – Изображение особенностей наномасштабного размера (10^{-9}–10^{-6} м) в пленке полиэтилентерефталата, полученное при помощи профилометра WYKO; (b) – особенности микромасштабного уровня (10^{-6} – 10^{-3} м) в армированном волокнистом композите; (c) – особенности мезомасштабного уровня на поперечном сечении вертолетного винта (10^{-3} – 10^{-1} м), полученные объединением нескольких кадров высокого разрешения.

Разработка в последние 50 лет высокопрочных композиционных материалов*, армированных стеклянными и углеродными волокнами, привела к необходимости исследования их структуры, что едва ли возможно без компьютерной микроскопии. Вплоть до самого последнего времени материалы разрабатывали, изменяя параметры технологического процесса и фиксируя изменение контролируемых макроскопических свойств. Изучение микроструктуры позволяет ускорить и облегчить этот процесс путем выяснения причины разрушения и изучения связи технологии со структурой материала.

1.1.2. Оптические и неоптические методы

Одна из целей микроскопии состоит в описании трехмерной структуры материала. Если материал изотропный и его свойства не зависят от направления в пространстве, размер A особенностей микроструктуры (в направлениях x, y и z) может быть измерен при помощи электромагнитной или акустической волны, если ее длина λ меньше A. На рис. 1.2 дан обзор пределов пространственного решения различных методов исследования структуры, описанных в частях II и III.

---

* В Советском Союзе первые стеклопластики были разработаны А.К.Буровым на 15 лет раньше, чем в Великобритании, и использовались в обшивке военных самолетов уже во время Великой Отечественной войны. – *Прим. редактора перевода.*

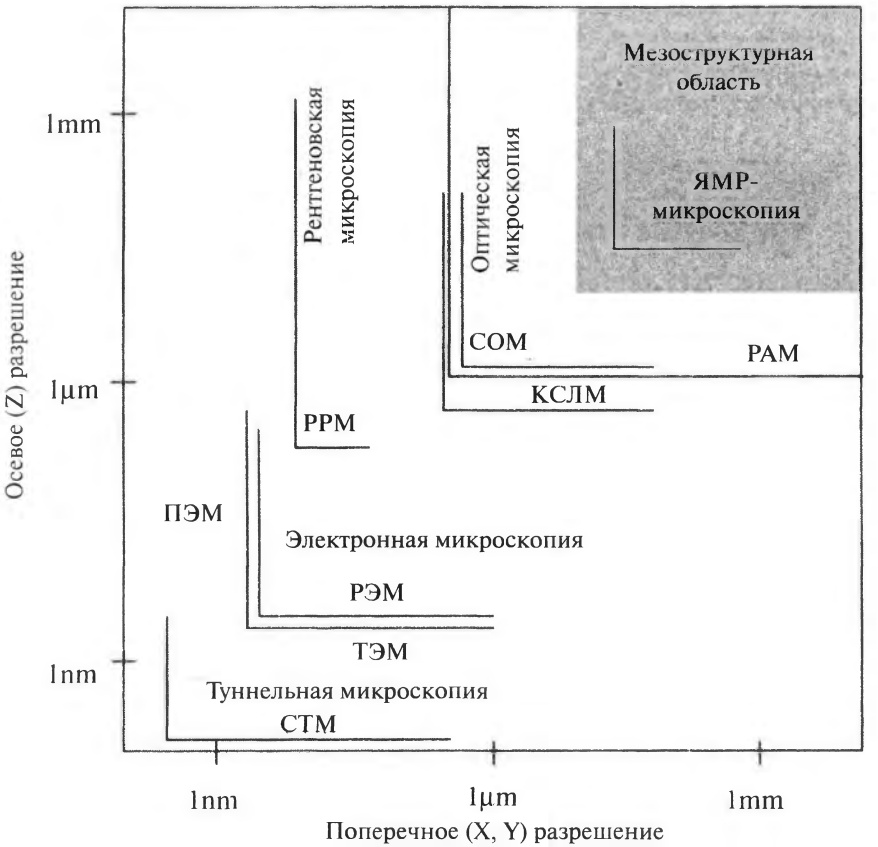


Рис. 1.2. Пределы пространственного разрешения различных методов. КСЛМ – конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, РАМ – растровая акустическая микроскопия, ЯМР - ядерный магнитный резонанс, РЭМ – растровая электронная микроскопия, СТМ – сканирующая туннельная микроскопия, РРМ - растровая рентгеновская микроскопия. ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия, РЭМ – растровая электронная микроскопия, АСМ – атомно-силовая микроскопия, СТМ – сканирующая туннельная микроскопия, СОМ – сканирующая оптическая микроскопия.

До середины двадцатого столетия считалось, что предел разрешения микроскопа ограничен длиной световой волны (параграф 1.4.1). Достичь нанометрового разрешения и получить изображение индивидуального атома удалось только после появления неоптических приборов типа сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) и атомно-силового микроскопа.

1.1.3. Возможности автоматизированных микроскопов

Имеется несколько способов увеличения функциональных возможностей обычного микроскопа при помощи компьютера. Во-первых, компьютер ускоряет процесс получения изображения. Во-вторых, он позволяет преобразовать изоб-

ражение для улучшения контраста (чтобы были лучше видны определенные особенности) и снижения уровня шума (посредством фильтрования и суммирования сигнала). В-третьих, компьютер позволяет интерпретировать изображение и

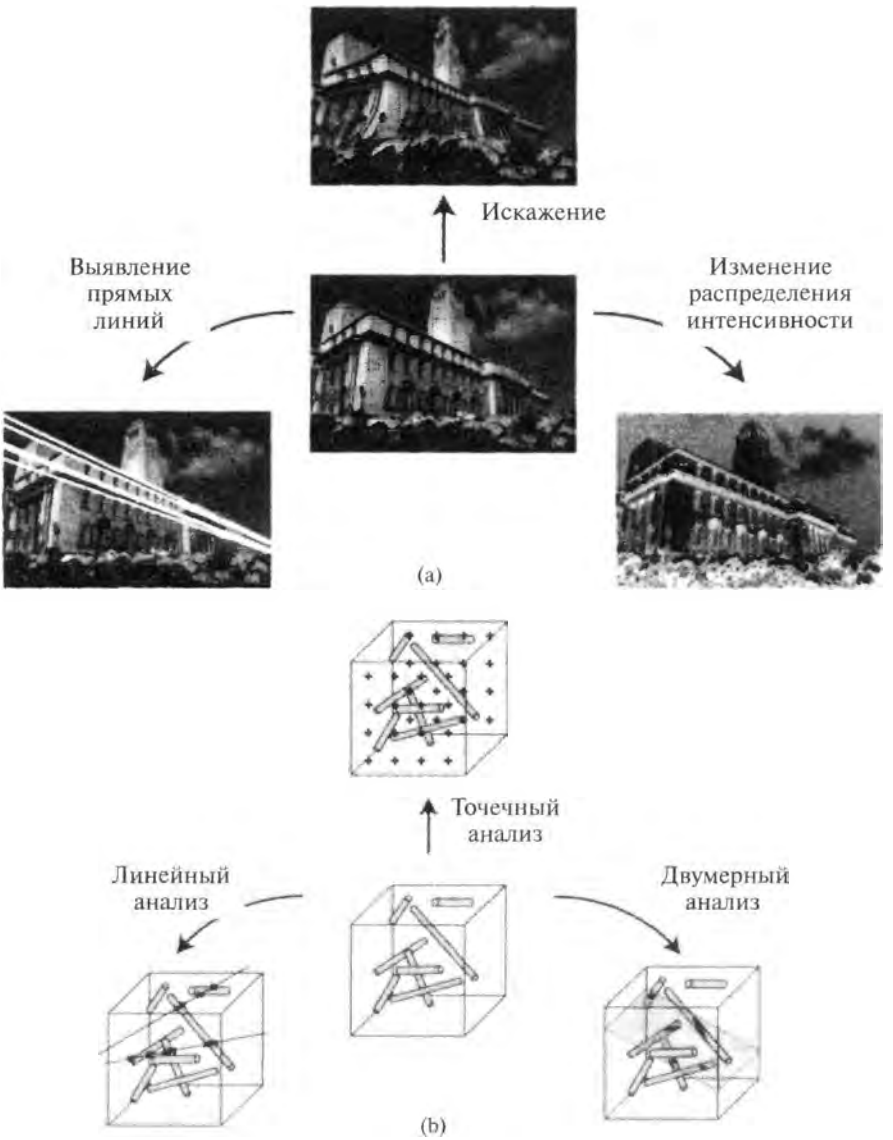


Рис. 1.3. (a) – Цифровое изображение можно анализировать и преобразовывать при помощи различных программ для выявления определенных особенностей, изменения контраста или получения специальных визуальных эффектов; (b) – стереология разрабатывает объективные методы измерения размеров особенностей. Области выборки могут быть точечными, линейными или двумерными. Отметим, что при интерпретации двумерных изображений гетерогенных структур нужно проявлять осторожность.

уменьшить субъективные ошибки оператора (например, при подсчете количества объектов или оценке их длины). Трехмерная интерпретация 2D-изображений осуществляется стереологическими методами, требующими выполнения множества вычислений, для чего компьютер практически идеален. Краткий обзор стереологии и методов обработки изображений приведен на рис. 1.3.

1.1.4. Моделирование и визуализация трехмерных объектов

Постоянно возрастающая мощь компьютера позволяет применять методы математического моделирования для исследования влияния технологии на структуру и свойства материала. Наиболее популярным методом моделирования сегодня является метод конечных элементов (рис. 1.4). Он основан на делении анализируемой структуры на множество мелких элементов простой формы. К модели прикладывают силу и вычисляют напряжение и деформацию в узлах сетки. Этим методом можно моделировать поведение детали при изменении температуры, влажности и других параметров.

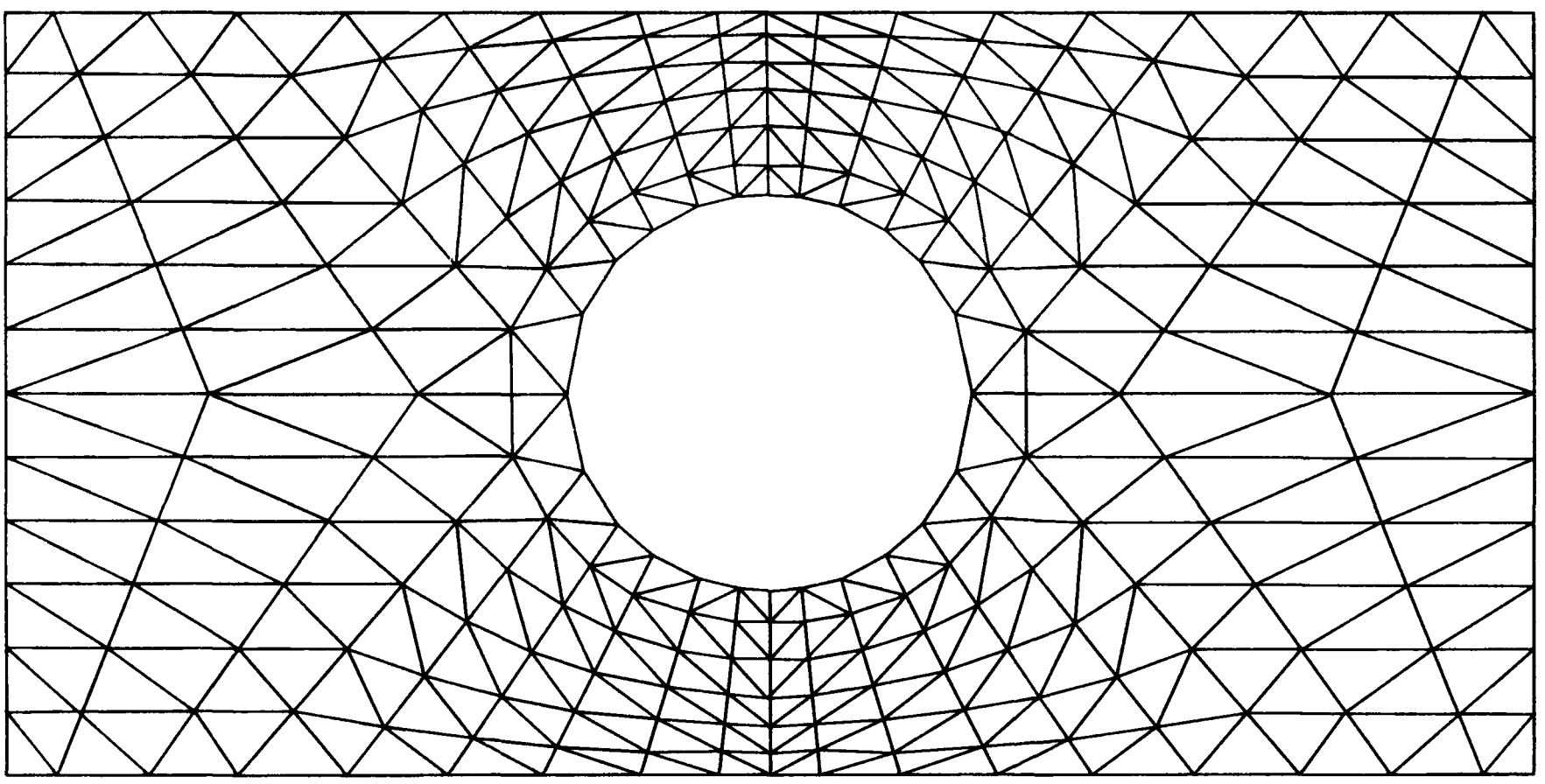


Рис. 1.4. Одним из важнейших методов компьютерного моделирования является метод конечных элементов, в котором материал разбивается на сетку мелких элементов. Для каждого элемента рассчитываются физические переменные и обеспечивается непрерывность числовых значений напряжения в узлах сетки.

Достоинством компьютерного моделирования является возможность построить виртуальную 3D-структуру исходя из набора 2D-изображений. При этом можно получить 2D-сечение трехмерного массива данных. На рис. 1.5 показана трехмерная структура армированного стеклопластика, полученная методом конфокальной сканирующей лазерной микроскопии.

1.2. Характеристики электромагнитного излучения

И сказал Бог: да будет свет. И стал свет.

Бытие 1,3.

1.2.1. Математическое моделирование и физическая реальность

Подобно автору Бытия, мы примем в этой книге прагматический подход к основному игроку в оптической микроскопии – свету. Философы и ученые пытались выяснить природу света в течение многих тысячелетий. В этой области достигнуты большие успехи, но даже теория Струн (являющаяся самым последним кандидатом на построение Великой всеобщей теории всего сущего) [1] требует некоторой доли веры для принятия теоретической модели, пытающейся объяснить связь между силами, элементарными частицами и светом. Почему? Потому что при попытках трактовать процессы субатомного мира приходится использовать лишь аналогии с нашим бытовым опытом. Что еще важнее, даже наиболее чувствительные приборы не могут непосредственно измерять характеристики субатомных явлений. Как следствие, невозможно получить прямое экспериментальное подтверждение новых теорий, аналогичное подтверждениям предсказаний классической механики в быту или астрономии.

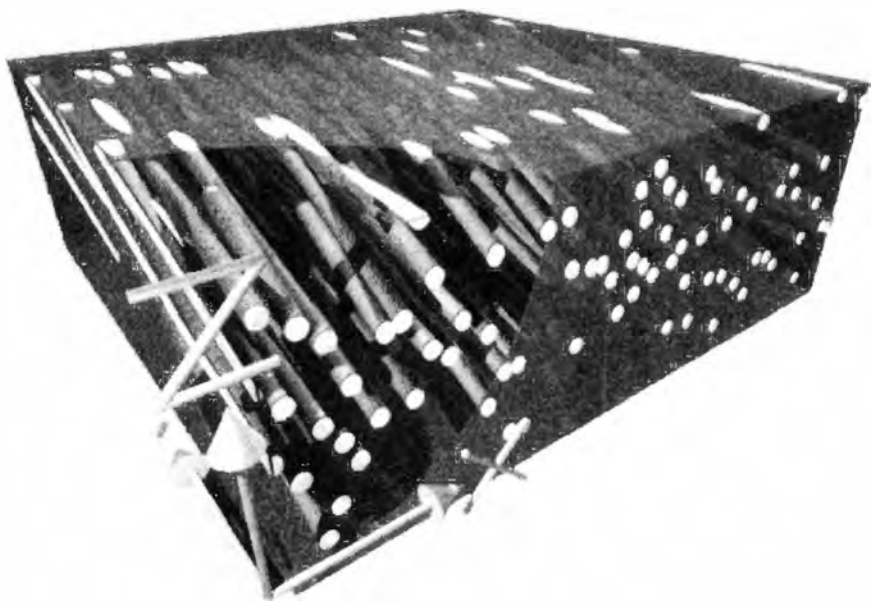


Рис. 1.5. Трехмерная структура стеклопластика, полученная методом конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. При построении изображения использовали штриховку.

К счастью, при изучении структуры материала его достаточно описать на наноуровне (10^{-9} м), не прибегая к описанию элементарных частиц (10^{-20} м). Более

того, для большинства задач достаточно исследовать материал лишь на мезоуровне, описав его особенности размером порядка 100 мкм. Если нужно объяснить работу оптического микроскопа, распространение света можно описывать или геометрической оптикой, или классической теорией распространения волн. Однако при описании взаимодействия света с материалом его удобнее считать потоком частиц, называемых фотонами. Начиная с эмоциональной дискуссии последователей Ньютона и Гюйгенса в XVII столетии свет считали или частицами, или волной. С точки зрения не слишком продвинутых в физике людей свет должен быть или частицей, или волной. Прагматику же свет можно считать или частицами (фотонами), или волной в зависимости от удобства. Чтобы описать это странное состояние дел, известный британский ученый сэр Артур Эддингтон предложил использовать термин «*волностица*». Он же провел аналогию между волной/частицей света и процессом подбрасывания монеты. Когда монета находится в воздухе, неизвестно, является ли она «орлом» или «решкой». Она оказывается в одном из этих состояний только после падения на пол. Другими словами, до измерения экспериментатора не должен волновать вопрос, является ли свет волной или фотоном. Одну или другую сторону своей природы вынуждает его демонстрировать акт измерения. Электромагнитная теория Максвелла описывает распространение света, а квантовая теория, построенная Бором, Шредингером, Гейзенбергом, Дираком и другими исследователями – его взаимодействие с материалом (например, поглощение и излучение). Электромагнитная теория, оптика и квантовая механика описаны во многих учебниках (см. библиографию к данной главе). Поэтому для краткости ниже будут описаны лишь основные идеи, необходимые для понимания принципа работы микроскопа.

1.2.2. Электромагнитная волна

Математическая модель электромагнитной волны основана на опыте изучения колебаний струны и поведения океанских волн. Рис. 1.6 иллюстрирует распространение волны. Бегущая гармоническая волна характеризуется амплитудой A, длиной λ, частотой f и скоростью распространения v_s. Распространение волны амплитудой U описывается уравнением:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2}+\frac{\partial^2 U}{\partial y^2}+\frac{\partial^2 U}{\partial z^2}=\frac{1}{v_s^{\,2}}\frac{\partial^2 U}{\partial t^2} \qquad (1.1)$$

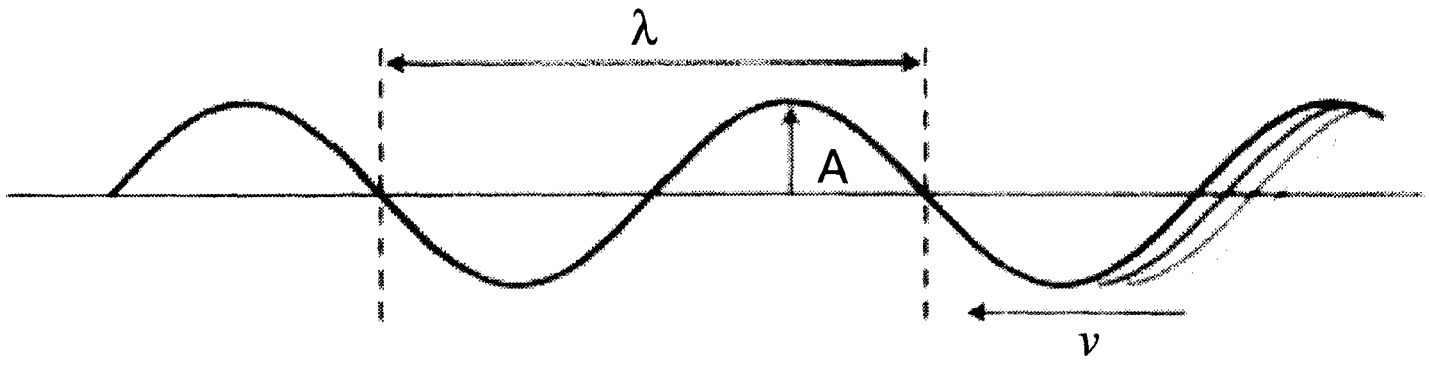


Рис. 1.6. Гармоническая волна может быть описана математической моделью, в которой волна имеет амплитуду A и длину λ. Количество гребней волны, проходящих через некоторую точку за одну секунду, называют *частотой* f, а *скорость волны* равна произведению $f\lambda$

Рассмотрим плоскую волну, распространяющуюся в направлении оси z. В этом случае уравнение (1.1) упрощается и приобретает вид:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial z^2} = \frac{1}{v_s^{\,2}} \frac{\partial^2 U}{\partial t^2} \tag{1.2}$$

Решение этого уравнения имеет вид:

$$U(z, t) = U_0 \cos(kz - \omega t), \tag{1.3}$$

где $k = 2\pi/\lambda$– волновое число и $\omega = 2\pi f$ – *угловая частота*. Произведение ωt называют фазой волны, определяющей положение ее максимумов и минимумов (рис. 1.6).

Существуют волны различного типа. В *поперечных волнах* смещение точек среды перпендикулярно направлению движения, а в *продольных* – параллельно ему. Звуковые волны в воздухе являются продольными, и области повышенного и пониженного давления, обусловленные сжатием и разрежением воздуха, ориентированы вдоль направления распространения звука. В отличие от газа, в твердых телах звуковые волны могут быть не только продольными (волнами растяжения-сжатия), но и поперечными (сдвиговыми), как иллюстрируется рис. 1.7.

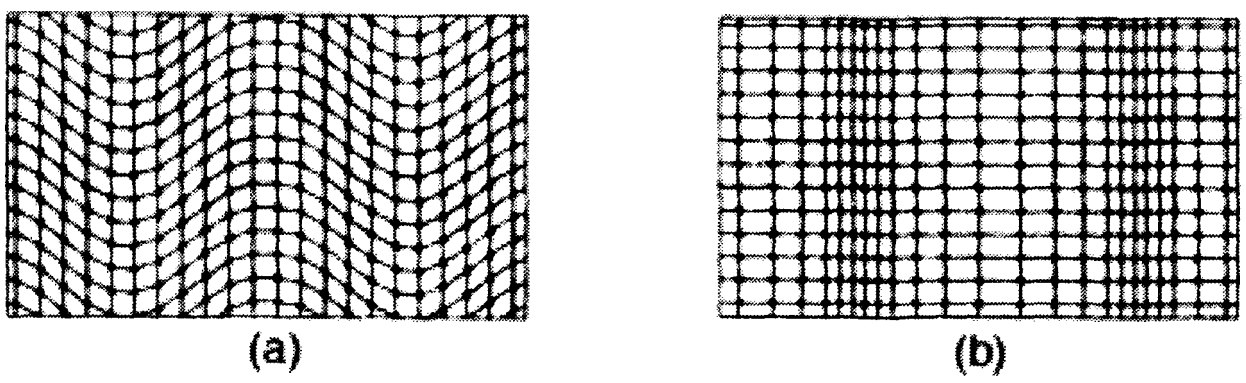


Рис. 1.7. Чтобы представить себе поперечные и продольные волны в твердом теле, рассмотрим кристалл, в котором атомы находятся в узлах квадратной решетки на одинаковом расстоянии друг от друга. (a) – В поперечной волне атомы смещаются перпендикулярно направлению распространения; (b) – в продольной волне атомы колеблются в направлении распространения, в результате чего создаются области повышенной и пониженной плотности.

Скорость сдвиговой волны v_s в упругой среде дается формулой

$$v_s = \sqrt{\frac{N}{\rho}}, \tag{1.4}$$

где N – модуль сдвига и ρ – плотность среды. В табл. 1.1 дан обзор различных типов волн и их скорости в твердых телах.

Главной заслугой Максвелла было осознание того, что свет можно представить в виде совместных колебаний электрического и магнитного поля, направленных перпендикулярно друг другу и направлению распространения (рис. 1.8). Основой электромагнитной теории являются уравнения Максвелла, использующие векторы напряженности магнитного поля H, магнитной индукции B, напряженности электрического поля E и электрической индукции D:

Таблица 1.1. Волны различного типа и их скорость в материалах

Тип волны	Материал	Скорость (м/с)
Электромагнитная	Воздух	3×10^8
	Вода	$2{,}25 \times 10^8$
	Стекло (типичное)	2×10^8
Акустическая (продольная)	Сухой воздух	331,5 (293K)
	Дистиллированная вода	1482,3 (293K)
	Кварцевое стекло	5660 (293K)
Акустическая (сдвиговая)	Кварцевое стекло	3420 (293K)
	Воздух и вода	Не распространяется

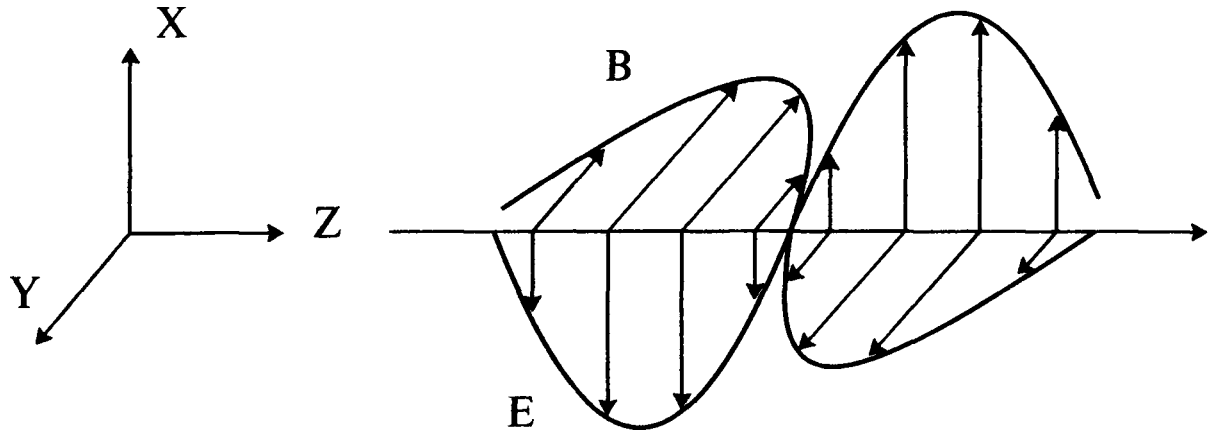


Рис. 1.8. В электромагнитной волне магнитное B и электрическое поля E всегда взаимноперпендикулярны. Направление распространения волны определяется векторным произведением E и B (соответвующим правилу буравчика).

$$rot\, E = -\frac{\partial B}{\partial t},$$

$$rot\, H = -\frac{\partial D}{\partial t}, \qquad (1.5)$$

$$div\, B = 0,$$

$$div\, D = 0,$$

где $D = \varepsilon E$, $B = \mu H$. Поскольку для любого вектора F выполняется математическое равенство

$$rot\left(rot\, f\right) = -\nabla^2 f + grad\left(div\, f\right), \qquad (1.6)$$

справедливо уравнение:

$$\frac{1}{c^2}\frac{\partial^2}{\partial t^2}(\varepsilon E) = \nabla^2 E \qquad (1.7)$$

Это уравнение является еще одним способом записи волнового уравнения. Скорость c электромагнитной волны равна:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\mu\varepsilon}} \qquad (1.8)$$

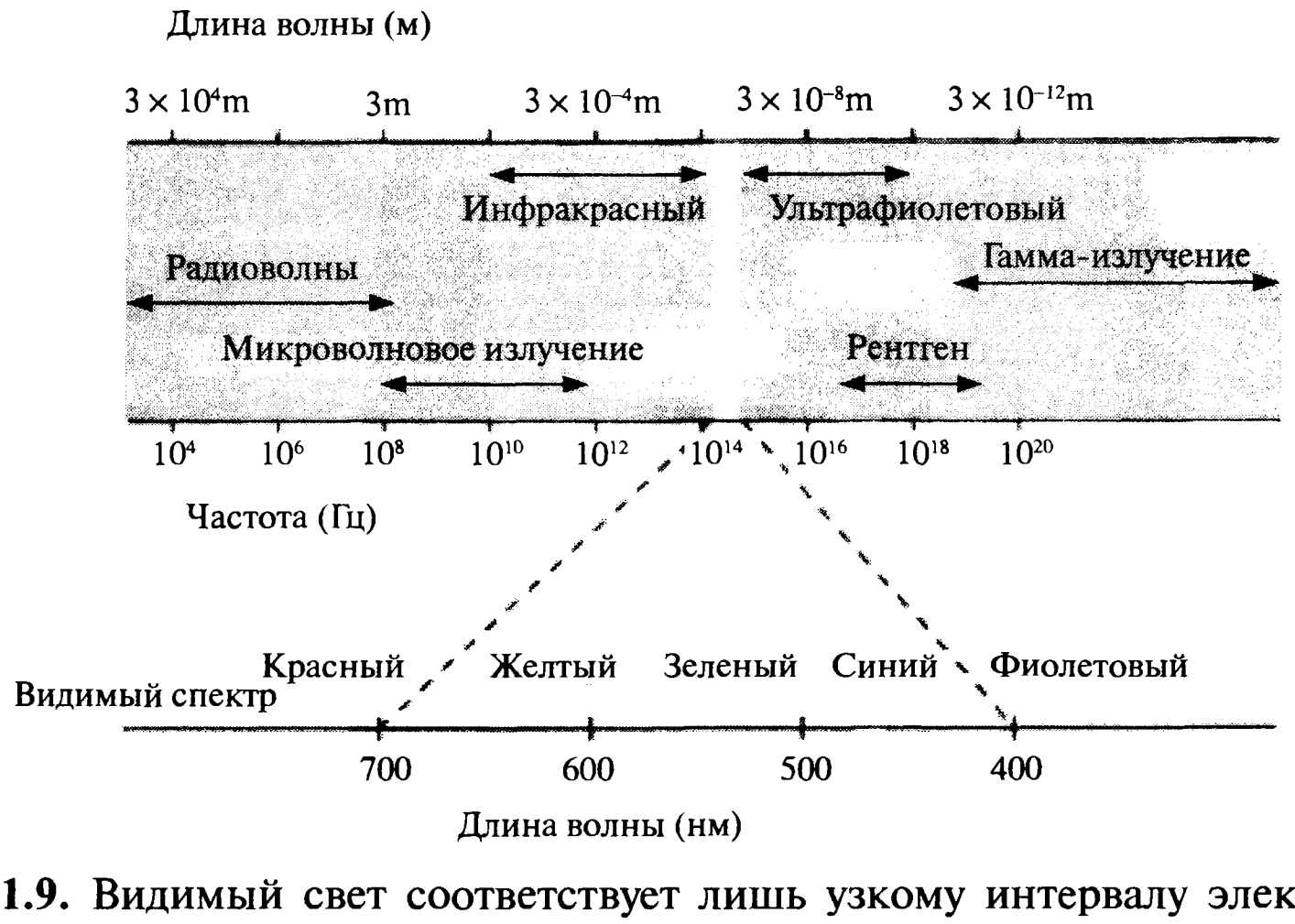


Рис. 1.9. Видимый свет соответствует лишь узкому интервалу электромагнитных волн, которые охватывают как длинноволновые радиоволны (низкой частоты), так и чрезвычайно короткие волны гамма-радиации (высокой частоты). Цвет определяется длиной световой волны.

Скорость света в среде определяется значениями магнитной (μ) и диэлектрической проницаемости (ε) материала. Триумфом теории Максвелла явилось то, что она не только описала оптические явления, но и выявила единую электромагнитную природу света и других форм излучения типа рентгена и радиоволн. Единственным различием всех этих столь непохожих явлений является длина волны. Классификация и типичные интервалы длин электромагнитных волн приведены на рис. 1.9.

Более подробно источники электромагнитного излучения будут рассмотрены ниже. Отметим, что имеется два типа источников света – когерентные и некогерентные. Электромагнитное излучение обусловлено колебаниями электрических зарядов. Если заряды колеблются в одной фазе, излучение является когерентным, примером чего является лазерное излучение. Во всех остальных лабораторных источниках света излучение обусловлено независимыми колебаниями различных зарядов, и поэтому оно некогерентно.

1.2.3. Показатель преломления

Электромагнитное излучение представляет собой волну, распространяющуюся в некотором направлении. Волна характеризуется длиной (измеряемой в метрах) и частотой (в Гц), как показано на рис. 1.8. Глаз чувствует яркость света, связанную с интенсивностью волны I и пропорциональную квадрату амплитуды A^2, а также цвет, определяемый длиной волны λ. Скорость световой волны c равна произведению частоты и ее длины λ ($c = \nu\lambda$). Величина c зависит от материала, через который она распространяется. Скорость света максимальна в вакууме, где она достигает 300 000 км/с. В веществе скорость света c определяется его показателем преломления n:

$$n = c_o/c \text{ или } c = c_o/n, \tag{1.9}$$

где c_o – скорость света в вакууме. Для вакуума показатель преломления равен

единице. Для воздуха и других газов он близок к единице. Значения показателя преломления некоторых сред представлены в табл. 1.2.

Таблица 1.2. Показатель преломления *n* некоторых материалов (при длине волны 550 нм)

Материал	**Показатель преломления (при $\lambda = 589$ nm)**	**Комментарии**
Воздух	1,000292	T = 293 K
Вода	1,3330	T = 293 K
ПТФЭ (тефлон)	1,325	
Полиамид (нейлон 66)	1,448	
ПВХ	1,542	Коэфф. преломления изменяется в широких пределах
Стекло краунглас	1,5694	Типичное стекло
Кварц (обыкновенный луч) (необыкновенный луч)	1,544 1,539	T = 293 K
Кальцит (обыкновенный луч) (необыкновенный луч)	1,660 1,486	T = 291 K
Алмаз	2,4195	

При описании интерференционных эффектов, обусловленных сложением двух волн, нужно вычислять не разницу длины пройденного ими пути δl, а разницу *оптического пути*, равную произведению $n\delta l$. Если в начале две волны имели одинаковую фазу, при разнице оптических путей δl разница фазы равна:

$$\theta = \frac{2\pi}{\lambda} n\delta l, \tag{1.10}$$

где фаза θ измеряется в радианах.

Показатель преломления определяет угол, на который отклоняется плоская волна на границе двух сред. На границе раздела свет делится на отраженный и преломленный лучи (рис. 1.10a). Направление преломленного луча дается законом Снелла

$$n_1 \sin\theta_1 = n_2 \sin\theta_2, \tag{1.11}$$

где θ – угол между направлением луча и нормалью к плоскости границы раздела. Из этого уравнения следует:

(a) при перпендикулярном падении света на границу раздела ($\theta_1 = 0^\circ$) направление распространения не изменяется (интенсивность уменьшается);

(b) если луч проходит из среды с показателем преломления n_1 в среду с более высоким показателем преломления n_2, он делится на преломленный (отклонившийся от начального направления) и отраженный пучки. Свет, прошедший через плоскопараллельную стеклянную пластинку, распространяется в прежнем направлении, но смещается на небольшое расстояние от первоначального луча (рис. 1.10b);

(c) если свет проходит из среды с показателем преломления n_2 в среду с более низким показателем преломления n_1, угол преломления больше угла падения. При некотором критическом значении угла падения угол преломления достигает 90°. При более высоких значениях угла падения свет испытывает *полное внутреннее отражение*, и граница раздела не пропускает свет. Критическое значение угла падения равно:

$$\theta_{crit} = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2}\right) \tag{1.12}$$

Если свет проходит из стекла ($n_2 = 1{,}5$) в воздух ($n_1 = 1$), критический угол = 41°.

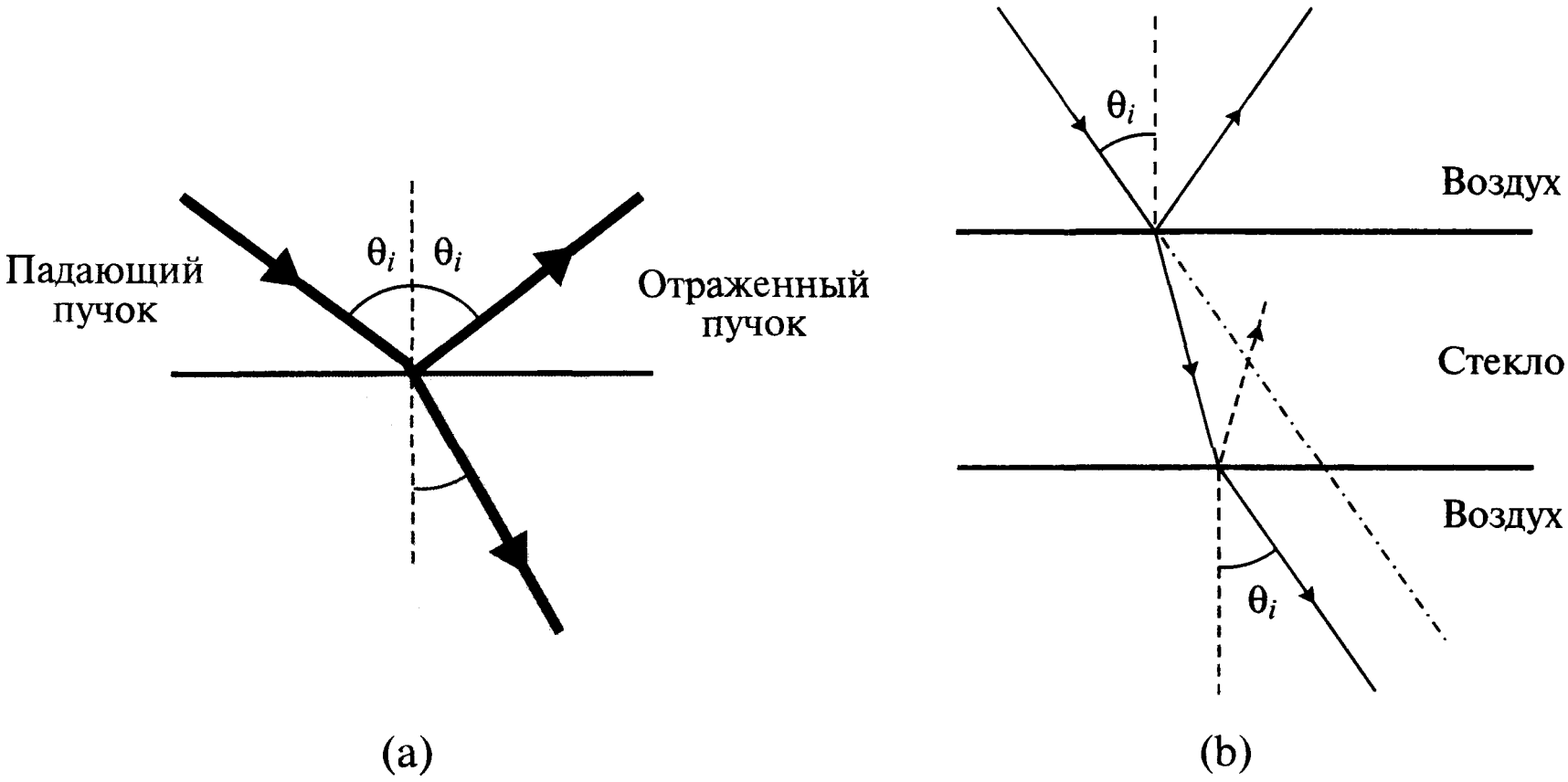


Рис. 1.10. (a) – Если свет падает из среды с низким значением показателя преломления (например, воздуха) на плоскую поверхность среды с более высоким показателем преломления (стекло), часть света отражается, а остальной свет проходит через границу раздела. Угол θ_r между преломленным лучом и нормалью к плоскости поверхности определяется формулой $n_g \sin\theta_r = n_a \sin\theta_i$, где n_g и n_a – показатели преломления стекла и воздуха соответственно. (b) – Если луч падает на плоскопараллельную стеклянную пластинку, прошедший пучок распространяется в начальном направлении, но смещается на небольшое расстояние от исходного луча.

Это явление успешно используют в оптических световодных волокнах, сердцевина которых имеет более высокий показатель преломления n_i по сравнению с оболочкой n_o. Критический угол лучей, испытывающих полное внутреннее отражение на границе с оболочкой, дается уравнением:

$$\alpha = \arcsin\sqrt{n_i^2 - n_o^2} \tag{1.13}$$

Как показано на рис. 1.11, из-за эффекта полного внутреннего отражения световые лучи не могут выйти из волокна и распространяются вдоль него на большое расстояние. В микроскопах оптические волокна используют для освещения образцов. В последних моделях конфокальных микроскопов оптические волокна используют и для построения изображения [3]. Отметим, что показатель преломления зависит от длины волны, причем он может изменяться довольно зна-

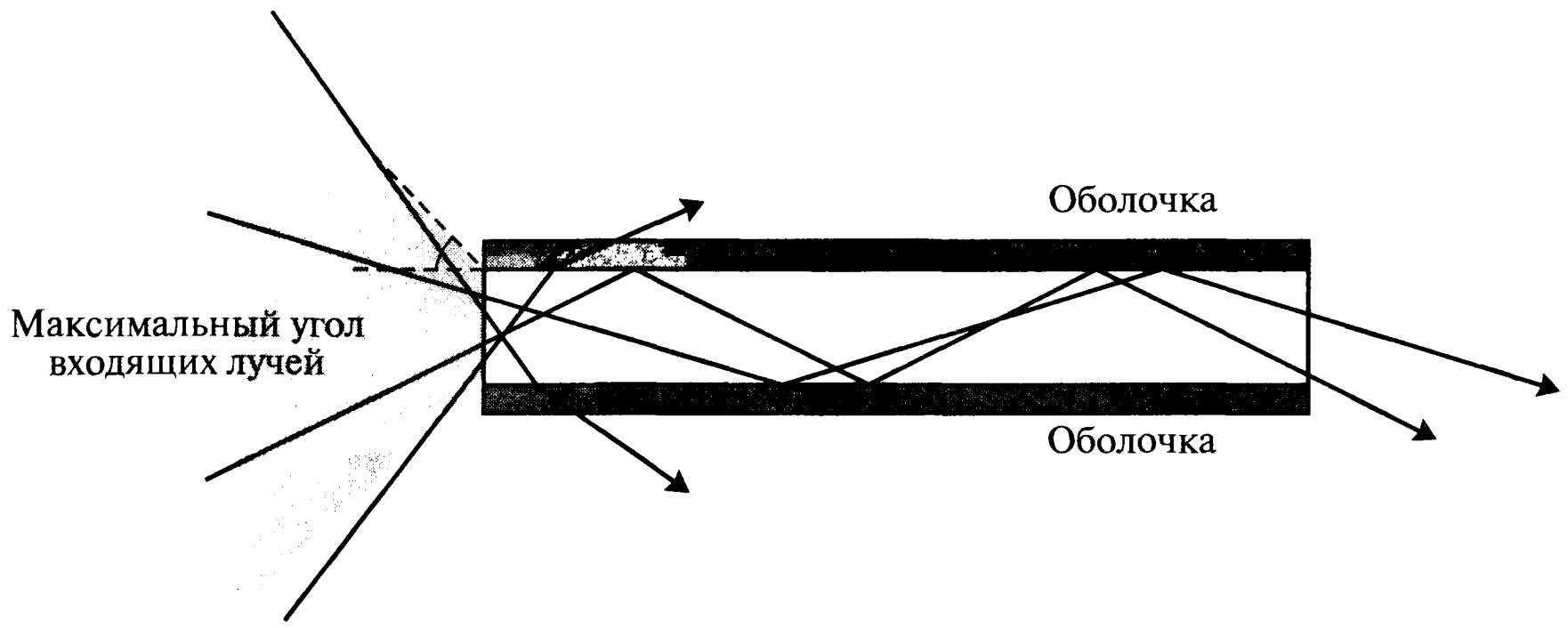
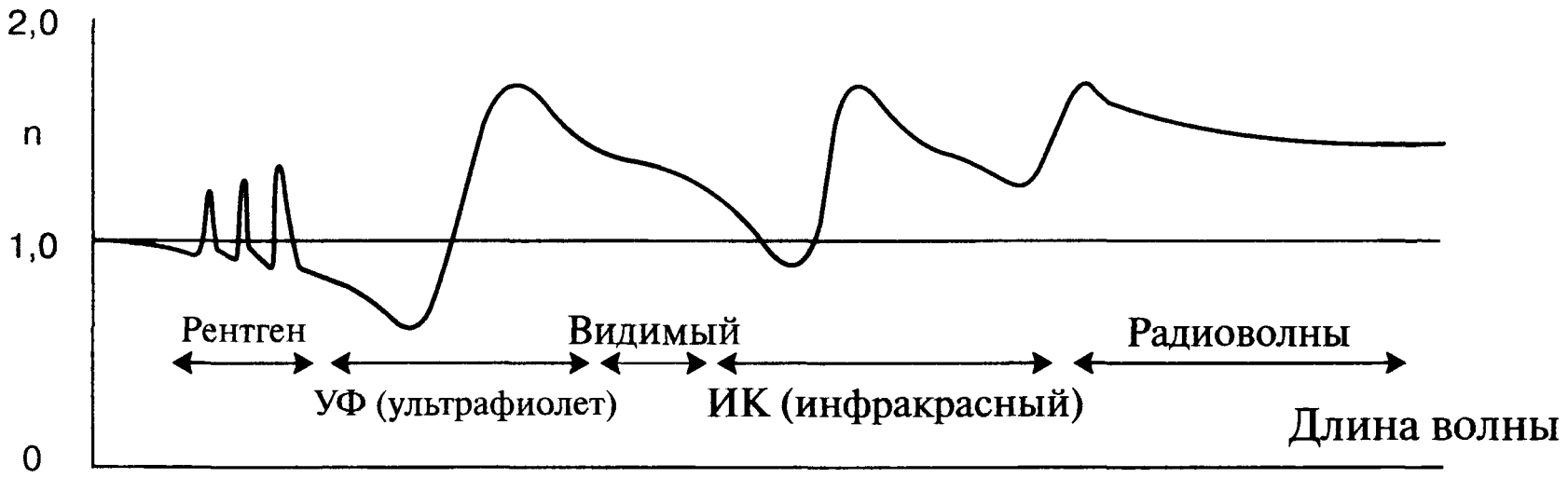


Рис. 1.11. Оптическое волокно состоит из стеклянной сердцевины с высоким значением показателя преломления и оболочки с более низким показателем преломления. Если угол между лучом и нормалью к плоскости поверхности превышает α, свет распространяется вдоль волокна, не выходя из него вследствие эффекта полного внутреннего отражения.



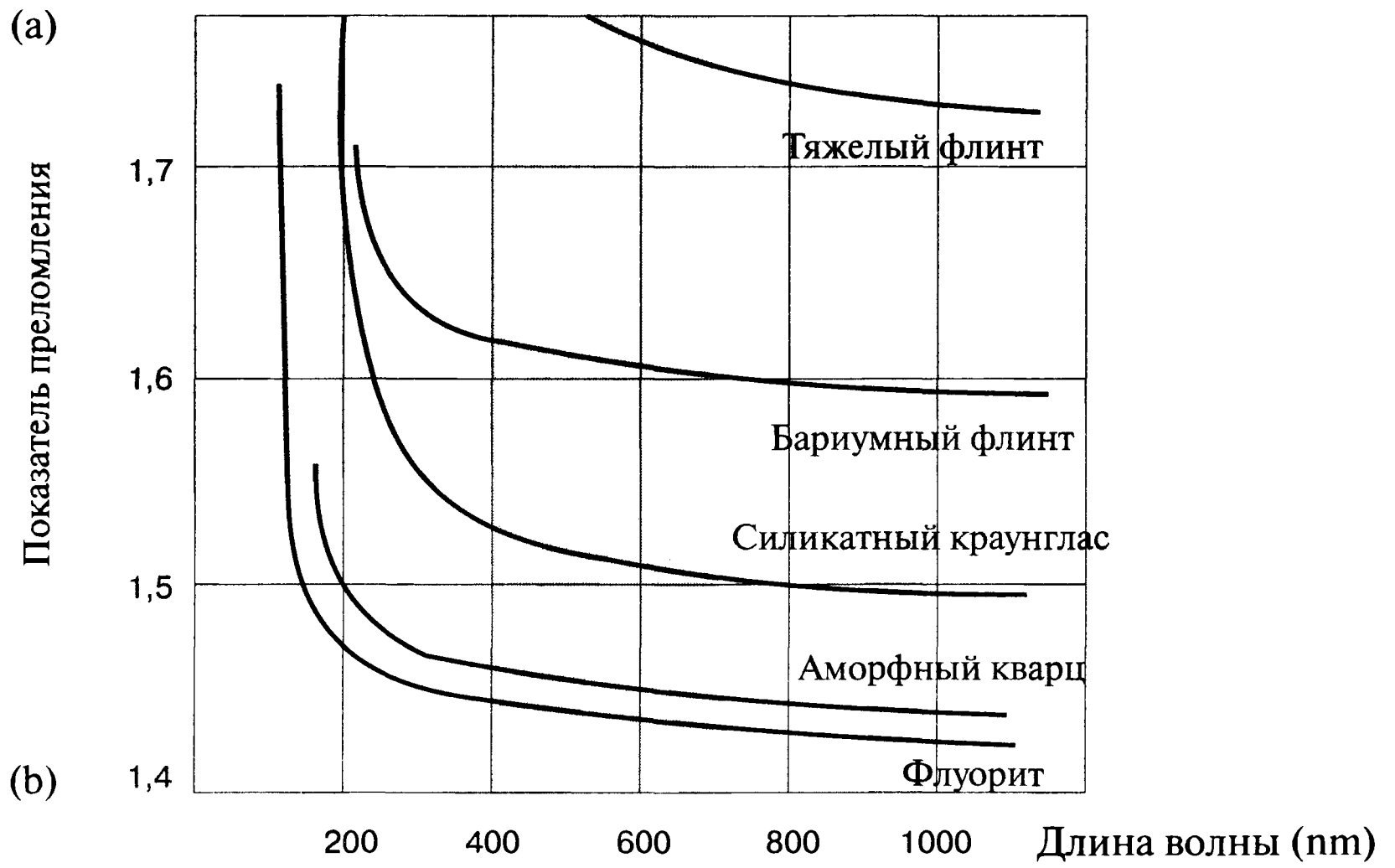


Рис. 1.12. (a) – Дисперсионная кривая материала, прозрачного в видимой части спектра. В области положительных значений производной $dn/d\lambda$ материал сильно поглощает свет; (b) – узкая область дисперсионной кривой некоторых материалов, из которых делают оптические линзы и призмы. В интервале видимого света величина $dn/d\lambda$ отрицательна, а dn/dk – положительна.

чительно, особенно вблизи края полос поглощения, как показано на рис. 1.12a. На рис. 1.12b показана зависимость показателя преломления от длины волны в видимой и ультрафиолетовой областях спектра для различных стекол, используемых в микроскопии.

1.2.4. Групповая скорость

До сих пор мы рассматривали плоскую гармоническую волну определенной частоты. Суперпозиция двух волн одинаковой амплитуды, имеющих близкие угловые частоты ($\omega + \Delta\omega$) и ($\omega - \Delta\omega$) и волновые числа ($k + \Delta k$) и ($k - \Delta k$), описывается формулой:

$$U = U_{k+\Delta k} + U_{k-\Delta k} \tag{1.14}$$

После преобразования она приобретает вид:

$$U = 2U_0\, e^{\beta} \cos(z\,\Delta k - t\Delta\omega) \tag{1.15}$$

Анализ этого уравнения показывает, что суммарный сигнал можно описать как волну, движущуюся вдоль оси Z (рис. 1.13). Однако в этом случае волна не гармоническая, а имеет форму последовательности модулированных биений. Если имеется не две, а большее количество волн (угловая частота которых лежит в интервале $\Delta\omega$, а волновые числа – в интервале Δk), вместо периодических биений может возникнуть одиночный импульс. Его огибающая распространяется со скоростью v_g, описываемой уравнением:

$$v_g = \frac{\Delta\omega}{\Delta k} \tag{1.16}$$

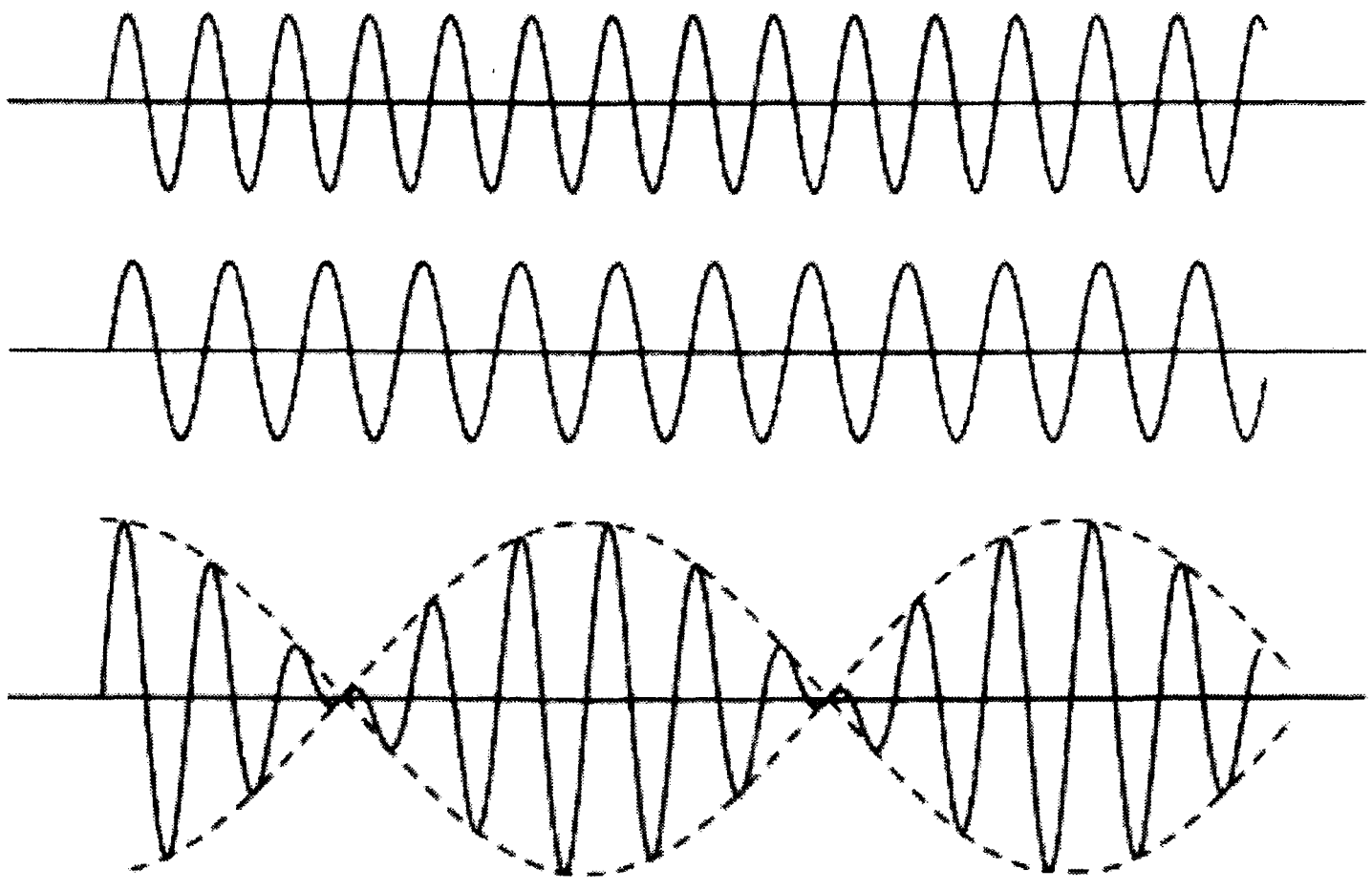


Рис. 1.13. При наложении двух волн одинаковой амплитуды и близкой частоты создается амплитудно-модулируемый сигнал. Огибающая сигнала распространяется с групповой скоростью, не равной скорости каждой волны.

Величину v_g называют *групповой скоростью* (в отличие от *фазовой скорости* v_s). В оптических средах фазовая скорость v_s зависит от угловой частоты ω. Это явление называют дисперсией света. Для большинства оптических материалов величина dn/dk положительна, как на рис. 1.12b. Можно показать, что групповая скорость описывается формулой:

$$v_g = v_s \left(1 - \frac{k}{n} \frac{\partial n}{\partial k} \right) \tag{1.17}$$

Если величина dn/dk положительна, групповая скорость меньше фазовой. Любой сигнал можно рассматривать как модулированный волновой пакет, распространяющийся с групповой скоростью v_g. В случае импульса почти монохроматического света, когда длина волн различается очень незначительно, групповая скорость хорошо определена. Энергия, переносимая электромагнитной волной через некоторую поверхность единичной площади, может быть вычислена при помощи вектора Умова–Пойнтинга **S**:

$$\mathbf{S} = [\mathbf{E}, \mathbf{H}] \tag{1.18}$$

Вектор **S** имеет размерность Вт/м^2. Поток энергии $< \mathbf{S} > = I\, \mathbf{n}_z$, где I – интенсивность и $\mathbf{n}_z$ – направление распространения волны. В изотропных средах направление потока энергии $\mathbf{n}_z$ совпадает с направлением волнового вектора **k** (амплитуда которого равна волновому числу), а в анизотропных кристаллах направления векторов **S** и **k** могут не совпадать.

1.2.5. Поляризация

Свет является поперечной электромагнитной волной, важной характеристикой которой является ее поляризация. Исторически поляризацию характеризуют направлением вектора электрического поля. Если при движении волны вектор электрического поля остается параллельным некоторому направлению, как показано на рис. 1.14a, волну называют плоскополяризованной. Плоскополяризованную световую волну можно описать вектором поляризации, ориентация которого остается неизменной. В случае естественного неполяризованного света мгновенное направление поляризации хаотически и быстро изменяется (все направления в плоскости, ортогональной направлению распространения волны, равновероятны). Существует четыре физических процесса, позволяющих получить поляризованный свет: поглощение, рассеяние, отражение и двулучепреломление. Изучая поляризацию световых волн, можно получить ценную информацию об этих физических явлениях. Поэтому эти процессы в материалах можно исследовать при помощи *поляризационного микроскопа*, снабженного двумя поляризаторами.

Помимо плоскополяризованного и неполяризованного, имеется множество других состояний поляризации света. Эти состояния можно описать при помощи фигур Лиссажу. Фигура Лиссажу (рис. 1.15) возникает на экране осциллографа, когда на входы каналов X и Y подают два синусоидальных сигнала, частоты которых совпадают или относятся как натуральные числа, например, 1:2. Два сигнала, один из которых подается на ось X, а другой на ось Y, обычно не имеют фазовой связи. Если сигналы имеют одинаковую частоту, форма фигуры Лиссажу не изменяется со временем. Если сигналы имеют различные частоты, форма фигуры

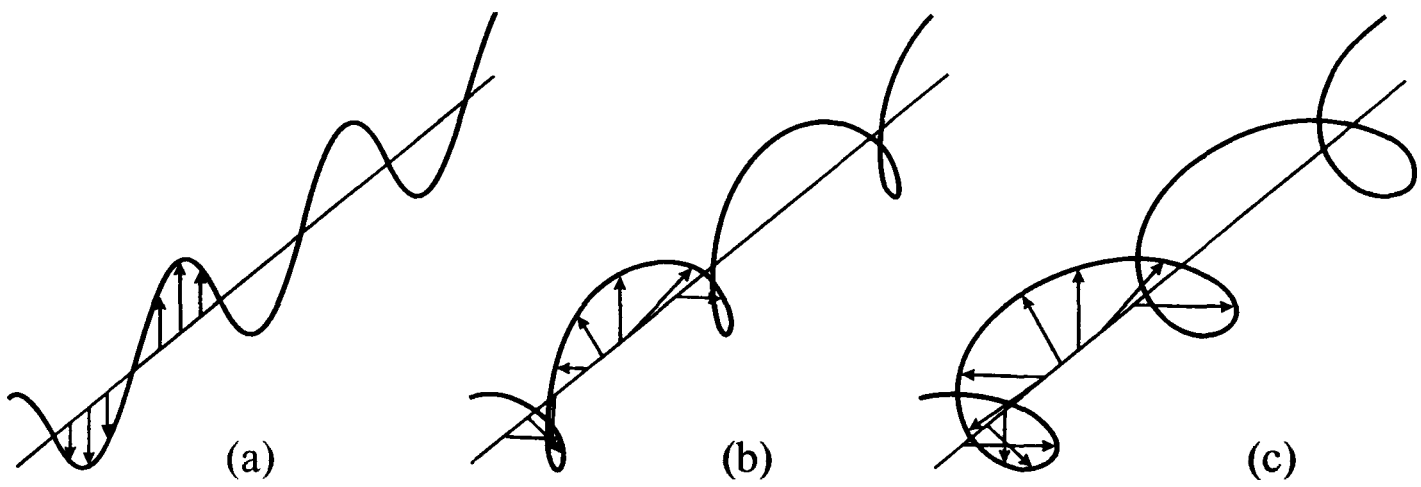


Рис. 1.14. Различные поляризационные состояния волны. Рассмотрим вектор электрического поля **E**. При распространении *плоскополяризованной волны* (a) вектор **E** ориентирован в одном направлении. При *эллиптической поляризации* волны (b) вектор **E** вращается, и при этом изменяется его амплитуда. *При круговой поляризации* (c) вектор **E** в ращается, а его амплитуда остается постоянной. При круговой и эллиптической поляризации вектор **E** может вращаться как по часовой стрелке, так и против нее относительно наблюдателя, на которого движется световая волна. В этих случаях свет называют *право-* и *левополяризованным* соответственно.

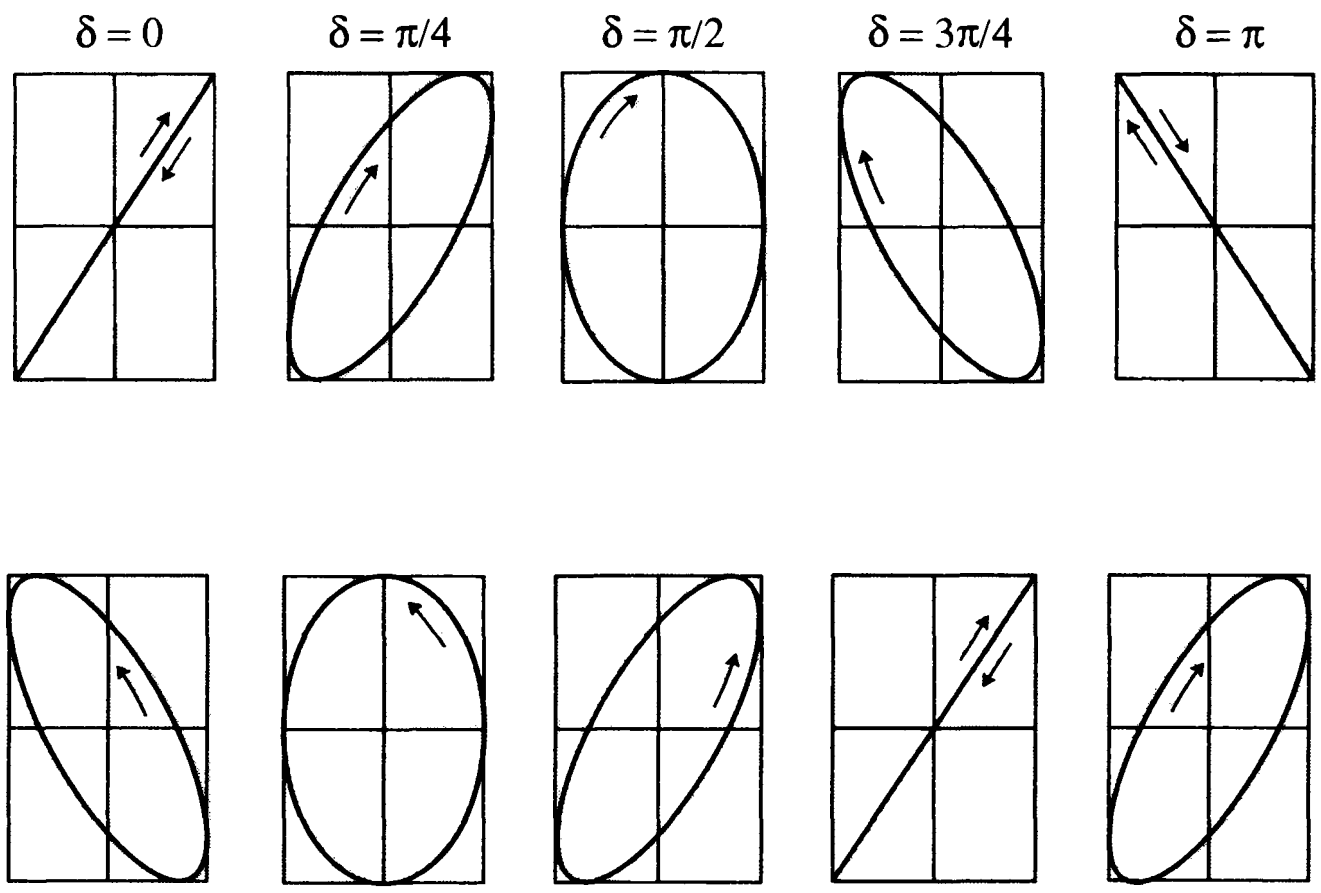


Рис. 1.15. Мы не можем «увидеть» поляризационное состояние световой волны. Однако имеется аналогия между поляризацией и фигурами Лиссажу, наблюдаемыми на экране осциллографа при сложении двух гармонических электрических сигналов одинаковой частоты, один из которых отклоняет луч по оси X, а другой – по оси Y. Если разница фаз этих сигналов равна 0 или π (а также 2π), это соответствует плоскополяризованному состоянию. При другой разнице фаз сигнал аналогичен эллиптически-поляризованной волне. Если амплитуды сигналов равны, разница фаз π/2 и 3π/2 соответствует круговой право- и левополяризованной волнам.

изменяется. При одинаковой частоте сигналов на экране осциллографа возникает статическая фигура, форма которой определяется следующими уравнениями:

$$x = a_2 \sin(\omega t - \alpha_2)$$
$$y = a_1 \sin(\omega t - \alpha_1) \qquad (1.19)$$

Преобразовав эти формулы, можно получить

$$\sin^2(\alpha_1 - \alpha_2) = \frac{y^2}{\alpha_1} + \frac{x^2}{\alpha_2} - \frac{2xy}{\alpha_1\alpha_2}\cos(\alpha_1 - \alpha_2) \tag{1.20}$$

Это уравнение не содержит времени и, следовательно, описывает фигуру, форма которой не зависит от времени. Пусть разница фаз двух волн равна

$$\delta = \alpha_1 - \alpha_2. \tag{1.21}$$

Если $\delta = 0$, 2π, 4π и т.д., уравнение (1.20) сводится к

$$y = \frac{a_1}{a_2}x \tag{1.22}$$

При $\delta = \pi$, 3π, 5π... оно имеет вид

$$y = -\frac{a_1}{a_2}x \tag{1.23}$$

Плоскополяризованную световую волну можно представить как гармоническую волну, вектор электрического поля которой колеблется вдоль одной оси. Пусть вектор электрического поля плоскополяризованной волны лежит в плоскости *yz*, а волна распространяется вдоль оси *z*. Если эта волна суммируется с другой плоскополяризованной волной, вектор электрического поля которой лежит в плоскости *xz*, движение кончика вектора суммы электрических полей в координатах (*x*, *y*) описывает эллипс. Такую волну (рис. 1.14b) называют эллиптически-поляризованной.

Если амплитуды двух волн равны ($a_1 = a_2$), а разница фаз между ними кратна 90°, кончик вектора электрического поля в координатах (*x*, *y*) описывает окружность. Про такой свет говорят, что он имеет круговую поляризацию. Если вращение вектора **E** в плоскости *xy* направлено по часовой стрелке (волна движется на наблюдателя), поляризацию называют *правой круговой*. Если вращение происходит против часовой стрелки, поляризацию называют *левой*. Рис. 1.14c иллюстрирует волну с круговой поляризацией.

1.2.6. Поляризаторы и пластинки в четверть длины волны

В микроскопии широко используют так называемый линейный поляризатор. В 1938 году Эдвин Лэнд изобрел специальную пленку (названную им поляроидом), состоящую из длинных ориентированных цепей углеводородных молекул, которая после помещения в раствор иода начинает проводить электрический ток. Он изобрел также метод обработки такой пленки. Поляризаторы были известны задолго до Лэнда, но изобретенные им пленки оказались очень дешевыми и удобными для использования в микроскопе. Если вектор электрического поля направлен вдоль оси молекул, появляется электрический ток и свет поглощается. Если же электрическое поле перпендикулярно цепям, ток не возникает и свет практически не поглощается. Направление, перпендикулярное оси цепей, называют *осью разрешенного распространения*. Интенсивность *I* плоскополяризованной волны, прошедшей через поляроид, описывается *законом Малюса*:

$$I = I_0 \cos^2\theta \tag{1.24}$$

Здесь I_0 – интенсивность падающего света, θ -- угол между осью поляризации падающей волны и осью разрешенного распространения (осью поляризатора).

Пластинка в четверть длины волны позволяет создать из двух плоскополяризованных лучей световую волну с круговой поляризацией. Некоторые прозрачные кристаллы типа кальцита или слюды обладают двулучепреломлением, иллюстрируемым рис. 1.16а. Показатель преломления этих кристаллов различен для двух направлений поляризации луча. Пластинка $1/4\lambda$ представляет собой специальным образом вырезанный монокристалл, в котором ось медленного распространения света (соответствующая более высокому значению показателя преломления n^1) перпендикулярна оси быстрого распространения (соответствующего более низкому значению n_2). Толщину пластинки d подбирают так, чтобы разница оптического пути двух перпендикулярных плоскополяризованных лучей была равна четверти длины волны света λ_0:

$$d = \frac{\lambda_0}{4(n_1 - n_2)} \tag{1.25}$$

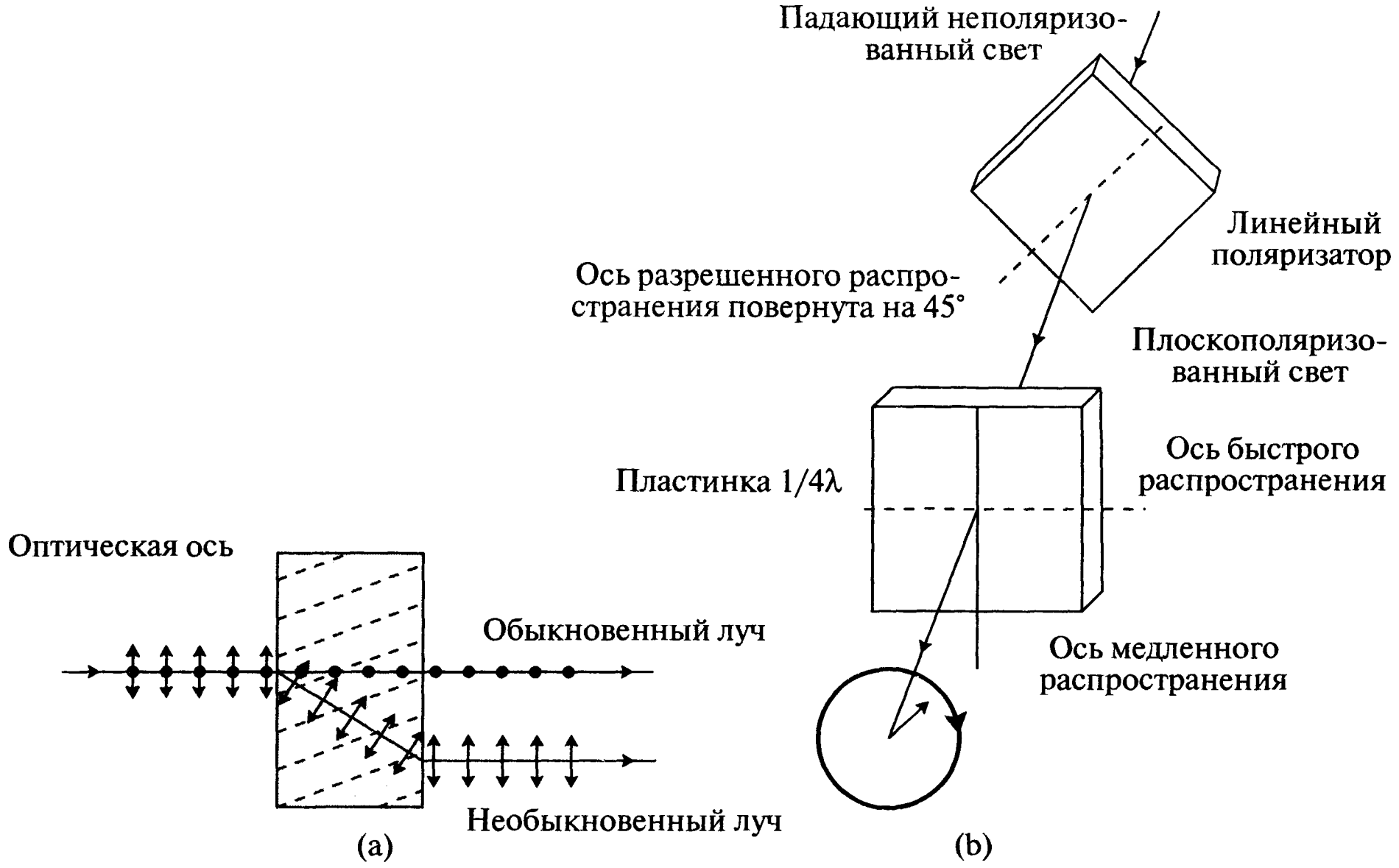


Рис. 1.16. (a) – Некоторые кристаллы обладают двулучепреломлением. Рассмотрим неполяризованный свет, падающий на такой кристалл перпендикулярно его поверхности. Обыкновенная (o) плоскополяризованная компонента луча после прохождения кристалла не преломляется, а необыкновенная (e) компонента, поляризованная перпендикулярно o-лучу, преломляется. (b) – Этот эффект можно использовать для получения света с круговой поляризацией при помощи поляризатора и пластинки $1/4\lambda$.

Пусть естественный неполяризованный свет падает на поляризатор, разрешенная ось которого повернута на угол 45° к оси медленного распространения света пластинки $1/4\lambda$. После прохождения поляризатора луч на входе пластинки $1/4\lambda$ можно представить как сумму двух плоскополяризованных лучей. На выходе из пластинки $1/4\lambda$ разница фаз этих лучей равна 90°, и суммарная волна будет иметь

правую круговую поляризацию, как показано на рис. 1.16b. Если поляризатор повернуть на 90° по часовой стрелке, на выходе из пластинки 1/4λ свет будет иметь левую круговую поляризацию.

1.3. Распространение световых волн

Преломление света удобно описать *лучевой диаграммой*, в которой свет представляет прямые лучи, направленные вдоль оси распространения. Этот подход называют *геометрической оптикой*. Направление светового луча в общем случае описывается принципом Ферма, согласно которому его траектория соответствует или максимуму, или минимуму длины оптического пути (расстояния, умноженного на показатель преломления среды). Для учета дифракционных явлений нужно использовать уравнения Максвелла.

Изучение микроструктуры материала основано на введении в него некоторой волны (световой, ультразвуковой или рентгеновской) и анализе отраженного или прошедшего лучей. Фундаментальной характеристикой, определяющей предел пространственного разрешения прибора, является длина волны λ, связанная с ее скоростью и частотой уравнением:

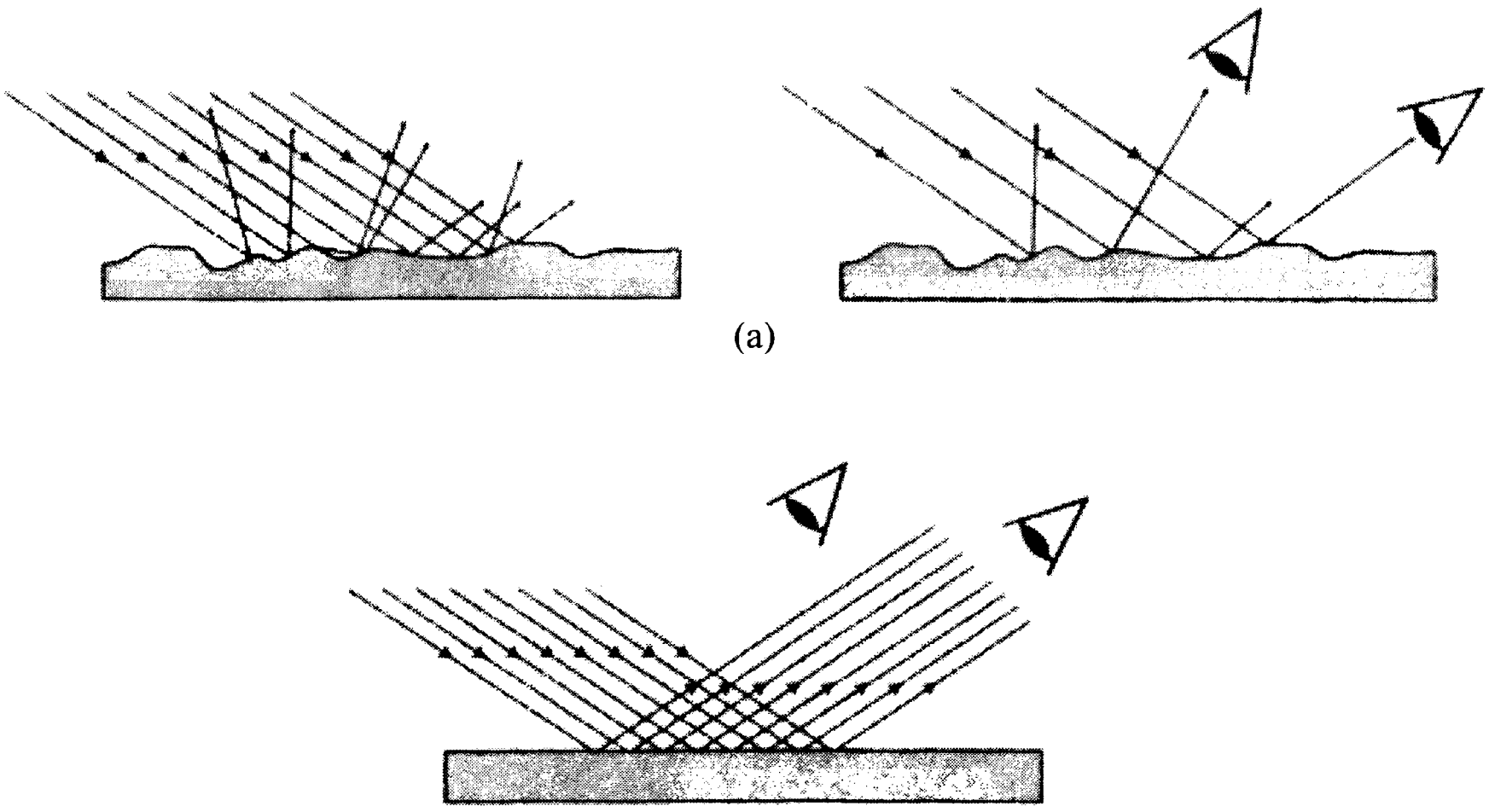
$$\lambda = c/f \tag{1.26}$$

Для создания изображения в поле зрения микроскопа должна изменяться интенсивность света (пропорциональная квадрату вектора электрического поля). Для определения коэффициента отражения на границе раздела двух сред можно использовать уравнения Максвелла с соответствующими граничными условиями. Их решение называют уравнениями Френеля, описывающими коэффициент отражения R (отношение интенсивностей отраженного и падающего света) и коэффициент прохождения T (отношение интенсивностей прошедшего и падающего света). Эти коэффициенты зависят от поляризации падающего света и показателей преломления материалов по обе стороны границы раздела.

Рассмотрим отражение света от плоской поверхности. Фундаментальным законом оптики является равенство углов падения θ_i и отражения θ_r. Однако этот закон справедлив лишь для оптически плоских поверхностей (рис. 1.17b). Это условие можно считать выполненным, если высота неровностей поверхности не превышает десятой доли длины световой волны λ. Если поверхность не является оптически плоской, свет случайно отражается в различных направлениях (рис. 1.17a), и поверхность выглядит матовой.

1.3.1. Отражение света от плоских поверхностей

При падении света на границу раздела двух сред (например, воздуха и стекла) он частично отражается. Для идеального металлического зеркала коэффициент отражения (доля отраженного света) R равен единице, а доля прошедшего света $T = 0$. Можно подумать, что при нормальном падении света на прозрачную стеклянную поверхность ситуация будет противоположной и $R = 0$, а $T = 1$. Однако в действительности это не совсем так, и на границе стекла небольшое количество света обязательно отражается. Доля отраженного света определяется уравнениями Френеля:



(a)

(b)

Рис. 1.17. (a) – Если поверхность материала имеет неровности, высота которых превышает длину световой волны λ, свет случайно отражается в различных направлениях, и поверхность выглядит матовой; (b) – если высота неровностей меньше λ/10, говорят, что поверхность оптически плоская. Поверхность в этом случае подобна зеркалу.

$$R = \left[\frac{(n_1 - n_2)}{(n_1 + n_2)}\right]^2, \tag{1.27}$$

где n_1 и n_2 – показатели преломления сред.

Согласно формуле (1.27) на границе воздух-стекло (типичное значение показателя преломления которого близко к 1,5) отражается приблизительно 4% света. Это может показаться незначительной величиной. Однако, если свет пересекает границу воздух-стекло много раз (m), количество потерянного света возрастает в соответствующее количество раз и становится равным примерно $0{,}04m$. К тому же, отраженный свет создает раздражающие артефактные явления. В двадцатом столетии этот неприятный эффект научились компенсировать, «просветляя» линзы, нанося на поверхность стекла тонкое покрытие, как показано на рис. 1.18. Принцип просветления основан на интерференции двух лучей, отраженных от верхней и нижней поверхностей покрытия, приводящей к их взаимному гашению при длине волны около 550 нм. Для этого должны выполняться два условия:

1. Интенсивности лучей, отраженных на обеих границах, должны быть равны. Это условие выполнено, если:

$$\left[\frac{(1 - n_b)}{(1 + n_b)}\right]^2 = \left[\frac{(n_b - n_g)}{(n_b + n_g)}\right]^2, \tag{1.28}$$

где n_b и n_g – показатели преломления покрытия и стекла соответственно. Отсюда путем несложных математических преобразований можно получить:

$$n_b = \sqrt{n_g} \tag{1.29}$$

2. Длина оптического пути света в покрытии должна быть равна половине длины волны. Таким образом, толщина покрытия должна быть равна:

$$t = \frac{\lambda}{4n_b} \tag{1.30}$$

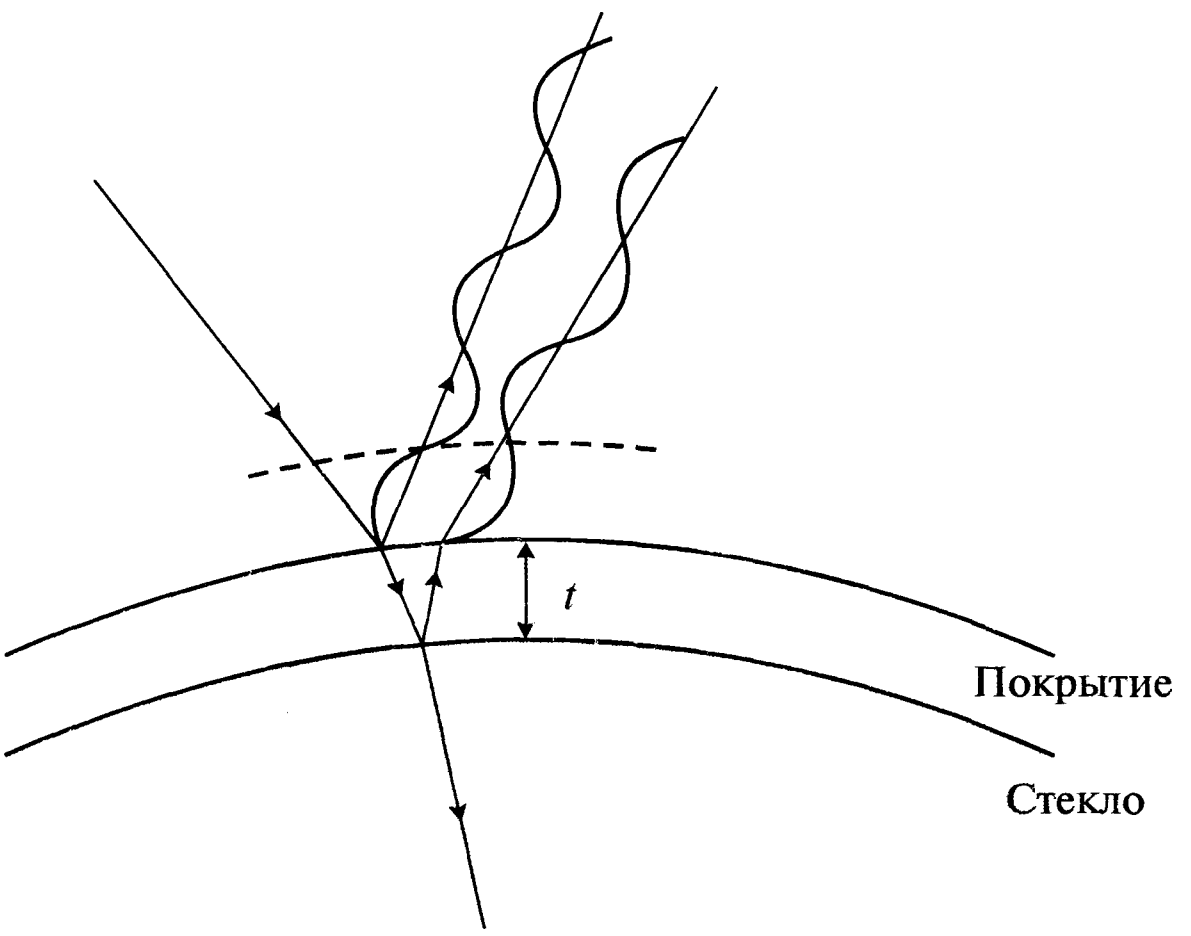


Рис. 1.18. Покрытие вызывает интерференцию лучей, отраженных от верхней и нижней поверхностей. При определенной толщине покрытия происходит взаимное гашение лучей и снижается доля отражаемого линзой света.

Покрытие обычно получают вакуумным напылением материала с требуемым коэффициентом преломления, в результате чего линза приобретает фиолетовый или красноватый оттенок. На практике просветленные линзы имеют не одно, а несколько покрытий (каждое со своим показателем преломления).

1.3.2. Влияние угла падения на коэффициент отражения

Согласно уравнениям Френеля, коэффициент отражения плоскополяризованного света зависит от направления поляризации. Уравнения Френеля выведены для двух случаев: когда электрическое поле параллельно поверхности (это называют TE модой) и когда магнитное поле параллельно ей (TM мода, рис. 1.19). При некотором угле падения θ_B, называемом *углом Брюстера*, наблюдается интересное явление. Если на плоскую поверхность падает неполяризованный свет под углом Брюстера θ_B, отраженный луч становится плоскополяризованным, причем электрическое поле параллельно поверхности, как показано на рис. 1.20. Прошедшая волна частично поляризована. Угол Брюстера определяется уравнением:

$$\theta_B = arctg\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \tag{1.31}$$

Для границы воздух–стекло $\theta_B = 57^\circ$. Для границы стекло–воздух:

$$\theta_B = arctg\left(\frac{n_1}{n_2}\right) \tag{1.32}$$

Уравнения Френеля *п*определяют зависимость коэффициента отражения R от угла падения θ_i. Для границы воздух–стекло эта зависимость приведена на рис. 1.21. Важным элементом микроскопа является светоделительная пластинка. Она представляет собой стеклянную пластинку, на которую нанесено полупрозрачное металлическое покрытие. Половина пучка от нее отражается, а вторая половина проходит, и $R = T = 0{,}5$. Светоделительную пластинку помещают под углом 45° к падающему лучу, и прошедший свет не изменяет своего направления, а отраженный луч перпендикулярен начальному направлению. С помощью светоделителей, призм, оптических волокон и плоских зеркал световыми лучами можно управлять, как электрическими сигналами в электронных системах.

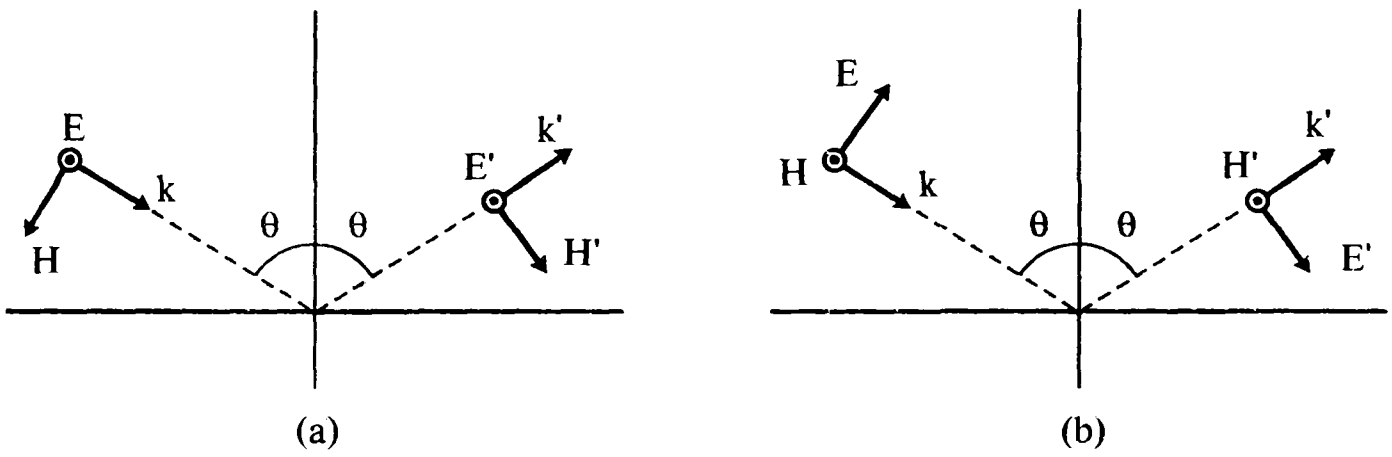


Рис. 1.19. Согласно уравнениям Френеля коэффициент отражения различен для электромагнитных волн, в которых (a) вектор электрического поля E параллелен границе (TE мода) и (b) перпендикулярен ей (TM мода).

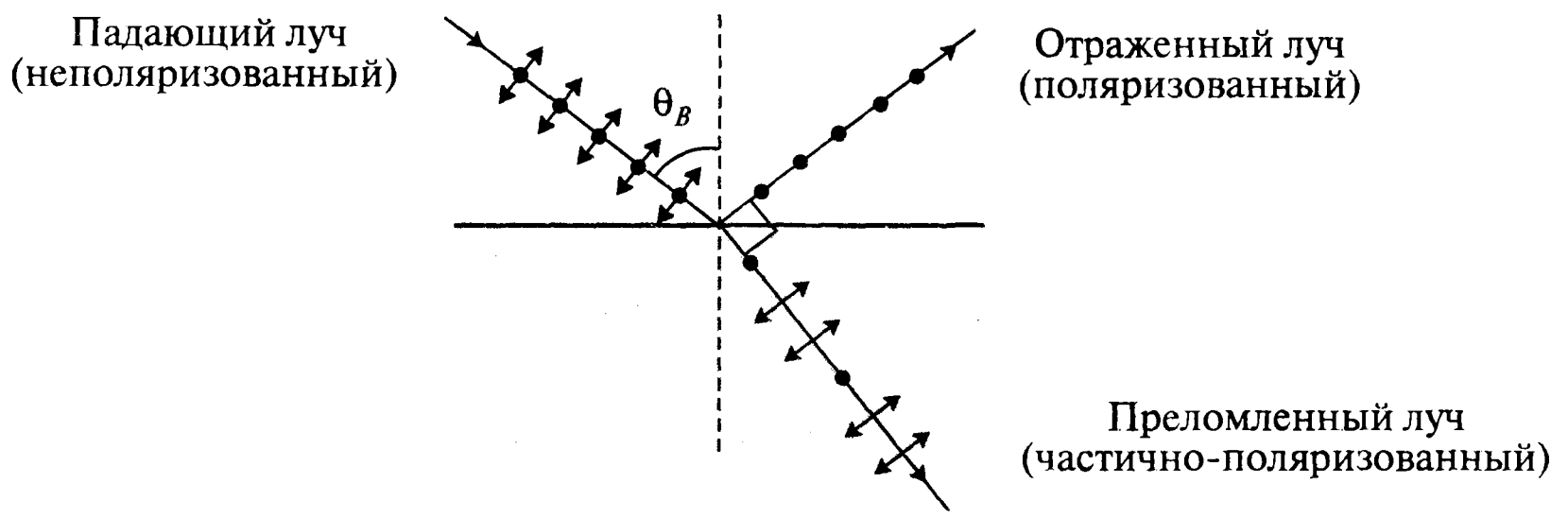
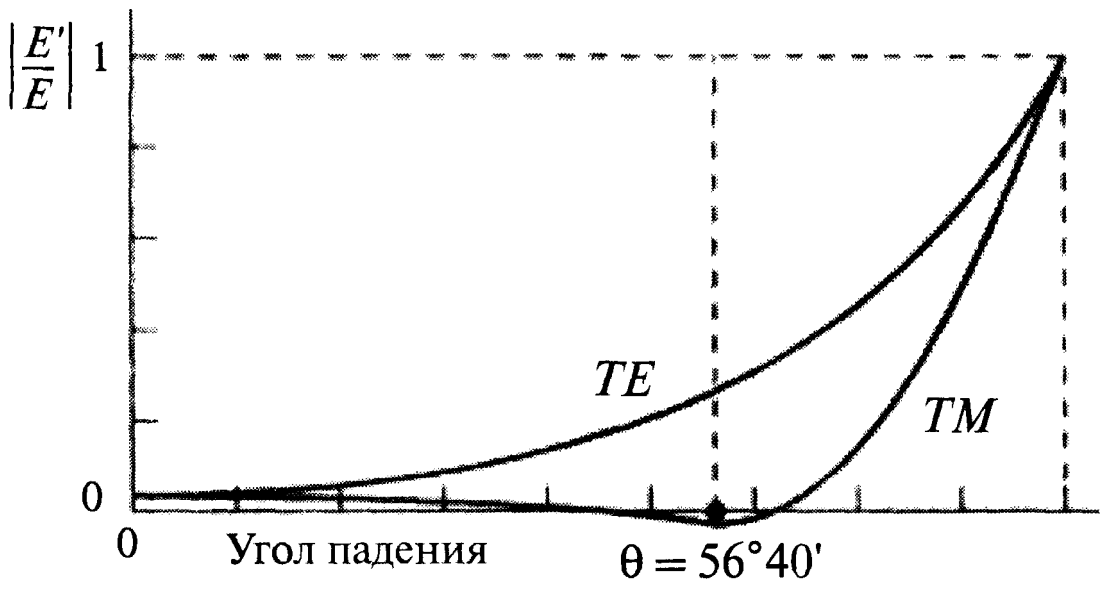


Рис. 1.20. При падении неполяризованного светового луча на поверхность диэлектрика под углом Брюстера отраженный луч оказывается плоскополяризованным. Отметим, что в этом случае отраженный и преломленный лучи взаимно перпендикулярны.

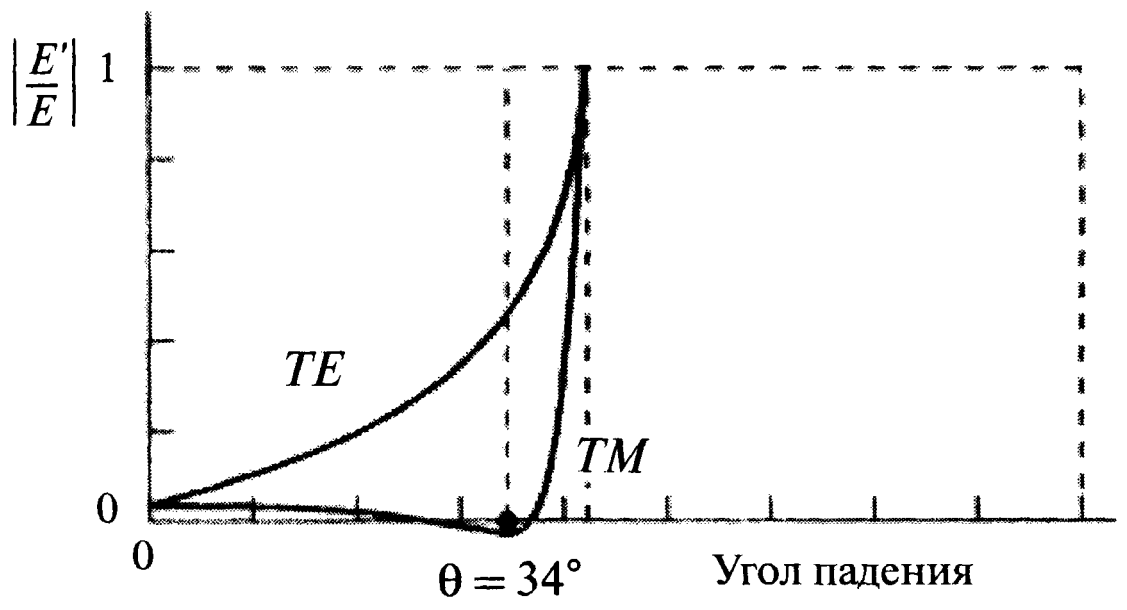
1.3.3. Отражение от неплоских поверхностей

До сих пор мы рассматривали только плоские поверхности, изменяющие направление распространения луча и позволяющие создать одно или несколько изображений (перевернутых или даже повернутых), но не изменяющие размер изображения. В случае изогнутой поверхности размер изображения можно уменьшить или увеличить. Эту особенность изогнутых поверхностей использовали в отражающем телескопе [4] и в отражающем микроскопе (параграф 1.4.5). Отражение лучей от изогнутых поверхностей иллюстрирует рис. 1.22. Лучи, перпендикулярные поверхности, отражаются по первоначальному пути. Параксиальные лучи (па-

раллельные оптической оси) после отражения сферическим или параболическим зеркалом сойдутся в одной точке на оптической оси, называемой фокусом. Положение изображения может быть определено по точке пересечения лучей. Отметим, что изображения двух объектов, расположенных с различных сторон от точки фокуса, совершенно различны (рис. 1.22). Обратим также внимание на то, что изображение точки, помещенной в фокус сферического зеркала, находится на бесконечности. Поэтому, если в фокус сферического зеркала поместить яркий источник света, образуется нерасходящийся (коллимированный) луч света, как в прожекторе.



(a)



(b)

Рис. 1.21. Уравнения Френеля определяют зависимость коэффициента отражения R (отношение интенсивности отраженного и падающего пучков) от угла падения. Изменение коэффициента отражения для TE и TM-мод показано для (a) внешнего отражения (например, воздух-стекло), и (b) - внутреннего отражения (стекло-воздух). Обратим внимание, что на границе стекло-воздух при углах падения более 42° световые лучи полностью отражаются.

1.3.4. Интерференция волн

Если два некогерентных источника света интенсивностью I_1 и I_2 поместить близко друг к другу, их интенсивности складываются и $I_t = I_1 + I_2$. Для источников, излучающих свет изотропно, суммарная интенсивность освещения на расстоянии r дается уравнением:

$$I_r = I_t / 4\pi r^2 \tag{1.33}$$

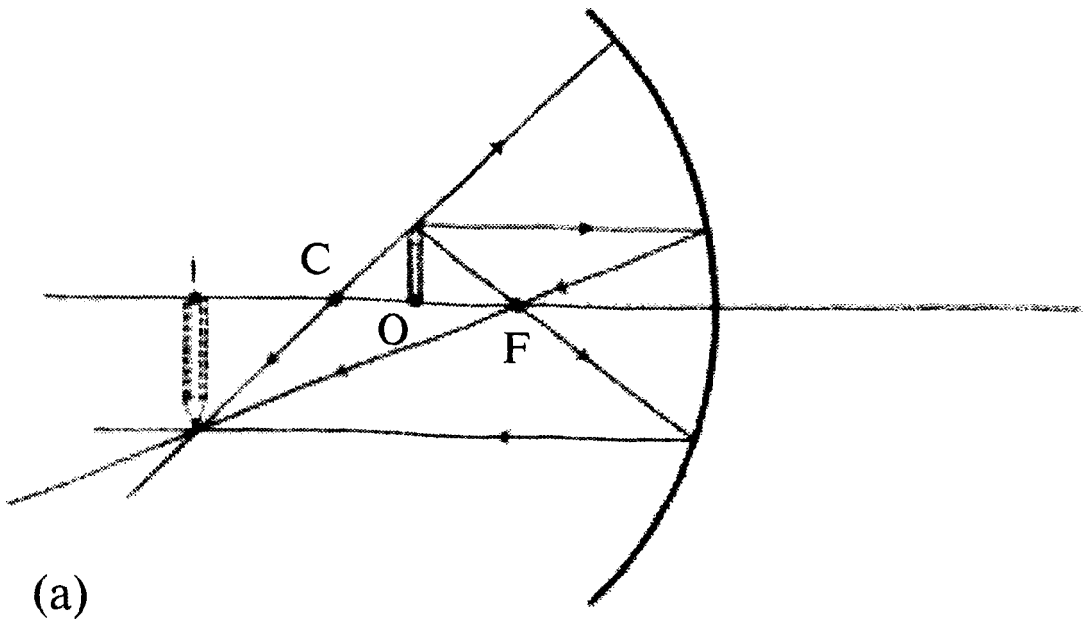


Рис. 1.22. Лучевые диаграммы можно использовать для определения размера и положения изображения. Рассмотрим изображения, формируемые вогнутым сферическим зеркалом в случаях, когда объект помещен (a) между центром кривизны и фокусом и (b) между фокусом и поверхностью зеркала. Изображение строится при помощи диаграммы, в которой первый луч идет через центр кривизны (перпендикулярно поверхности зеркала), а второй луч – через фокус (после отражения он параллелен оси).

Обычно источники света являются некогерентными, поскольку миллиарды волн, излучаемых точечными источниками, не связаны по фазе. Поэтому полная интенсивность равна средней интенсивности этих волн. Если световой луч разделить на два пучка, они будут когерентными. Если до объединения в некоторой точке лучи пройдут одинаковый оптический путь, они будут иметь одинаковую фазу. В других точках они будут иметь некоторую разницу фаз (рис. 1.23). Разница длины пройденного пути δl и разница фаз θ связаны формулой:

$$\theta = \frac{2\pi}{\lambda} n \delta l, \tag{1.34}$$

где n – показатель преломления среды.

Классической иллюстрацией интерференции является эксперимент Юнга, в котором монохроматический источник (излучающий свет длиной волны λ), пройдя через две узкие параллельные щели, создает когерентные световые волны. В результате на экране (рис. 1.23а) появляются чередующиеся светлые и темные полосы. Светлые полосы соответствуют областям, где волны складываются в фазе, а темные – областям, где разность фаз равна 180°, и они вычитаются. Пусть амплитуды двух когерентных волн равны I_1 и I_2. При сложении интерферирующих

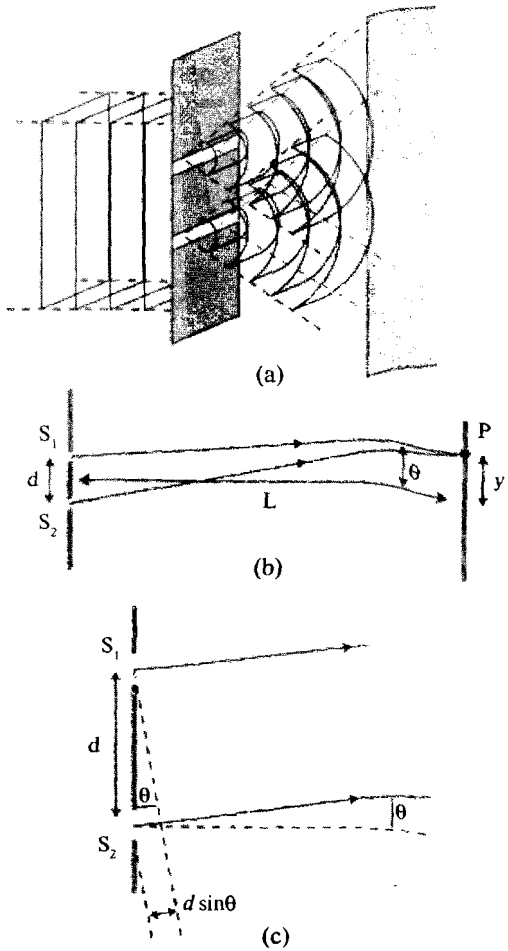


Рис. 1.23. Примеры интерференции. (a) – При падении плоской волны на экран с двумя узкими щелями создаются два расходящихся волновых фронта. Эти волны когерентны, и на втором экране в одних областях они суммируются (образуя светлые полосы, параллельные щелям), а в других вычитаются, образуя темные полосы; (b) – в точке P волны S_1 и S_2 складываются, если разница оптического пути кратна длине волны λ; (c) – если расстояние L до экрана гораздо больше расстояния между щелями, интерферирующие лучи параллельны (это называют *дифракцией Фраунгофера*), а разница оптического пути равна $d \sin\theta$, где d -- расстояние между щелями и $\theta = y/L$.

волн суммарная амплитуда равна $I_1 + I_2$, а при вычитании – $|I_1 - I_2|$ (рис. 1.24). Амплитуда суммарной волны в точке P дается формулой:

$$I = 4I_0 \cos^2 \frac{\delta}{2}, \tag{1.35}$$

где $\delta = \frac{2\pi}{\lambda} d \sin\theta$, d - расстояние между щелями и θ – угол с осью симметрии.

В интерферометре Майкельсона две когерентные волны создают с помощью посеребренной светоделительной пластинки, через которую половина пучка проходит, а половина отражается. После деления лучи проходят различный оптический путь, а затем объединяются и создают систему интерференционных полос, как показано на рис. 1.25. Интерферометры играют важную роль во многих областях физики. Например, их используют в приборах, с помощью которых в настоящее время пытаются обнаружить гравитационные волны.

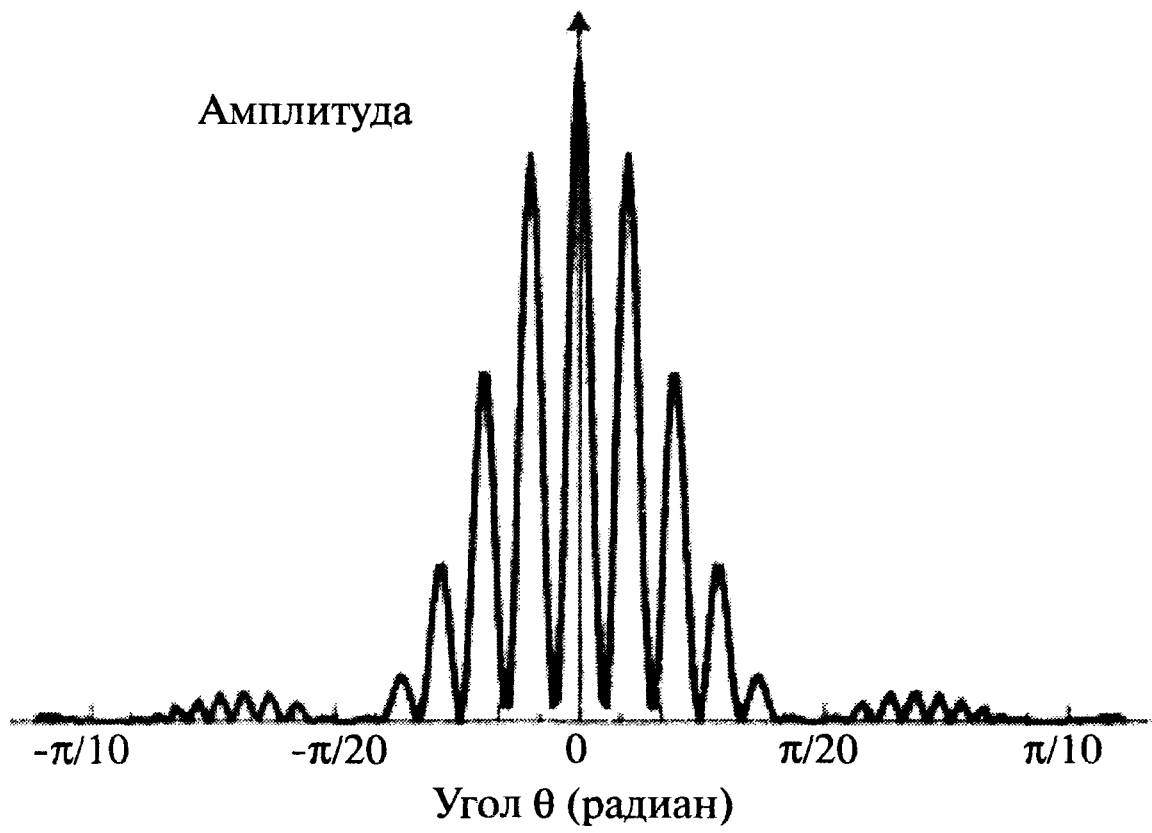


Рис. 1.24. Юнг первым получил интерференционную картину на двух щелях. Расстояние d между щелями равно 1,5 мм, а ширина щелей $a = 6$ мкм.

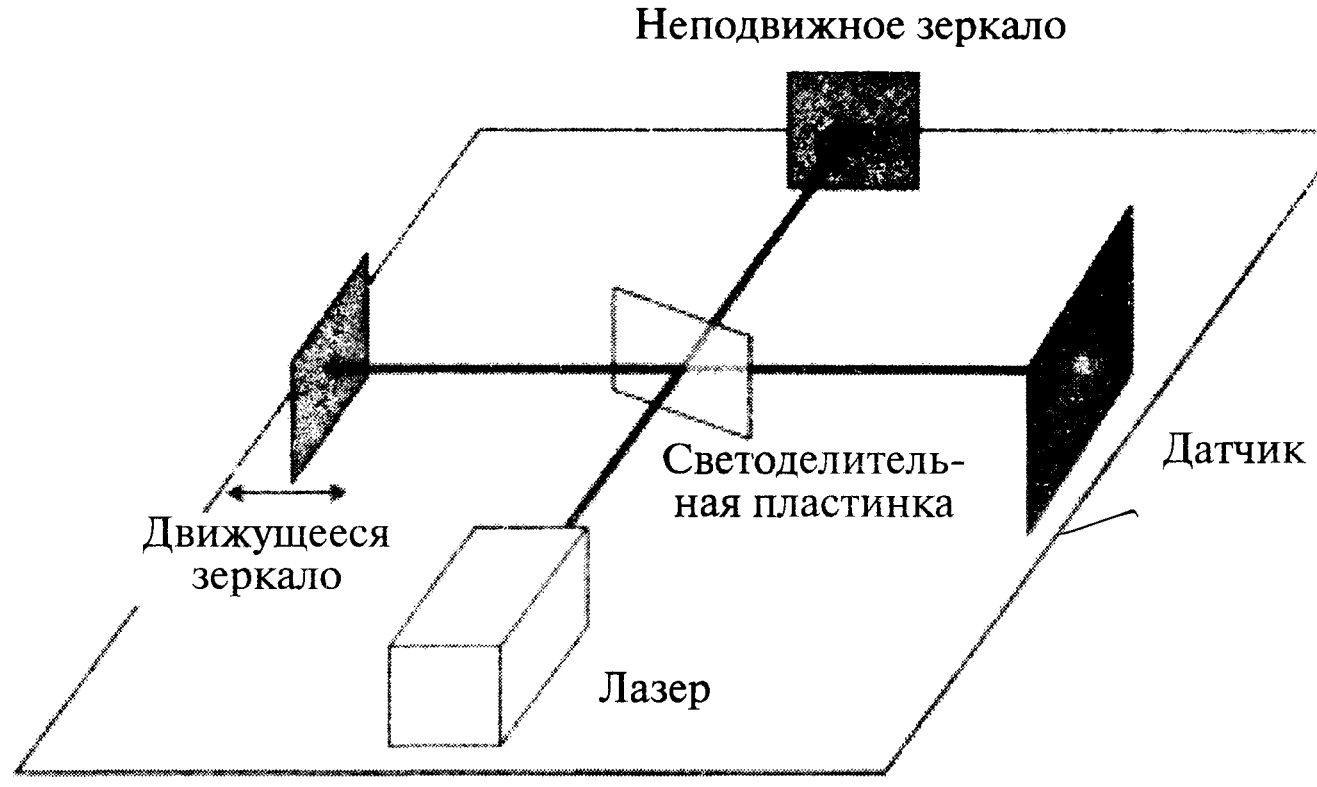


Рис. 1.25. В современном интерферометре Майкельсона в качестве источника используют коллимированный лазерный пучок, который направляют на светоделительную пластинку. Отраженный луч направляют на движущееся зеркало, а прошедший – на неподвижное. После отражения от зеркал лучи вновь сходятся в светоделительной пластинке и формируют на экране (детекторе) интерференционную картину.

1.3.5. Светофильтры

В оптических системах часто требуется монохроматический свет (одной длины волны). В театрах для получения различных цветов мощные софиты, дающие широкополосный белый свет, закрывают цветной пленкой. Типичные спектральные характеристики светофильтров[1] из желатина или цветного стекла показаны на рис. 1.26a. Отметим, что данные светофильтры пропускают инфракрасный свет. Спектральные характеристики других светофильтров показаны на рис. 1.26b, а их использование иллюстрирует рис. 1.26c. Во флуоресцентной микроскопии используют «светофильтры возбуждения», выделяющие узкую спектральную полосу, а также «запирающие светофильтры», пропускающие лишь длинноволновое флуоресцентное излучение, но не пропускающие возбуждающий свет. Отметим, что длина волны возбуждающего света всегда немного короче длины флуоресцентного излучения[2] .

В исследовательской работе часто возникает потребность в узкополосных светофильтрах, пропускающих свет лишь в очень узкой полосе длин волн. Для их создания можно использовать интерференцию. Такой светофильтр можно сделать, напылив на стеклянную подложку последовательно полупрозрачное металлическое покрытие, тонкий слой диэлектрика типа криолита, снова слой металла и, наконец, закрыть систему второй стеклянной пластинкой. Если толщина диэлектрической пленки равна d, а показатель преломления n, то при нормальном падении будут складываться волны, длина которых определяется формулой:

$$\lambda_{int} = \frac{2nd}{m}, \tag{1.36}$$

где m – порядок интерференции ($m = 1,2,3...$). Если диэлектрическая пленка достаточно тонкая, то в оптическом диапазоне максимальное пропускание будут иметь лишь несколько длин волн λ_{int}. Нежелательные интерференционные максимумы можно удалить с помощью подходящего цветного стекла или желатинового светофильтра. В настоящее время можно изготовить светофильтр с очень узким диапазоном пропускания практически для любой длины волны оптического диапазона. Наиболее узкополосные светофильтры имеют ширину порядка 1,5 нм. Спектральные характеристики (коэффициент пропускания) типичных светофильтров показаны на рис. 1.26b, а их использование в микроскопе иллюстрирует рис. 1.26c.

В микроскопии часто используют нейтральные светофильтры. На рис. 1.27 показаны спектры пропускания таких светофильтров. Коэффициент пропускания нейтрального светофильтра постоянен во всем оптическом диапазоне, и его используют для уменьшения интенсивности луча. Нейтральный светофильтр можно изготовить вакуумным напылением металлической пленки на стеклянную подложку. Светофильтры часто устанавливаются в перемещающиеся рамки или во вращающемся диске, в которых можно разместить несколько светофильтров с различными коэффициентами пропускания.

---

[1] В отличие от других, фильтры, выделяющие волну света определенной длины, носят название «светофильтры». – *Здесь и далее прим. перев.*

[2] В соответствии с законом Стокса.

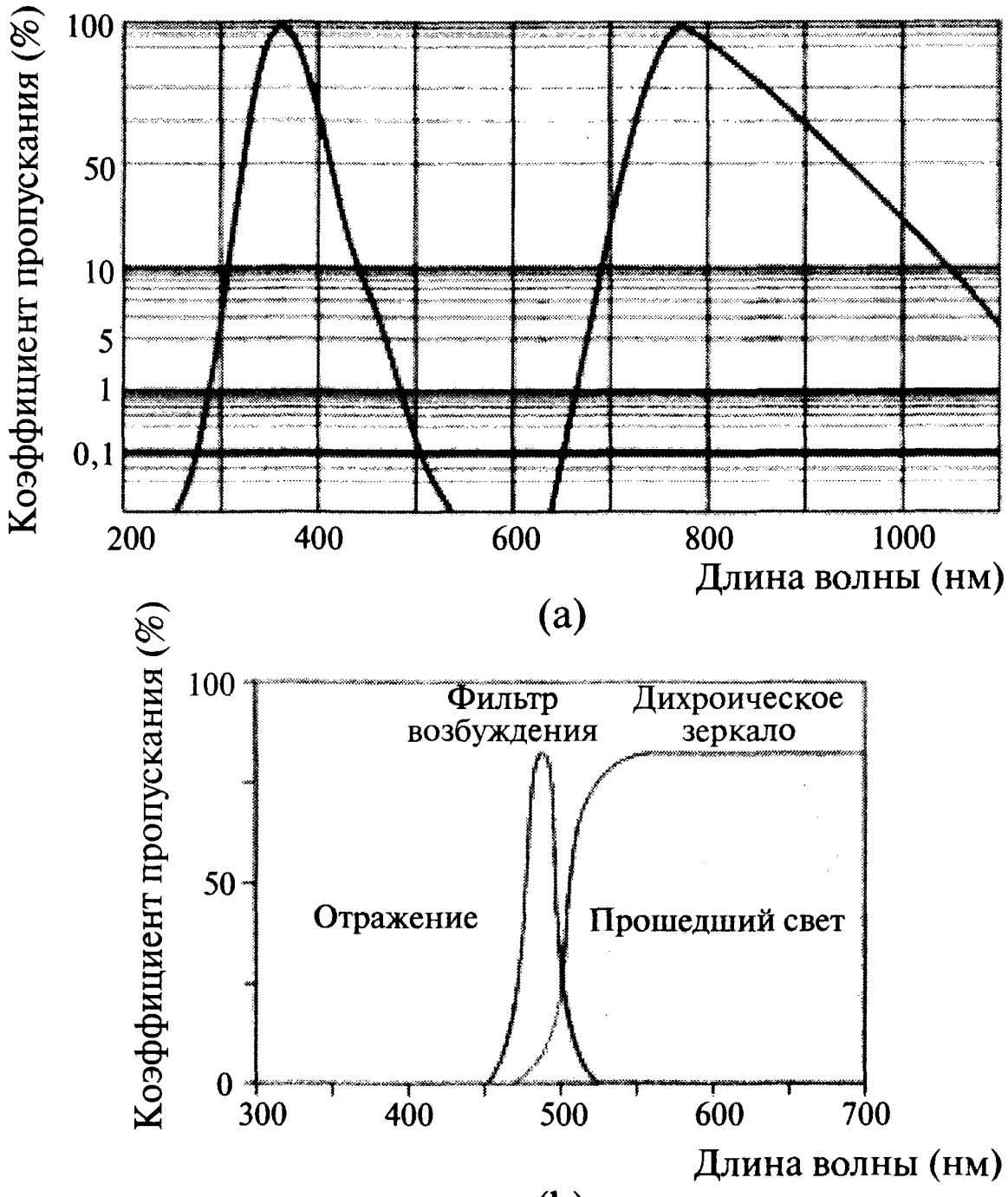


Рис. 1.26. Любой материал действует как некоторый спектральный фильтр. Не существует материалов, совершенно прозрачных при всех частотах из-за наличия полос поглощения, в которых сильно изменяется показатель преломления, как на рис. 1.12а. (а) – Спектральная характеристика цветного стекла марки BG3, имеющего два окна пропускания в зеленом и инфракрасном свете; (b) – спектральные характеристики фильтра возбуждения с узким окном пропускания и дихроического зеркала с широкой полосой пропускания. (c) – Фильтром можно выделить узкую спектральную полосу определенной длины волны. Например, на флуоресцирующий образец с помощью полупрозрачного дихроического светоделительного зеркала можно направить коротковолновый свет. Флуоресцентное излучение пройдет через дихроическое зеркало, а нежелательный свет можно удалить дополнительным узкополосным фильтром.

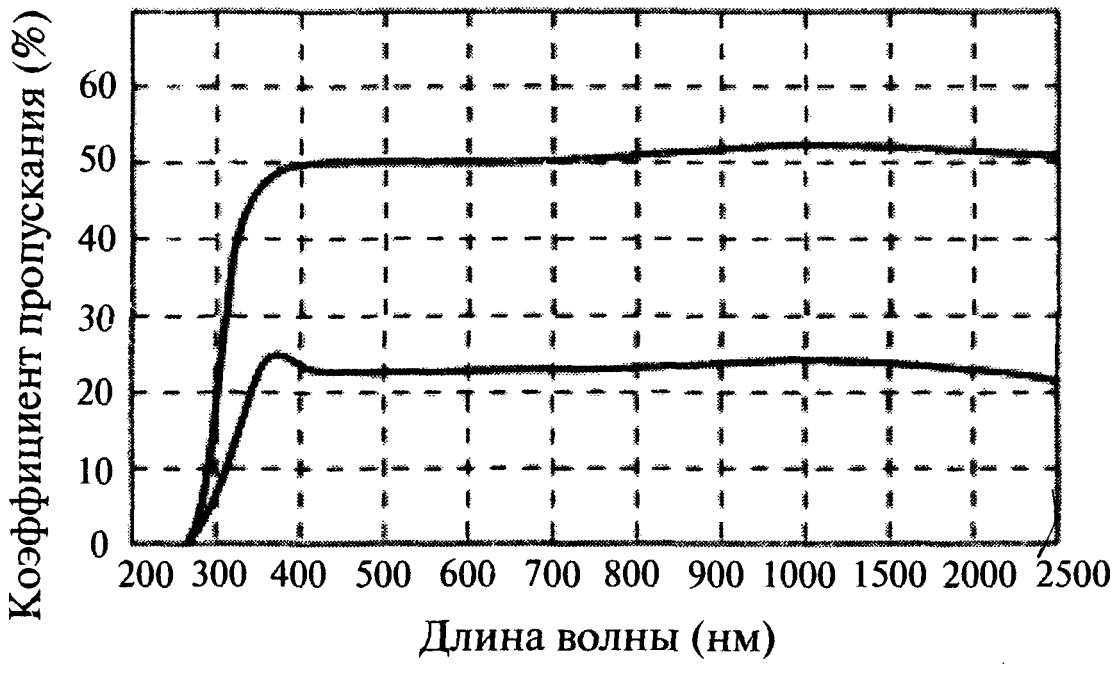


Рис. 1.27. Коэффициент пропускания нейтрального фильтра постоянен в широком диапазоне длин волн (видимого и ИК-диапазонов). В микроскопах такие фильтры используют для уменьшения интенсивности лазерного излучения.

1.3.6. Дифракция

Дифракция тесно связана с интерференцией. Классически ее описывают как результат взаимодействия различных областей одного светового фронта, а интерференцию - со взаимодействием различных волн. Гюйгенс предположил, что световой фронт можно рассматривать как набор мельчайших вторичных когерентных источников, показанных на рис. 1.28. Ширина щели (сотни микрон) должна намного превышать длину света. После прохождения монохроматического света через щель на экране будет наблюдаться ряд светлых и темных полос (рис. 1.29). Дифракционная картина описывается математическим выражением, похожим на уравнение (1.35):

$$I = 4I_o \frac{\sin^2 \phi/2}{\phi/2}, \qquad (1.37)$$

где I -- амплитуда волны в точке экрана, находящейся на расстоянии d от оптической оси, D -- расстояние между щелью и экраном, $\phi = \frac{2\pi}{\lambda} a \sin\theta$, $\theta = arctg\,(d/D)$.

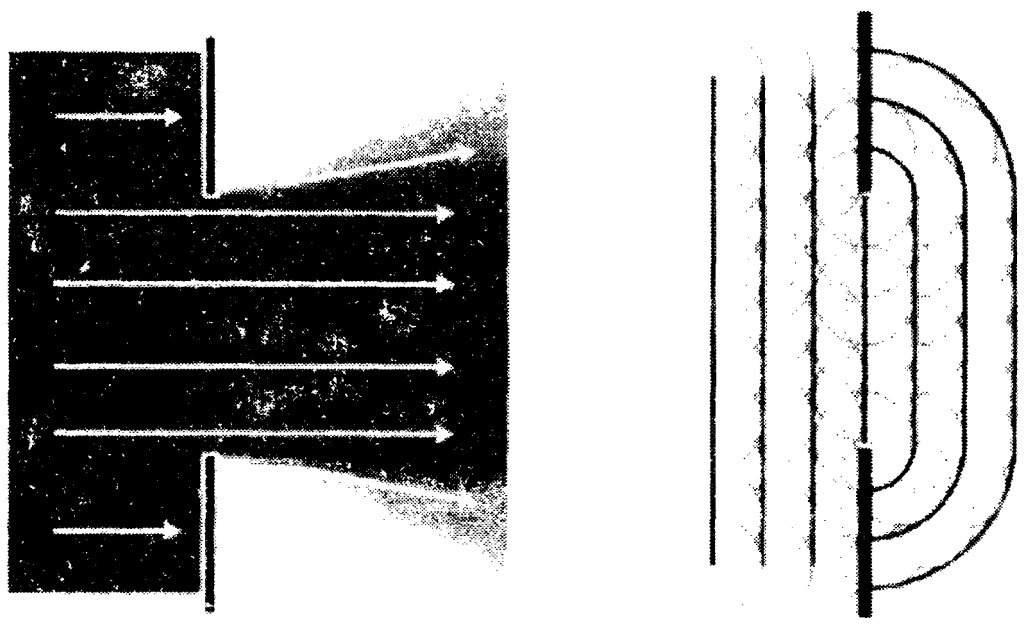


Рис. 1.28. Дифракция света на отверстии. Дифракция проявляется в распространении света в область геометрической тени. Гюйгенс объяснил этот эффект, введя понятие вторичных когерентных источников света в плоскости щели. Свет вторичных источников интерферирует и создает эффект дифракции.

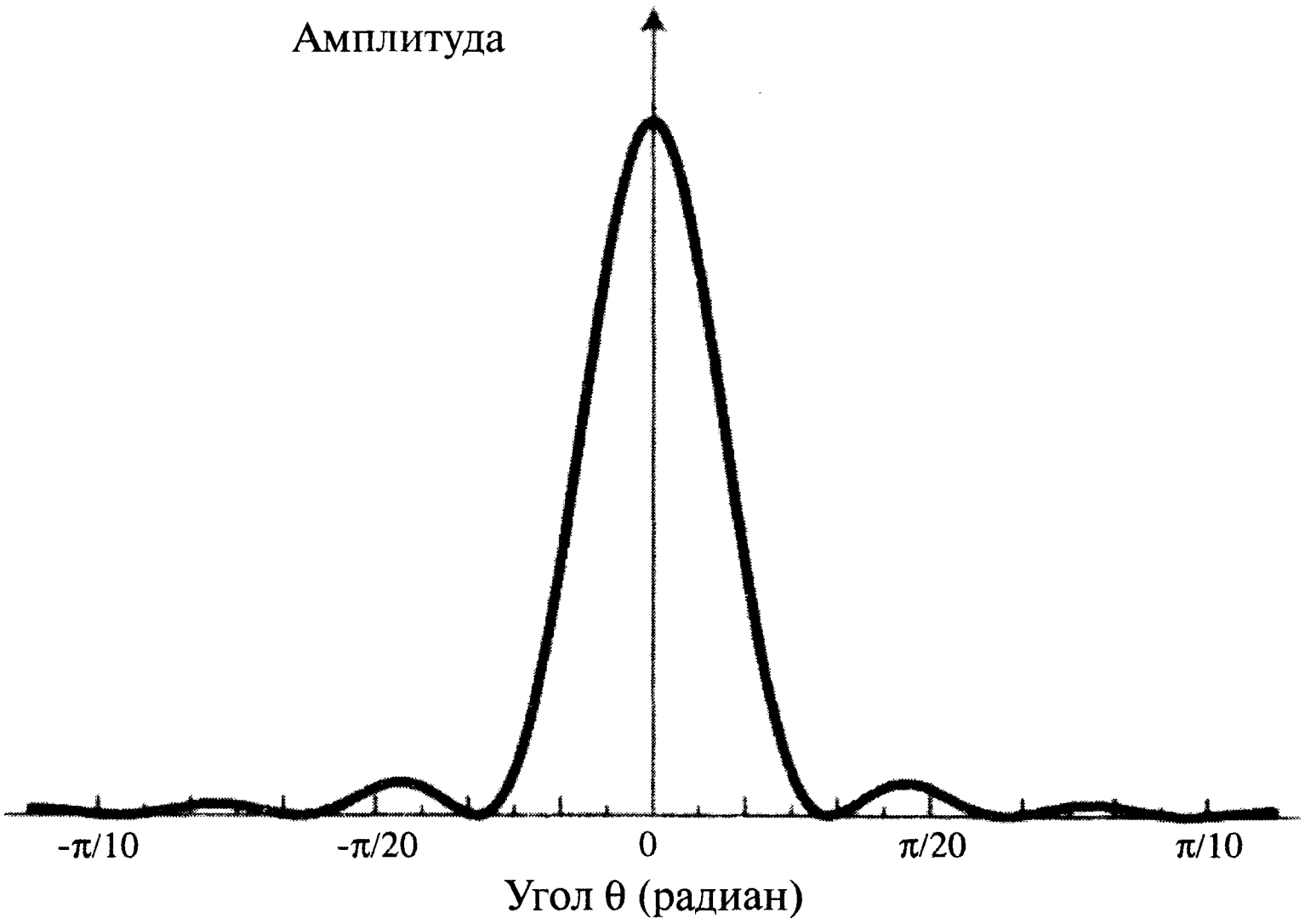


Рис. 1.29. Изменение интенсивности света на экране в зависимости от угла θ для щели шириной a = 9 мкм. Обратим внимание на подобие формы дифракционной картины и интенсивности интерференционных полос двух щелей на рис. 1.24.

При наличии отверстия пространственное разрешение определяется дифракцией. Оптические линзы имеют круглую форму, и поэтому в микроскопии (параграф 1.4.3) важнейшее значение имеет уравнение Эри, описывающее амплитуду световой волны за круглым отверстием:

$$I = \left[\frac{2\,J_1(z)}{z}\right]^2, \tag{1.38}$$

где $J_1(z)$ – функция Бесселя первого порядка [6], и

$$z = \frac{2\pi}{\lambda} h' \sin U'_{max}, \tag{1.39}$$

где h' – расстояние от оси, U'_{max} – половина угла светового конуса прошедшего света. Распределение интенсивности за щелью очень похоже на радиальное распределение интенсивности за круглым отверстием. Изображение круглого отверстия на экране показано на рис. 1.30. Яркий дифракционный кружок в центре изображения круглого отверстия называют кружком Эри. Первый минимум интенсивности при $z = 1{,}22\pi$ соответствует расстоянию от оси, определяемому уравнением:

$$h' = 0{,}61\frac{\lambda}{\sin U'_{max}} \tag{1.40}$$

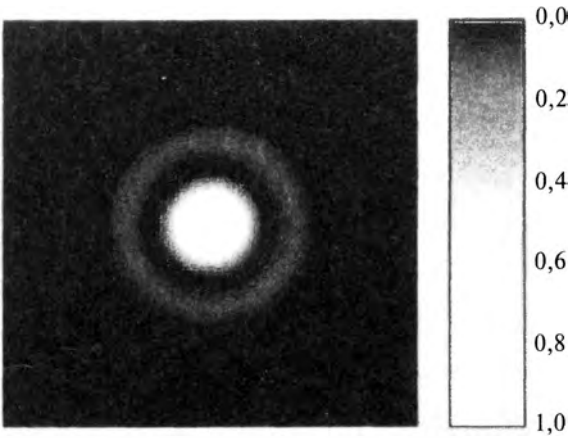


Рис. 1.30. Если свет точечного источника проходит через круглое отверстие, распределение интенсивности света на экране имеет цилиндрическую симметрию. Радиальное распределение интенсивности похоже на распределение за щелью (рис. 1.29). Яркое центральное пятно окружено более слабыми кольцами.

1.3.7. Поглощение света

Некоторые материалы прозрачны, и свет в них распространяется практически без поглощения. Прозрачность материала определяется степенью поглощения света. Человеческий глаз воспринимает только очень узкую часть электромагнитного спектра в диапазоне длин волн от 380 нм (фиолетовый цвет) до 750 нм (красный). «Прозрачность» материала отражает нашу субъективную оценку малых потерь в видимом диапазоне света. При других длинах волн тот же материал может быть совершенно непрозрачным. Аналогично, непрозрачный в оптическом диапазоне материал может быть совершенно прозрачным в другом диапазоне длин волн.

Существует несколько различных процессов, ответственных за поглощение света, но все они могут быть описаны простой математической моделью, показанной на рис. 1.31. Эта модель предполагает, что при прохождении света через тонкий слой материала толщиной δl его интенсивность уменьшается на величину, пропорциональную интенсивности падающего пучка и толщине слоя:

$$\delta I = -kI\delta l \tag{1.41}$$

константу k называют *коэффициентом поглощения* (зависящим от длины волны). Интегрируя это уравнение, получаем закон Бера-Ламберта:

$$I(\lambda) = I_0 e^{-\kappa(\lambda)L}, \tag{1.42}$$

где I_0 – начальная интенсивность пучка. Иногда поглощение описывают оптической плотностью материала Ω, которую определяют по формуле:

$$\Omega = \log\left(\frac{I(\lambda)}{I_o}\right) \tag{1.43}$$

Из этой формулы следует, что коэффициент поглощения и оптическая плотность образца толщиной L связаны соотношением:

$$\Omega = \frac{\kappa L}{\ln 10} = 0{,}434\kappa L \tag{1.44}$$

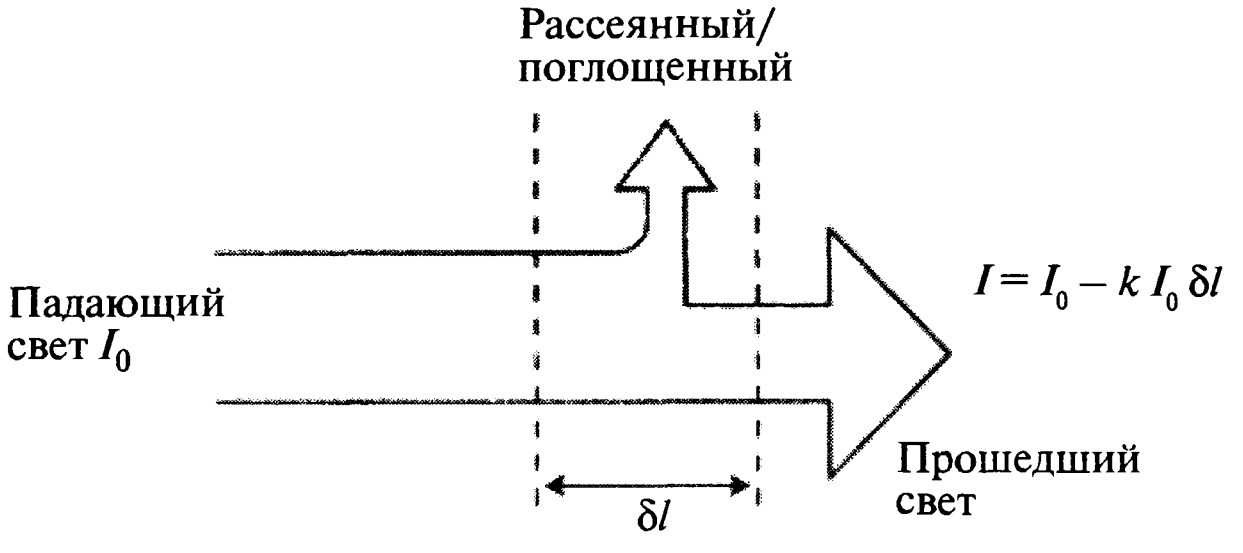


Рис. 1.31. Существует несколько различных физических процессов, приводящих к ослаблению светового луча. Интенсивность всех этих процессов зависит от толщины слоя материала δl и интенсивности луча I_0. Если изменение интенсивности луча может быть описано линейным уравнением $I = I_0 - k\, I_0\, \delta l$, где k – константа материала, характеризующая процессы поглощения, интенсивность прошедшего света при увеличении толщины уменьшается экспоненциально.

Хотя стекло совершенно прозрачно в видимом диапазоне, в ультрафиолетовой области оно имеет полосы поглощения, в которых сильно возрастает показатель преломления (рис. 1.12b). Следовательно, величины коэффициента поглощения нужно относить к определенной длине волны. Доля света, прошедшего через плоскопараллельную пластину толщиной L, описывается формулой:

$$T = (1 - R_1)\, e^{-\kappa L} (1 - R_2), \tag{1.45}$$

где R_1 и R_2 – коэффициенты отражения на передней и задней поверхностях пластины.

Помимо поглощения, прозрачность материала зависит от степени рассеяния света. Рассеяние вызывается вариацией показателя преломления материала на неоднородностях размером меньше длины волны, например, на примесях, дефектах и т.д. Обратим внимание, что рассеяние влияет на интенсивность прошедшего светового луча совершенно аналогично поглощению. Следовательно, оно может быть описано уравнением, аналогичным (1.45). Если N – количество рассеивающих центров в единице объема и σ_s – поперечное сечение одного центра, уменьшение интенсивности света описывается экспоненциальным законом:

$$(z) = I_0 exp(-N\sigma_s z) \tag{1.46}$$

Джордж Стокс обнаружил, что в люминесцирующих материалах длина волны вторичного люминесцентного излучения выше длины падающего света. Этот эффект называют «сдвигом Стокса». Уже Максвелл понял, что этот эффект противоречит электромагнитной теории света, а объяснили его только после появления квантовой теории.

Квантовую теорию разрабатывали в течение первой четверти двадцатого столетия. Для объяснения формы спектральной кривой интенсивности излучения черного тела, показанной на рис. 1.32, Планк в 1900 году выдвинул гипотезу, что

энергия колебаний молекул имеет вид дискретных уровней. Он также предположил, что энергия самого низкого колебательного уровня равна $E_{min} = h f$, где f – частота собственных колебаний электрических зарядов материала и h – постоянная Планка. В 1905 году для объяснения фотоэффекта Эйнштейн [7] предположил, что свет также излучается дискретными импульсами, которые он назвал «фотонами», и энергия фотона равна:

$$E = h\nu, \tag{1.47}$$

где ν – частота света. Отметим, что фотоэффект, иллюстрируемый рис. 1.33, нельзя объяснить в рамках классической электромагнитной теории Максвелла. Объяснение фотоэффекта явилось триумфом фотонной теории света.

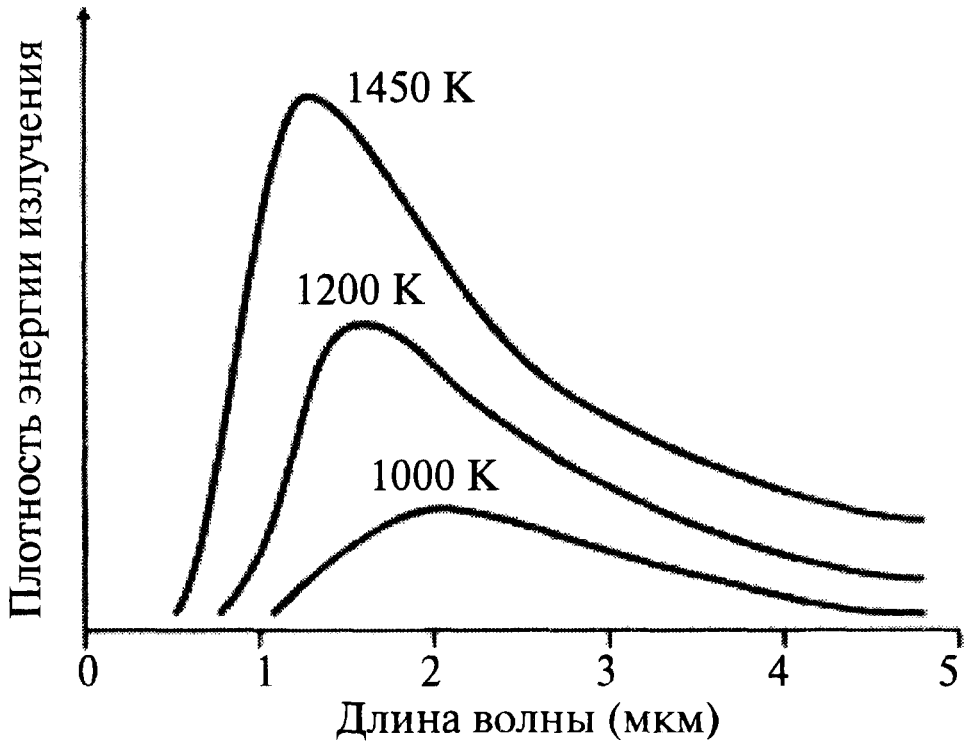


Рис. 1.32. Кривая плотности излучения абсолютно черного тела, моделирующая тепловое излучение реальных тел. Чем выше температура, тем больше площадь под кривой. Положение максимума сдвигается в область более коротких длин волн. Связь между температурой тела T (в градусах Кельвина) и длиной волны λ (в мм), соответствующей максимуму излучаемой мощности, дается законом Вина $T = 2{,}898/\lambda$. Классическая допланковская теория излучения предсказывала, что плотность энергии излучения должна увеличиваться при уменьшении длины волны. Этот парадокс назвали ультрафиолетовой катастрофой.

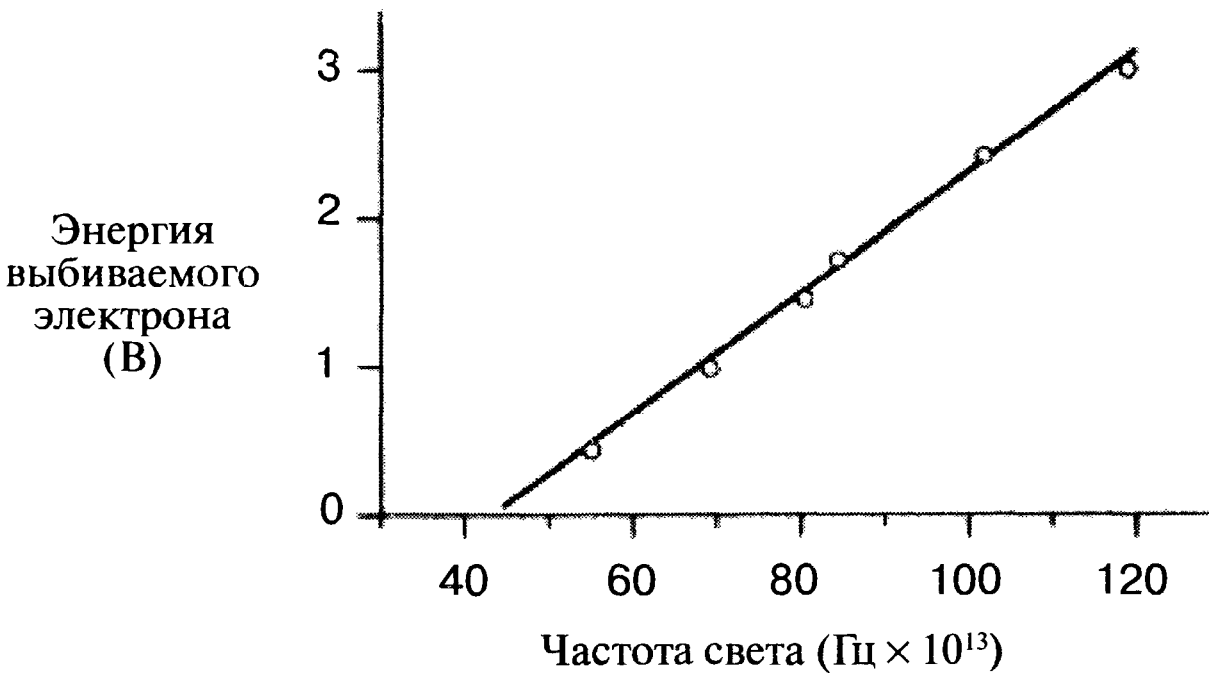


Рис. 1.33. При освещении светом некоторого материала из него могут выбиваться электроны. Эйнштейн первым понял, что зависимость максимальной энергии выбиваемых электронов от частоты света ν можно объяснять в рамках квантового подхода.

1.3.8. Квантовая механика и теория Бора

В 1900 году атом представляли как тяжелое неподвижное положительно заряженное ядро, вокруг которого вращаются легкие отрицательно заряженные электроны подобно вращению планет в Солнечной системе. Точное измерение частоты дискретных линий излучения возбужденного атома водорода (рис. 1.34) показало, что модель атома нужно пересматривать. Хотя физики написали эмпирические формулы, описывающие линии излучения атома водорода, оставалось непонятным, почему эти линии дискретны. В 1913 году датский физик Нильс Бор выдвинул два предположения, объясняющих спектр излучения атома водорода:

1. Электроны могут вращаться только на некоторых дискретных орбитах. Эти орбиты имеют различную энергию. Невозбужденное состояние атома Бор назвал основным.
2. Когда электрон переходит из одного состояния в другое, излучается или поглощается квант света. Частота кванта v дается формулой:

$$v = \Delta E/h, \tag{1.48}$$

где h – постоянная Планка (6,63 x 10^{-34} Дж с) и ΔE – разница энергии состояний.

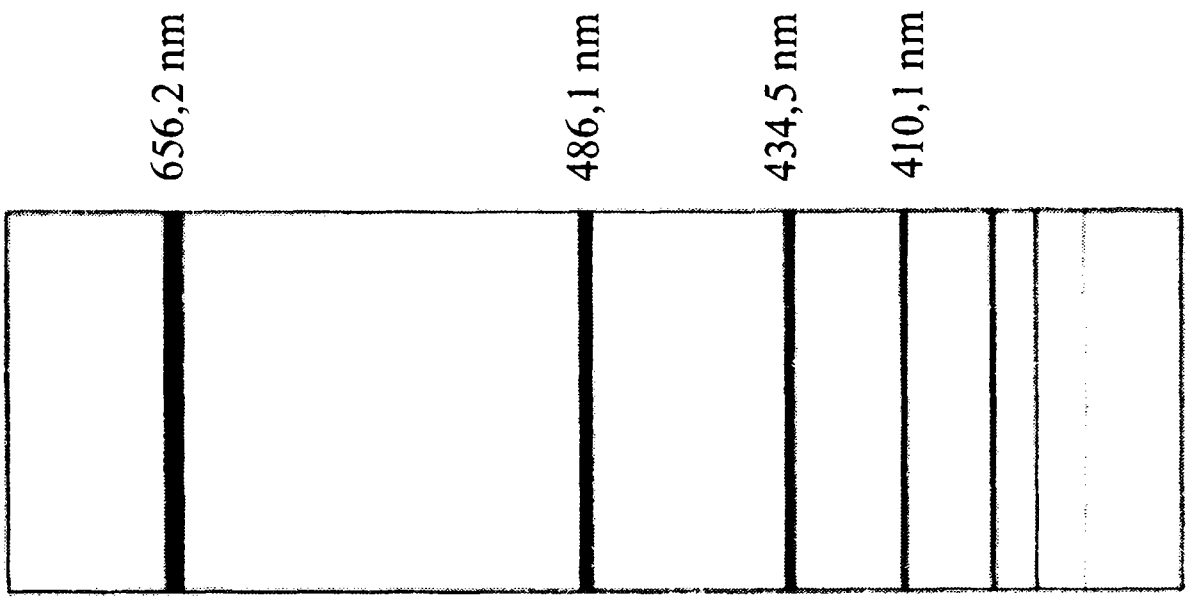


Рис. 1.34. Экспериментальным основанием квантовой теории был дискретный характер линий спектра атомарного водорода. Классическая физика не могла объяснять дискретный характер спектра. Бор описал их положение, предложив модель дискретных орбит электронов.

Эти предположения подразумевают, что свет представляет собой поток частиц энергии, названных фотонами. Используя эти постулаты, Бору удалось описать положение линий спектра водорода. Допустимые орбиты аналогичны стоячим волнам в колеблющейся струне. В кандидатской диссертации де Бройль предположил, что электрон является волной, длина которой описывается уравнением $\lambda = h/p$, где p – импульс электрона. Электрон может оставаться на орбите, только если длина орбиты равна целому числу длин волн, как показано на рис. 1.35. В противном случае в результате интерференции волны вычлись бы.

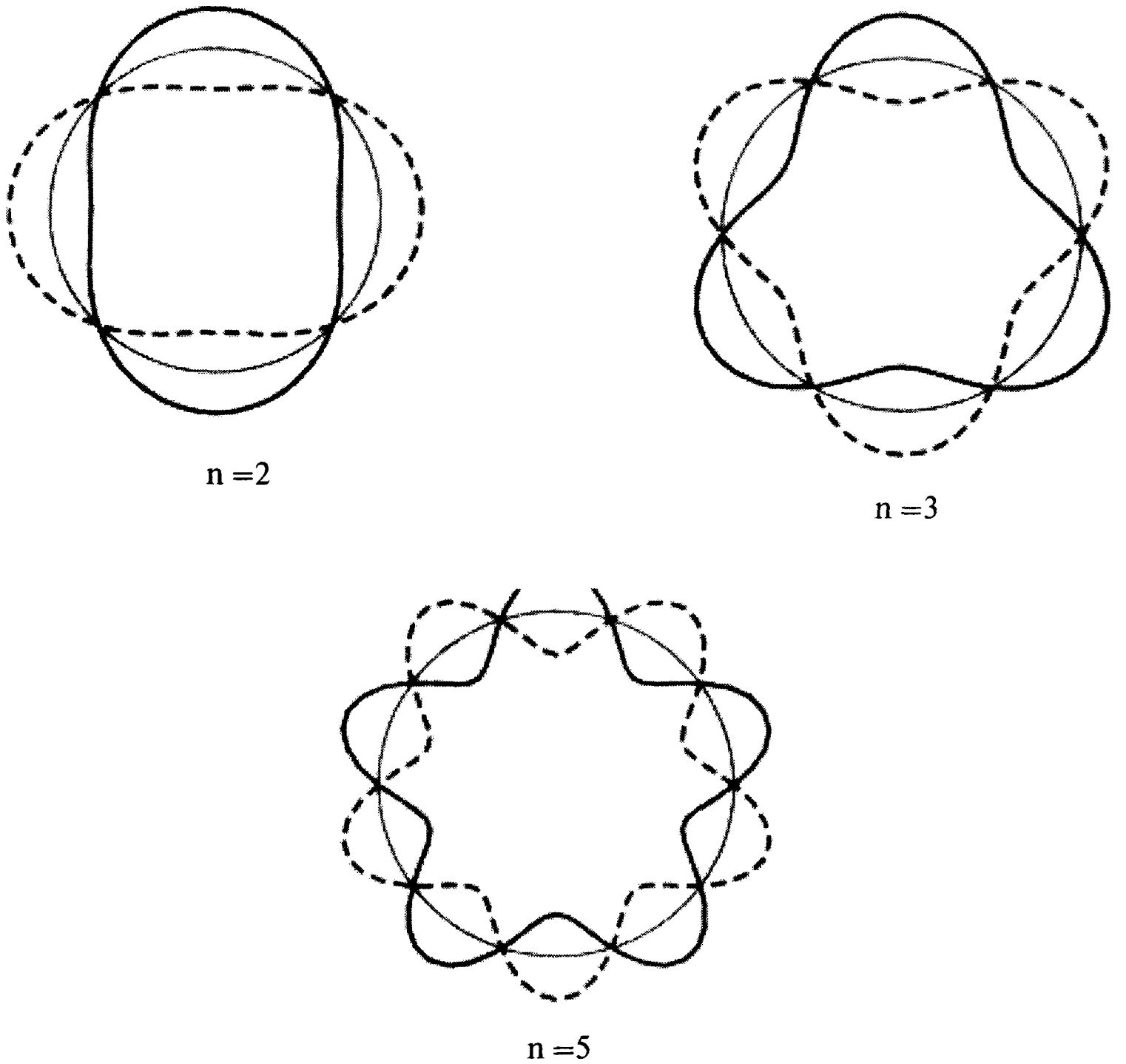
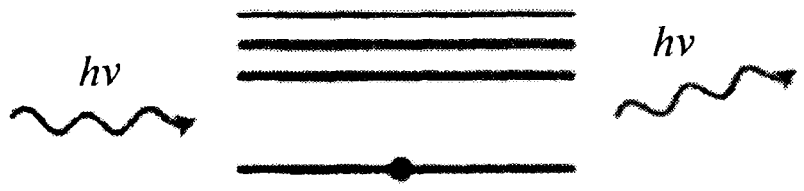


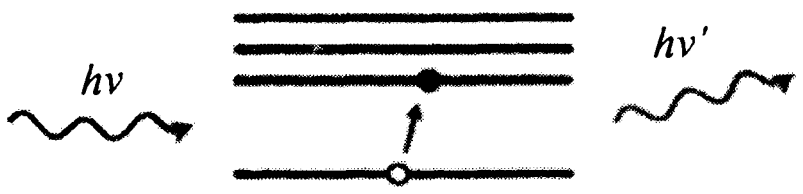
Рис. 1.35. Энергетические уровни в модели Бора соответствуют орбитам, длина окружности которых кратна дебройлевской длине волны электрона λ_e. Стоячие волны на орбите радиусом r описываются уравнением $2\pi r = n\lambda_e$. Для других радиусов электронные волны в результате интерференции вычитаются, и стоячая волна не возникает. Увеличение величины n соответствует возрастанию энергии электрона.

Дискретная природа энергетических уровней приводит к нескольким интересным явлениям, наблюдаемым при взаимодействии фотона с атомом. Пусть фотон имеет частоту ν, а его энергия равна $h\nu$. Если эта энергия недостаточна для перехода электрона в более высокое энергетическое состояние (рис. 1.36а), атом остается в основном состоянии, и фотон упруго рассеивается. Если длина волны фотона ($\lambda = c/\nu$) превышает размер атома, упругое рассеяние описывается классической теорией Рэлея, согласно которой вероятность рассеяния света пропорциональна $1/\lambda^4$.

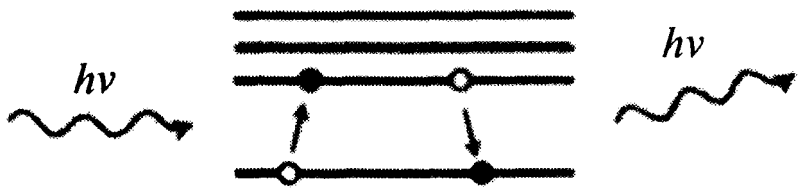
Если энергия перехода из основного в первое возбужденное состояние равна ΔE, а падающий фотон имеет именно такую энергию, происходит «*резонансное поглощение*» фотона, и электрон переходит в возбужденное состояние. Через некоторое время электрон возвращается в основное состояние и испускает фотон, энергия которого равна энергии первичного фотона. Это называют «*спонтанным излучением*». Фаза вторичного фотона не коррелирует с фазой исходного фотона.



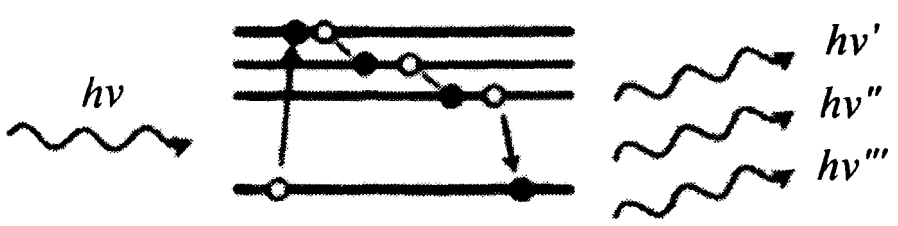
(a) Упругое рассеяние



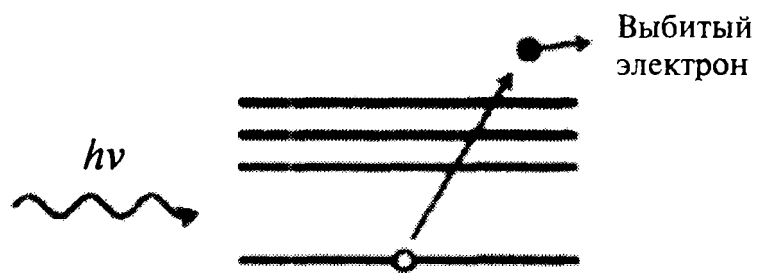
(b) Неупругое рассеяние



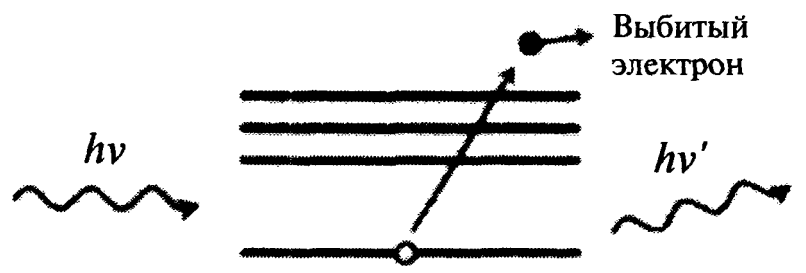
(c) Резонансное поглощение



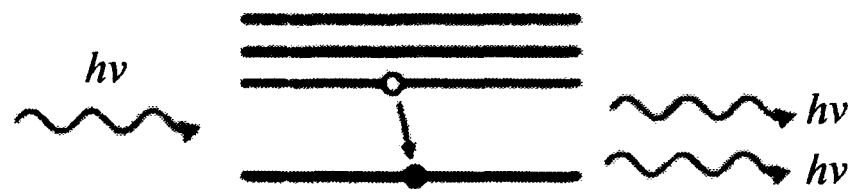
(d) Флуоресцентное излучение



(e) Ионизация и фотоэффект



(f) Комптоновское рассеяние



(g) Вынужденное излучение

Рис. 1.36. Разрешенные энергетические состояния электрона описываются линиями. Самая низкая линия соответствует основному состоянию электрона. Для перехода на более высокий уровень необходима энергия. На диаграммах приведены различные типы взаимодействия света и материала, (a) – упругое рассеяние, (b) – неупругое рассеяние, (c) – резонансное поглощение, (d) – флуоресцентное излучение, (e) – ионизация и фотоэффект, (f) – комптоновское рассеяние, (g) – вынужденное излучение.

Если энергия фотона достаточна для перехода электрона на более высокий энергетический уровень (рис. 1.36b), то фотон «неупруго рассеивается» и передает атому энергию ΔE. Частота вторичного фотона v_f не равна энергии первичного фотона:

$$hv_f = hv - \Delta E \tag{1.49}$$

Этот эффект был впервые описан Раманом* и получил название комбинационного рассеяния. В западной литературе его называют рамановским рассеянием. В современной спектроскопии комбинационное рассеяние играет важную роль. Более подробно оно описано в главе 5.

---

* Одновременно с советским оптиком Мандельштамом. – *Прим. редактора перевода.*

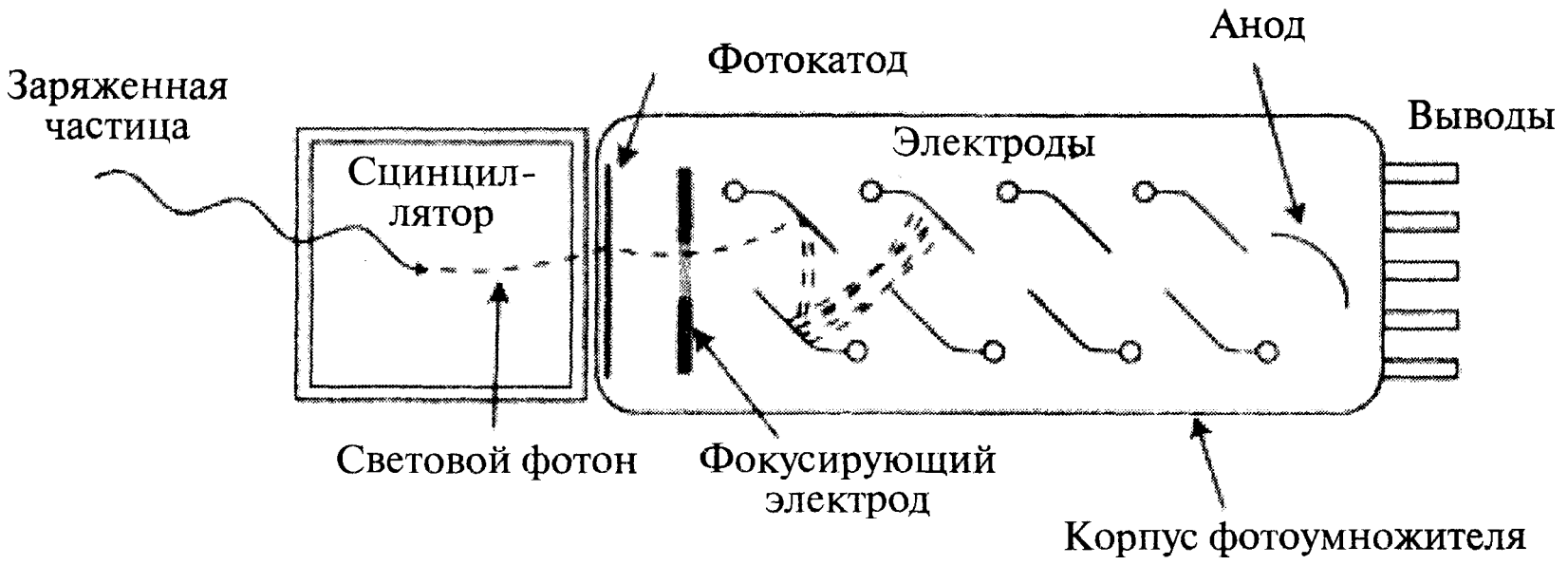


Рис. 1.37. Фотоумножитель является одним из важнейших электронных устройств. На поверхность стекла наносят тонкую пленку, называемую фотокатодом. Когда на фотокатод попадает фотон, из него выбивается электрон. На ряд металлических сеток подается постепенно возрастающий потенциал. Самый высокий потенциал подается на анод. Выбитый из фотокатода электрон ускоряется электрическим полем, и он выбивает из ближайшего электрода несколько вторичных электронов. Количество электронов лавинообразно возрастает, и на аноде возникает короткий импульс тока, величина которого определяет число фотонов, попавших на фотокатод. Как и сцинциллятор, излучающий фотоны при попадании частиц большой энергии, фотоумножитель можно использовать для регистрации высокоэнергетичных частиц.

Если энергия фотона превышает ΔE, то электрон может перейти на второй или более высокий возбужденный энергетический уровень (рис. 1.36c). После этого (за время порядка 10^{-8} с) атом возвращается в основное состояние, проходя через несколько промежуточных состояний. При каждом переходе излучается фотон. Этот процесс называют флуоресценцией. Некоторые атомы и молекулы существуют в возбужденном состоянии в течение миллисекунд, секунд и даже дольше. В этом случае процесс называют люминисценцией. На этом явлении основана работа экрана электронного осциллографа.

Если энергия фотона еще выше, электрон может покинуть атом (без испускания фотона), приводя к его ионизации. Это явление называют фотоэффектом. Он характеризуется наличием критической энергии фотона, ниже которой фотон не способен выбить электрон. Фотоэффект описывается уравнением:

$$E_e = h\nu - W \tag{1.50}$$

Величину W называют работой выхода электрона. Она представляет минимальную энергию, требуемую для выбивания электрона. Если энергия фотона превышает W, выбиваемый электрон имеет энергию E_e. На фотоэффекте основано действие очень чувствительного измерительного устройства – фотоумножителя, схема которого приведена на рис. 1.37.

Фотон падает на фотокатод, нанесенный на стеклянную подложку, и выбивает из него электрон. Электрон ускоряется электрическим полем в направлении первого электрода (его потенциал выше, чем у катода) и выбивает из него сразу несколько вторичных электронов. Как следствие, количество электронов лавинообразно возрастает по мере движения между соседними электродами вплоть

до достижения последнего электрода, называемого анодом. На аноде электроны создают импульс тока, который может быть обработан соответствующей электроникой для определения числа фотонов, попавших на фотокатод. В настоящее время наиболее чувствительные фотоумножители способны регистрировать одиночные фотоны, и некоторые микроскопы имеют специальный режим работы, называемый «*подсчетом фотонов*». Обратим внимание, что в этом режиме работы фотоумножитель является датчиком, измеряющим число фотонов, падающих на его поверхность за некоторый период времени. При его помощи можно создать 2D-изображение сканированием фотоумножителя по поверхности образца, как описано в главе 3. Отметим, что на катоде электроны могут выбиваться не только фотонами, но и другими частицами.

1.3.9. Источники электромагнитного излучения

Космические объекты создают изображение в телескопе, поскольку они или излучают (звезды), или отражают свет (например, Луна, планеты и искусственные спутники). В материаловедении материалы с естественным свечением практически не встречаются. Поэтому образец нужно осветить, чтобы свет, прошедший через него или отраженный от его поверхности, создал изображение. Освещение образца должно быть однородным.

Раньше единственным источником искусственного света были свечи, и поэтому единицей измерения уровня освещенности довольно долго была «*свеча*». К настоящей революции в микроскопии привело изобретение электрической лампы, являющейся надежным и мощным источником света (рис. 1.38). Освещенность образца можно увеличить, расположив источник в фокусе сферического зеркала.

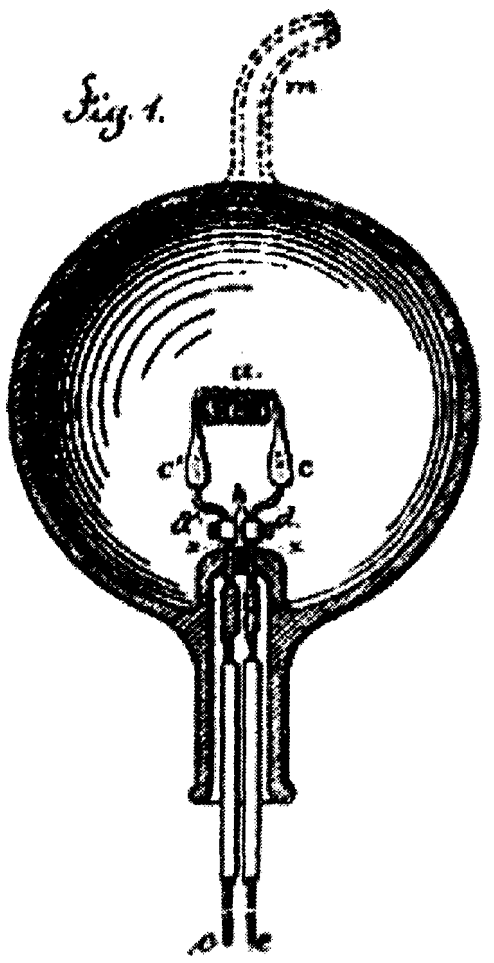


Рис. 1.38. Первым источником искусственного света была электрическая лампа Эдисона, запатентованная 27 января 1880 года.*

---

* Первым источником искусственного света была электрическая лампочка П.Н. Яблочкова, изобретенная в 1875 г. и запатентованная во Франции в 1876 г. – *Прим. редактора перевода*.

В современных микроскопах часто используют лазерное освещение. Действие лазера основано на эффекте вынужденного излучения. Если атом находится в возбужденном состоянии и взаимодействует с фотоном, энергия которого равна разнице энергий возбужденного и основного состояний атома, может произойти «*вынужденный переход*». При этом испускаемый фотон имеет одну фазу с первичным фотоном. Если этот процесс происходит в миллиардах возбужденных атомов, когерентный световой луч постепенно увеличивает свою мощность. Атомы в лазере возбуждают при помощи световой вспышки высокой энергии (рис. 1.39). Возбужденный электрон переходит в основное состояние, и излучается фотон с той же частотой и фазой, что и первичный фотон. Эти фотоны многократно отражаются зеркалами, находящимися в торцах лазера. Таким образом, излучение усиливается и создается когерентный и коллимированный луч. Одно из зеркал частично прозрачное и пропускает часть падающих фотонов.

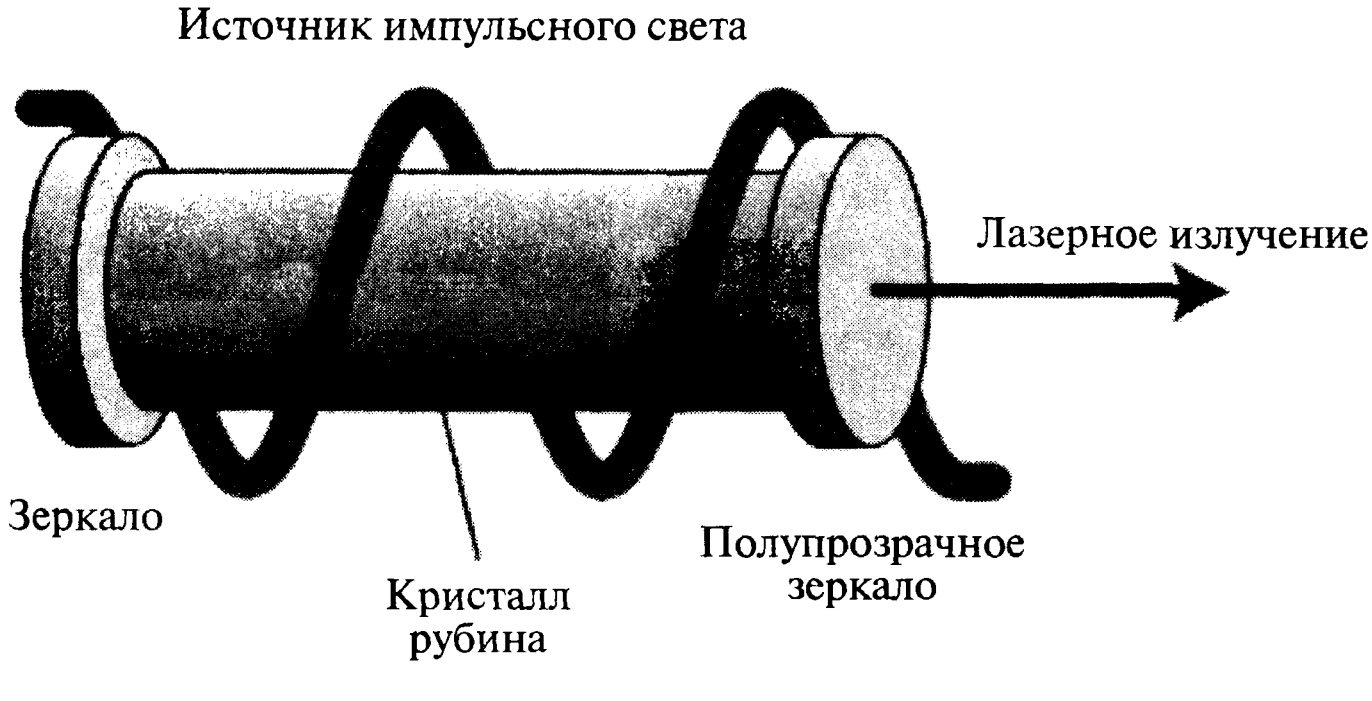


Рис. 1.39. Схема рубинового лазера. Под действием мощной вспышки света электроны переходят в возбужденное метастабильное состояние. Свет многократно отражается от торцов кристалла и инициирует вынужденные переходы электронов в основное состояние. Вынужденное излучение постепенно усиливается и проходит через полупрозрачное зеркало в торце кристалла.

1.4. Конструкция микроскопа

Выше обсуждалось взаимодействие света с плоскими и неплоскими поверхностями и отверстиями. Существуют микроскопы, увеличивающие изображение, используя лишь отражение (параграф 1.4.5). В настоящее время такие микроскопы используют только для ультрафиолетового и инфракрасного света (из-за их поглощения стеклом). Однако в большинстве микроскопов используются преломляющие линзы.

1.4.1. Линзы

Сначала мы рассмотрим естественную линзу, которой является глаз. На рис. 1.40 показано поперечное сечение глаза. Мускулы способны изменять кривизну глаза и, как следствие, изменять его фокусное расстояние. Эта способность к «аккомодации» позволяет нам рассматривать объекты, находящиеся на различных расстояниях от глаза. Спектральная чувствительность глаза определяет видимый интервал электромагнитного спектра (длиной волны от 380 до 760 нм). Анализ лучевых диаграмм показывает, что на сетчатке глаза формируется перевернутое изображение внешнего мира. Однако наш мозг обрабатывает его и создает прямую (неперевернутую) картину мира!

Мелкие объекты видны невооруженным глазом тем лучше, чем ближе они к глазу. Однако глаз не способен создать ясное изображение объекта, если он находится ближе расстояния наилучшего видения, зависящего от возраста человека. Обычно считают, что расстояние наилучшего видения равно 25 см. На этом расстоянии легко различаются объекты размером приблизительно 300 мкм. Чтобы обнаружить более мелкие объекты, нужна увеличивающая линза или микроскоп.

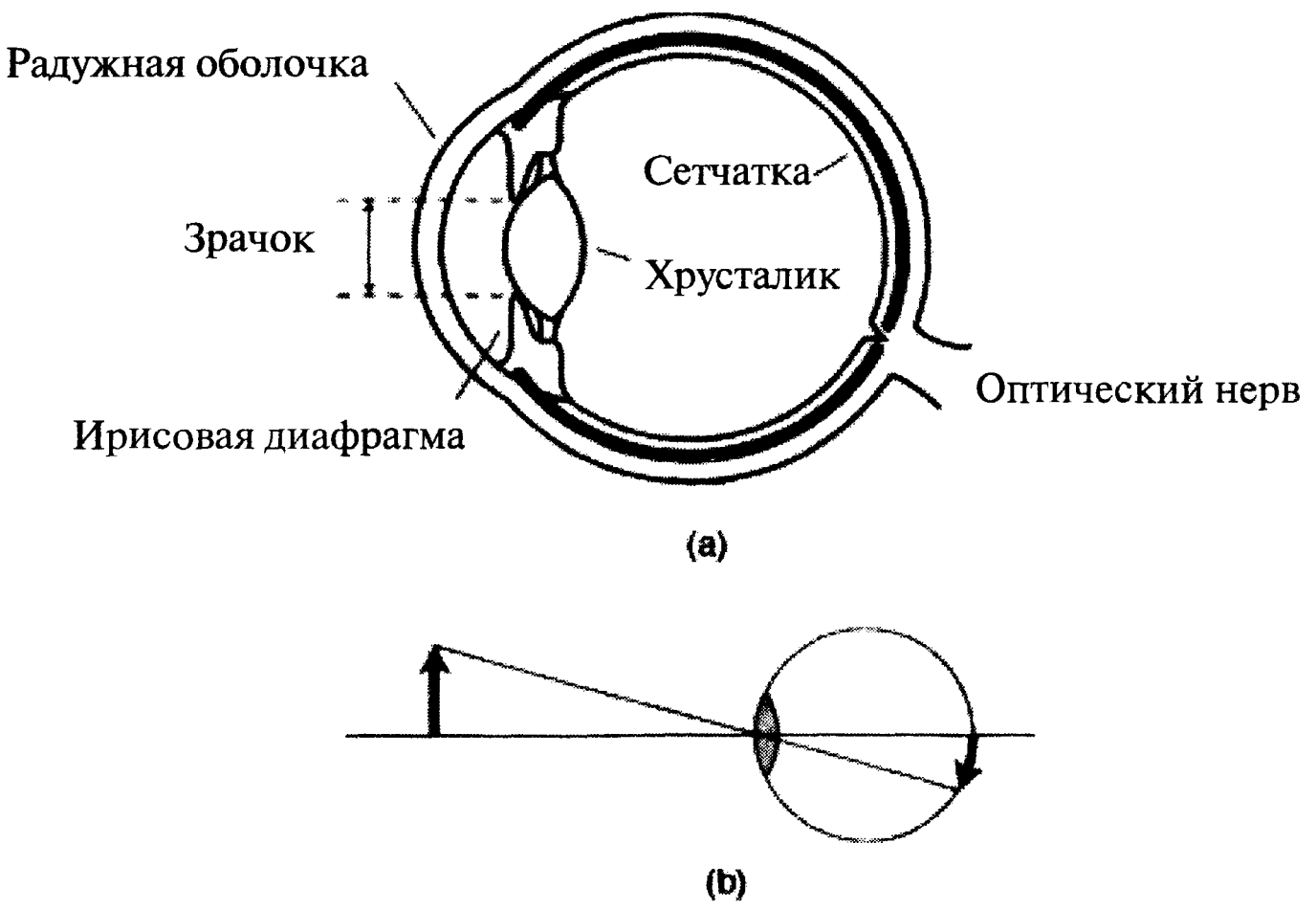


Рис. 1.40. (a) – Глазное яблоко представляет собой линзу, поддерживаемую мускулами, способными изменять ее кривизну. Линза создает изображение на светочувствительных палочках и колбочках на сетчатке глазного яблока. Зрачок регулирует количество света, входящего в глаз. (b) – На сетчатке создается перевернутое изображение внешнего мира.

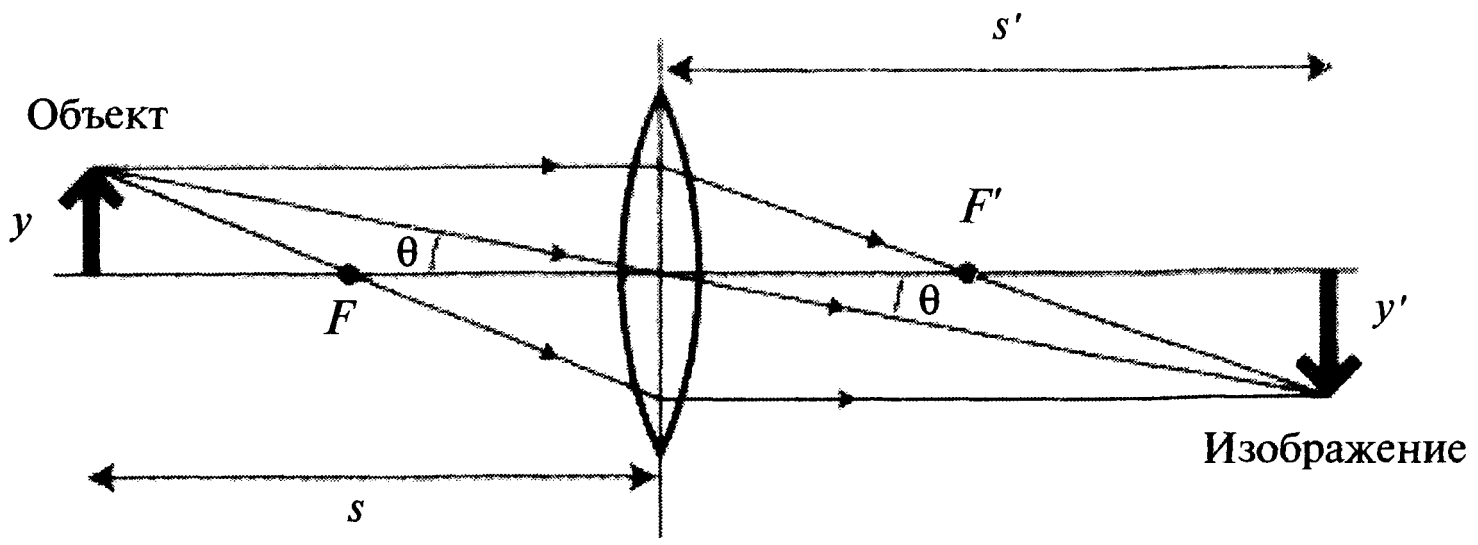


Рис. 1.41. Изображение точечного объекта можно построить с помощью лучевой диаграммы, показанной на рис. 1.22. Положение изображения можно определить также с помощью формулы тонкой линзы $1/s + 1/s' = 1/f$, где f – фокусное расстояние. Размер изображения можно определить, вычислив увеличение.

Уже древние греки поняли, что зеркало позволяет увеличить плотность солнечной энергии. Викинги имели линзы, о чем свидетельствуют найденные в раскопах стеклянные поделки в форме линз. Письменные подтверждения этого отсутствуют. Первым линзу начал систематически изучать арабский ученый и философ Алхасен, живший в XI столетии [9].

Для построения изображения, формируемого собирающей линзой, можно использовать лучевую диаграмму (рис. 1.41). Но еще удобнее это сделать с помощью формулы тонкой линзы. Для тонкой стеклянной линзы эта формула имеет вид:

$$1/s + 1/s' = 1/f = P = (n - 1)\,(1/r_1 - 1/r_2), \qquad (1.51)$$

где P – оптическая сила линзы (измеряемая в диоптриях или $м^{-1}$), f – фокусное расстояние, s и s' – расстояния до объекта и изображения, n – показатель преломления стекла, r_1 и r_2 – радиусы кривизны передней и задней поверхностей линзы. Чтобы эту формулу можно было применять не только для собирающей, но и для рассеивающей линзы, нужно использовать соответствующий знак фокусного расстояния, показанный в таблице 1.3.

В оптической системе изображение может быть действительным или мнимым. Если в плоскость мнимого изображения поместить экран, изображение на нем не появится. Например, изображение нашего лица в зеркале расположено за зеркалом. Однако на экране, помещенном за зеркалом, оно, очевидно, не появляется. Напротив, если в плоскость действительного изображения поместить экран, изображение на нем возникнет. Например, в фотоаппарате фотопленку помещают в плоскость реального изображения.

Положение изображения можно найти с помощью лучевой диаграммы, точка пересечения линий которой определяет плоскость изображения. Для линзы нужно рассмотреть три луча. Первый из них параллелен оси, а два других проходят через фокусы линзы. Положительная (собирающая) линза имеет утолщение в ее середине, а отрицательная (рассеивающая) – тоньше в середине, как показано на рис. 1.42.

Отметим, что линза может быть сложной и состоять из нескольких линз с малым фокусным расстоянием. Такие линзы используют в окулярах микроскопа. Исследуемый объект помещают на фокусном расстоянии от линзы, в результате

чего получают увеличенное мнимое изображение, которое рассматривают глазом с расстояния наилучшего видения. «*Оптическая сила*» (или *поперечное увеличение*) характеризует эффективность линзы. Ее определяют как отношение угловых размеров изображения и объекта, помещенного на расстоянии наилучшего видения от глаза.

Поперечное увеличение тонкой линзы описывается формулой:

$$M = y'/y = s/s', \tag{1.52}$$

где y' и y – размеры изображения и объекта. Отрицательное увеличение означает, что изображение перевернуто. Чтобы применять эту формулу и для рассеивающих линз, им приписывают некоторый знак (таблица 1.3).

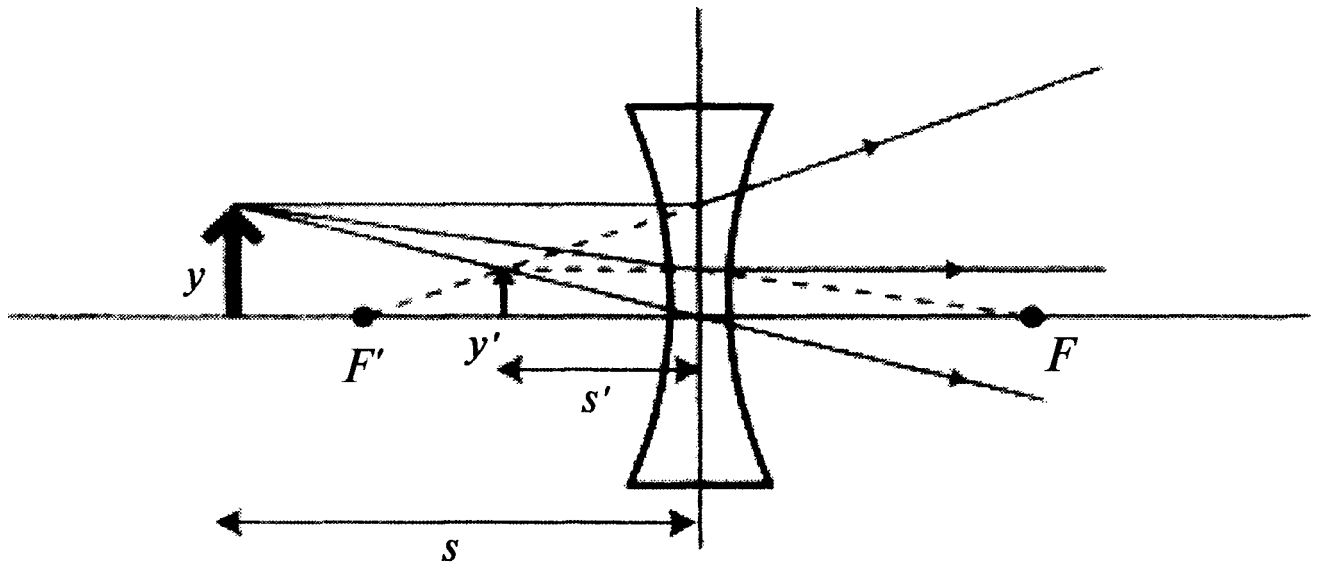


Рис. 1.42. Для определения положения уменьшенного изображения, полученного при помощи рассеивающей линзы, также можно использовать лучевые диаграммы. При использовании формулы тонкой линзы необходимо учитывать знак линзы.

Таблица 1.3. Знаки тонких линз и сферических поверхностей

Параметр	Знак	
	+	–
r_1	Выпуклая (передняя поверхность)	Вогнутая (передняя поверхность)
r_2	Вогнутая (передняя поверхность)	Выпуклая (передняя поверхность)
f	Собирающая линза	Рассеивающая линза
y	Прямой объект	Перевернутый объект
y'	Прямой объект	Перевернутый объект
M	Прямой объект	Перевернутый объект

На рис. 1.43 показано увеличение собирающей линзы в зависимости от расстояния до объекта. Для удобства расстояние от линзы до изображения считали равным расстоянию наилучшего видения. Увеличение линзы описывается формулой:

$$M = 1 + l_n / f, \tag{1.53}$$

где l_n – расстояние наилучшего видения и f – фокусное расстояние линзы.

Геометрическая оптика позволяет построить увеличенное изображение, но не объясняет причины ухудшения его качества в связи с дифракцией света. Чтобы описать разрешение (возможность различить две точки) и контраст изображения, необходимо использовать теорию дифракции.

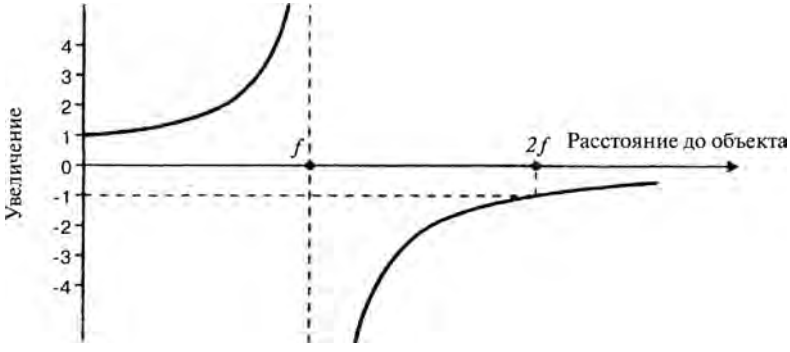


Рис. 1.43. Зависимость увеличения собирающей линзы от расстояния до объекта. Для определения увеличения использовали формулы (1.51) и (1.52). При приближении к фокусу резко возрастает увеличение. В фокусе изображение не формируется. Отрицательное увеличение при больших расстояниях до объекта соответствует перевернутому изображению.

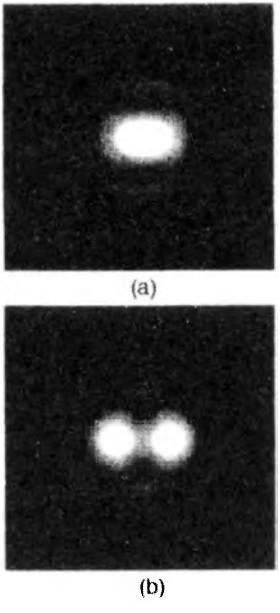


Рис. 1.44. Первую попытку определить пространственное разрешение оптической системы предпринял Рэлей. Он рассмотрел дифракционные картины двух близко расположенных точечных источников. По Рэлею, две близко расположенные точки перестают различаться, когда нулевой максимум интенсивности изображения одной точки совпадает с первым минимумом интенсивности второй точки (a). Если точки расположены дальше, два пятна Эри ясно различимы (b). В этом случае два источника разрешены и можно построить цифровое изображение.

Разрешение оптического прибора лимитируется дифракцией света. Когда свет, прошедший через небольшое отверстие, проектируется на экран, наблюдается не просто яркое пятно, как в геометрической оптике, а ряд концентрических светлых и темных колец вокруг яркого центрального пятна (рис. 1.30). Если два отверстия поместить близко друг к другу, как на рис. 1.44, создаваемыми ими дифракционные картины накладываются. Размер центрального дифракционного пятна ограничивает пространственное разрешение соседних точек. Дифракция ограничивает разрешение и в случае линзы. Рэлей предложил критерий, определяющий минимальное расстояние d_{min} между двумя точечными источниками, при котором они все еще разрешаются (т.е. не сливаются) на экране. Предел разрешения достигается, когда центр дифракционного пятна одного точечного источника накладывается на первое темное кольцо дифракционной картины второго источника. Таким образом, разрешающая способность линзы описывается формулой:

$$d_{min} = \frac{1,22\lambda}{2n \sin \alpha}, \tag{1.54}$$

где λ – длина световой волны. Величину $n \sin \alpha$ называют числовой апертурой линзы (NA).

Идеальное воспроизведение объекта ограничено тем, что в объектив микроскопа попадает не весь свет от объекта, а лишь некоторая его часть (рис. 1.45). Как следствие, некоторая часть информации теряется. Кроме того, для идеального воспроизведения объекта все световые лучи должны пройти одинаковый оптический путь и иметь одинаковую фазу. Поскольку оба эти условия не могут быть выполнены, изображение несовершенно.

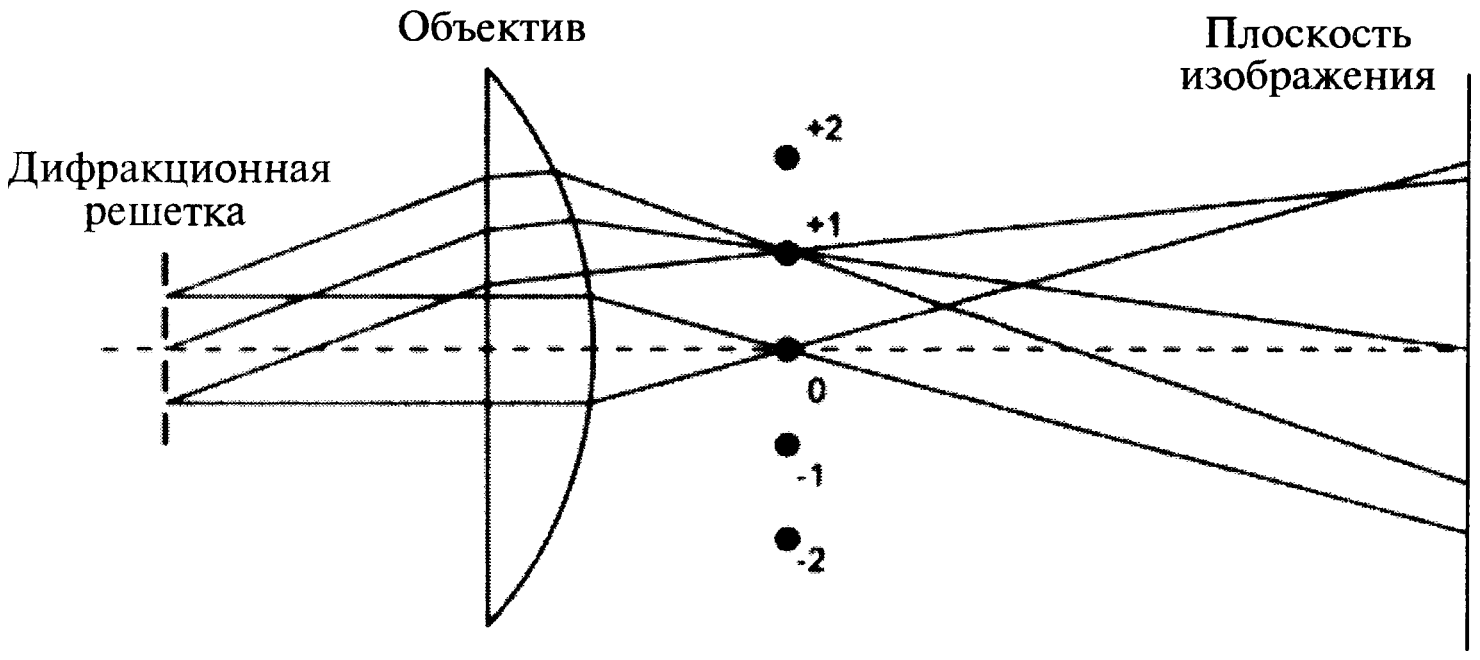


Рис. 1.45. Чтобы проиллюстрировать неидеальность создаваемого линзой образа, рассмотрим изображение дифракционной решетки. Показанные лучи соответствуют нулевому и первому дифракционному максимумам. Линза собирает в фокусной плоскости параллельные лучи, соответствующие максимумам различного порядка. Из-за конечности своего углового размера она способна сфокусировать лишь несколько первых максимумов. Поэтому изображение воспроизводится лишь несколькими первыми дифракционными максимумами и не является точной копией объекта. Обратим внимание, что дифракционные максимумы в фокусной плоскости можно фильтровать.

1.4.2. Микроскоп

Хотя увеличительные стекла изготавливались в Пизе (Италия) уже в конце тринадцатого столетия, изобретение очков приписывают Роджеру Бэкону, францисканскому монаху и преподавателю Оксфордского университета XIII века. Любопытно, что в то время никто не пытался поместить одну линзу перед другой с целью создания телескопа или микроскопа.

Каково различие между оптическим телескопом и микроскопом? В телескопе реальное изображение, созданное объективом (с большим фокусным расстоянием f_o), формируется в задней фокальной плоскости. Окуляр телескопа размещают так, чтобы это изображение оказалось в его передней фокальной плоскости, как показано на рис. 1.46. В отличие от телескопа, объектив микроскопа имеет очень короткое фокусное расстояние. Рассматриваемый объект помещают очень близко к фокусу объектива, чтобы расстояние до изображения было намного больше фокусного расстояния. Промежуточное изображение объекта является реальным и увеличенным. Его рассматривают через окуляр, который повторно увеличивает изображение, как показано на рис. 1.47.

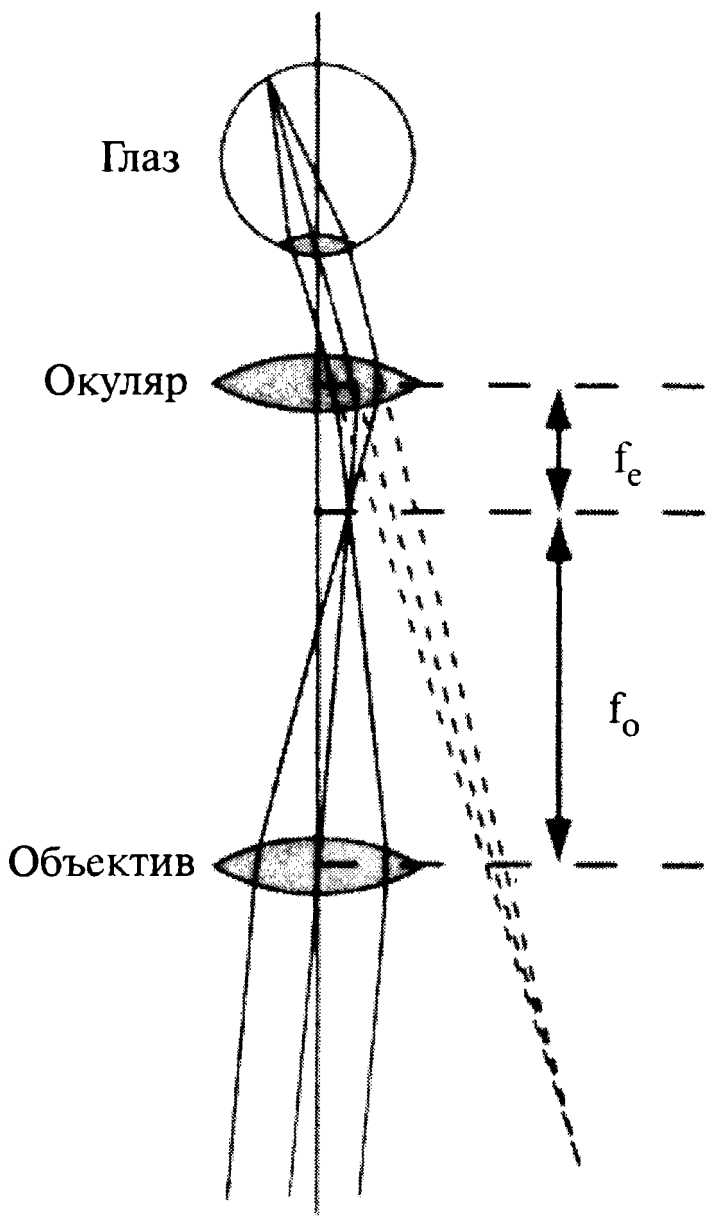


Рис. 1.46. Из двух собирающих линз можно сделать телескоп. Параллельные лучи от звезд сходятся в фокусной плоскости объектива, совпадающей с передней фокусной плоскостью окуляра. Увеличение такой системы равно $M = \theta_e/\theta_o = -f_o/f_e$, где f_o и f_e – фокусные расстояния объектива и окуляра. В телескопе объектив является длиннофокусным, а окуляр – короткофокусным. Окуляр действует подобно простой лупе, в которую рассматривают реальное изображение, формируемое объективом.

Есть соблазн увеличивать изображение объекта до бесконечности, добавляя дополнительные линзы. Однако французский ученый Аббе[1] показал, что из-за волнового характера света невозможно различить особенности, расстояние между которыми меньше длины волны. Поэтому использование слишком большого количества линз ведет к бесполезному увеличению.

Телескопы имеют большой диаметр, поскольку они должны собирать достаточное количество света от удаленных неярких звезд. Микроскоп же должен иметь максимальное разрешение. В оптическом микроскопе яркость изображения достигается за счет использования интенсивного источника света. Отраженный (или прошедший) свет собирают при помощи объектива с большим значением числовой апертуры NA, характеризующей долю собираемого света.

Изобретение микроскопа приписывают голландскому драпировщику Энтони ван Левенгуку, жившему в XVII веке. Левенгук создал простейший микроскоп, состоящий из двух крошечных линз-бусинок в металлической оправе, которую подносили к глазу. Умение и терпение Левенгука были таковы, что разрешающая способность его микроскопа была значительно выше, чем у большинства более сложных микроскопов, построенных в XVIII столетии! Изобретение телескопа приписывают Галилею (в 1610 году).

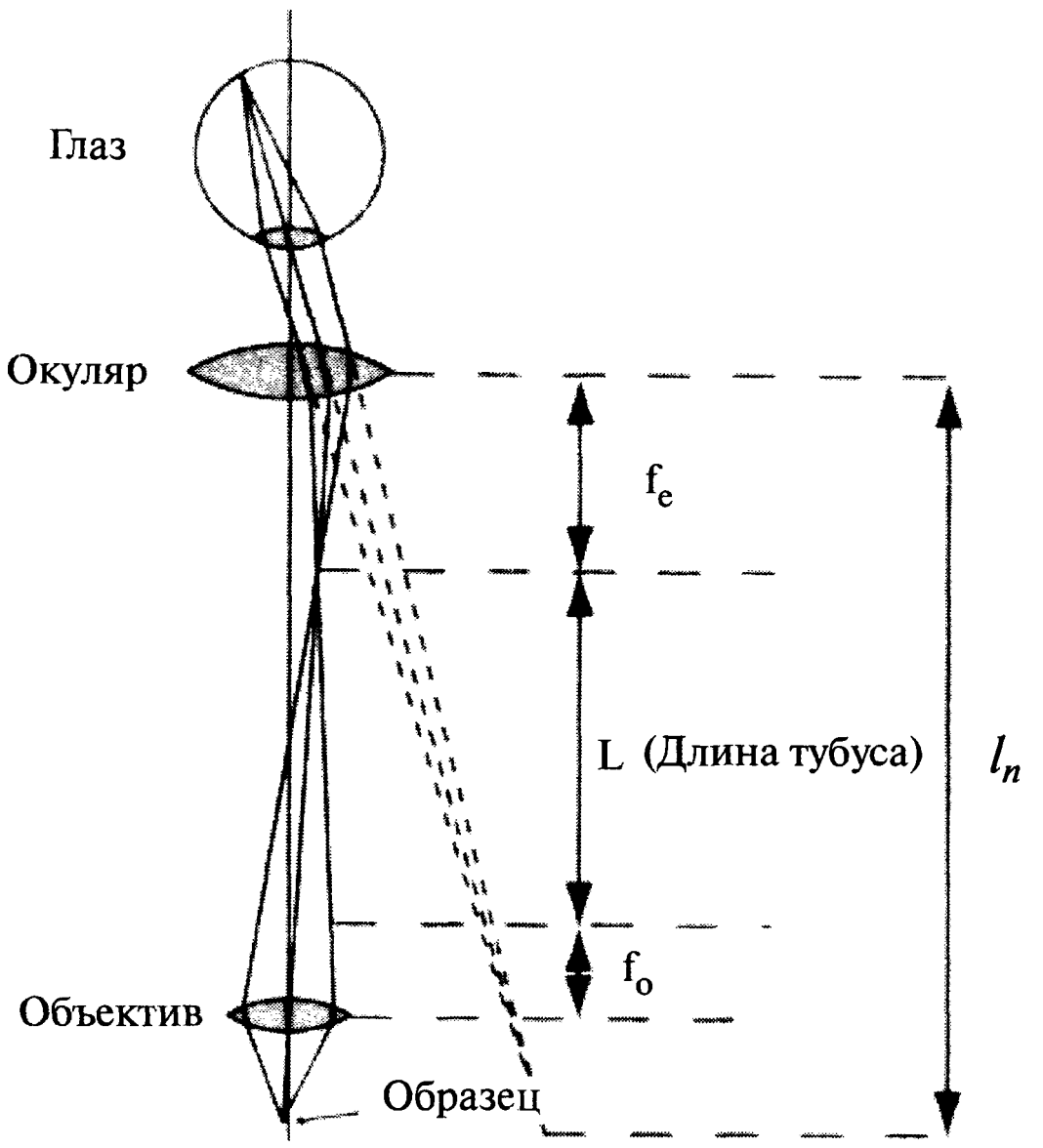


Рис. 1.47. Простейший микроскоп состоит из двух собирающих линз. Короткофокусный объектив с фокусным расстоянием f_o создает реальное изображение на небольшом расстоянии L от фокусной плоскости. Это изображение рассматривают через окуляр с фокусным расстоянием f_e, причем конечное изображение находится на расстоянии наилучшего видения l_n от глаза. Увеличение микроскопа равно $M = -L\, l_n / f_o f_e$.

---

[1] Физик и математик Эрнст Аббе открыл свой закон, работая на предприятии Карла Цейсса в Германии в 1872 г.

Уже первые микроскопы, появившиеся в XVII веке, поразили воображение ученых того времени. В 1660 году Марчелло Мальпиги использовал микроскоп для подтверждения теории Вильяма Харви о циркуляции крови, рассматривая поток крови в кровеносных капиллярах лягушки. После этого в течение следующих 200 лет практически все микроскопы имели специальные пластинки, позволявшие наблюдать циркуляцию крови рыб и лягушек. Вопросы, занимавшие микроскопистов XVII века, описаны в трактате «Micrographia» Роберта Гука [10], изданном в 1651 году. Важнейшими техническими проблемами микроскопов того времени были хроматическая и сферическая аберрации объективов, а также недостаточная жесткость корпуса и тубуса.

Объектив микроскопа фокусируют на образец, полученное промежуточное изображение рассматривают в окуляр и получают увеличенное реальное изображение (рис. 1.47). Поскольку яркость изображения обратно пропорциональна квадрату числовой апертуры, она обратно пропорциональна квадрату увеличения. Отметим, что во флуоресцентном микроскопе отраженного света яркость обратно пропорциональна четвертой степени числовой апертуры.

Увеличение микроскопа равно произведению поперечного увеличения объектива и углового увеличения окуляра:

$$M = -\frac{Ll_n}{f_o f_e}, \tag{1.55}$$

где L – длина тубуса микроскопа (равная расстоянию между задним фокусом объектива и передним фокусом окуляра), l_n – расстояние наилучшего видения, f_o и f_e – фокусные расстояния объектива и окуляра соответственно.

Если между линзой и образцом находится воздух, максимальное значение величины $n \sin \alpha$ равно единице, но на практике числовая апертура NA редко превышает 0,85[1] . В микроскопии часто используют иммерсионные объективы, погружаемые в жидкость[2] (рис. 1.48). Поскольку показатель преломления масла или другой иммерсионной жидкости (и покровного стекла) выше, чем у воздуха, это позволяет увеличить максимальный угол, под которым лучи от точечного источника попадают в объектив. Следовательно, при использовании иммерсии значение NA выше, чем в случае воздуха. Максимальные значения NA иммерсионных объективов достигают 1,3–1,4 в зависимости от типа иммерсионной жидкости. Обратим внимание, что объектив, предназначенный для работы с определенным типом иммерсии, с другим применять не следует. Объективы микроскопов проходящего света в основном предназначены для работы с покровным стеклом, а объективы микроскопов отраженного света работают без них, и это нужно учитывать при работе.

Яркость изображения определяется количеством попадающего в объектив света, которое пропорционально величине NA. Если объектив сфокусирован на определенную плоскость, то особенности объекта, находящиеся в пространстве немного выше и ниже этой плоскости, оказываются не в фокусе. Диапазон расстояния, на котором особенности объекта выглядят достаточно резко, называют глубиной резкости. Таким образом, плоскость объекта можно считать тонким

---

[1] В серийном производстве последнего поколения микроскопов современные технологии позволяют получать числовую апертуру сухого объектива, равную 0,95.

[2] Иммерсионной жидкостью могут служить масло (n=1,52), глицерин (n=1,47), дистиллированная вода (n=1,33) и т.д.

слоем, в котором все точки находятся в фокусе. Глубина резкости h выражается формулой:

$$h = \pm \frac{\lambda}{4n \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)}, \tag{1.56}$$

где n – показатель преломления изучаемого материала. Глубина резкости различных объективов для длины волны 550 нм приведена в таблице 1.4.

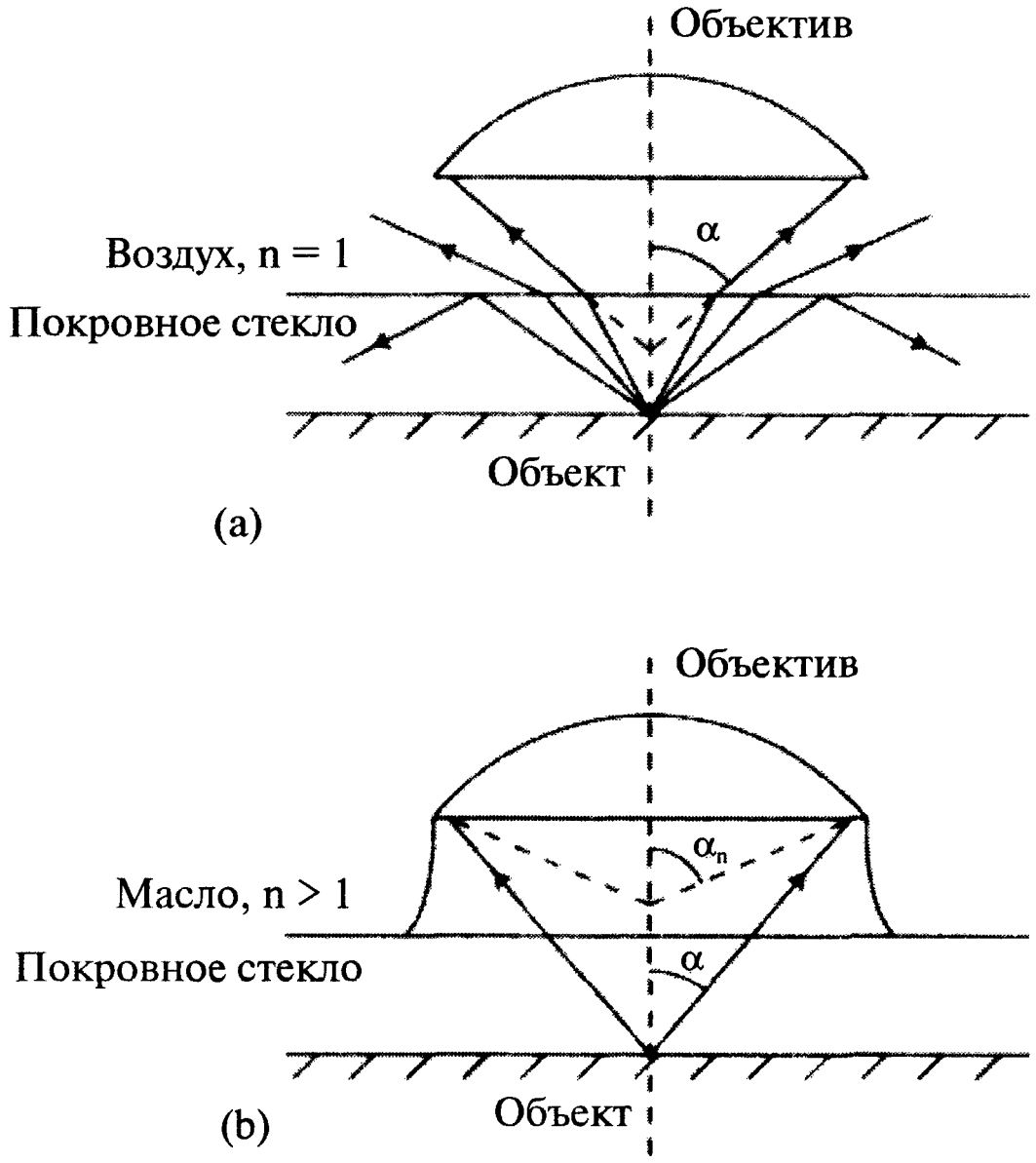


Рис. 1.48. Чтобы не повредить образец, его накрывают покровным стеклом. В этом случае из-за преломления света на границе со стеклом максимальный угол, под которым свет точечного источника попадает в объектив, меньше, чем без покровного стекла (a). Если использовать иммерсионный объектив и согласовать показатель преломления масла с показателем преломления стекла, апертура выше (b).

Поле зрения, т.е. та часть поверхности образца, которая видна в микроскопе, зависит как от объектива, так и от окуляра[1]. Размер изображения может быть ограничен внутренним диаметром тубуса микроскопа (стандартный размер которого равен 23,2 мм)[2], но на практике он обычно ограничивается диаметром окуляра

---

[1] На самом деле ограничение поля видения связано еще и с бинокулярной насадкой. В современных микроскопах объективы рассчитываются на максимальное линейное поле 25 мм (кроме экономичных объективов ограниченных по полю до 20 мм). Это связано с тем, что объективы имеют длину тубуса «бесконечность».

[2] Современный стандарт микроскопии не ограничивается данным размером.

(18 мм)[1]. Таким образом, при десятикратном (10×) увеличении окуляра и увеличении объектива 10× диаметр поля зрения равен 1,8 мм. Если увеличение микроскопа равно 40×, диаметр поля зрения равен 0,45 мм. Отметим, что выпускаются широкопольные микроскопы с диаметром тубуса 30 мм[2], плоскими объективами и широкопольными окулярами. Такие микроскопы особенно удобны для фотографирования.

Таблица 1.4. Глубина резкости различных объективов

Числовая апертура (NA)	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00	1.25
Глубина резкости (мкм) Воздух (n = 1)	56	8.6	2.0	0.81	–	–
Глубина резкости (мкм) (иммерсионный объектив, n = 1,5)	82	13	3.2	1.4	0.73	0.42

Один из наиболее важных вопросов состоит в том, при каком увеличении микроскопист может увидеть все детали объекта? Ответ на него зависит от разрешающей способности глаза. Невооруженный глаз может различить две точки, если угол между ними не меньше одной минуты. Таким образом, на расстоянии наилучшего видения разрешающая способность глаза равна 100 мкм. Чтобы избежать излишнего напряжения глаза, расстояние между двумя точками должно быть в два-три раза больше. Минимальное увеличение, необходимое для разрешения двух точек, равно отношению разрешающей способности глаза (скажем, 300 мкм) к расстоянию между этими точками. Расстояние между двумя точками ограничено длиной волны, и это означает, что оптимальное увеличение находится в интервале от 500× до 1000×. Если используется большее увеличение, снижается количество разрешаемых деталей, а качество изображения ухудшается, поскольку становится заметной дифракционная размытость[3]. Избыточное увеличение называют бесполезным.

1.4.3. Аберрация

До сих пор обсуждались идеальные тонкие линзы. В реальных линзах наблюдаются эффекты, снижающие качество изображения. В середине XVIII века корпус и тубус микроскопа стали делать из меди, и это решило проблему механической жесткости объектива. Серьезным недостатком первых линз была хроматическая аберрация, состоящая в фокусировании волн различной длины (цвета) в различные точки на оптической оси (рис. 1.49а). Причиной этого явления является дисперсия, т.е. зависимость показателя преломления стекла *n* от длины волны λ. Остроумный способ борьбы с хроматической аберрацией линз большого диаметра,

---

[1] В современных микроскопах линейное поле окуляра 10х, равное 18 мм, является минимальным. В основном это поле 20 мм, 23 (22) мм и 25 мм.

[2] В современных микроскопах это является обычным.

[3] Появляется так называемая вуаль, которая снижает контраст изображения.

используемых в оптических телескопах, был найден семьей Доллондов. Для этого они использовали комбинацию стекол марок крон и флинт и сделали двойную ахроматическую линзу, изображенную на рис. 1.49b. Эта идея была воспринята амстердамским изготовителем инструментов Гарманусом Ван Дэйжлом, который в конце XVIII столетия начал делать маленькие микроскопные ахроматические линзы. Это снизило хроматическую аберрацию, но не устранило сферической аберрации, состоящей в несовпадении фокусов для лучей, находящихся на различном расстоянии от оси линзы, как показано на рис. 1.50.

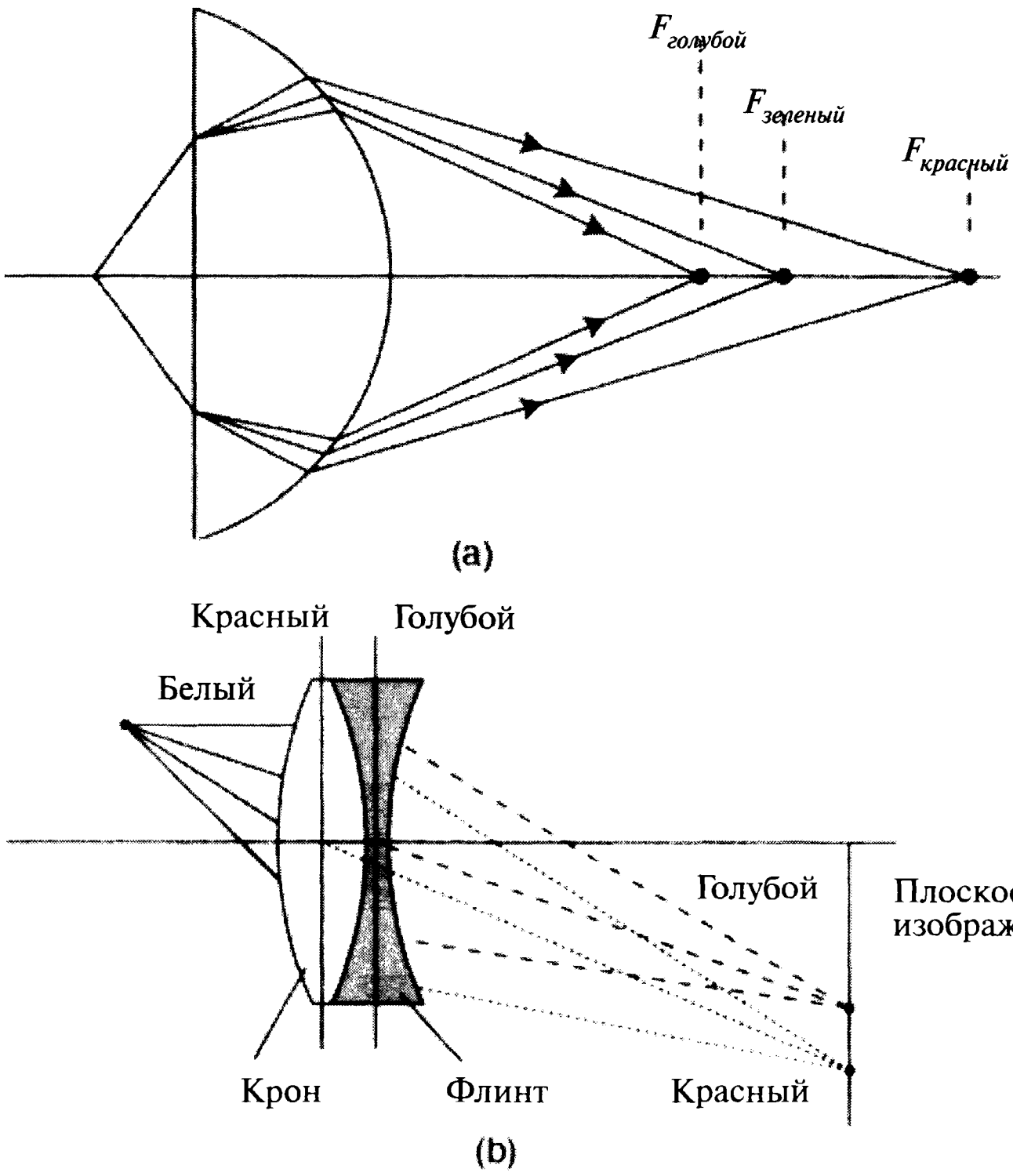


Рис. 1.49. (a) – Хроматическая аберрация линзы. Из-за дисперсии (зависимости показателя преломления от длины волны) лучи различного цвета при прохождении через линзу преломляются по-разному (рис. 1.12b), и положение плоскости изображения является размытым. Решение этой проблемы состоит в создании двойной ахроматической линзы, состоящей из собирающей линзы из стекла крон и рассеивающей линзы из флинта (b). Это позволило избавиться от продольной хроматической аберрации, но поперечная сферическая аберрация лучей, идущих под большими углами к оси, сохранилась.

В 1820–1830 годах изготовители микроскопов интенсивно работали над проблемой устранения сферической аберрации. Они заложили основу создания составных микроскопных линз и начали делать микроскопы отраженного света. Главный шаг к устранению сферической аберрации был совершен в 1830 году

Джозефом Листером, который использовал комбинацию двух ахроматических линз, расположенных на некотором расстоянии друг от друга [11]. Это привело к тому, что оптический микроскоп в Викторианскую эпоху стал важнейшим инструментом в медицине и материаловедении. Снижение сферической и хроматической аберраций позволило достичь теоретического предела разрешения оптического микроскопа. Разработчики микроскопов увеличили жесткость тубуса микроскопа и начали использовать грубую и точную фокусировку. В 1860 году появились бинокуляры, в результате чего использование микроскопа стало менее утомительным. Микроскопы продавали в больших сундуках красного дерева, в которых размещалось до 100 принадлежностей. На континенте больших успехов добились немецкие производители микроскопов Карл Цейсс в Йене и Ернст Лейц в Ветцларе [12].

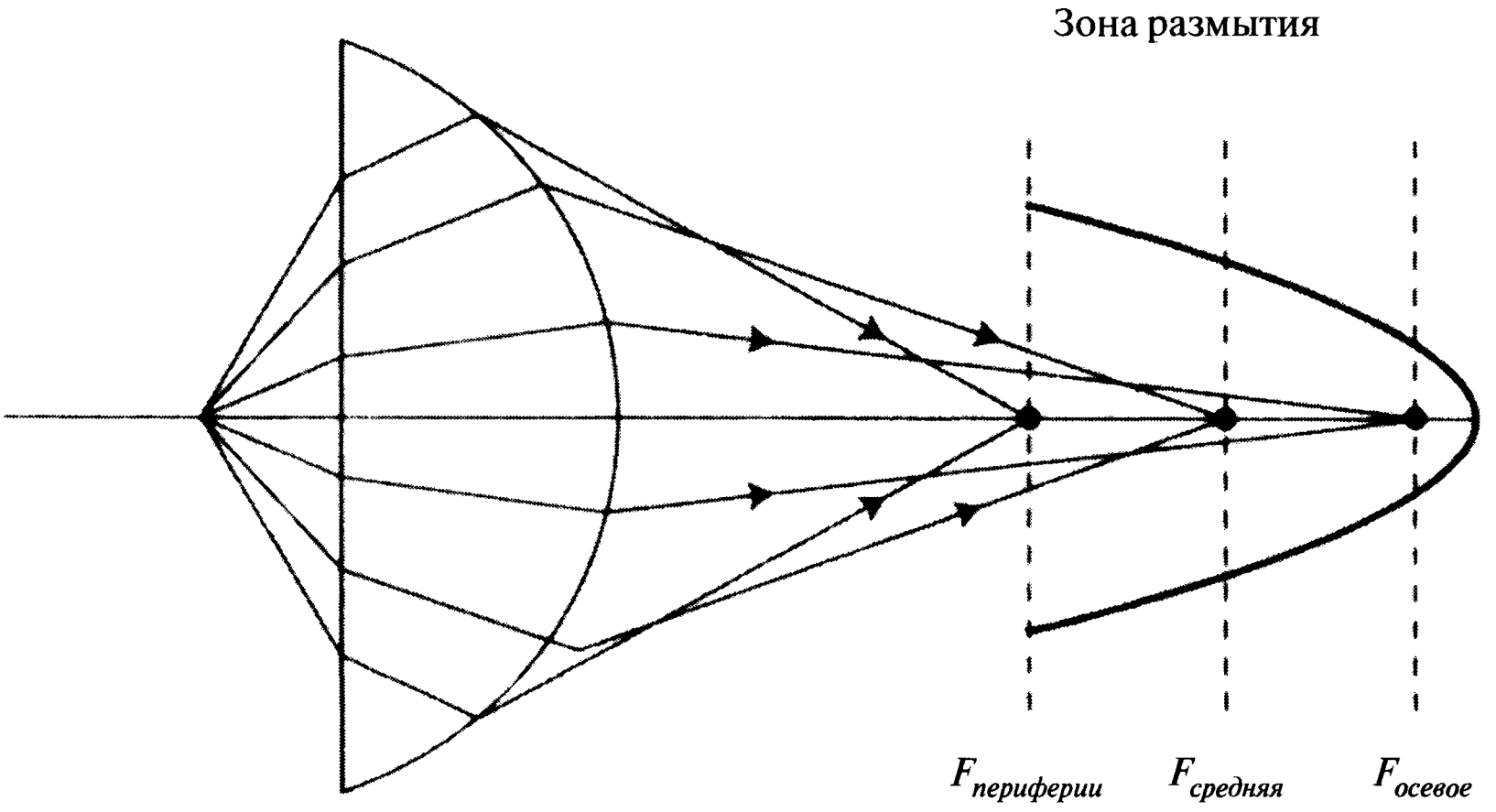


Рис. 1.50. Сферическая аберрации линзы обусловлена тем, что лучи на периферии линзы преломляются сильнее лучей, проходящих вблизи оси. Этот эффект можно компенсировать изменением профиля линзы, но обычно для этого используют составные линзы.

На объективе обычно имеется маркировка, позволяющая установить его тип. Например, если на корпусе написано «0,17», толщина покровного стекла должна быть равна 0,17 мм. Там же описана числовая апертура NA. Кроме этого, может иметься надпись «160» или «∞». Надпись «160» означает длину тубуса микроскопа, 160 мм соответствует расстоянию от опорной плоскости объектива, т.е. края револьверного устройства (гнезда куда ввинчивается объектив), до опорной плоскости окуляра, т.е. верхнего среза окулярной трубки бинокулярной насадки. Если на объективе имеется символ «∞», вместо фокусирования изображения в плоскости изображения «160» в тубусе создается параллельный пучок. Такие объективы называются объективами, исправленными на «бесконечность». Их нужно использовать вместе со специальной линзой (тубусной), фокусирующей луч в плоскость изображения окуляра.

С открытием фотографии в середине XIX века на многих микроскопах появились фотоприставки, для которых желательно широкопольное изображение и,

соответственно, широкоугольный объектив. В этом случае тубус микроскопа должен иметь увеличенный диаметр (обычно 30 мм). Имеется два типа широкоугольных объективов: планахроматы и планапохроматы. Они имеют весьма сложную конструкцию. Например, планахромат с увеличением 100x и числовой апертурой 1,3 состоит из десяти линз, а аналогичный планапохромат – из четырнадцати, как показано на рис. 1.51. Надпись «Planapo» на объективе является сокращением слова «планапохромат». Она означает, что объектив ахроматичен для четырех цветов[1] и не имеет сферической аберрации (рис. 1.52). Надпись «PlanFl»[2] означает, что объектив имеет частичную компенсацию хроматической аберрации для четырех длин волн, но она менее строгая, чем у Planapo. Как следствие, эти объективы дешевле.

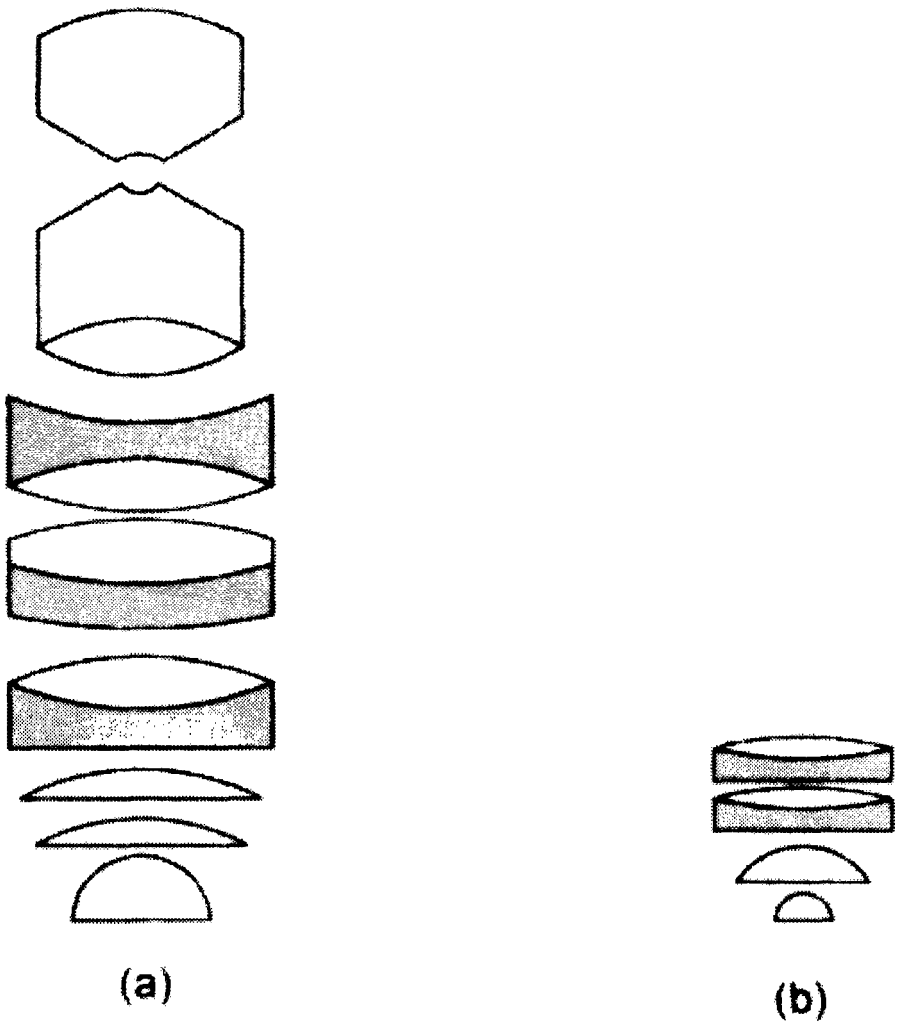


Рис. 1.51. Конструкция некоторых современных объективов. (a) – Иммерсионный апохроматический объектив для работы с плоским объектом; (b) – более простой и дешевый иммерсионный ахроматический объектив. Он сконструирован таким образом, чтобы аберрация была не слишком сильной, поле зрения было достаточно большим, а цена не слишком высокой.

Для микроскопа большое значение имеет качество осветительной системы, включающей конденсор. Осветительная система должна удовлетворять трем требованиям:

1. Обеспечивать максимальное разрешение и контраст изображения.
2. Просто регулироваться.
3. Поле зрения должно быть равномерно освещено.

---

[1] Обычно речь идет о трех длинах волн – синяя, зеленая, красная.

[2] Указанные обозначения устарели. В современных микроскопах FL обозначает люминесцентный объектив. Флюоритовая же система, о которой идет речь, обозначается полностью, например, Fluar, Fluotar. В сложной буквенной аббревиатуре, как, например, в японских микроскопах, это может быть буква F.

Этим требованиям отвечают две схемы осветительной системы. Схема первой приведена на рис. 1.53. Она состоит из крупного источника света S и конденсорной линзы С, создающей изображение источника в плоскости объекта. Числовая апертура NA конденсора должна быть не меньше, чем у объектива. Вторую систему называют системой Келера (рис. 1.54). Она состоит из небольшого, но мощного источника света, помещенного в фокус линзы, и конденсора, как и предыдущая система.

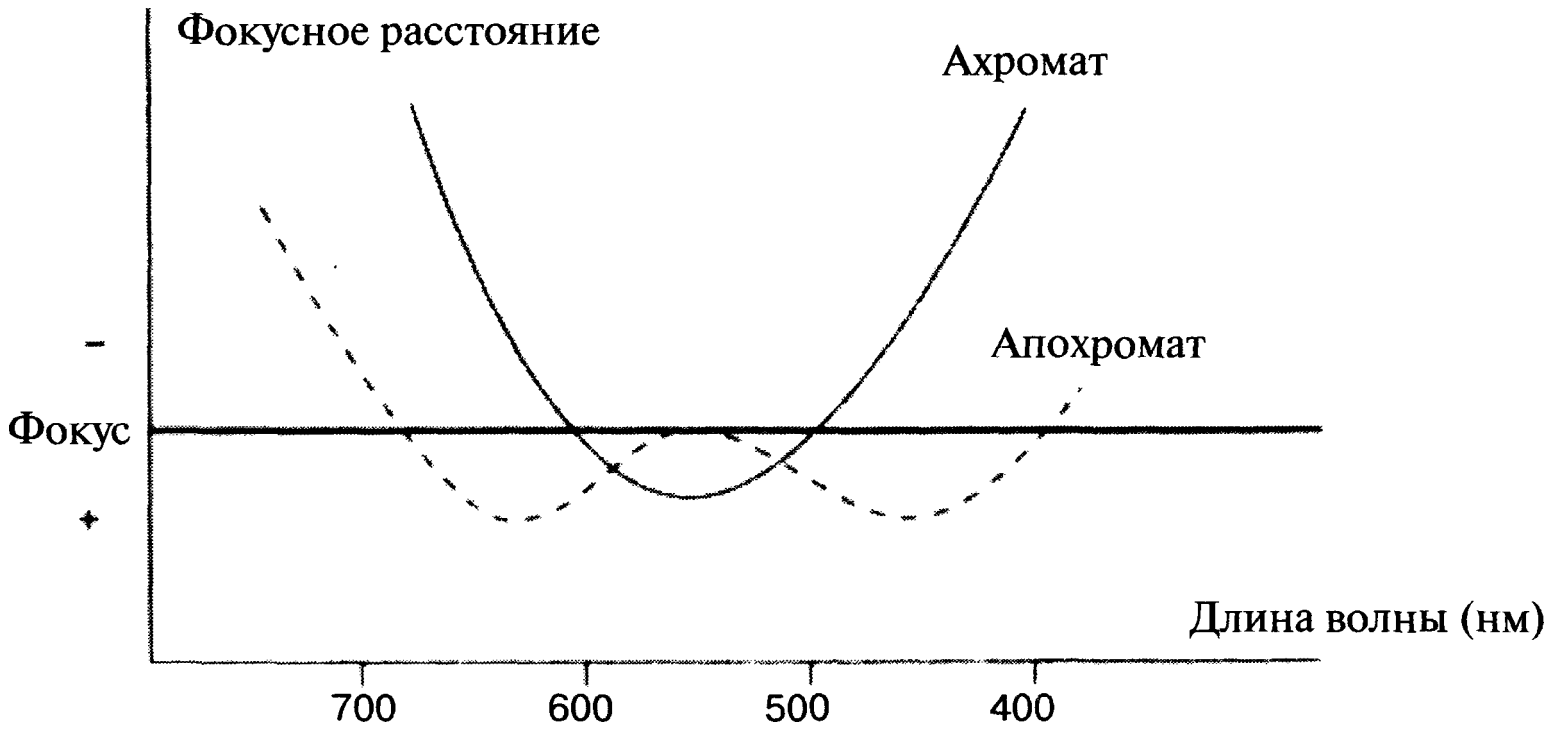


Рис. 1.52. Фокусное расстояние ахроматического объектива пропорционально квадрату длины волны. Хроматическая аберрация апохроматического объектива значительно меньше, чем у ахроматического. Он идеален для получения цветных микрофотографий.

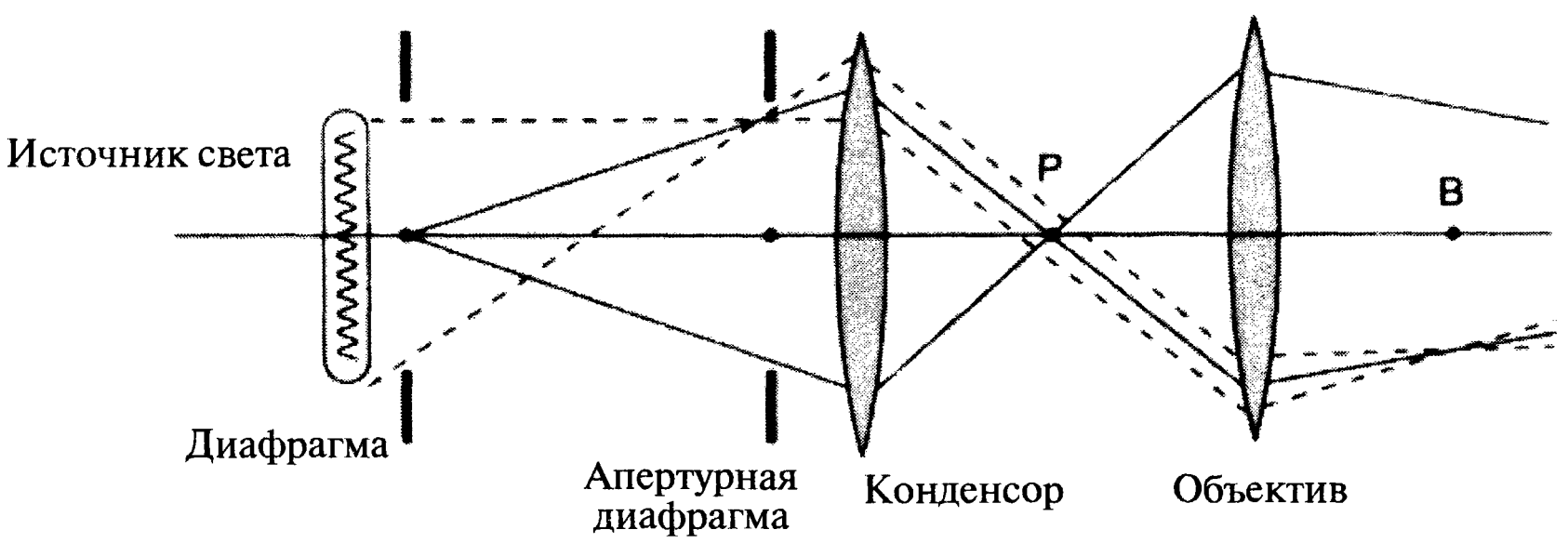


Рис. 1.53. Конденсор создает изображение источника света в плоскости изображения объекта. Изображение диафрагмы также формируется в задней фокусной плоскости объектива В.

Образец можно рассматривать как через тонкое покровное стекло, так и без него. Мягкий биологический образец с неровной поверхностью можно зажать между двумя покровными стеклами. В этом случае естественно использовать иммерсионный объектив с большим увеличением (имеющий малую глубину резкости). Если на объективе написано «NCG» или «NC»[1] , он предназначен для работы

[1] Эта аббревиатура относится к японским микроскопам. В микроскопах Цейсс работа с объектами без покровного стекла вводится в маркировке объектива сразу после длины тубуса «∞/0» или обозначается приставкой «Epi» (ф. Цейсс, ЛОМО) или буквой «N» (ф. Лейка) перед типом оптической коррекции.

без покровного стекла. Обратим внимание, что объективы микроскопов отражающего света почти всегда предполагают работу без покровного стекла.

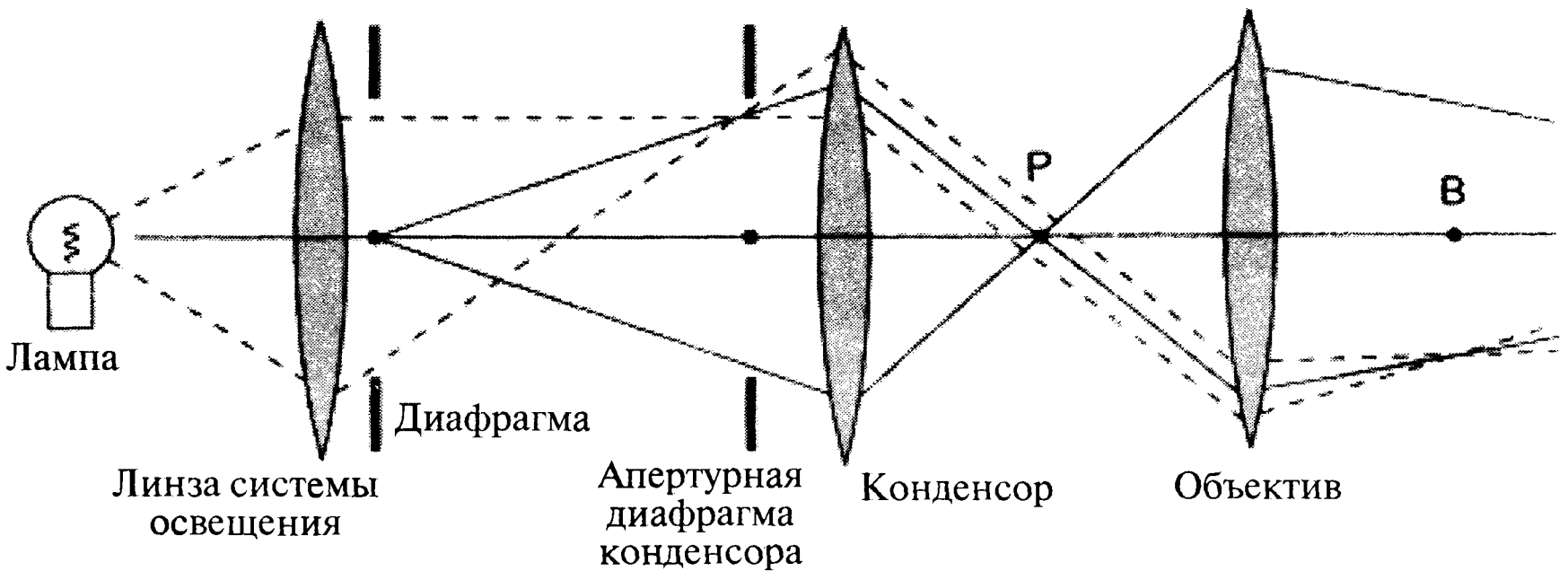


Рис. 1.54. В системе освещения Келера используется источник света малого размера. Хорошо настроенная линза системы освещения создает изображение источника в плоскости диафрагмы конденсора. Диафрагма находится в передней фокусной плоскости конденсора. Эта система освещения позволяет использовать небольшой, но интенсивный световой источник. Задняя поверхность линзы освещения действует как однородно-освещенный протяженный источник света.

Самым важным элементом микроскопа является объектив. Он может быть предназначен для работы на воздухе или быть иммерсионным, когда между ним и объектом помещается жидкость типа масла или воды. В этом случае на корпусе объектива написано «МИ», «oel» и нанесено черное кольцо. Аналогично, надпись «WI» означает, что объектив предназначен для работы в воде. Водоиммерсионные объективы достаточно дорогие и используются в основном в биологии и медицине[1].

На некоторых объективах имеется надпись «UV». Она указывает, что объектив сделан из специального стекла и работает в ультрафиолетовой области спектра (длина волны менее 400 нм). Их применяют для возбуждения в люминесцентных микроскопах отраженного света[2].

При выборе объектива нужно учитывать его рабочее расстояние. Этот параметр особенно важен для конфокальных микроскопов, в которых он ограничивает глубину проникновения (глава 4). Рабочее расстояние объектива – это расстояние от его передней плоскости[3] до покровного стекла (или поверхности образца, если стекло не используется) при условии, что образец находится в фокусе. Описание объективов и их рабочих расстояний приведено в таблице 1.5.

---

[1] Однако и в микроэлектронике также могут использоваться объективы водной иммерсии.

[2] Подобные объективы могут работать и в специальных микроскопах для микроэлектроники и в ультрафиолетовых микроскопах.

[3] Под понятие «передняя плоскость» может подходить как первая поверхность фронтальной линзы, так и поверхность металлической оправы, которая может выступать на 0,10–0,05 мм от линзы. Для расчетчика оптической системы это первая поверхность линзы; для тех, кто работает на микроскопе, – это поверхность оправы, т.е. рабочее расстояние – это свободное расстояние. В описаниях иногда указывается Free, т.е. свободное.

Парфокальным расстоянием[1] называют расстояние от опорной плоскости объектива (края гнезда револьверного устройства, в которое вкручивается объектив), до образца при условии, что он находится в фокусе. В современных микроскопах оно равно 45 мм.[2] При стандартном парфокальном расстоянии легко менять объективы практически без потери фокусировки, вращая их в револьверном устройстве. Набор объективов с различным увеличением, при смене которых не теряется фокусировка, называют *парфокальным*. Отметим, что такие объективы обычно имеют различную габаритную длину. Если после смены объектива деталь объекта (например, перекрестие), находящаяся в центре поля зрения, остается в центре, то такие объективы называют *пароцентричными*.

Таблица 1.5. Рабочее расстояние различных объективов

Тип объектива	Увеличение M	Числовая апертура (NA)	Рабочее расстояние (мм)
Epiplan (воздух)	50x	0,5	7,00
Epiplan (воздух)	100x	0,75	3,00
Achroplan (вода)	40x	0,75	1,98
Achroplan (вода)	63x	0,90	1,45
Achroplan (вода)	100x	1,00	1,00
Planapo (вода) с покровным стеклом и покрытием	40x	1,20	0,22
Planapo (масло) с покровным стеклом	100x	1,40	0,10
Planapo (масло)	60x	1,40	0,17

Некоторые «сухие» объективы с увеличением в диапазоне от 20x до 60x имеют встроенную корректирующую оправу, при вращении которой изменяется расстояние между внутренними линзовыми элементами. Корректировка устраняет сферическую аберрацию, возникающую, если толщина покровного стекла слегка отличается от стандартного значения. Диапазон коррекции обычно лежит в интервале 0,11 – 0,22 мм.

Обычно в микроскопе имеется окуляр. На окуляре, как правило, написано его увеличение и цифры 20 (18), 22 (21, 23) или 26,5 (25). Эти цифры называются «линейное поле»[3] окуляра. Диаметр поля зрения (в мм) рассчитывается делением линейного поля окуляра на увеличение объектива. Следовательно, если увеличение объектива 10x, а окуляр имеет линейное поле 22, то диаметр поля зрения равен 2,2 мм.

На окуляре могут иметься надписи C, K, PL, WF или H. Если объектив не имеет коррекции поперечной хроматической аберрации, нужно использовать окуляр,

---

[1] В стандарте это расстояние называется «высота объектива».

[2] В современных микроскопах фирмы Nikon (Япония) это расстояние равно 60 мм.

[3] Линейное поле окуляра –это размер полевой диафрагмы, расположенной внутри окуляра в плоскости изображения и ограничивающей видимое поле на предмете. Окулярное число – это произведение линейного поля окуляра на его увеличение.

компенсирующий этот недостаток объектива. Буквы С и К означают, что окуляр является компенсационным. Надпись WF указывает, что окуляр широкоугольный. Буква Н свидетельствует, что глаз не обязательно прижимать к окуляру[1] . Это удобно для людей, носящих очки. Фотоокуляр[2] – это окуляр с малым увеличением, проектирующий созданное объективом изображение на плоскость фотопленки. Пониженное увеличение фотоокуляра устраняет проблему бесполезного увеличения на фотопленке.

1.4.4. Оптический микроскоп проходящего света

В этом микроскопе свет источника сначала проходит через образец, а затем попадает в объектив. Существует два типа микроскопов проходящего света. В микроскопах светлого поля в отсутствие образца поле зрения яркое. Из образца свет сразу попадает в объектив. Точки образца, где свет поглощается или рассеивается, выглядят более темными. В микроскопах темного поля освещение боковое, и в отсутствие образца свет в объектив не попадает, как показано на рис. 1.55. Когда свет, рассеянный некоторой точкой образца попадает в объектив, она выглядит яркой на темном фоне. Некоторые объективы имеют встроенную ирисовую диафрагму, которую можно частично закрыть. В этом случае числовая апертура равна меньшему (из двух) значений, написанных на корпусе. Диафрагма позволяет поддерживать на одном уровне фоновую освещенность темного поля. В светлопольном режиме работы ирисовая диафрагма полностью открыта. В материаловедении светлое поле можно использовать только в специальных случаях, например, при изучении тонких прозрачных пленок.

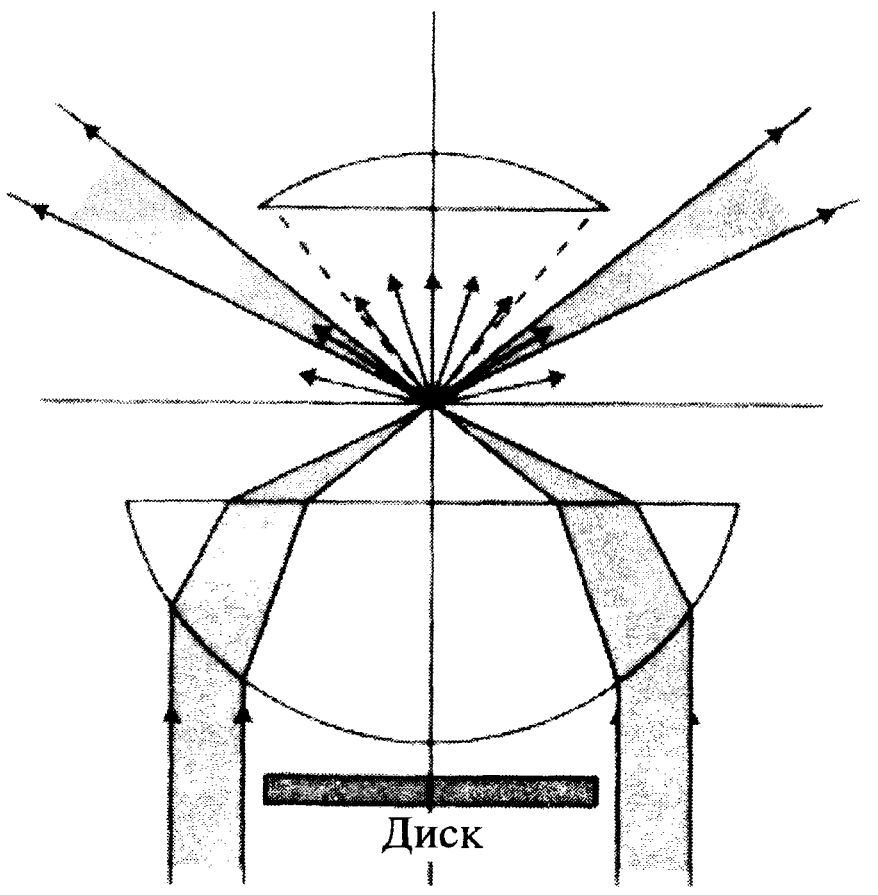


Рис. 1.55. Часто объекты лучше рассматривать в темном поле. В этом режиме работы в центре оптической системы за конденсором устанавливают диск небольшого диаметра, не пропускающий свет, идущий непосредственно от источника. В объектив попадает лишь свет, рассеянный объектом.

---

[1] Дополнительно или вместо этой надписи на корпусе окуляра маркируется знак – очки. Обычно расстояние от таких окуляров до глаза соответствует 15–18 мм.

[2] В современных микроскопах в основном используются цифровые фотоаппараты с объективами.

1.4.5. Оптический микроскоп отраженного света

Существуют микроскопы отраженного света двух типов. В первом для увеличения используют отражающие поверхности, как показано на рис. 1.56. Для увеличения в них используются сферические зеркала, а в тех случаях, когда не удается обойтись без линз, их изготавливают из материалов типа кварца, имеющих низкое поглощение света в интересующих интервалах длин волн.

Микроскопы второго типа используют обычные линзы. Они в научно-исследовательских лабораториях используются очень широко. В настоящее время эти микроскопы имеют базовую конструкцию, позволяющую использовать специальные модули для работы в режимах *темного поля, флуоресцентного света, интерференции, фазового контраста*[1], *суммирования сигнала* и т.д. [13]. Некоторые из них подробно рассмотрены ниже. Базовая конструкция оптического микроскопа отраженного света с компьютерным управлением описана в главе 3.

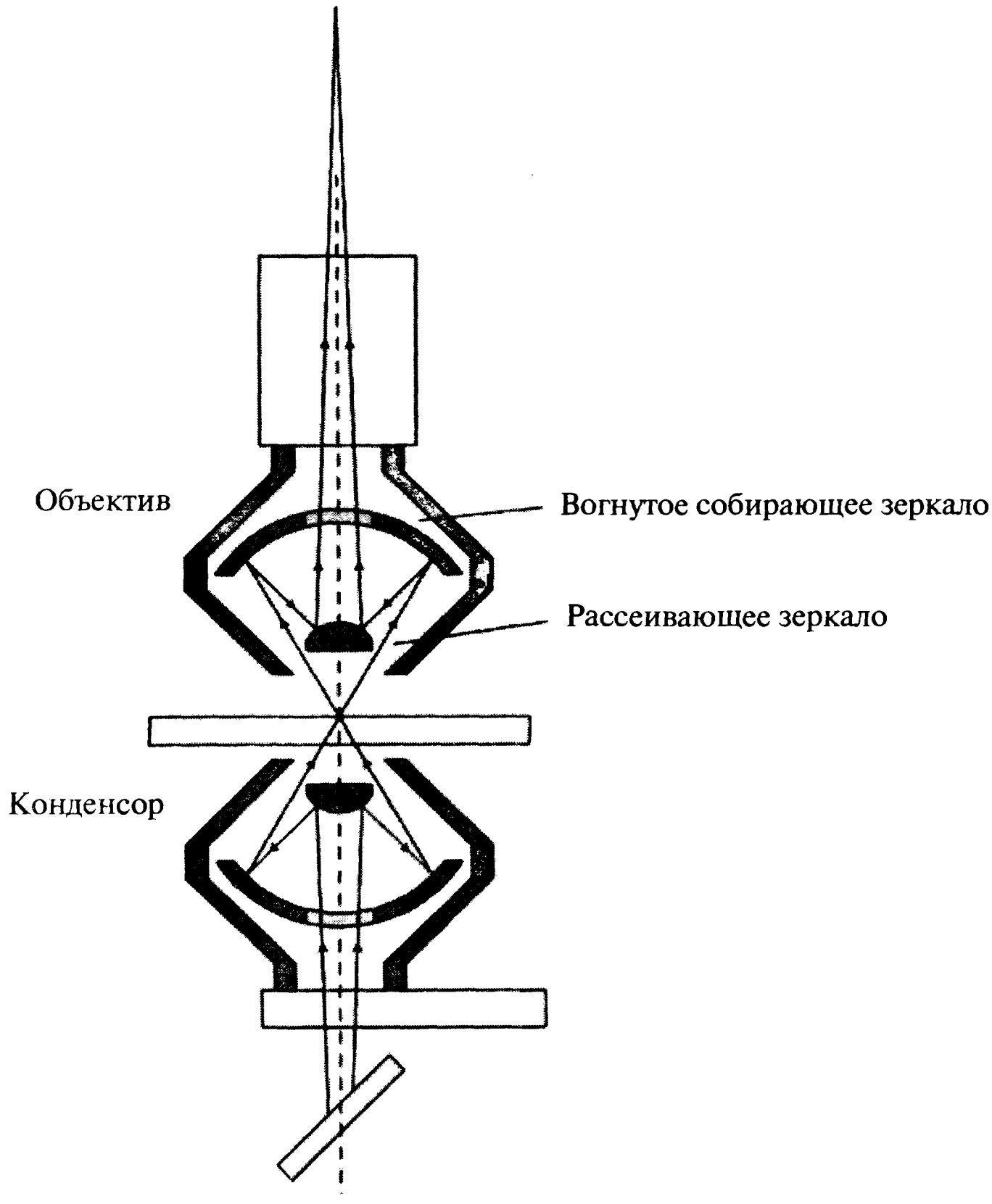


Рис. 1.56. Микроскоп, использующий только отражающие оптические поверхности. Такие микроскопы встречаются не слишком часто, но их можно использовать в диапазонах сильного поглощения света стеклом. В частности, в ультрафиолетовом и инфракрасном свете.

---

[1] В современных микроскопах режим фазового контраста в отраженном свете не используется. Его заменяет дифференциально-интерференционный контраст.

Микроскоп, основанный на отражении от сферических поверхностей, особенно хорош для работы в широком диапазоне длин волны. Другим достоинством микроскопов на основе отражающей оптики является очень большое рабочее расстояние объектива (таблица 1.5). Примером такого микроскопа, часто используемого материаловедами, является Nikon Optiphot. В этом микроскопе объектив действует подобно конденсору. Он имеет возможность регулировки уровня освещения, что позволяет изменять яркость изображения образца. Недостатком таких микроскопов является невысокий контраст изображения. Как следствие, биологам приходится окрашивать образцы.

1.4.6. Флуоресцентный микроскоп

Для использования флуоресцентного микроскопа обязательно должны выполняться два условия:

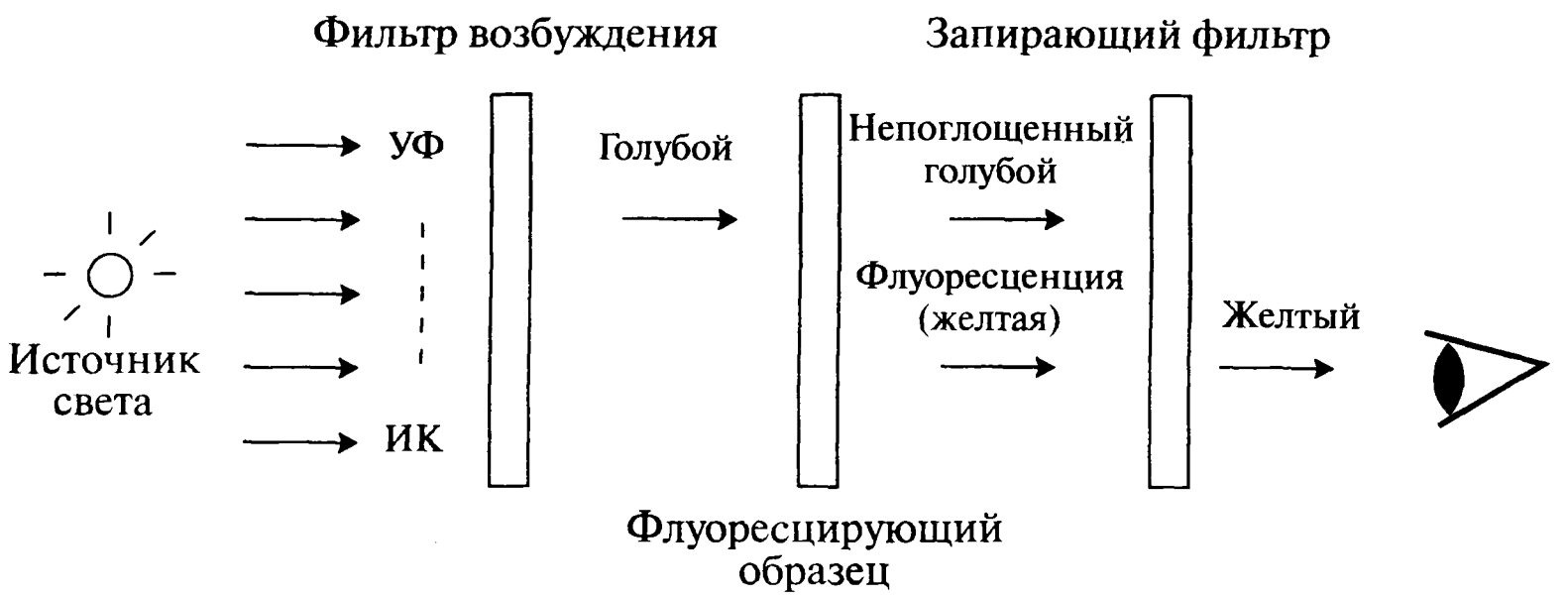
1. Образец должен освещаться светом, возбуждающим флуоресцентное свечение материала.
2. Длина волны возбуждающего света должна быть короче флуоресцентного излучения, создающего изображение (из-за стоксовского смещения).

Для выделения флуоресцентного свечения необходимо использовать высококачественные оптические светофильтры. Во флуоресцентной микроскопии это является обязательным условием. Схема такого микроскопа приведена на рис. 1.57a. Принципы создания оптических светофильтров были описаны выше. Обратим внимание, что интенсивность флуоресцентного свечения чрезвычайно мала по сравнению с возбуждающим светом, и для улучшения отношения сигнал/шум возбуждающий свет должен быть полностью устранен. Раньше во флуоресцентных микроскопах с этой целью использовали метод темного поля. Для возбуждения флуоресценции необходим мощный источник света в диапазоне, близком к ультрафиолетовому диапазону. Поэтому источником света в таких микроскопах является ртутная, галогеновая или ксеноновая лампа. В самых последних моделях флуоресцентных микроскопов (рис. 1.57b) используют принцип освещения по Келеру.

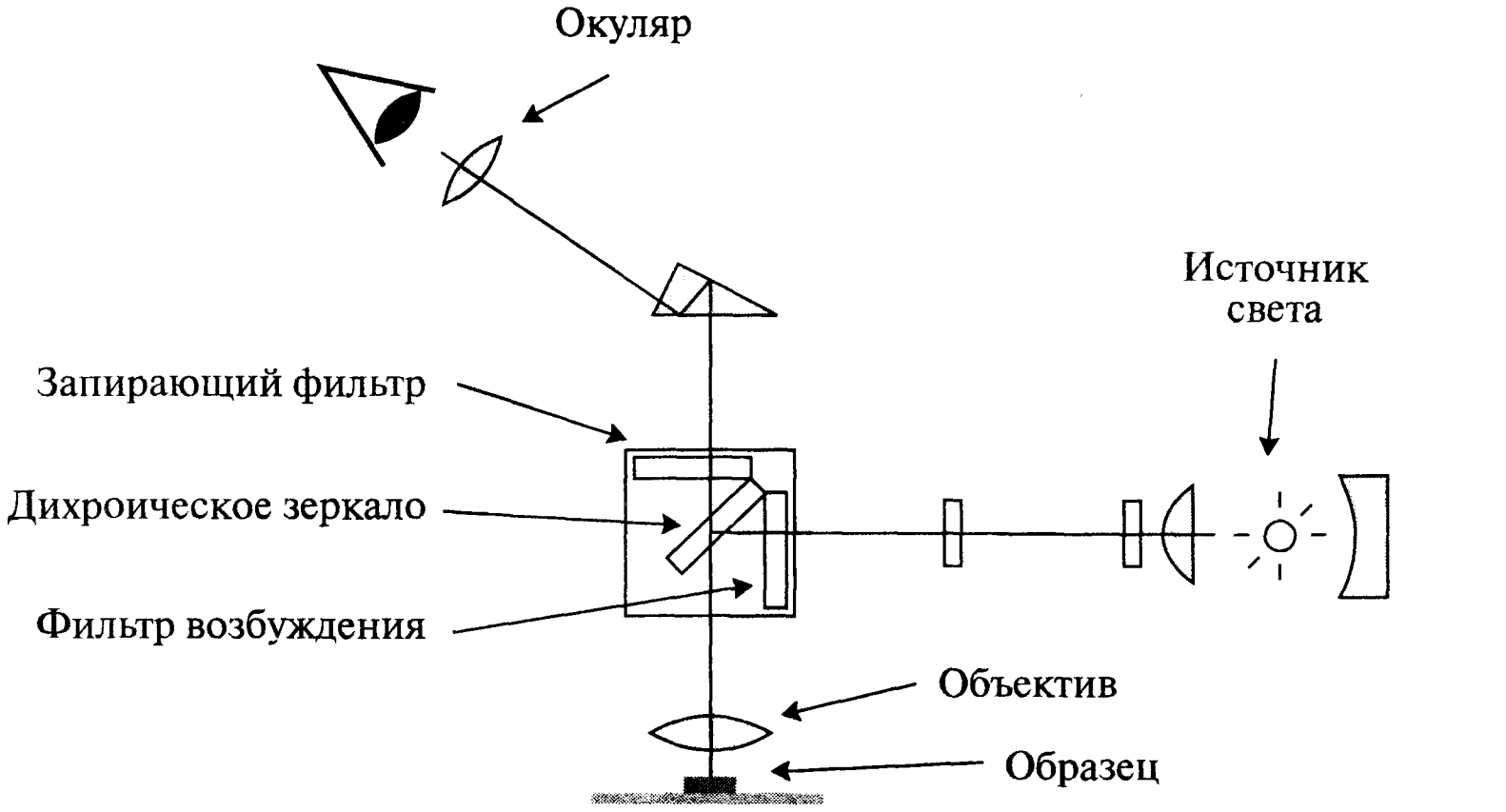
При работе с ультрафиолетом требуется проявлять осторожность. Оптические элементы в этом случае должны пропускать ультрафиолет (и не должны обладать собственной флуоресценцией). Типичной иммерсионной жидкостью является глицерин из-за меньшей по сравнению с маслом флуоресценцией[1]. Другой проблемой флуоресцентной микроскопии является эффект фотоотбеливания, состоящий в постепенном снижении интенсивности излучения при больших временах облучения. Чтобы избежать чрезмерного облучения образца ультрафиолетом, источник возбуждающего света имеет заглушку или нейтральный фильтр, снижающий дозу облучения.

---

[1] В современных микроскопах глицерин используется мало. В основном применяется специальное нефлуоресцирующее масло или дистиллированная вода.



(a)



(b)

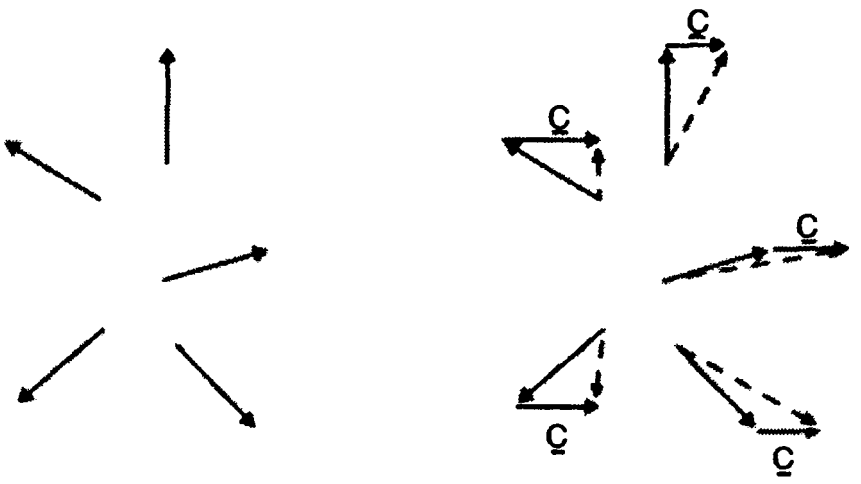
Рис. 1.57. (a) – Принцип работы флуоресцентного микроскопа. Излучение широкополосного источника света попадает на фильтр, который пропускает узкий диапазон длин волн в синей части спектра. Запирающий фильтр отделяет длинноволновое флуоресцентное излучение от коротковолнового возбуждающего света; (b) – схема типичного флуоресцентного микроскопа.

1.4.7. Методы темного поля, фазового контраста и интерференционная микроскопия

При работе в светлом поле некоторые объекты не позволяют получить достаточно контрастное изображение. Однако при этом образец может изменить фазу прошедших или отраженных лучей. Глаз реагирует на изменение интенсивности и цвета (длины волны), но не воспринимает разницы фаз. Поэтому в методе фазового контраста изменение фазы волны переводят в изменение интенсивности (или цвета), что делает особенности видимыми.

Существует два типа образцов, для которых эти методы особенно эффективны: 1) прозрачные образцы с небольшой вариацией оптической плотности, и 2) непрозрачные образцы с небольшим изменением уровня поверхности. Рассмотрим, что происходит в этих случаях. Если числовая апертура объектива велика, в изображение вносит вклад большое количество света. Пусть объект очень прозрачный (например, тонкая полимерная пленка), но его оптическая толщина варьируется,

и, соответственно, в плоскости изображения изменяется фаза волны. Если амплитуда волны одинакова на всем поле зрения, микроскопист видит однородное яркое поле. Поскольку интенсивность света постоянна, векторы электрического поля имеют равные длины (рис. 1.58a). Различное направление векторов отражает вариацию фазы. Если к вектору волны в каждой точке (рис. 1.58b) добавить постоянный вектор, амплитуда суммы векторов начнет варьироваться и появится изображение. Как следствие, изменения фазы преобразуются в изменения интенсивности и появляется изображение. На этой идее основаны методы темного поля, фазового контраста и интерференционная микроскопия.



(a) (b)

Рис. 1.58. (a) – В различных точках прозрачной тонкой пленки при равной амплитуде волны (длине вектора электического поля E) может различаться фаза прошедшего света. Глаз реагирует на интенсивность света и не воспринимает изменение фазы. (b) – В методе фазового контраста изменение фазы преобразуют в изменение интенсивности путем добавления к вектору E малого постоянного вектора. Изменение длины пунктирных векторов иллюстрирует изменение амплитуды суммарной световой волны.

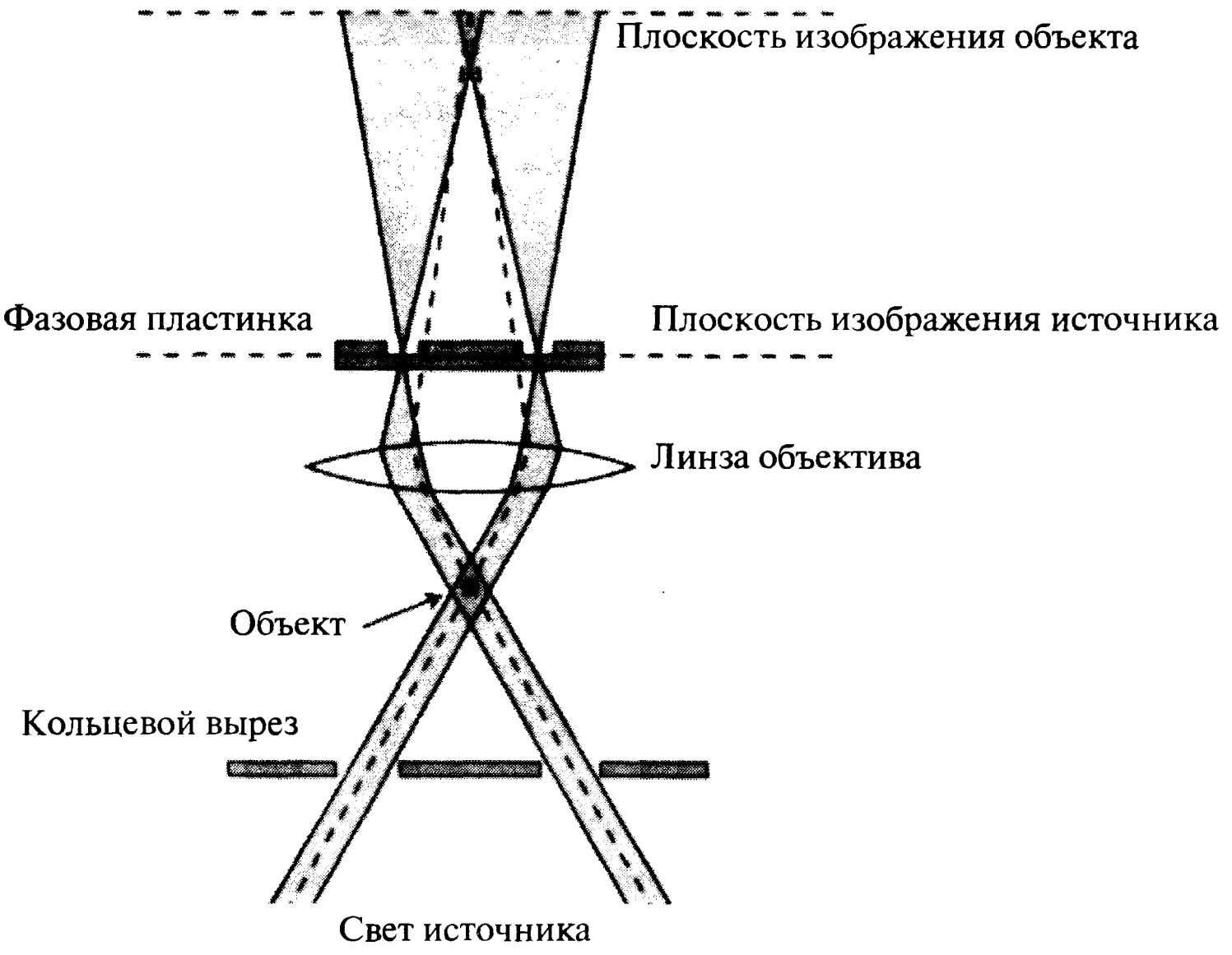


Рис. 1.59. Метод фазового контраста. Фазовая пластинка добавляет постоянный вектор к варьирующемуся вектору E световой волны и преобразует изменение фазы в изменение интенсивности света.

В методе темного поля в каждой точке определяется изменение вектора электрического поля, а в методе фазового контраста, предложенного Цернике в 1935 году, сдвигается фаза части света в каждой точке изображения, как показано на рис. 1.59. Рассеяние света приводит к вариации интенсивности в поле зрения. Фазовая пластинка представляет собой прозрачную стеклянную пластинку, у которой оптическая толщина центральной части на четверть длины волны больше, чем у остальной части. Фазовая пластинка аналогична пространственному фильтру (параграф 1.5.2), воздействующему на наиболее низкие пространственные частоты луча.

Имеется два типа интерференционных микроскопов.

1. Интерферометры, в которых обеспечивается интерференция лучей, прошедших через две различные части объекта.
2. Интерферометры, в которых луч, прошедший через объект, интерферирует с постоянным опорным сигналом, как показано на рис. 1.60.

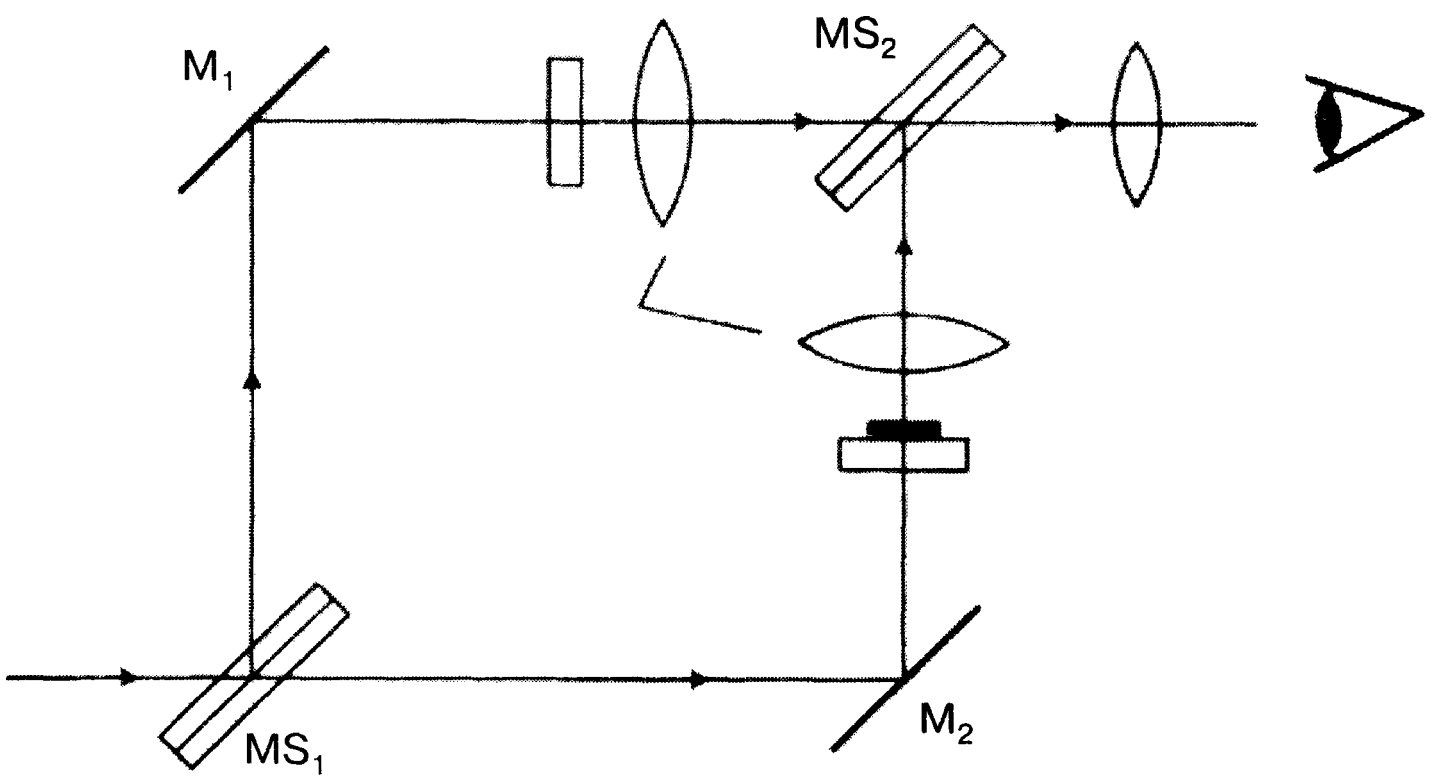


Рис. 1.60. В интерференционном микроскопе светоделительная пластинка MS_1 делит лазерный пучок на два луча, одна половина которого направляется на контрольную пластинку, а вторая проходит через образец. Затем лучи объединяются в пластинке MS_2 и попадают на датчик.

Интерференционная микроскопия использует сложение двух когерентных волн с различным оптическим путем. Изменение уровня поверхности становится видимым благодаря появлению интерференционных полос. Интерферограммы аналогичны контурным картам. Они позволяют очень точно измерять высоту поверхности. В последнее время в микроскопии появились новые методы – поверхностная топография и конфокальная сканирующая лазерная микроскопия (глава 4).

Вторым типом интерференционного микроскопа является микроскоп Номарского. Основным его компонентом является призма Волластона, сделанная из двух склеенных кварцевых клиньев, разрешенные направления поляризации которых взаимно перпендикулярны, как показано на рис. 1.61a. Схема микроскопа Номарского приведена на рис. 1.61b. Плоскополяризованный свет, отраженный полупрозрачным зеркалом, проходит через призму дважды. Первый раз до образ-

ца, а второй раз после отражения от него. Для луча, поляризованного параллельно одному из направлений поляризации призмы, оптическая толщина призмы непрерывно изменяется от края до края. Луч, прошедший через призму на некотором расстоянии от ее центра, после отражения проходит через нее симметрично относительно центра. Как следствие, полный оптический путь равен удвоенному оптическому пути в центре призмы. В результате все лучи проходят одинаковый оптический путь. Это условие необходимо для интерференции в плоскости изображения. При вращении анализатора изменяются условия интерференции двух плоскополяризованных световых лучей, в результате чего волны некоторой длины вычитаются, и создается цветное изображение. Когда анализатор поворачивают на угол 45°, один из двух лучей подавляется, и формируется нормальное изображение.

Рис. 1.61. (a) – Призма Волластона использует эффект двулучепреломления для разделения луча на два луча с различной поляризацией. Двулучепреломляющий кристалл разрезают и склеивают, как показано на рисунке; (b) – схема интерференционного микроскопа Номарского, использующего призму Волластона.

На объективах, предназначенных для интерференционных микроскопов Номарского, имеется надпись «NIC», а на объективах для дифференциально-интерференционного микроскопа – «DIC».

1.4.8. Поляризационный микроскоп

Еще одна возможность повысить контраст изображения прозрачного образца состоит в использовании скрещенных поляроидов. Поляризационный микроскоп отличается наличием двух поляроидов, один из которых находится до образца, в системе освещения, и называется *поляризатор*, а второй, называемый *анализатором*, расположен за образцом, в тубусе микроскопа. Один из поляроидов расположен во вращающемся специальном тубусе[1], на котором имеется шкала, позволяющая определять угол поворота. Обычно разрешенные направления поляризатора и анализатора устанавливаются взаимноперпендикулярно и параллельно измерительной сетке окуляра[2]. При необходимости один или даже оба поляроида можно вывести из оптического хода лучей, что позволяет рассматривать образец в неполяризованном свете.

Если образец изотропен, то в скрещенных поляроидах поле зрения становится темным. Если же образец двулучепреломляющий, то плоскость поляризации может быть непараллельна оптической оси образца. Поскольку обыкновенный и необыкновенный лучи распространяются в материале с различной скоростью, вектор электрического поля будет вращаться. Следовательно, образец будет ярким на темном фоне.

В специальное гнездо, расположенное в тубусе микроскопа за объективом, можно вставить дополнительную пластинку, ориентированную под углом 45° к направлению поляризатора. Она помогает интерпретировать эффекты, обусловленные поляризацией света. Эта пластинка состоит из тонких клиньев или пластин двулучепреломляющего материала, вырезанных определенным способом относительно кристаллографической оси. Для наблюдения интерференционных полос в заднюю фокальную плоскость объектива можно установить *линзу Бертрана*. Ее размещают непосредственно под окуляром. Обратим внимание, что под действием механического напряжения стекло и полимеры становятся оптически анизотропными, причем степень анизотропии выше в областях концентрации напряжения. Это можно использовать для определения наиболее напряженных областей в деталях из прозрачных полимеров. Таким способом можно изучать напряжения в деталях механизмов и в конструкциях. Чтобы не появлялись оптические артефакты, объективы[3] и покровные стекла в поляризационном микроскопе не должны иметь механических напряжений.

Изображения некоторых материалов в поляризационном и дифференциально-интерференционном микроскопах показаны на рис. 1.62 и 1.63.

---

[1] Это обычно анализатор, или во вращающейся оправе – это обычно поляризатор.

[2] Обычно направление поляризации в виде стрелки маркируется на корпусе оправ поляризатора и анализатора.

[3] В том числе и линзы конденсора. На корпусе объективов и конденсора существует маркировка «П» или «Pol», и при этом надпись окрашена в красный цвет.

1.5. Фотоника

Светом, как и электронами, можно управлять. Имея это в виду, представим, как можно сделать оптический компьютер. Рассмотрим основные действия электронно-вычислительной машины, которые более подробно будут описаны в главе 2. Электрические сигналы в компьютере передаются и преобразуются. Аналогично, световые лучи можно передавать с помощью системы зеркал, призм и оптических волокон, а их интенсивность можно уменьшать или увеличичивать. Для передачи информации свет можно модулировать подобно электрическому сигналу. Современные ПЗС-матрицы преобразуют непрерывное двумерное оптическое изображение в последовательность дискретных электрических сигналов, которые можно преобразовывать при помощи компьютера. Вместо этого можно гораздо более эффективно преобразовать двумерное оптическое изображение при помощи линз и пространственных фильтров. Хранить изображения можно голографическим методом. Таким образом, основные действия электронного компьютера (передача, обработка и хранение сигнала) могут осуществляться и оптическими системами. Развитие фотоники и нанотехнологии приводит к миниатюризации таких устройств, и в принципе можно подумать о возможности создания оптического компьютера в объеме небольшого кристалла [14]!

1.5.1. Магнитооптические и электрооптические материалы

Одно из требований, предъявляемых к оптическим сетям, используемым в компьютере, является возможность быстрого включения и выключения световых лучей. Для этого можно использовать электрооптический *эффект Керра*, состоящий в появлении двулучепреломления в изотропном материале при наложении электрического поля. Этот эффект объясняют ориентацией материала в электрическом поле. Материал ведет себя как одноосный кристалл, в котором оптическая ось параллельна направлению электрического поля. Разница показателей преломления в направлениях, параллельном (n_{par}) и перпендикулярном (n_{perp}) электрическому полю E, представляется формулой:

$$n_{par} - n_{perp} = KE^2\lambda_0 \qquad (1.57)$$

Здесь λ_0 – длина волны света в вакууме, а K - постоянная Керра.

На рис. 1.64 показана схема быстродействующего модулятора света, называемого ячейкой Керра. Показатель преломления некоторых двулучепреломляющих кристаллов изменяется в электрическое поле. Это называют *эффектом Поккельса*, причем в этих кристаллах изменение показателя преломления прямо пропорционально величине поля. Используя эффект Поккельса, делают быстродействующие световые затворы и модуляторы света, время действия которых равно примерно 25 мкс (рис. 1.65).

Одна из особенностей электрических схем состоит в возможности нелинейной обработки сигнала. Это может быть сделано и в оптике. Лазерный пучок света большой интенсивности в оптически прозрачной среде вызывает появление сильного электрического поля вследствие поляризации материала под действием оптической волны. В сильном поле связь поляризации с электрическим полем становится нелинейной, и появляются нелинейные эффекты. В частности,

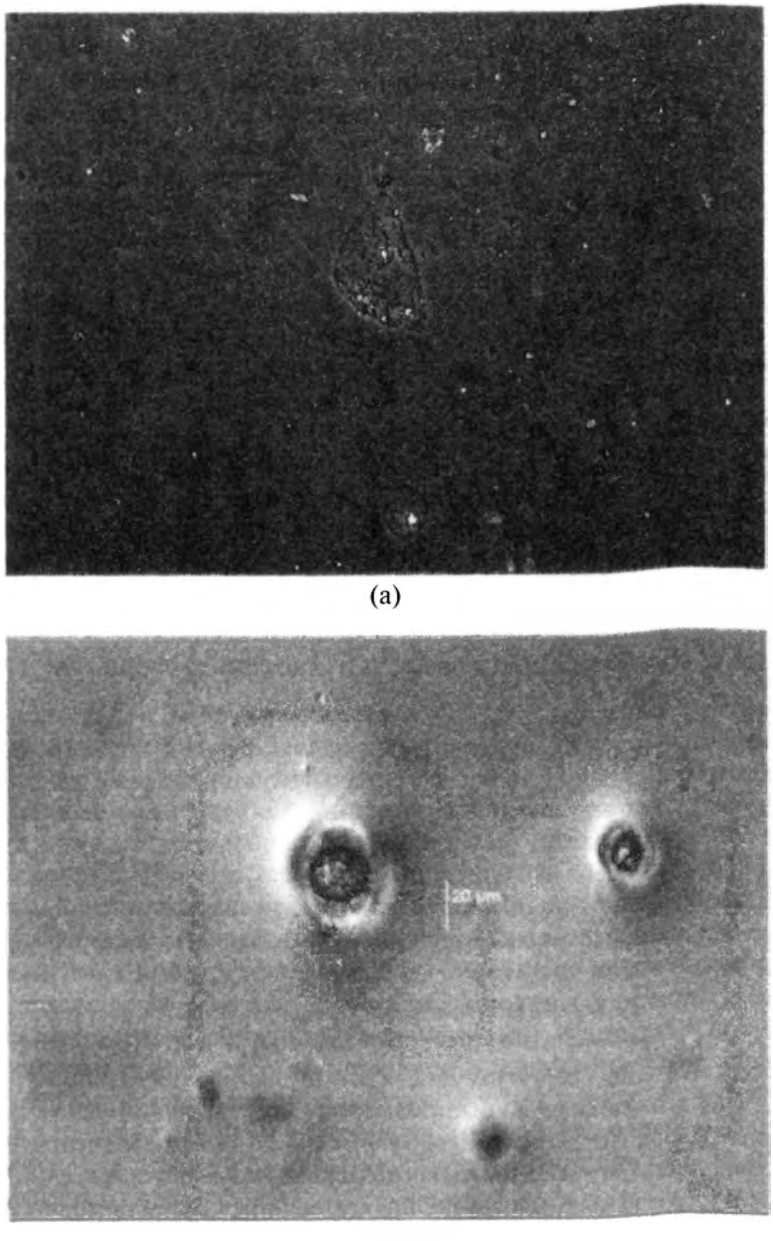
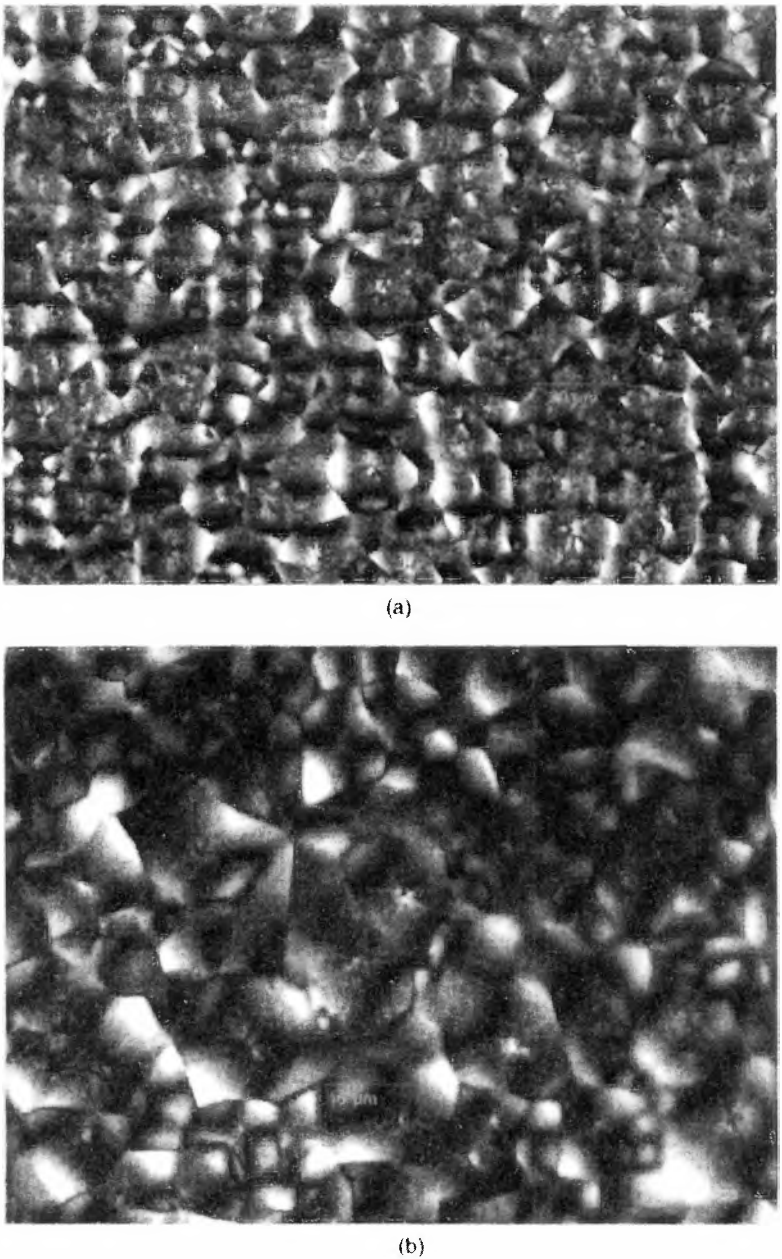


Рис. 1.62. Изображения (a) полиэтилентерефталата (ПЭТФ), полученное методом фазового контраста и (b) чернил, полученное методом дифференциально-интерференционного контраста (ДИК) в микроскопе Nikon Microphot FXA.



(a)

(b)

Рис. 1.63. Изображение цветных чернил в скрещенных поляроидах при различных увеличениях микроскопа Nikon Microphot FXA.

возникают новые гармоники оптической волны, происходит удвоение частоты, сложение частот и т.д. Таким образом, все процессы передачи и преобразования сигналов в электрической схеме имеют аналоги и в оптике.

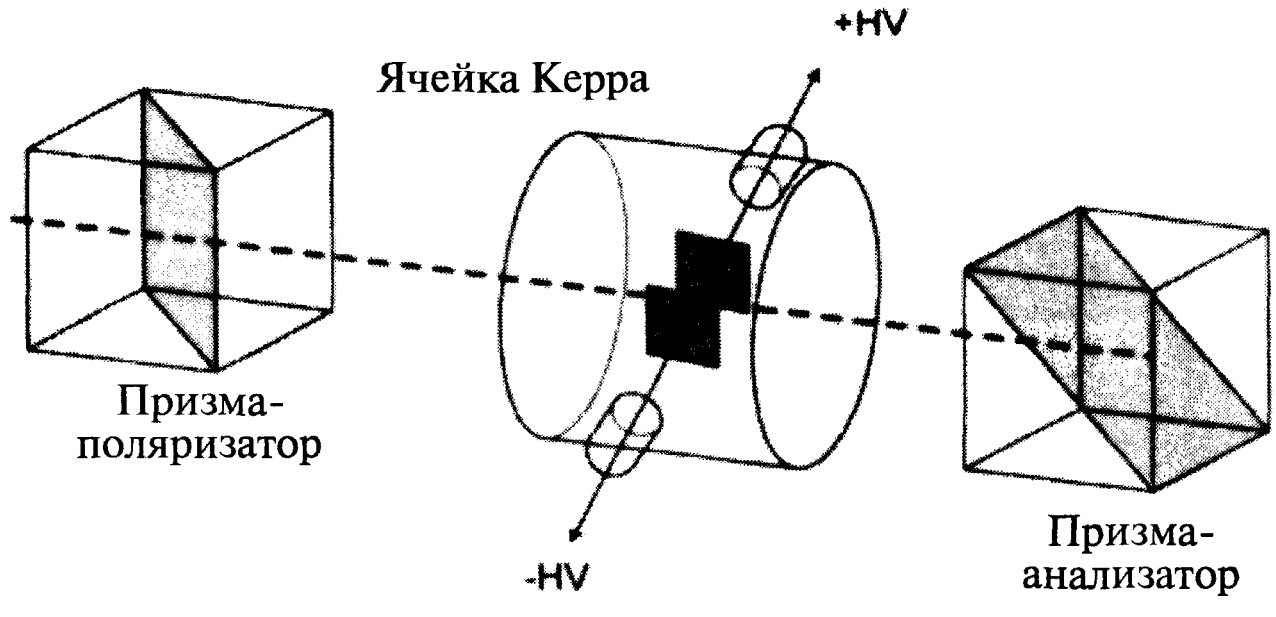


Рис. 1.64. Ячейка Керра является быстродействующим оптическим затвором. Первая призма поляризует свет. Прикладывая к пластинам большую разницу потенциалов, вектор поляризации светового луча поворачивается, и луч не проходит через вторую призму.

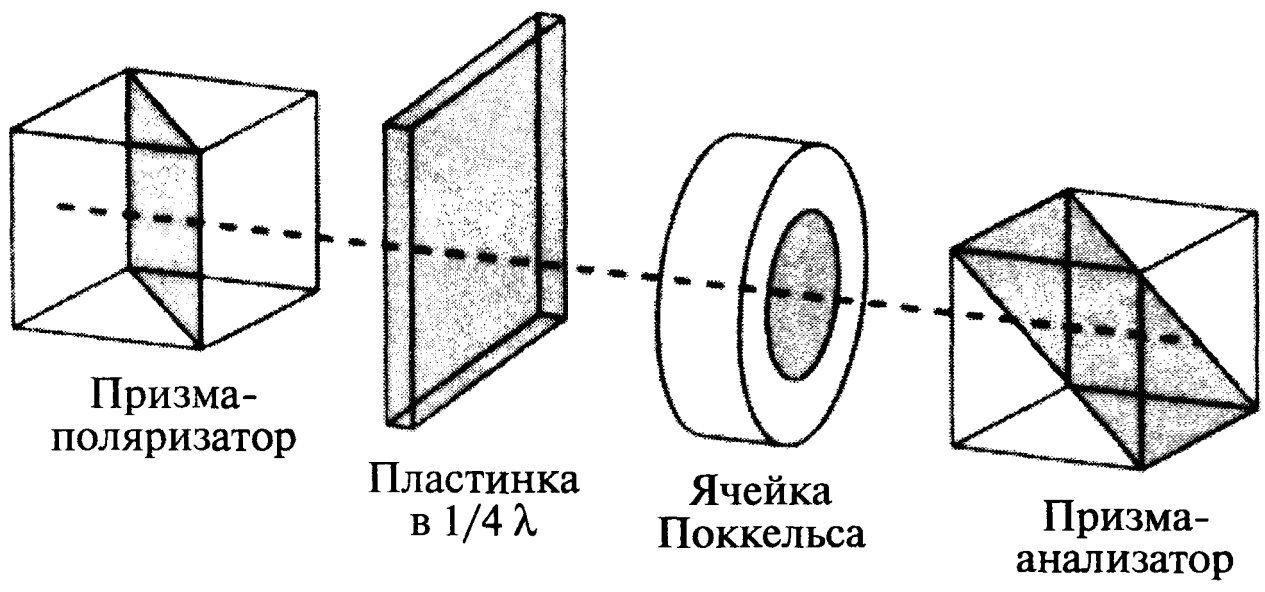


Рис. 1.65. Ячейка Поккельса также является быстродействующим затвором и модулятором света. Ее действие основано на электрооптическом эффекте, состоящем в изменении показателя преломления кристалла в электрическом поле. Изменение показателя преломления пропорционально величине приложенного поля. Эту схему используют для модуляции света. Пластина в четверть длины волны обеспечивает оптический сдвиг. При отсутствии поля через нее проходит 50% света.

1.5.2. Оптические свойства линзы

При описании действия компьютера ключевым словом является преобразование. Работа компьютера состоит в некотором преобразовании входящих данных. Как будет описано в следующей главе, преобразование 2D-изображения требует большого количества вычислений. Для уменьшения шума, выявления некоторых особенностей, а также для вычисления Фурье-образов применяют различные фильтры. Эта процедура была бы более эффективной, если бы при преобразованиях изображение оставалось оптическим. Поэтому рассмотрим, что происходит в процессе создания изображения линзой.

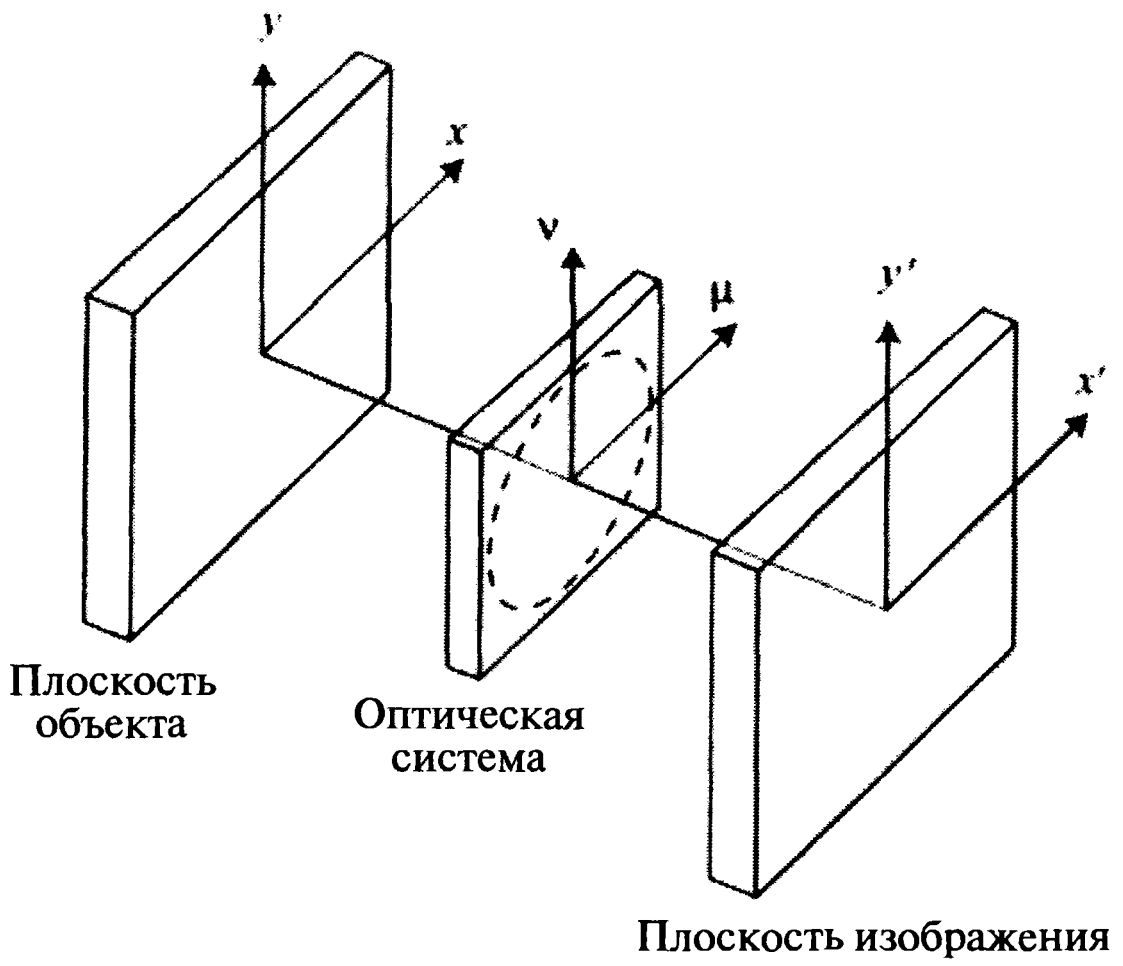


Рис. 1.66. Обобщенная модель, описывающая работу практически любой оптической системы. Особенности, находящиеся в плоскости объекта, отображаются оптическим пространственным фильтром на плоскость изображения. Пространственный фильтр характеризуется некоторой эффективной апертурой (которая обычно определяется диаметром объектива). Фильтрование осуществляют при помощи частично прозрачных экранов различной формы.

Рассмотрим дифракцию света в обобщенной оптической системе, показанной на рис. 1.66. Дифрагирующее отверстие расположено в плоскости μν, а дифракционная картина появляется в плоскости XY, являющейся фокальной плоскостью линзы. После дифракции параллельные лучи в направлении, определяемом углами α, β, γ, сходятся в некоторой точке фокальной плоскости. Пусть эта точка имеет координаты P(X,Y). В общем случае, если отверстие описывается функцией апертуры g(x, y), то наблюдаемая в плоскости XY картина описывается функцией:

$$U(\mu,\nu) = \iint g(x, y)e^{i(\mu x+\nu y)}\, dxdy, \qquad (1.58)$$

где $\mu = kX/L$ и $\nu = kY/L$ – пространственные частоты, размерность которых обратна длине, как у волновых чисел. Функция U является Фурье-образом g, а дифракционная картина является Фурье-образом функции апертуры.

Рассмотрим плоскость изображения (X,Y) объекта, освещаемого когерентным светом. Дифракционная картина $U(\mu,\nu)$ функции объекта $g(x,y)$ появляется в плоскости $\mu\nu$ (или XY). Функция изображения представляет собой Фурье-преобразование $U(\mu,\nu)$. Если все пространственные частоты в диапазоне $\mu = (-\infty,+\infty)$, $\nu = (-\infty,+\infty)$ передаются оптической системой одинаково, то функция изображения $g'(x', y')$ будет пропорциональна функции объекта $g(x, y)$ и, следовательно, будет истинным образом объекта. Конечная апертура в плоскости (μ, ν) ограничивает пространственные частоты, передаваемые оптической системой, а аберрация и дефекты линзы искажают функцию $U(\mu,\nu)$, создавая новую функцию $T(\mu,\nu)$, называемую «функцией пропускания» оптической системы.

Функцию пропускания можно изменить с помощью диафрагм или частично прозрачных экранов, расположенных в плоскости (μ,ν). Эту процедуру называют

пространственным фильтрованием. Заметим, что она аналогична фильтрованию электрического сигнала пассивной сетью. Функция объекта представляет собой входящий сигнал, функция изображения – выходящий сигнал, а оптическая система действует подобно фильтру, который одни пространственные частоты передает, а другие – нет (рис. 1.67).

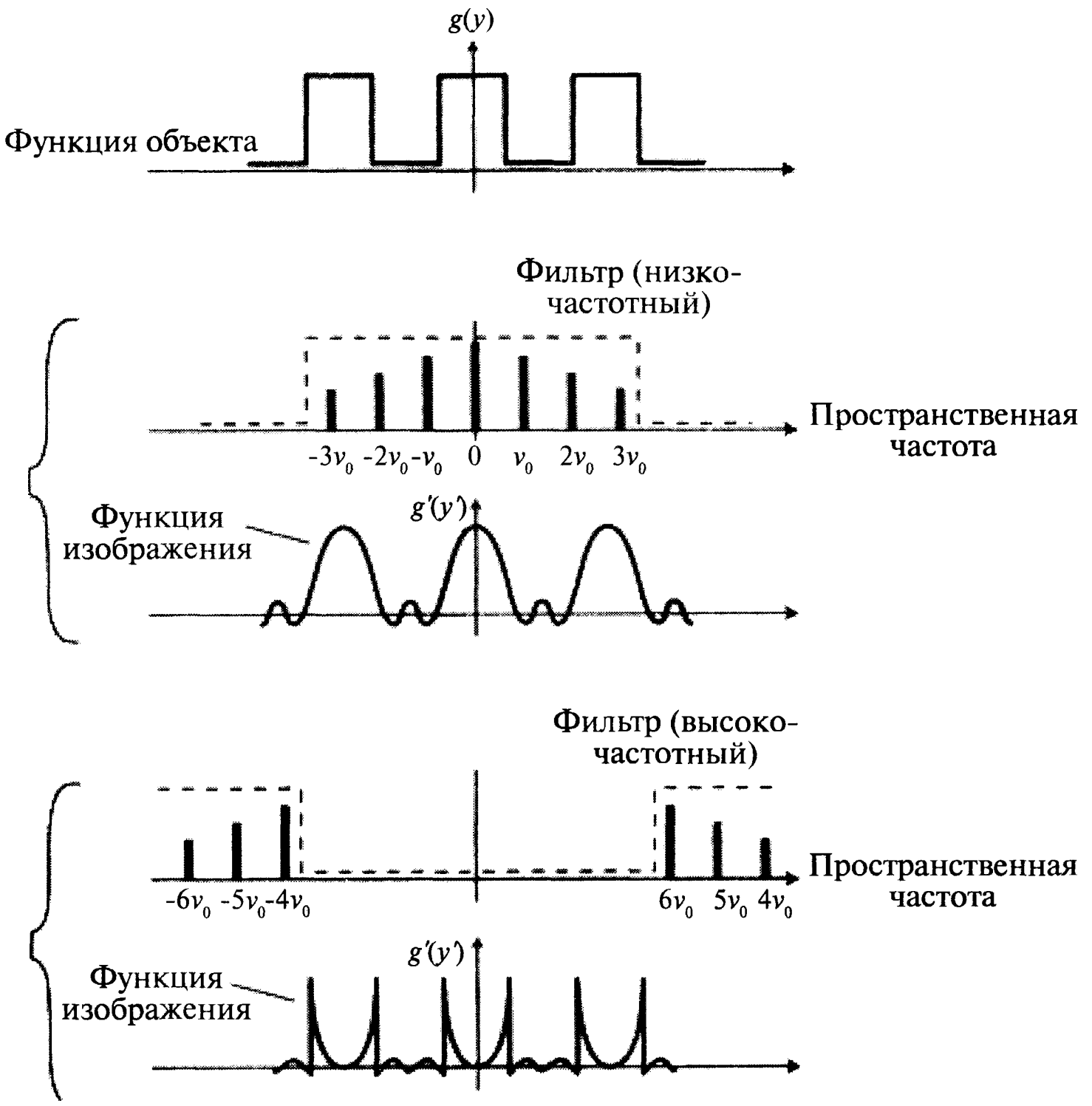


Рис. 1.67. Рассмотрим сигнал в виде периодических прямоугольных импульсов. Пространственный фильтр, пропускающий лишь три первые Фурье-компоненты (пространственные частоты в интервале $\pm 3\nu_0$), создает изображение, показанное в средней части рисунка. Если пространственный фильтр пропускает только высокие частоты, изображение имеет вид пиков, показанных в нижней части рисунка.

Если апертурная диафрагма имеет ограниченную ширину $2b$ и пропускает в плоскости (μ,ν) лишь частоты $\nu < kb/f$, то она ведет себя как низкочастотный фильтр. Если на оптической оси помещен экран, не пропускающий лучи, параллельные оси, то экран будет служить высокочастотным фильтром. Очевидно, что основанный на оптике компьютер может иметь скорость работы, во много раз превосходящую скорость современных электронно-вычислительных машин, использующих сложный алгоритм расчетов при построении каждой точки изображения.

1.5.3. Оптоэлектронные нейронные сети

В настоящее время проявляется значительный интерес к оптоэлектронным нейронным сетям, имеющим адаптивную аналоговую память, в отличие от двоичной системы цифровых данных в обычных ЭВМ. При создании изображения эти сети потенциально могут иметь гораздо более высокую скорость.

Электронные аналоги биологических нейронных сетей разрабатывались в течение многих десятилетий [15]. Недостатком больших электронных сетей является огромное количество проводников, связывающих элементы системы. Потребность в создании альтернативных методов связи инициировала разработку оптических нейронных сетей. Отметим, что оптическая связь допускает параллелизм из-за отсутствия взаимодействия световых волн. Важным компонентом нейронной сети являются нелинейные оптические элементы. В настоящее время на практике их использовать крайне сложно, но, несмотря на это, попытаемся представить, как в будущем можно будет делать оптические системы.

Большинство динамических голографических нейронных сетей состоит из множества слоев. Выходной сигнал некоторого слоя представляет собой множество плоских волн, которые после прохождения голографической решетки передаются в виде плоских волн на вход следующего слоя. Кодирование 2D-массива информации выполняется посредством Фурье-преобразующей линзы, как показано на рис. 1.68. Как и в голографии, структурные решетки получают, пропуская когерентный расходящийся луч через входную маску (световой пространственный модулятор) и систему линз. Второй луч (когерентный первому) пропускают через голографический материал для воссоздания изображения. Два луча интерферируют и создают в материале периодическое распределение интенсивности света, формирующее решетку, которая позволяет создать изображение на выходе системы. Материалы типа серебра, галидов, дихромата желатина, титаната бария и допированного железом ниобата лития позволяют создать периодические решетки с изменяющимся коэффициентом пропускания или показателем преломления. После формирования каждую решетку можно рассматривать как связь, вес которой определяется амплитудой решетки и ее размером. Голографический материал для адаптивных нейронных сетей должен быть динамическим, и после введения новых данных решетка должна обновляться. Одна из проблем состоит во взаимодействии оптических волн и решеток в толстых образцах.

Еще один метод создания динамических связей обеспечивают оптические лучи, пространственно разделенные в одной плоскости, как показано на рис. 1.69. Массив адаптивных пространственных модуляторов света в этой плоскости модулирует их или определяет вес луча. Эти системы представляют собой взаимосвязанные 2D-системы, в которых число связей пропорционально площади модулятора света. Оптимальны сети среднего размера, имеющие от 100 до 1000 входов (пикселей). При большем количестве входов лучше использовать голографический подход. Структура матричного множителя показана на рис. 1.69. Входящее оптическое излучение попадает на цилиндрическую линзу и расширяется в одном измерении, затем проходит через пространственный модулятор света и фокусируется второй цилиндрической линзой в ортогональном направлении на каждую выходную единицу. Взаимосвязь между входами и выходами формируется одним оптическим лучом, проходящим через некоторую точку пространственного модулятора света. Взвешивание сигнала осуществляется изменением

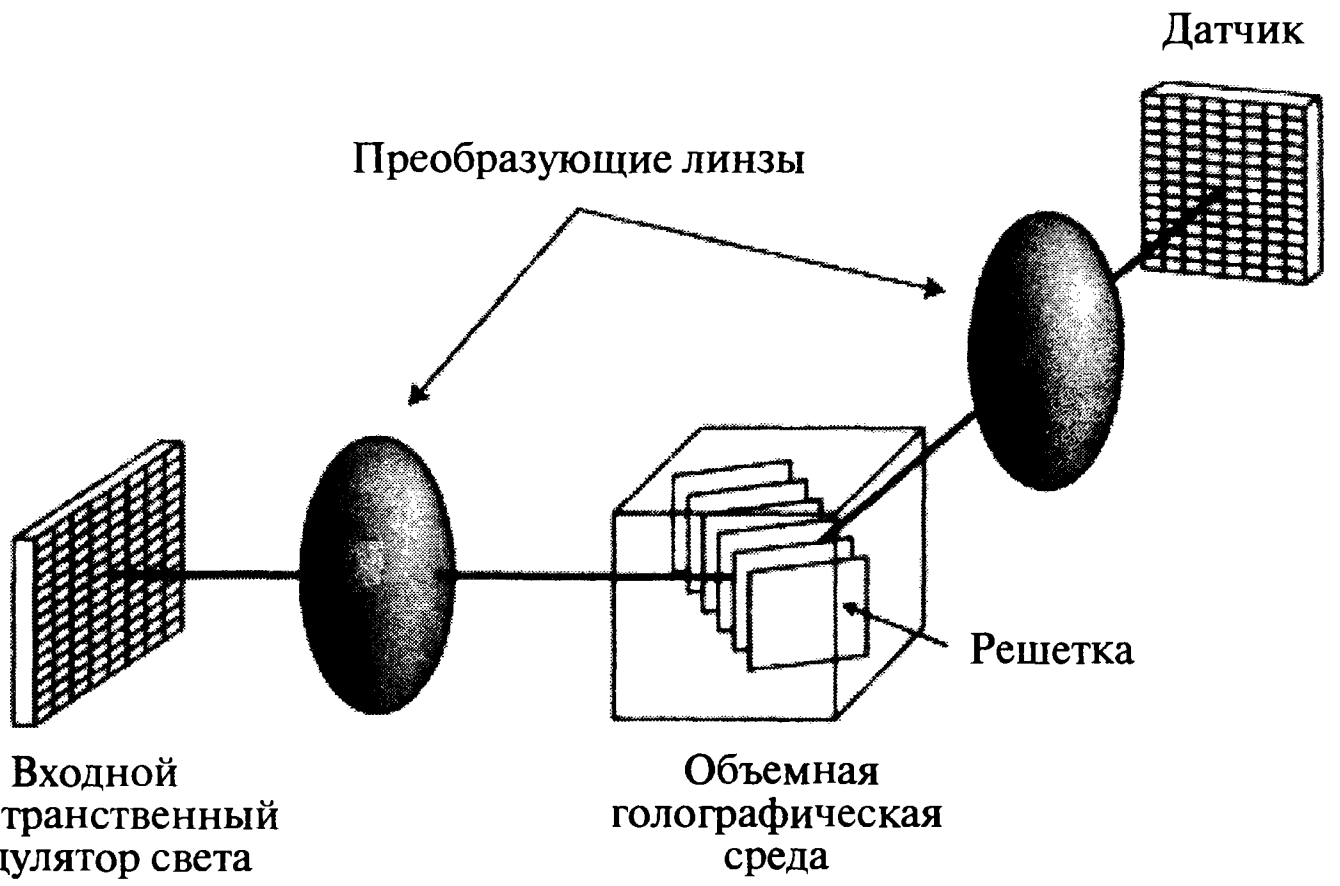
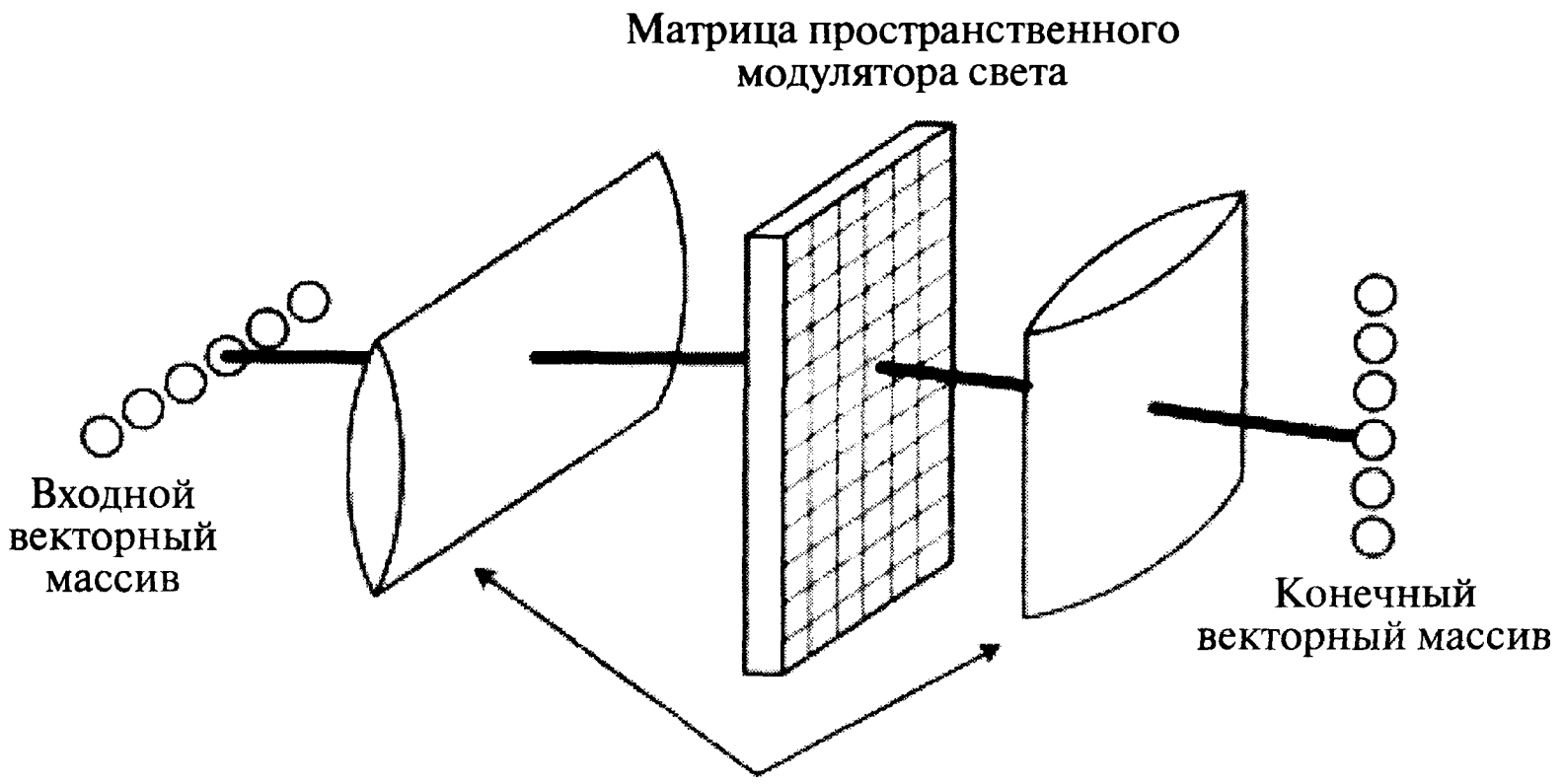


Рис. 1.68. Модель голографической системы, основанной на светопреломляющих материалах, способных хранить огромное количество информации в малом объеме. Информацию несет изменение коэффициента поглощения или показателя преломления трехмерного объема материала.



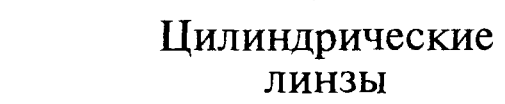


Рис. 1.69. Эта структура представляет собой пространственно-переключаемую систему, которая может действовать как матрица, производящая умножение векторов.

интенсивности лучей. Собирая двумерную систему оптических преобразующих блоков, можно построить большую многослойную сеть, включающую множество оптоэлектронных устройств и обеспечивающую требуемые нелинейные связи для решения сложных задач обработки сигнала. Преломляющие или дифракционные оптические элементы могут обрабатывать входящее и выходящее 2D-изображение.

На рис. 1.70 схематически показан массив линз (преломляющих элементов) или голограмм (дифракционных элементов), производящих деление сигнала и копирующих входную информацию в плоскость изображения, где она распространяется на многие амплитудно-кодируемые точки. Затем производится про-

странственная модуляция, состоящая во взаимосвязанном взвешивании и суммировании сигналов большой области с помощью множества оптических элементов, после чего производится детекция. На рис. 1.70 пространственные модуляторы света (ПМС) используются в качестве взвешивающих элементов и параллельных оптических входных/выходных устройств для оптоэлектронных соединений. Хотя пространственный модулятор света может быть сделан из GaAs, наилучшими материалами для таких микроустройств представляются кремний или жидкие кристаллы.

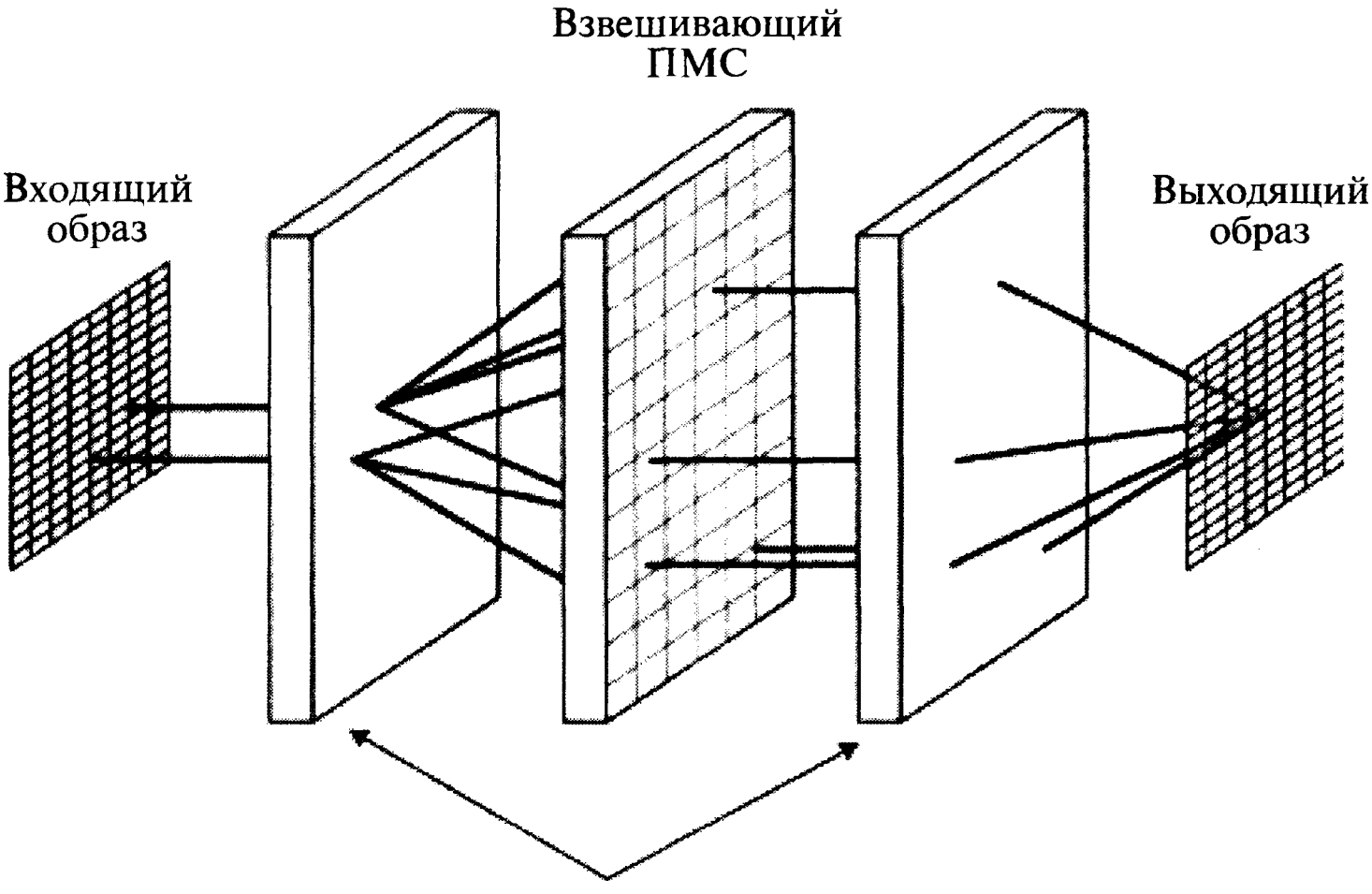


Рис. 1.70. Массив линз и пространственных модуляторов света, состоящих из множества пиксельных (точечных) элементов. Для преобразования изображения прозрачность каждого пиксельного элемента можно изменять.

1.5.4. Будущее компьютерной оптической микроскопии

Оптика является одной из наиболее старых областей физики, но, несмотря на это, она продолжает активно развиваться. ЭВМ может быть превзойдена эффективным оптическим компьютером в ближайшем будущем. Оптический компьютер разрабатывают многие компании, например, Snyder [16]. Хотя сейчас управление лазерным светом осуществляют крупногабаритными оптическими устройствами, в будущем их размер может быть значительно уменьшен. В идеале, для адекватного описания взаимодействия света и материала необходимо использовать квантовый подход, введенный в работе Дирака [17].

Фотонные устройства важны по двум причинам. Во-первых, они могут иметь гораздо большее количество одновременно работающих элементов по сравнению с обычными ЭВМ (например, при выполнении Фурье-преобразования). В потенциале они могут быть сверхбыстрыми, потому что передача информации осуществляется фотонами (движущимися со скоростью света, равной 3×10^8 м/с), а не электронами, скорость дрейфа которых в проводниках имеет порядок 10^4 м/с.

С учетом прогресса нанотехнологии, возможно, оптическая система будет иметь вид небольшого кристаллического блока, в котором фотоны управляют

цифровым изображением. Недавно сообщили о создании миниатюрного конфокального микроскопа [18]. Объем этого микроскопа равен 1 мм^3, а его схема приведена на рис. 1.71. Линзы в нем представляют собой крошечные полимерные бусинки в кремниевых кольцах, закрепленных в кремниевой пластине. Перемещение линз при их фокусировке и юстировке осуществляется методом электрострикции. Источником света является светодиод синего света, а фотодатчик регистрирует отражаемый образцом свет. На следующей стадии развития конструкция микроскопа должна включить источник энергии для светодиода и устройство, передающее изображение от микроскопа на компьютер посредством радиосигнала. Управляемый компьютером оптический микроскоп не самого отдаленного будущего, вероятно, будет напоминать по размеру кристаллик сахара!

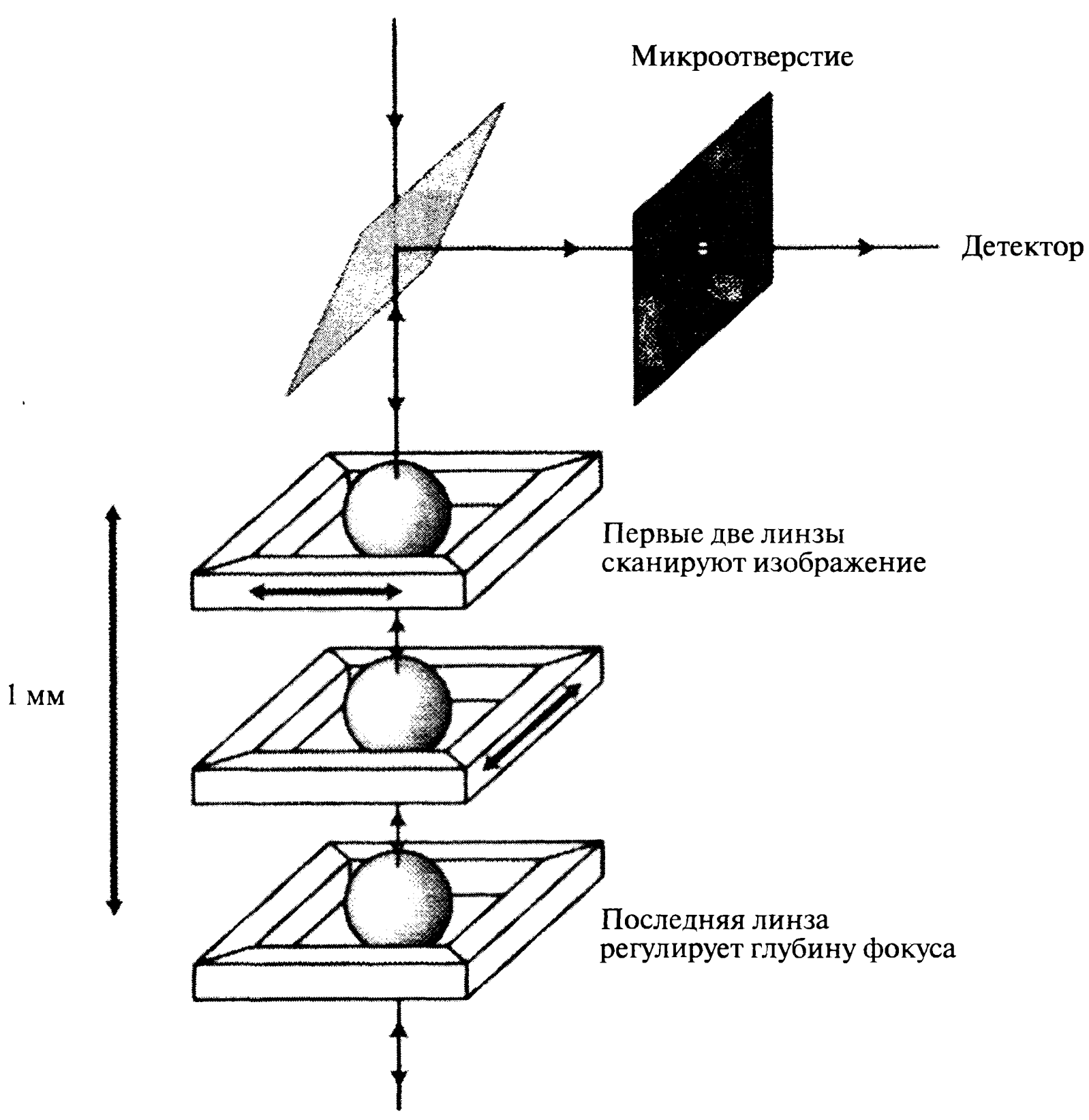


Рис. 1.71. Замечательным примером наноуровневой разработки является миниатюрный конфокальный микроскоп объемом порядка нескольких кубических миллиметров. Источником света в нем является миниатюрный светодиод, а линзы представляют собой бусинки полимерного материала. Эти бусинки закреплены в пьезоэлектрических рамках и для фокусировки могут перемещаться по осям x, y и z.

1.6. Литература

1. B. Greene (2000), *The Elegant Universe*, *Vintage*.
2. J.C. Maxwell (1873), *A Treatise on Electricity and Magnetism*, 2 vols, Oxford.
3. P.M. Delaney and M.R. Harris (1995), Fibreoptics in confocal microscopy, ch.33 in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, ed. J.B. Pawley, Plenum Press.
4. R.N. Wilson (1996), *Reflecting Telescope Optics* Vol. 1, Springer; (1999) *Reflecting Telescope Optics* Vol. 2, Springer
5. Project VIRGO, Gravity Wave Detector, website *http://www.virgo.infn.it/ central.html*
6. G.N. Watson (1944) *A Treatise on the Theory of Bessel Functions*, 2nd edn, Cambridge University Press.
7. A. Einstein (1905), *Ann. der Physik* (4), 17, 132.
8. R.B. Lindsay (1970), *Lord Rayleigh - The man and his work*, Pergamon Press.
9. A. Mark-Smith (ed.) (2001) *Alhacen's Theory of Visual Perception: A critical edition,* with English translation and commentary of Alhacen's 'De aspectibus'.
10. R. Hpoke (1665), *Micrographia*, 47.
11. J.J. Lister (1830), On some properties in achromatic object-glasses applicable to the improvement of the microscope. *Phil. Trans of Royal Soc*, 187-200.
12. G. l'E. Turner (1980), Antique Scientific instruments, Blandford Press Ltd., pp 117-18.
13. M. Herzberger, O.W. Richards and L.A. Harris (1988), Optical microscope, in *Optics Source Book*, Science Reference Series, McGraw-Hill, pp 77-90.
14. A. Snyder, Light guiding light in the new millenium, Clifford Paterson Lecture to the Royal Society, London, 10 December 2001, reporting on research at the Optical Sciences Centre, University of Sydney.
15. E. Sanchez-Sinencio and C. Lau (1992), *Artificial Neural Networks: Paradigms, Applications and Hardware Implementations*, IEEE Press.
16. Berkeley Nanoscience Research Center, website *http://www.foundry.lbl.gov*
17. P.A.M. Dirac (1927), The quantum theory of the electron, Part I, *Proc. Roy. Soc.* (London), A117, 610-24; The quantum theory of the electron, Part II, Proc. Roy. Soc, A118, 361.
18. C. Zandonella (2001), Sick cells can't escape the eagle eye of the micro-microscope, *New Scientist*, 172 (2320), 24.

1.7. Дополнительная литература

G. L'E. Turner (1980), *Antique Scientific Instruments*, Blandford Press Ltd.
P.A. Tipler (1995), *Physics for Scientists and Engineers*, 3rd edn, Worth Publishers.
R.S. Longhurst (1967), *Geometrical and Physical Optics*, Longman Publishers.
R. Haynes (1984), *Optical Microscopy of Materials*, Blackie & Son Ltd.
S.G, Lipson and H. Lipson (1969), *Optical Physics*, Cambridge University Press.
D.G. Gianeoli (1980), *Physics: Principles and Applications*, Prentice/Hall International.
S.P. Parker (ed) (1987), *Optics Source Book*, McGraw Hill.
M. Born and E. Wolf (2001), *Principles of Optics*, 7th expanded edn, Cambridge University Press.
E. Hecht (1975), *Optics*, Schaum Outline Series, McGraw Hill.
B. Hoffmann (1965), *The Strange Story of the Quantum*, Pelican Books.
F.A. Jenkins and H.E. White (1957), *Fundamentals of Optics*, 3rd edn, McGraw Hill.
Spindler and Hoyer (2001), *The Catalogue - Optomechanics GE4.*
G.R. Fowles (1975), *Introduction to Modern Optics*, 2nd edn, Holt, Rinehart & Winston Publishers.
J.B. Pawley (1995), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd edn, Plenum Press.

Глава 2

Цифровое изображение и его обработка

> Крупнейшие телеграфные компании почти всех иностранных государств и колоний приняли тарификацию, по которой за каждое переданное слово необходимо платить некоторую сумму. На последнем заседании Парламента к этой системе оплаты перешла и Великобритании. Каждый, кто посылал телеграфные сообщения за границу, по своему опыту знает выгоду использования кода, известного и отправителю, и принимающей стороне. Этим способом сообщение, состоящее из дюжины обычных слов, может быть передано единственным кодированным словом с полнотой и четкостью, которой не удалось бы достигнуть, если бы не ограничения стоимости...
>
> *Unicod, Универсальные Телеграфные Коды, 9-ое издание, 1894.*

2.1. Введение

Опыт каждого человека о «реальном мире» является субъективным представлением о том, «какова действительность». Наши чувства: зрение, слух, осязание, вкус и обоняние – вполне достаточны для удовлетворения бытовых потребностей. Чувствительность глаз, ушей, пальцев, языка и носа можно увеличить при помощи технических устройств типа микроскопа, телескопа, слухового аппарата и т.д. Ощущения должны быть представлены в виде, который может быть обработан нашим мозгом. Система кодирования влияет на нашу реакцию на ощущения. Удивительно, но изображение вшешнего мира на сетчатке глаза перевернуто вверх тормашками. Тем не менее, оно правильно интерпретируется мозгом! Дискретные нервные импульсы достигают мозга в виде некоторого кода, несущего информацию о цвете, форме и яркости внешнего мира. Человеческое ухо воспринимает информацию, которую несет амплитуда и частота звуковой волны. Человеческую систему кодирования оптического сигнала можно дурачить скоростью и сложностью трехмерного изображения. Тяжело определить, что действительно существует (является физической действительностью), а что было смоделировано мозгом (виртуальный мир). Философ Декарт, возможно, был первым, кто представил человека как машину, а Тьюринг первым провел аналогию между человеком и информационным процессором. Идеи Тьюринга обозначили путь к машинам фон Неймана – первым программируемым вычислительным устройствам.

Человек воспринимает не только чувственную информацию, но и сообщения, концепции и идеи (в форме математических символов и текста). Сообщения непрерывно получаются, передаются, запоминаются, делятся и изменяются. Любая информация обрабатывается некоторым кодом. Код математических действий (сложение, вычитание, умножение, интегрирование) является всеобщим, а текст кодируется во множестве форм на разных языках (английском, французском, китайском и т.д.), в которых слова и иероглифы имеют некоторое значение. Например, китайские иероглифы являются «нарисованными» словами. Таким образом, можно иметь целую иерархию кодирования информации. Для иллюстрации рассмотрим цитату, приведенную в качестве предисловия к этой главе. Она говорит, что для снижения стоимости передачи сообщения (а возможно, и для сохранения тайны) одно слово кода может представлять целую фразу или предложение. Например, сообщение «у меня серьезные проблемы, не осталось денег, пошли £100» в Юникоде обозначалось просто словом «obeliscus», а сообщение «не осталось денег, заболел и хочу вернуться домой» обозначалось словом «oblique»!

Простейшая система кодирования информации использует лишь два символа – «0» и «1», соответствующие состояниям «выключено» и «включено» электрореле или «точке» и «тире» в азбуке Морзе. Набором символов «0» и «1» можно закодировать любую информацию. Обратим внимание, что можно придумать систему кодирования, использующую единственное состояние, но она будет неэффективной, поскольку числа и буквы в ней должны быть представлены одним символом различной длины.

Развитие электрических устройств и потребность в их автоматизации привели к появлению компьютеров, использующих двоичную систему кодирования. В первых электрических машинах для начала и прекращения действия использовали ручные выключатели и ими же выбирали режим работы, например, «быстро/медленно» или «вперед/назад». В XIX столетии постепенное усовершенствование часов привело к созданию механизмов, способных заменить человека в запрограммированных по времени действиях и обеспечивающих автоматическое переключение электрической машины. Обратную связь использовали уже в механических устройствах (например, в механизме регулировки часов и первых паровых двигателях). Математик викторианской эпохи Чарльз Бэббэдж попытался построить первую вычислительную машину, работающую путем переключения редукторов и механических движений. Его машина заработала бы, но для этого требовалась точность размеров, нереальная для того времени. Идеи Бэббэджа на 100 лет опередили его время, и реальные электронные вычислительные машины появились только после развития электроники.

2.2. Цифровая информация

2.2.1. Числовые коды

Наша система чисел основана на числе 10. Любое число записывается как набор коэффициентов при числе 10 в некоторой степени, причем значения этих коэффициентов находятся в диапазоне от 0 до 9. Любое число N можно разложить по основанию B, и коэффициенты при числах, равных некоторой степени B, будут находиться в диапазоне от 0 до B - 1.

Например, обычное десятичное число «сто двадцать три» можно представить в виде:

$$123 = \mathbf{1}\times 10^2 + \mathbf{2}\times 10^1 + \mathbf{3}\times 10^0 \quad (2.1)$$

По основанию 5 оно может быть представлено следующим образом:

$$123 = \mathbf{4}\times 5^2 + \mathbf{4}\times 5^1 + \mathbf{3}\times 5^0 = 443 \quad (2.2)$$

В коде с основанием 2 (называемом двоичным) оно имеет вид:

$$123 = \mathbf{1}\times 2^6 + \mathbf{1}\times 2^5 + \mathbf{1}\times 2^4 + \mathbf{1}\times 2^3 + \mathbf{0}\times 2^2 + \mathbf{1}\times 2^1 + 1\times 2^0 = 1111011 \quad (2.3)$$

В последовательности двоичных цифр (называемых *битами*) первым (самый левый бит) пишут коэффициент при самой высокой степени двойки, а наименее значимая цифра (коэффициент при самой низкой степени) – последним. Последовательность четырех бит называют *нибблом*, а последовательность 8 бит – *байтом*. Более длинную последовательность бит называют *словом*. В компьютерных программах используется также система счисления по основанию 16:

$$123 = \mathbf{7}\times 16^1 + \mathbf{11}\times 16^0 \quad (2.4)$$

Эту систему счисления называют *шестнадцатеричной*. Используемые в ней коэффициенты лежат в пределах от 0 до 15. Чтобы избежать путаницы с десятичной системой, она использует первые шесть букв алфавита. Коэффициенты от 10 до 15 представлены буквами A–F, как показано в Таблице 2.1.

Десятичное число 123 в шестнадцатеричной системе счисления имеет вид «7B». Шестнадцатеричная система играет важную роль в компьютерном программировании, поскольку адреса памяти (определяемые 16 или 32-битовыми числами) и величины данных (8-битовые) выражаются в шестнадцатеричных кодах. Обычно числа в шестнадцатеричной системе (гексакодах) отмечают знаком «доллара», например:

$$\$123=\mathbf{1}*16^2 + \mathbf{2}*16^1 + \mathbf{3}*16^0 = 256 + 32 + 3 = 291 \text{ в десятичной системе} \quad (2.5)$$

Таблица 2.1. Обозначение чисел 10–15 в шестнадцатеричной системе счисления

A	B	C	D	E	F
10	11	12	13	14	15

2.2.2. Кодирование текста

Текстовые знаки также можно кодировать числами. Например, буква «A» может быть записана как «$41» (65 в десятичной системе), буква «B» как «$42» (66 в десятичной системе), «C» как «$43» и так далее. Другим письменным символам также можно придать соответствующий числовой код, называемый *алфавитно-цифровым*. Если система расшифровки понимает, что эти числа должны интерпретироваться как буквы, она может восстановить первоначальный текст. Алфавитно-цифровые знаки и их шестнадцатеричные коды приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2. Матрица алфавитно-цифровых кодов (ASCII)

ASCII	Char	Signal	ASCII	Char	ASCII	Char	ASCII	Char
0		NUL	32	Space	64	@	96	
1	☺	SOH	33	!	65	A	97	a
2	☻	STX	34	”	66	B	98	b
3	♥	ETX	35	#	67	C	99	c
4	♦	EOT	36	$	68	D	100	d
5	♣	ENQ	37	%	69	E	101	t
6	♠	ACK	38	&	70	F	102	f
7	•	BEL	39	’	71	G	103	g
8	-	BS	40	(	72	H	104	h
9	❍	HT	41	)	73	I	105	i
10	-	LF	42	*	74	J	106	j
11	-	VT	43	+	75	K	107	k
12	-	FF	44	,	76	L	108	I
13	-	CR	45	—	77	M	109	m
14	-	SO	46	.	78	N	110	n
15	☼	SI	47	/	79	O	111	0
16	►	DLE	48	0	80	P	112	p
17	◄	DC1	49	1	81	Q	113	q
18	⇕	DC2	50	2	82	R	114	r
19	!	DC3	51	3	83	S	115	s
20	¶	DC4	52	4	84	T	116	t
21	§	MAK	53	5	85	U	117	u
22	■	SYN	54	6	86	V	118	v
23	↑	ETB	55	7	87	W	119	w
24	↑	CAN	56	8	88	X	120	x
25	↓	EM	57	9	89	Y	121	y
26	→	SUB	58	:	90	Z	122	z
27	←	ESC	59	;	91	[	123	{
28	–	FS	60	<	92	\	124	|
29	↔	GS	61	=	93	]	125	}
30	▲	RS	62	>	94	^	126	”
31	▼	US	63	?	95	-	127	-

2.2.3. Кодированные процессы и действия

Логик Джорж Буль создал математическую основу современной цифровой электронной техники, введя логическую систему, основанную на символах «0» и «1». Чтобы электронная система управления действовала согласно входящим сигналам, она должна выполнять логические (однозначные) команды, соответствующие этому сигналу. Все человеческие решения могут быть разбиты на несколько простых логических действий (например, логическое И или логическое ИЛИ). Решение о включении электрического света можно принять на основании того, что уровень освещения низок И кто-то хочет читать в комнате. Точно так же электронное устройство может включить свет в салоне автомобиля, если уровень внешнего освещения низок И дверь (водителя ИЛИ пассажира) открыта. Эти примеры иллюстрируют логические операции И и ИЛИ. На рис. 2.1а приведены электронные схемы устройств, выполняющих эти логические операции. Логичес-

кое И представлено двумя последовательными ключами, а логическое ИЛИ – двумя параллельными ключами. Реальные устройства должны выполнять достаточно сложные логические действия. Булева алгебра позволяет упрощать и находить эквивалентные логические схемы реальных устройств. Основные логические операции, лежащие в основе любого устройства, приведены в Таблице 2.3.

На рис. 2.1а показаны схемы механических ключей, которые размыкают или замыкают цепь и создают на выходе определенное напряжение. Положительное напряжение на выходе свидетельствует, что контакты ключа замкнуты, а нулевое, что они разомкнуты. Сложную сеть механических ключей можно моделировать электрической схемой и, следовательно, процесс переключения и передачу данных можно осуществлять очень быстро. Кроме того, для автоматизации должен существовать некоторый способ принятия решения электрической цепью! В большинстве систем управления это достигается при помощи некоторого датчика и пороговой цепи. Датчиками часто являются резисторы, сопротивление которых зависит от величины некоторого физического параметра (например, давления, температуры или освещенности). Рассмотрим фоторезистор (его сопротивление зависит от освещенности), соединенный последовательно с постоянным сопротивлением и электрической батареей. Изменение интенсивности света приводит к изменению напряжения на фоторезисторе. Пороговая цепь сравнивает напряжение с некоторым заранее установленным порогом напряжения. Если напряжение на датчике выше порога, напряжение на выходе цепи будет

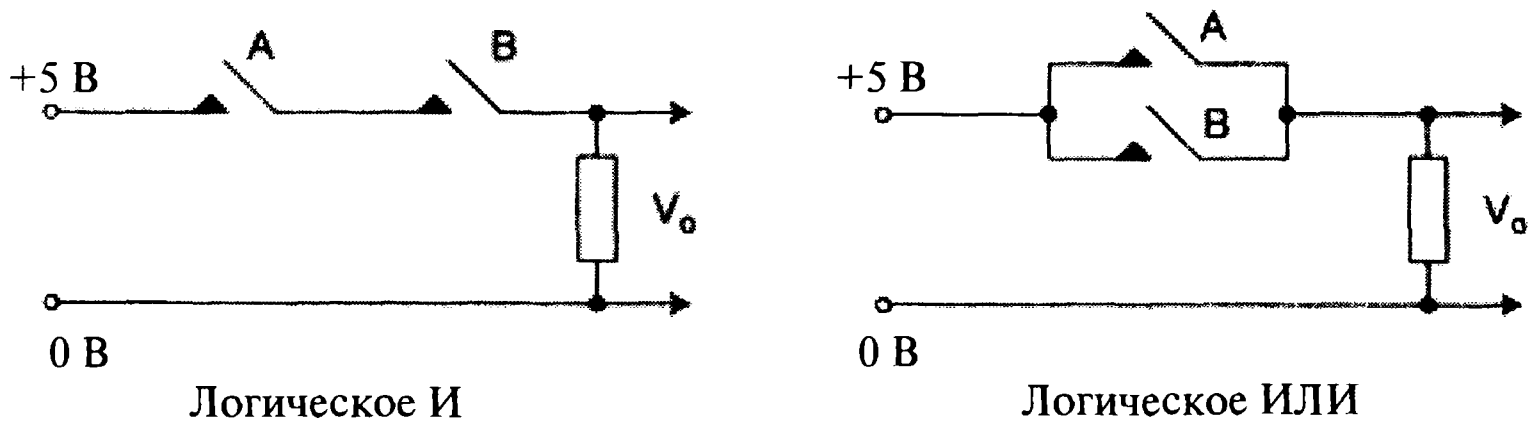
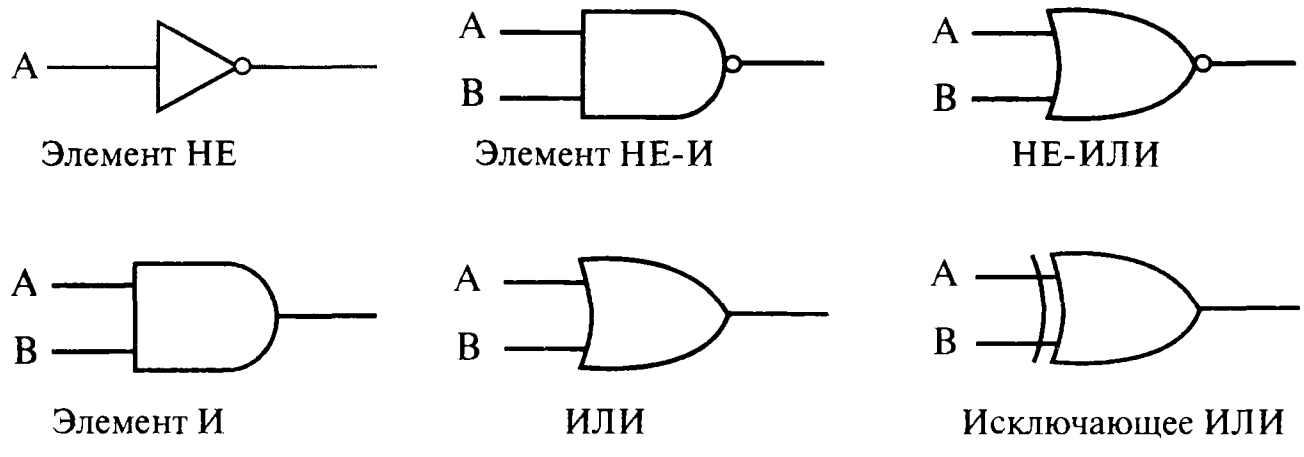


Рис. 2.1. Ручные переключатели A и B создают на выходе схемы напряжение V_o = +5 В, если (a) они оба включены (логическое И) или (b) включен один из них (логическое ИЛИ). Полупроводниковые диоды создают на выходе напряжение, равное V_o = +5 В, если на оба входа A и B подано +5 В (логическое И) или если на один из входов подано +5 В (логическое ИЛИ).

иметь определенное положительное значение. В противном случае напряжение на выходе пороговой цепи будет нулевым. Если порог напряжения соответствует некоторому уровню освещенности, который человек считает недостаточным для удобного чтения, электрическая цепь включится автоматически. В действительности цепь выполняет пожелания человека и поддерживает его суждение о достаточности или недостаточности уровня освещения. Датчик вместе с пороговой цепью принимает самое простое логическое решение, а именно лампочка должна быть включена или выключена. Это решение (положительное или нулевое напряжение) объединяется с другими логическими командами, чтобы включить или выключить лампочку. Действие такого устройства основано на математической логике. В начале 1960-х годов появилось другое направление логики, которую Заде [2] назвал нечеткой логикой, подражающей принятию решений людьми. Человеческие решения часто являются результатом оценки внешних условий, не основанных на точных входящих данных. Несмотря на это, мы достаточно хорошо управляем автомобилем и самолетом. Нечеткая логика исследует проблемы управления с неточными входными данными.

Таблица 2.3. Символы ИЛИ, И, НЕ-И, НЕ-ИЛИ, Исключающее ИЛИ, исключающее НЕ-ИЛИ



A	B	И	НЕ-И	ИЛИ	НЕ-ИЛИ	Исключающее ИЛИ	Исключающее НЕ-ИЛИ
0	0	0	1	0	1	0	1
0	1	0	1	1	0	1	0
1	0	0	1	1	0	1	0
1	1	1	0	1	0	0	1

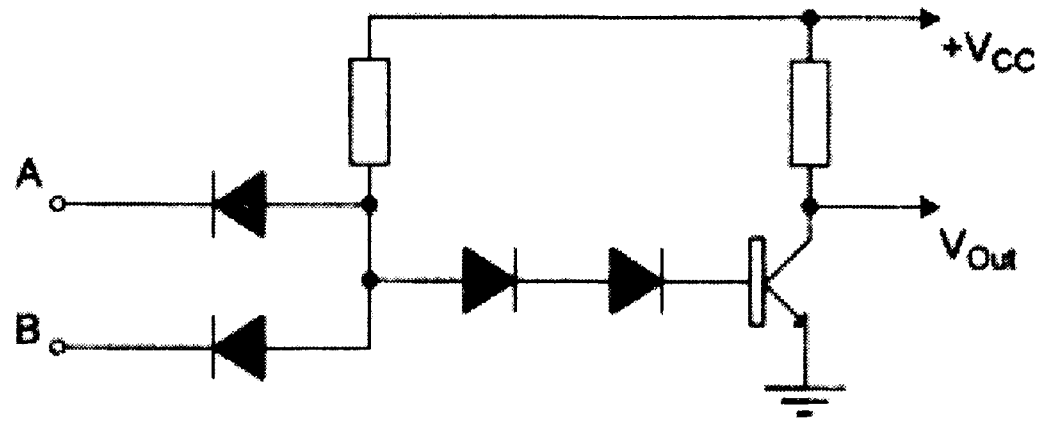
2.3. История развития вычислительных методов

2.3.1. Транзистор

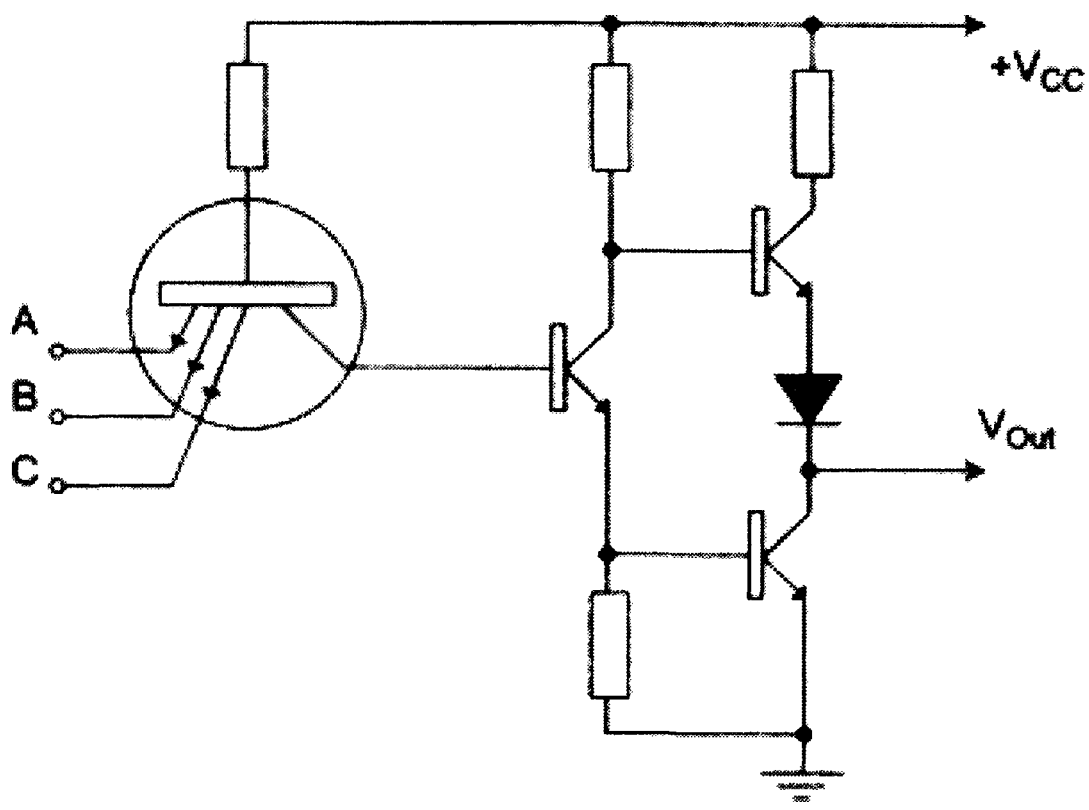
Во время Второй мировой войны для расшифровки кодов немецкой шифровальной машины «Энигма» Тьюринг и его коллеги разработали и построили первую вычислительную машину на электронных лампах. Теоретикам помогали инженеры Министерства Связи, имевшие опыт работы с крупномасштабными релейными сетями. После войны возможности вычислительных машин были оценены в Великобритании и США, а Шэннон и Вивер [3] создали теорию передачи информации через телефонные станции. В это же время ученые и инженеры занялись разработкой крупногабаритных релейных предшественников современных

вычислительных машин. Когда появился транзистор, начала раскручиваться спираль миниатюризации компьютеров, продолжающаяся и сегодня.

На рис. 2.1b показаны схемы полупроводниковых цепей, которые осуществляют те же логические операции, что и механические релейные устройства. Недостатком диодных цепей является необходимость стабилизации уровня напряжения. Следовательно, для улучшения отношения сигнал/шум и повышения надежности требуется усиление сигнала. Позднее появились биполярные и мультиэмиттерные транзисторы, решающие эту проблему (рис. 2.2), затем полевой транзистор и, наконец, мультитранзисторные схемы на одной кремниевой микросхеме. Транзисторные элементы делают последовательным нанесением нескольких слоев допированных полупроводников и изолирующих окислов.

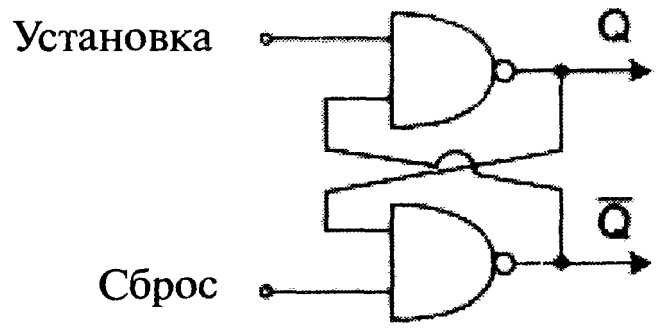


(а) диодно-транзисторная схема

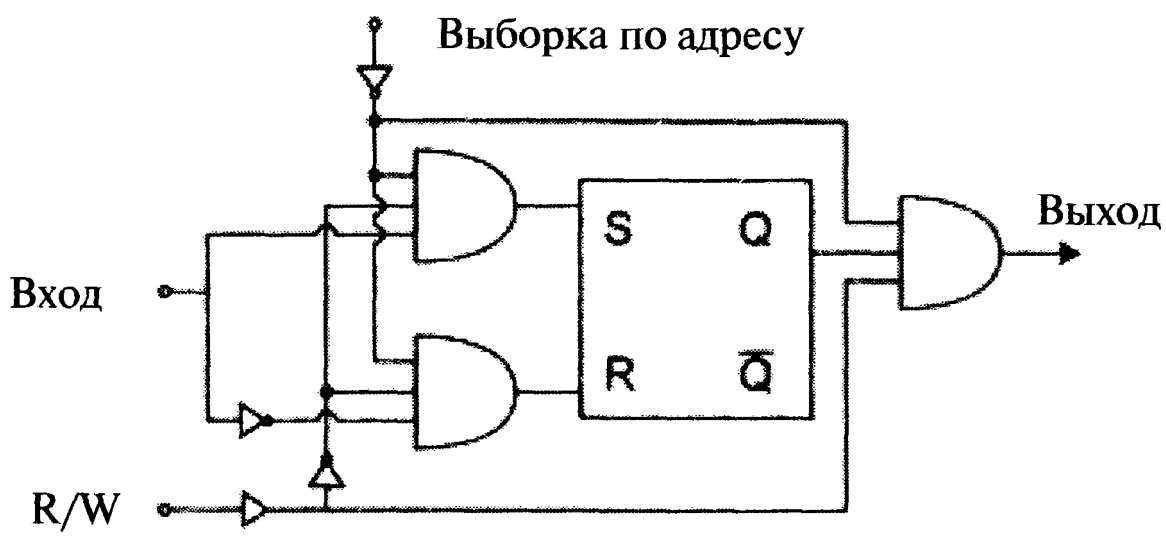


(б) транзистор-транзисторная схема

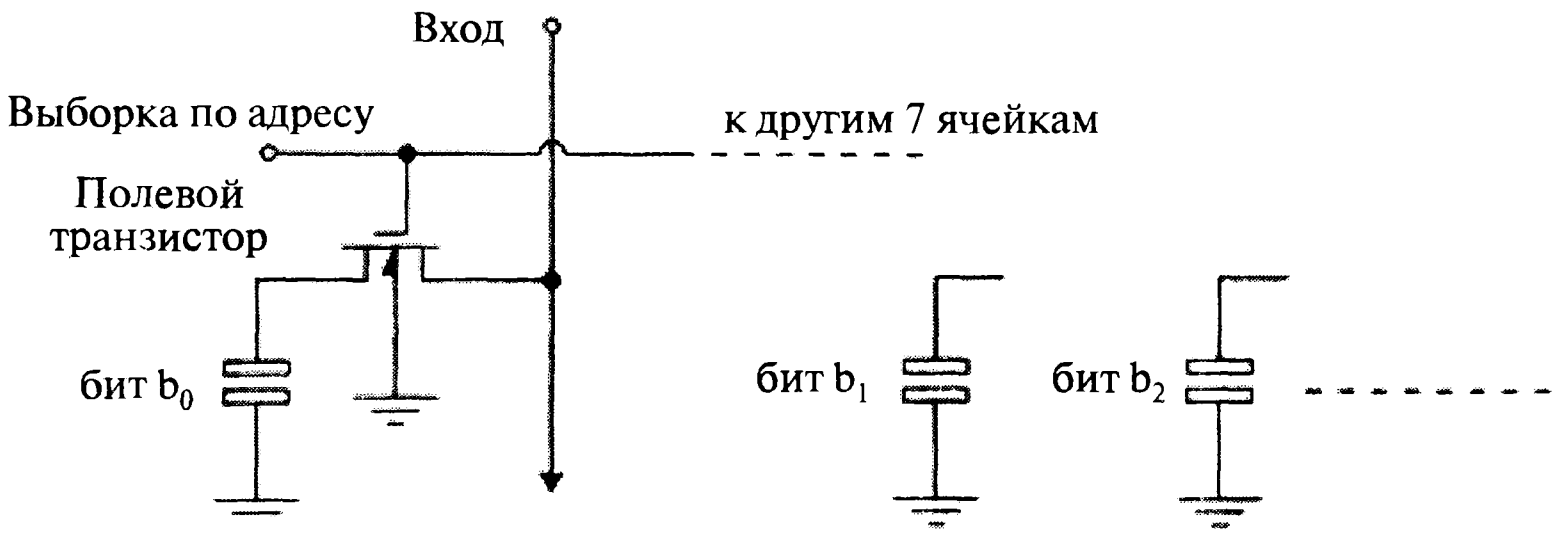
Рис. 2.2. (а) – Комбинация диодов и транзисторов, называемая диодно-транзисторной схемой, уменьшает уровень шума. Два последовательных диода отключают транзистор, если на любой из входов (A или B) подается нулевое напряжение; (b) – в семидесятые годы в логические схемы стали включать мультиэмиттерные транзисторы, и интегральные схемы стали называть транзистор-транзисторными. Обе цепи осуществляют логическую операцию НЕ-И.



(a) триггер с раздельным входом (SR-триггер)



(b) статическая память произвольного доступа



(c) динамическая память произвольного доступа

Рис. 2.3. Компьютеры имеют большое количество электронных ячеек памяти; (a) – переключающиеся элементы, аналогичные электрореле, являются основой большинства ячеек памяти. Они имеют два устойчивых состояния и изменяют свое состояние, когда приходит отрицательный импульс напряжения (состоящий в переходе из состояния 1 в состояние 0) на входы S или R. (b) – Ячейка памяти произвольного доступа. Логическое состояние управляющей линии «читать/писать» (R/W) определяет, должна ли информация записываться или считываться из ячейки. Контрольная линия выбора адреса включает или выключает ячейку. Мультивход канала И обеспечивает правильное действие ячейки. (c) – В схеме динамической памяти случайного доступа заряд на конденсаторе определяет состояние ячейки. Заряд управляется полевым транзистором. Если не требуется большая мощность, вместо транзистор-транзисторных схем используют схемы на основе полевых транзисторов.

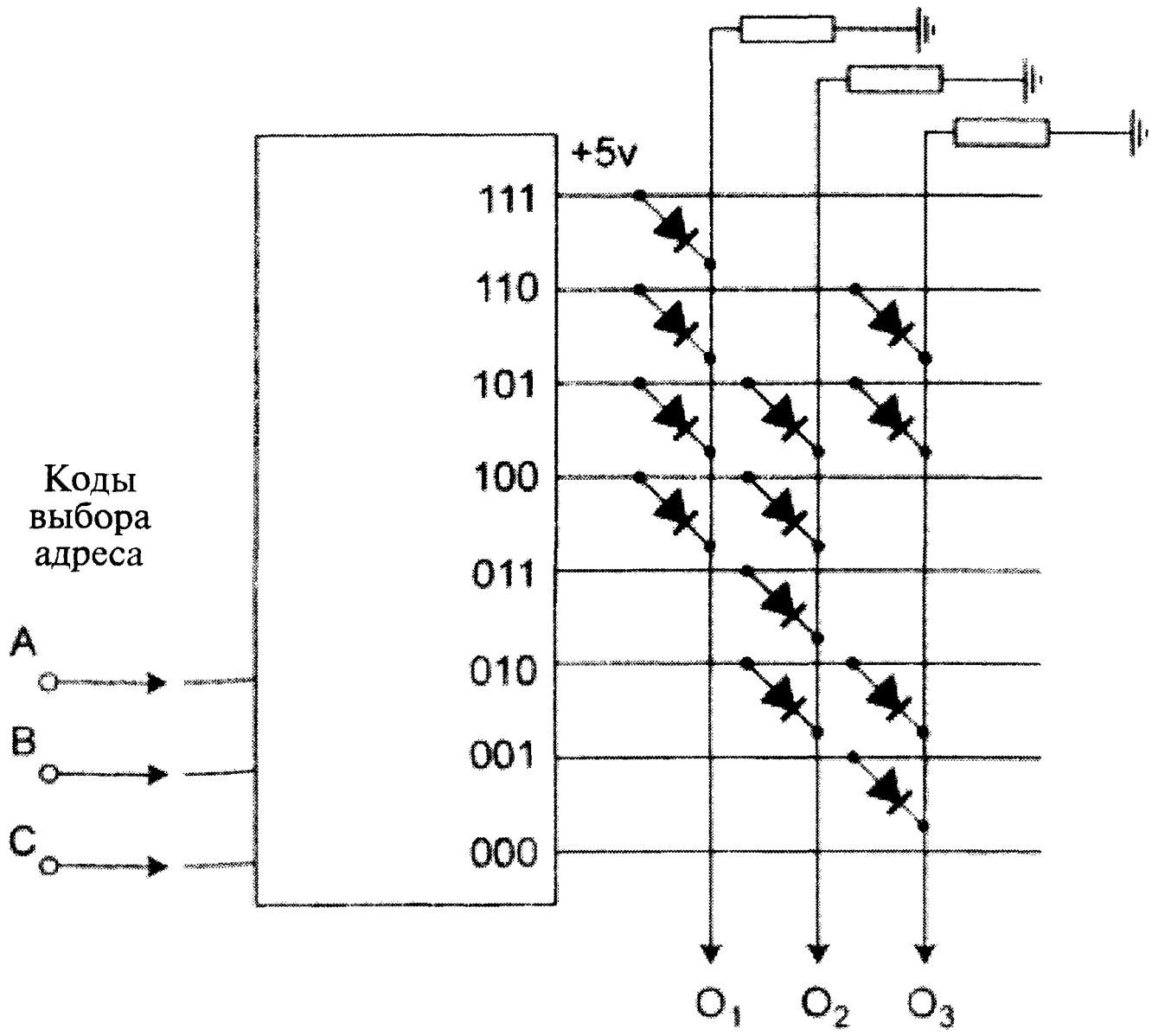
Для принятия решения люди используют знания и поступающую информацию. Отметим, что описанные логические цепи действуют независимо от продолжительности сигнала. Человеческая память хранит информацию, которая может

быть восстановлена и изменена. Поскольку достоверно не известно, как мозг запоминает информацию (и вызывает ее, когда требуется), попытки построить искусственную электронную память могут показаться самонадеянными. Появление напряжения V на обкладках конденсатора может быть обусловлено электрическим током. Заряд Q связан с напряжением формулой V = Q/C, где C – емкость конденсатора. Последовательность двоичных цифр (бит) может быть описана рядом заряженных или разряженных конденсаторов. К сожалению, любой конденсатор в конечном счете разряжается, и поэтому для такого типа памяти требуется вспомогательная схема регенерации. Это используется, например, в динамической памяти произвольного доступа (DRAM). Говорят, что память имеет «произвольный доступ», если к ее ячейкам можно обратиться в любой последоватьности (а не обязательно сначала к первой, затем ко второй, третьей и т.д.).

В компьютерах используют элементы, изменяющие свое логическое состояние при появлении импульса напряжения. Этот элемент поддерживает свое состояние, пока оно не изменится на противоположное другим импульсом. Типичная схема такой цепи показана на рис. 2.3a. В современных компьютерах эта схема является основой сложнейших микросхем статической памяти произвольного доступа (SRAM). Обычно все элементы памяти являются 8-битовыми (однобайтовыми). Однако ячейки памяти могут быть и десяти-, двенадцати-, четырнадцати- или шестнадцатибитовыми. Чтобы получить доступ к данным, на адресный вход элемента памяти направляются соответствующие коды. На схеме, изображенной на рис. 2.3b, направление потока данных определяется логическим состоянием на входе линии управления (R/W). Если управляющий вход находится в состоянии 1, данные (появляющиеся на входе) будут записываться. Если линия находится в состоянии 0, данные будут считываться с ячейки и посылаться в другое место. Для сравнения на рис. 2.3c приведена схема динамической памяти произвольного доступа (DRAM).

Для любого компьютера важнейшее значение имеют и элементы памяти, состояние которых в процессе работы изменить нельзя. Такая форма памяти требуется для хранения информации, позволяющей при включении привести компьютер в рабочее состояние. Эти ячейки памяти называют постоянными запоминающими устройствами (ПЗУ) (в англоязычной литературе – ROM-память), что иллюстрируется рис. 2.4.

Самые современные элементы памяти имеют более сложную структуру, не требующую дополнительных логических элементов. Первым типом элементов многоцелевой памяти является двухпортовая память, представляющая собой память произвольного доступа и позволяющая считывать информацию из одной ячейки и одновременно записывать информацию в другую ячейку той же микросхемы. Это позволяет, например, изменять информацию об интенсивности изображения одного пиксельного элемента и одновременно передавать на дисплей информацию с других пикселей. Дальнейшая интеграция была достигнута с помощью схем видеопамяти случайного доступа (VRAM) (рис. 2.5). Эти элементы позволяют изменять информацию в элементах памяти и одновременно передавать последовательность видеосигналов на монитор или компьютер.



(a)

A	B	C	O_1	O_2	O_3
0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1
0	1	0	0	1	1
0	1	1	0	1	0
1	0	0	1	1	0
1	0	1	1	1	1
1	1	0	1	0	1
1	1	1	1	0	0

(b)

Рис. 2.4. Постоянное запоминающее устройство (ПЗУ или ROM) – это элементы памяти, информация которых не изменяется даже при отключении энергии. (a) – Упрощенная трехбитовая цепь, в которой адреса A, B и C находятся в состоянии 1. Сигнал амплитудой +5 В на линии входа подается на верхний диод (напряжение на всех других выходах равно 0). Ток течет через резистор и верхний диод. На выходе O_1 напряжение равно +5 В (логическое состояние 1), а на выходах O_2 и O_3 – ноль. (b) – Логические состояния на выходе для восьми возможных комбинаций трех входных сигналов на адресах A, B и C. Очень широко используется перепрограммируемый ПЗУ (EEROM). Для изменения кодов нужно приложить электрический сигнал.

2.3.2. История развития микропроцессоров

Изобретение транзистора в 1948 году физиками Шокли, Браттэйном и Бардиным, изучавшими поверхностные свойства полупроводников, описано в работе [4]. За изобретением устройства «точечного контакта» последовало открытие (Шокли) биполярного транзисторного перехода. Шокли разработал полевой транзистор, что привело к созданию основного блока современной электроники –кремниевой интегральной микросхемы. Интегральная микросхема была определена Килби и Нойсом как «элемент твердого тела, в который включены несколько пассивных или активных компонентов, не имеющих внешней связи между ними» [5]. Одновременное изобретение микросхемы в 1959 г. компаниями Texas Instruments и Fairchild Semiconductor Corporation ознаменовало начало современной революции в электронике. Совершенствование технологии производства интегральных схем привело к уменьшению их размера, и в конце 1960-х годов началось коммерческое производство первых компьютеров на основе микросхем.

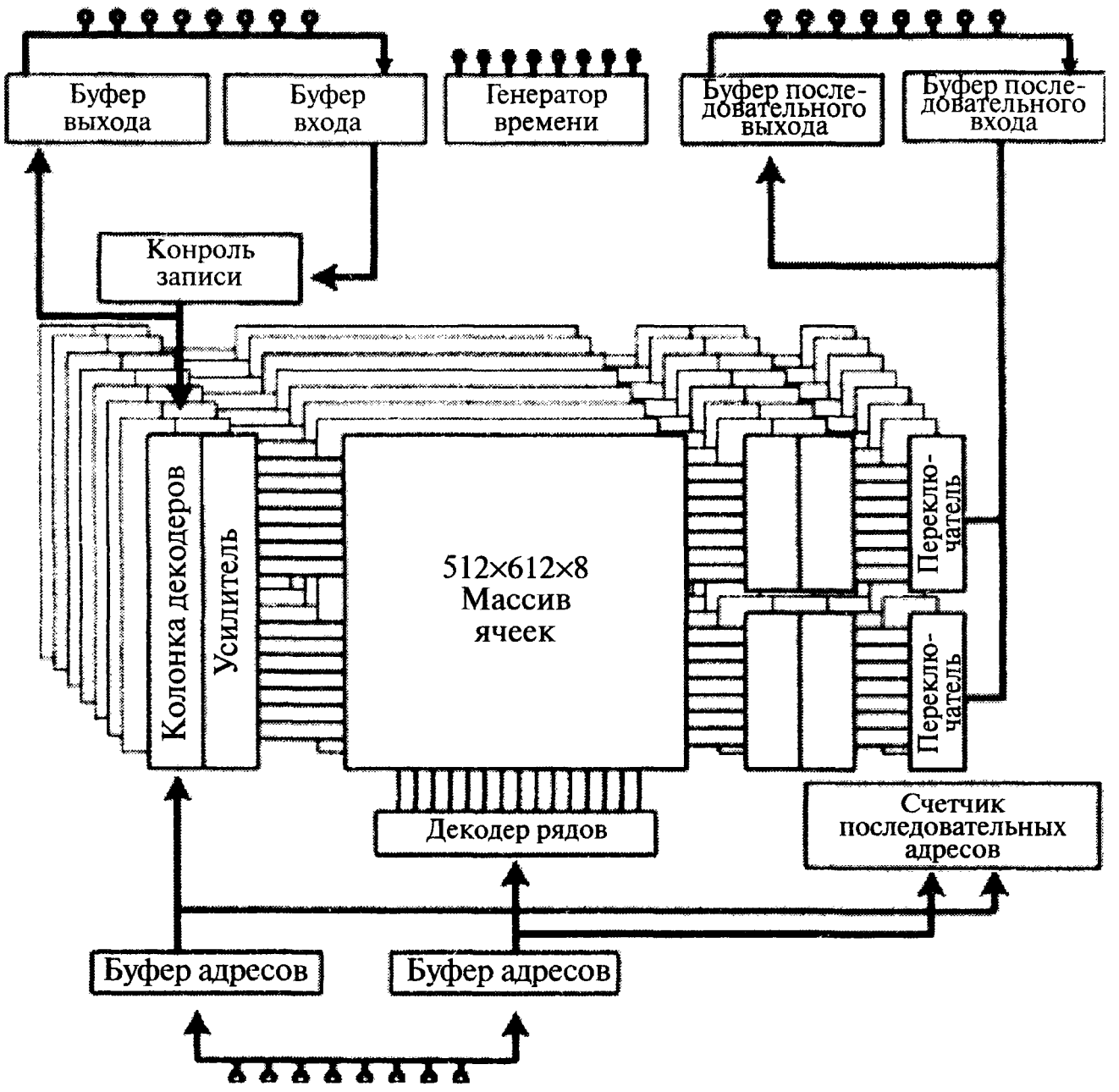


Рис. 2.5. В последних видеокартах используются микросхемы видеопамяти случайного доступа (VRAM). Их примером являются микросхемы Toshiba TC528267, имеющие 512×512×8 бит памяти. Они позволяют вводить новую информацию, а имеющиеся данные выводить на дисплей или передавать на соседние элементы для дальнейшего преобразования.

2.3.3. Motorola 6802

8-битовый микропроцессор Motorola 6802 широко использовался до самого последнего времени. Принцип его работы аналогичен работе промышленных компаний. В любой компании менеджеры управляют потоком информации, отправляя ее в архив или извлекая ее оттуда. Исходя из этой информации, дирекция на основе

некоторых правил принимает решения. Аналогично, в компьютере центральный процессор (CPU) (рис. 2.6) контролирует работу программы (обычно при этом используется только читаемая память). Во время работы программы информация считывается, а после выполнения ЦПУ операций пишется в активную память.

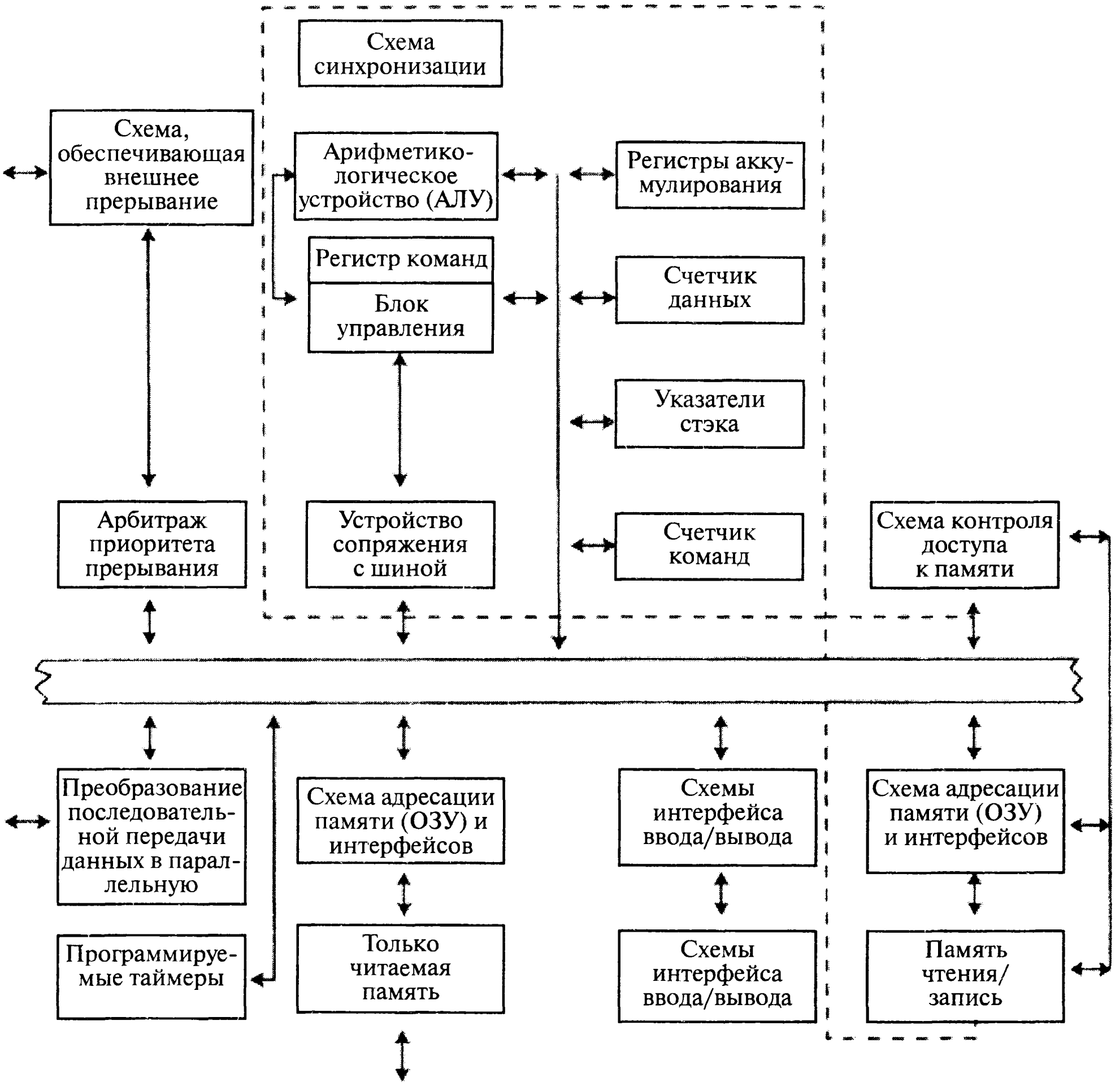


Рис. 2.6. Начиная с 1980-х годов основным элементом центрального процессора стала 8-битовая микросхема Motorola 6802. Специальные элементы этой микросхемы несут информацию о выполняемой программой команде, а сумматоры A и B выполняют операции сложения или вычитания.

ЦПУ связан с элементами памяти двумя системами проводников, расположенными на печатной плате и называемыми «шинами». Первые ЦПУ имели 16-битовые адресные шины и 16-битовые коды, по которым система определяла адреса памяти, в которые записываются или из которых считываются 8-битовые данные. 8-битовые шины данных содержали информацию, описывающую расположение элементов памяти, определяемых кодом адресной шины. На рис. 2.6 не показаны

управляющие линии, определяющие тип операции, например, считывание или запись информации. Отметим, что связываться с ЦПУ одновременно мог только один элемент памяти, и по этой причине действия были последовательными.

Аналогично тому, как действия сотрудников компании управляются часами, все операции ЦПУ и связанных с ним элементов памяти синхронизированы. Основные действия занимают несколько тактовых интервалов, и в 1970-х годах, когда тактовая частота компьютера была порядка 1 МГц, время выполнения одного действия занимало несколько микросекунд, и процессор мог исполнять от 250 до 300 тысяч действий в секунду.

Важными направлениями деятельности компании являются маркетинг и реклама. Связь с внешним миром осуществляется параллельно одним или несколькими микросхемами входа/выхода процессора. Эти микросхемы называют периферийными адаптерами (PIA), периферийными входами/выходами (PIO) или универсальными адаптерными интерфейсами (VIA). Они имеют несколько 16-битовых адресов, и некоторые из них имеют 8-битовые коды, передаваемые на другое устройство или вводимые из них. Другие элементы памяти содержат управляющие коды, которые могут обрабатываться в соответствии с выполняемой программой. Самым быстрым методом передачи информации является параллельная связь, при которой 8-битовая информация подается на выход, на который одновременно выходят отправитель и адресат. Второй метод передачи информации является последовательным, когда каждый бит посылается (или получается) последовательно по одному каналу связи согласно некоторому алгоритму (типа RS232). Последовательная связь работает медленнее, но требует меньше соединительных линий (а именно только две – сигнал и землю).

В 1970-х годах выполнение одной операции занимало несколько микросекунд. В то время актуальной была задача перевода аналового сигнала в цифровую форму. Оцифровка состоит в переводе аналогового сигнала в число и сохранении его в памяти компьютера. Оцифровку осуществляет АЦП, аналогово-цифровой преобразователь (ADC). Экономичный 8-битовый АЦП в то время переводил аналоговый сигнал в цифровой вид за 15-20 микросекунд.

2.3.4. Измерительные системы Vela и LabView

Все измерительные системы имеют несколько общих элементов. Обязательно должен иметься датчик, переводящий некоторый физический параметр (например, температуру) в напряжение. Отметим, что напряжение может быть представлено значением, усредненным по некоторому интервалу времени, что позволяет снизить шум датчика. В середине XX столетия физические параметры измеряли при помощи специализированных приборов. Например, существовали вольтметры, амперметры, фазоизмерители, таймеры, измерители мощности, емкости и т.д. После появления цифровых методов стало можно использовать программное обеспечение. Оцифровку сигнала осуществляет АЦП, затем он сохраняется в RAM памяти и обрабатывается. Цифровые данные можно вывести на монитор в виде цифр с семью значащими цифрами или в виде аналогового сигнала (через цифро-аналоговый преобразователь (ЦАП), переводящий цифровой сигнал в аналоговый вид). Образовательная программа Vela [6] состояла в создании многоцелевого школьного прибора на основе микропроцессора Motorola 6802. Она

содержала более 80 программ, что позволяло моделировать упомянутые выше измерительные инструменты. Краткий обзор основных элементов интегральной схемы Vela дает рис. 2.7. Недостаток этой измерительной системы состоял в относительно медленной работе, однако во многих случаях это не является проблемой. Немного позднее компания National Instruments разработала измерительную систему LabView. Она позволяла выбрать на компьютерном экране одно из измерительных устройств и определить диапазон его измерений [7]. Компьютер имел специальную карту входа/выхода, связанную с измерительными датчиками.

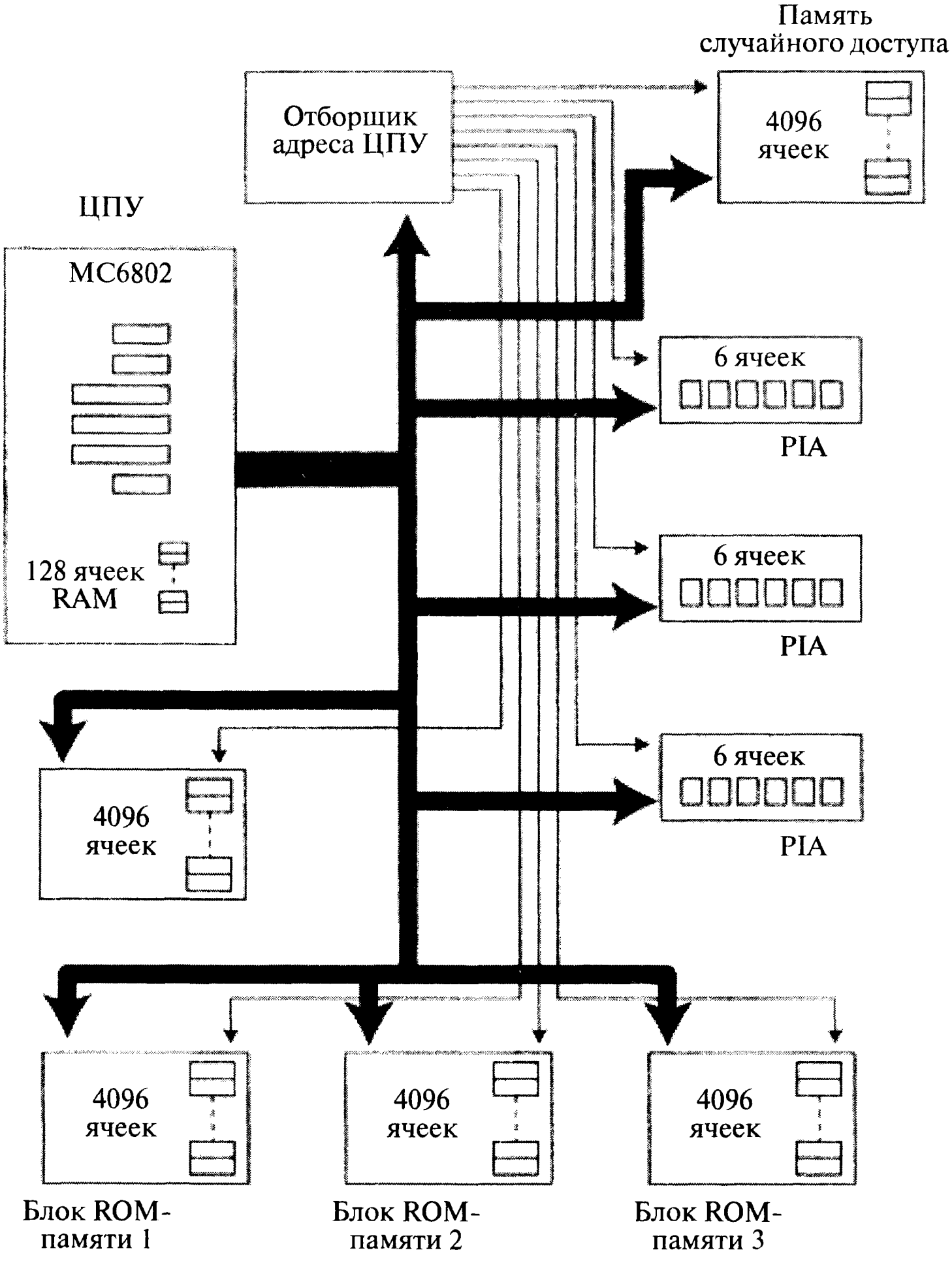


Рис. 2.7. Схема многофункционального прибора Vela, измеряющего время, частоту, фазу, оцифровывающего данные и т.д. В трех EPROMах закодированы более 60 различных измерительных функций. Один из периферийных адаптеров (PIA) используется для выбора с помощью клавиатуры рабочей функции и для показа данных в виде семизначных чисел. Второй PIA-адаптер соединен с предварительным усилителем, АЦП и ЦАП, а третий PIA обеспечивает параллельное расширение и связь с принтером.

2.3.5. Связь языка программирования с электроникой

В 1980-х годах тактовая частота микропроцессоров возросла, и они стали выполнять более сложный набор команд, выбираемых пользователем. Рис. 2.8 иллюстрирует связь логической схемы с программами микропроцессора Motorola 6802. 8-битовые коды передаются от адреса памяти $1234 в один из специализированных регистров ЦПУ (на сумматор А или В). Это является первой стадией операции сложения двух чисел. Команда языка ассемблера или строка в программе должна быть соответственно LDAA $1234 или LDAB $1234. Они представляют собой трехбайтовые команды, которые понимает ЦПУ 6802. Эти три байта связаны с тремя смежными точками памяти EPROM программы. Первый байт оперативного кода находится в состояниях B6 или F6, устанавливающих логические переключатели в соответствующем направлении. Последующие два байта несут цифровые данные. Единственным различием двух кодов операций является логическое состояние одного из битов операционного кода. Логическое состояние этого бита определяет направление движения 8-битовых данных из адреса $1234, как показано в рис. 2.8.

Компания Motorola усложнила свой микропроцессор и разработала микросхему с емкостью памяти 68000 бит, которую использовали в компьютерах Макинтош. Другие компании использовали микропроцессор с уменьшенным набором инструкций. Этот микропроцессор использовал то, что некоторые команды вызываются гораздо чаще других. Поэтому в нем оптимизировалось время выполнения часто вызываемых команд. Сложные действия выполнял специальный сопроцессор, что позволило увеличить скорость работы программ.

2.3.6. Транспьютер T800 фирмы INMOS

В конце 1980-х годов широко использовали микросхему, называемую транспьютером. Траспьютер, казалось, был пределом «компьютера на микросхеме». Основным его достоинством была более высокая скорость выполнения операций и передачи информации. Имеется три возможности решения этой задачи. Первая состоит в увеличичении тактовой частоты, что подразумевает дальнейшую миниатюризацию транзисторных элементов. Именно ее реализуют нынешние процессоры компании Intel. Однако должен существовать предел, выше которого процесс фотолитографии, при помощи которого делают микросхемы, перестает действовать. Следовательно, этот путь не может быть долгосрочным решением проблемы. Во-вторых, можно использовать несколько ЦПУ (чтобы они выполняли параллельные действия). Третья возможность состоит в разработке микросхем «специфического применения» (ASIC), связанных с шинами и способных выполнять сложные действия (освобождая ЦПУ для решения других задач).

Британская фирма INMOS выпустила микросхему, обеспечивающую параллельную работу нескольких микропроцессоров. Траспьютер T800 имел мощный встроенный 32-битовый процессор с плавающей точкой, который выполнял арифметические вычисления независимо от ЦПУ. Он имел память 4 кбайт (кб) и четыре быстродействующих последовательных линии связи, позволяющие вводить и выводить данные независимо от главного процессора, как показано на рис. 2.9а. Это позволило траспьютеру стать основным блоком сложных сетей, оптимизирующих преобразование информации. Для транспьютера был разработан

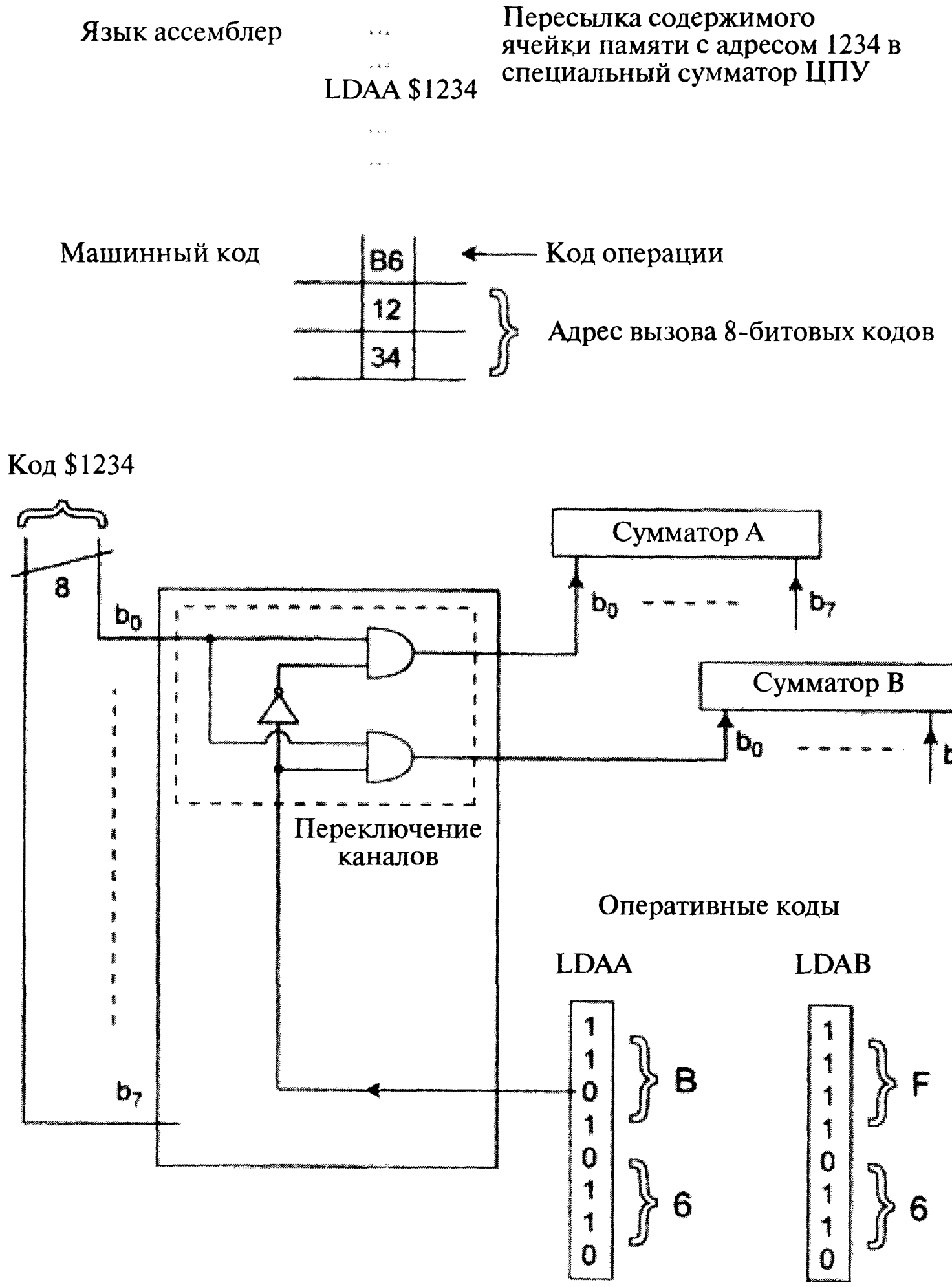


Рис. 2.8. Для иллюстрации связи системы Vela с логическими входами и сумматорами ЦПУ M6802 рассмотрим команду, состоящую из трех кодов (B6, 12 и 34), занимающих три бита памяти в EPROMe. Первый байт представлял собой код контроля (B6), причем третий бит этого байта – логический «0». В микросхеме Motorola несколько иной код F6 управляет загрузкой сумматора B. Третий бит управляет связью, как показано на схеме. Если управляющий бит находится в состоянии «0», 8-битовые данные из точки памяти 1234 передаются на сумматор A. Если же он находится в состоянии «1», данные направляются на сумматор B. Другие биты управляющего кода обеспечивают передачу данных.

новый язык программирования OCCAM, в котором были определены не только последовательные (SER), но и параллельные (PAR) действия. После компиляции программы код проверялся на одном траспьютере, выполняющем параллельные

действия. После проверки коды можно было изменить для выполнения параллельных действий. Сеть транспьютеров использовали и в первой системе автоматического анализа изображений, описанной в следующей главе.

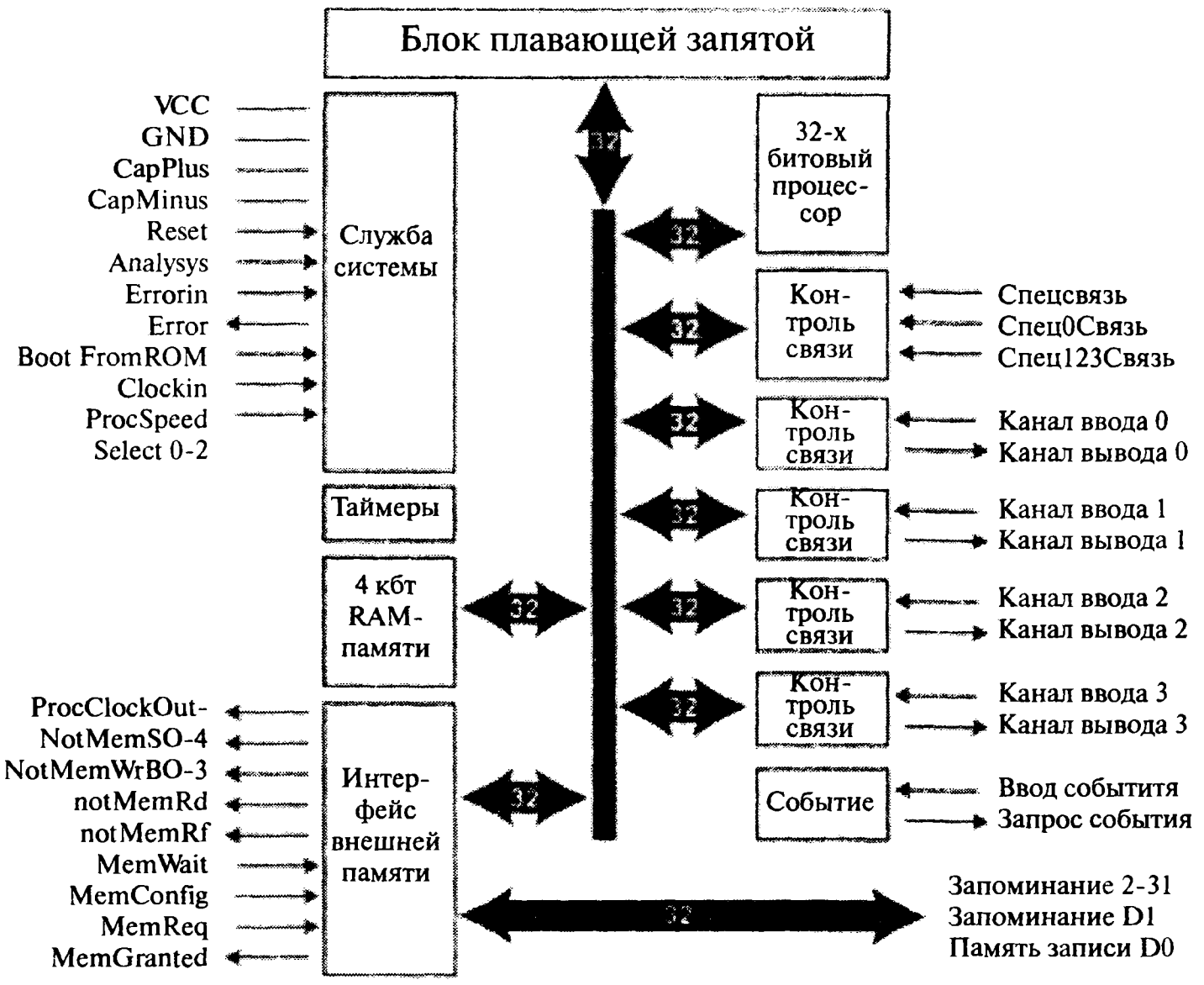


Рис. 2.9. (a) – Схема траспьютера T800 компании INMOS. Вместо 8-битового ЦПУ, как в процессоре Motorola 6802, траспьютер имел 32-битовый ЦПУ. На одной кремниевой микросхеме имелись таймеры, 4 кб RAM-памяти и четыре быстродействующих последовательных связи, позволяющие независимо вводить и выводить данные. Интерфейс позволял с помощью внешней памяти расширять ее до значений порядка Гб. (b) – Четыре быстродействующих канала связи позволяют создать массив траспьютеров. «Решетка» удобна для решения задач методом конечных элементов. «Конвейеры» оптимальны для решения задач, алгоритм которых содержит несколько (n) действий, выполнение каждого из которых требует примерно одинакового вычислительного времени. 3D-«куб» имеет наименьшее количество связей между наиболее удаленными транспьютерами. Следовательно, он оптимален для выполнения задач, требующих частой связи между любыми транспьютерами.

Параллельная обработка информации особенно эффективна для выполнения сложных расчетов и для обработки изображения. Например, для ускорения обработки видеоинформации можно использовать «конвейер», «решетку» и «гиперкуб», показанные на рис. 2.9b. Конвейер особенно эффективен для алгоритмов, которые могут быть разделены на n операций с примерно одинаковым временем вычислений ΔT. Соединяя последовательно n процессоров и вводя данные каждые ΔT секунд, конвейер выдает ответ каждые ΔT секунд. Решетка из множества взаимосвязанных процессоров моделирует реальный мир, в котором каждый процессор контролирует некоторую область. Физические задачи можно моделировать при помощи дифференциальных уравнений, решение которых описывает поведение системы. Гиперкуб особенно эффективен, если при решении задачи все элементы существенно связаны между собой. В n-мерном кубе любой процессор имеет n связей с другими процессорами, а время передачи данных в этой конструкции минимально (рис. 2.9b).

Скорость процессора Пентиум компании Intel постепенно превысила скорость траспьютера. Это обусловлено двумя причинами. Во-первых, разработчики постоянно увеличивали тактовую частоту Пентиума, в то время как транспьютер не смог преодолеть порог 25 МГц. Во-вторых, при использовании Пентиума разработчикам программного обеспечения не нужно было изучать новый язык программирования. Они могли просто использовать новые микросхемы в уже существующих машинах. Поскольку скорость Пентиума удваивалась каждые 12–18 месяцев, потребность в параллельных схемах, используемых транспьютером, уменьшилась. Исключением являются самые мощные машины, решающие сложные вычислительные задачи.

2.3.7. Сигнальный процессор (DSP)

Несмотря на сказанное выше, параллельная обработка сигнала используется до сих пор. Некоторые американские компании, например, Texas Instruments, решили разрабатывать микросхемы, состоящие из нескольких внутренних процессоров, блоков памяти и линий связи. Такие системы имеют преимущество при выполнении простых, но часто повторяемых операций для каждого пикселя изображения. Для этого разработали специализированную микросхему, которую назвали цифровым сигнальным процессором (DSP). Это устройство и его применения описаны в работе [8]. Оно предназначено для построения изображения, когда для каждого пикселя выполняются весьма простые вычисления.

Компания INMOS разработала процессор DSP A100, который можно представить как конвейер взаимосвязанных элементов, осуществляющих умножение, линий задержки и блоков памяти, схематически показанных на рис. 2.10. A100 состоит из 32 ячеек, выполняющих различные цифровые операции. Аналоговый сигнал поступает на канал D_{in}, где он оцифровывается каждые ΔT секунд, время задержки каждой ячейки конвейера. Через время ΔT на выходе появится сигнал $O_1 = D_0W_0$, через $2\Delta T$ на выходе будет сигнал $O_2 = D_0W_1 + D_1W_0$ и так далее, где W – весовой коэффициент. Способность умножать и складывать позволяет моделировать электрические цепи. Например, выходной сигнал низкочастотного RC-фильтра описывается уравнением (2.6). Его можно описать рядом, совпадающим с сигналом на выходе конвейера

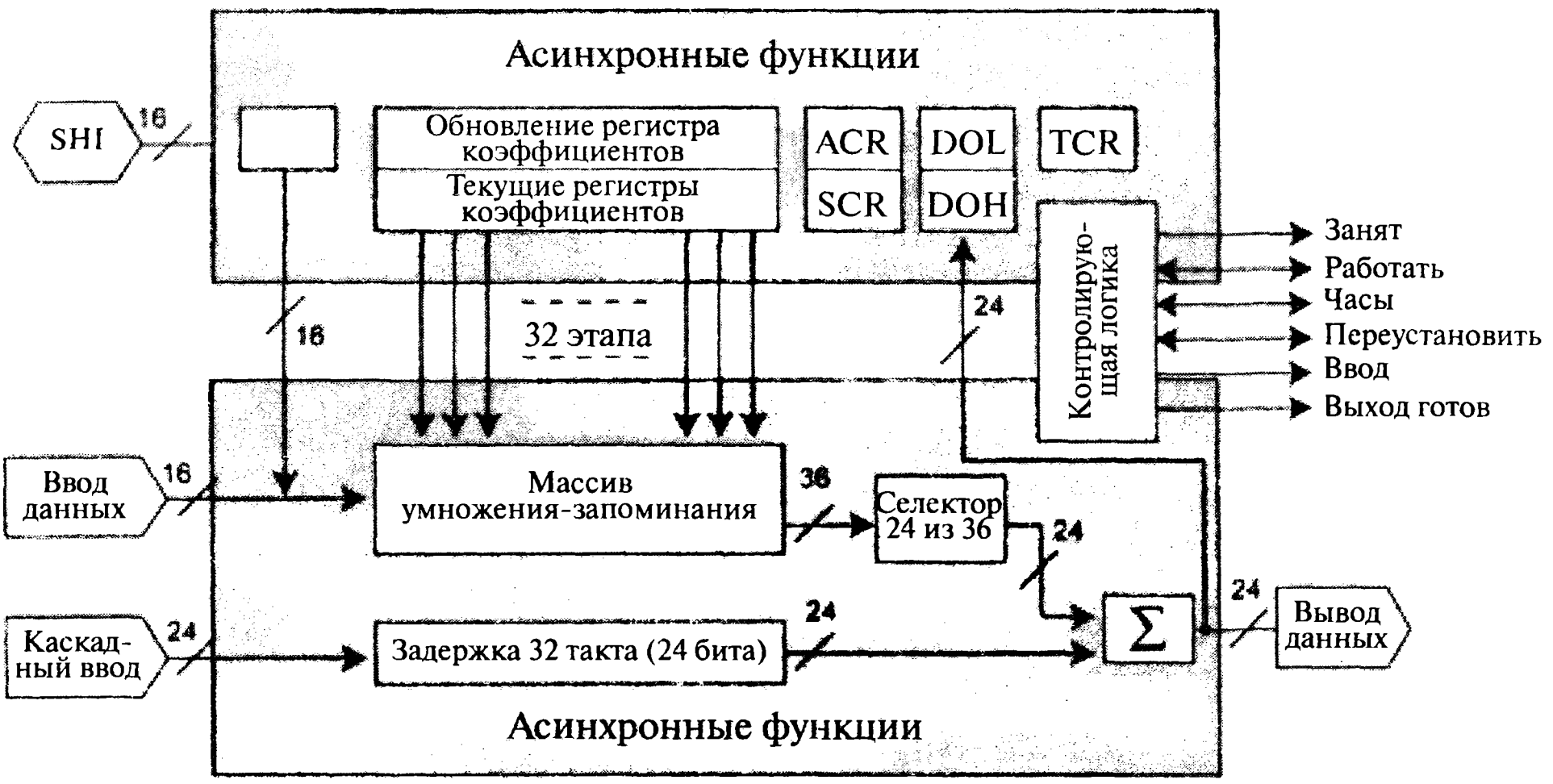


Рис. 2.10. Схема сигнального процессора (DSP) A100, производимого компанией INMOS в 1980-х годах.

$$V_{out}(n)=b_0V_{in}(n)+a_1b_0V_{in}(n-1)+a_1^2b_0V_{in}(n-2)+... \qquad (2.6)$$

Кроме того, конвейер может вычислять двумерные свертки для конволюционной и корреляционной фильтрации, а также Фурье-преобразование. Многие процедуры преобразования цифровых данных состоят в параллельном выполнении простых повторяющихся действий. В частности, умножение и сложение используют при вычислении коэффициентов корреляции, при выполнении свертки и фильтрации, вычислении производных (градиентов) на массиве цифровых данных [9] и т.д. В качестве примера рассмотрим, как одномерный «конвейер» можно использовать для низкочастотного фильтрования. На рис 2.11 приведена схема низкочастотного фильтра, состоящего из резистора *R* и конденсатора C, а также его частотная характеристика.

Предположим, что входное V_i и выходное напряжение V_o измеряется каждые *T* секунд, и величины $V_i(nT)$ и $V_o(nT)$ представляют их значения в момент времени $t = nT$. Если *T* достаточно мало, производная равна:

$$\frac{dV_o}{dt}=\frac{V_o(nT)-V_o[(n-1)T]}{T} \qquad (2.7)$$

Низкочастотный фильтр описывается дифференциальным уравнением:

$$V_O(t)+RC\frac{dV_O(t)}{dt}=V_i(t) \qquad (2.8)$$

Это уравнение можно записать в виде:

$$V_O(nT)+\frac{RC}{T}V_O(nT)-\frac{RC}{T}V_O[(n-1)T]=V_i(nT) \qquad (2.9)$$

Отсюда получаем:

$$V_O(nT)=\frac{1}{1+RC/T}V_i(nT)+\frac{RC/T}{1+RC/T}V_O[(n-1)T] \qquad (2.10)$$

Эта формула соответствует рекуррентной формуле:

$$V_O(n)=b_O V_i(n) + a_1 V_O(n\text{-}1), \tag{2.11}$$

где

$$b_O = \frac{1}{1+RC/T} \tag{2.12}$$

$$a_1 = \frac{RC/T}{1+(RC/T)} \tag{2.13}$$

Рекуррентная подстановка значений V_0 в правую часть уравнения (2.10) дает:

$$V_0(n)=b_0 V_i(n) + a_1 b_0 V_i(n\text{-}1) + a_1^2 b_0 V_i(n\text{-}2)+a_1^3 b_0 V_i(n\text{-}3)+\ldots \tag{2.14}$$

Точность вычисления этого ряда зависит от числа учитываемых слагаемых. Типичным сигнальным процессором еще не так давно был INMOS Al00. Рис. 2.12 иллюстрирует, как осуществляют разложение в ряд ячейки умножения/сложения и линии задержки этого процессора. Эта цепь действует подобно низкочастотному RC-фильтру. С помощью DSP можно создать и другие фильтры (даже с характеристиками, которые не достижимы в аналоговых фильтрах).

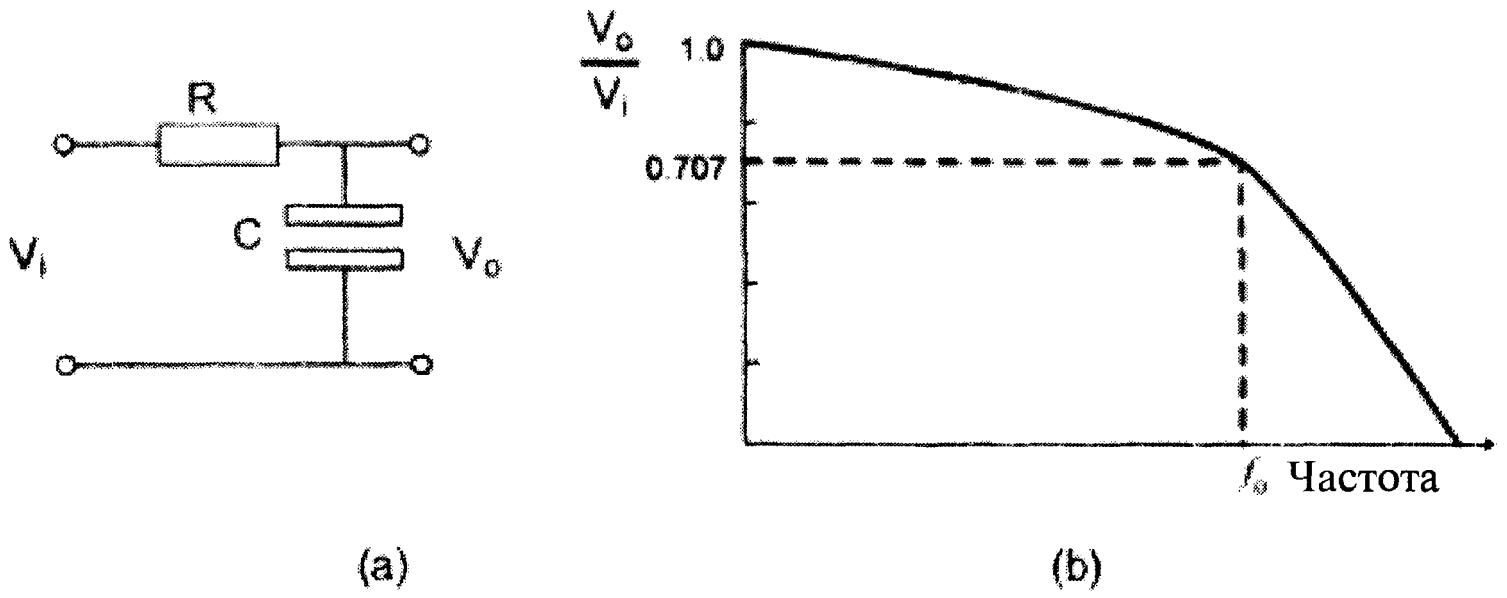


Рис. 2.11. (a) – Цепочка, состоящая из резистора *R* и конденсатора *C*, действует как фильтр, не пропускающий сигналы высокой частоты. V_0 и V_i – напряжения на входе и выходе *RC* – цепочки. (b) – Частотная характеристика фильтра. Ширина полосы пропускания фильтра $f_0 = 1/2\pi RC$.

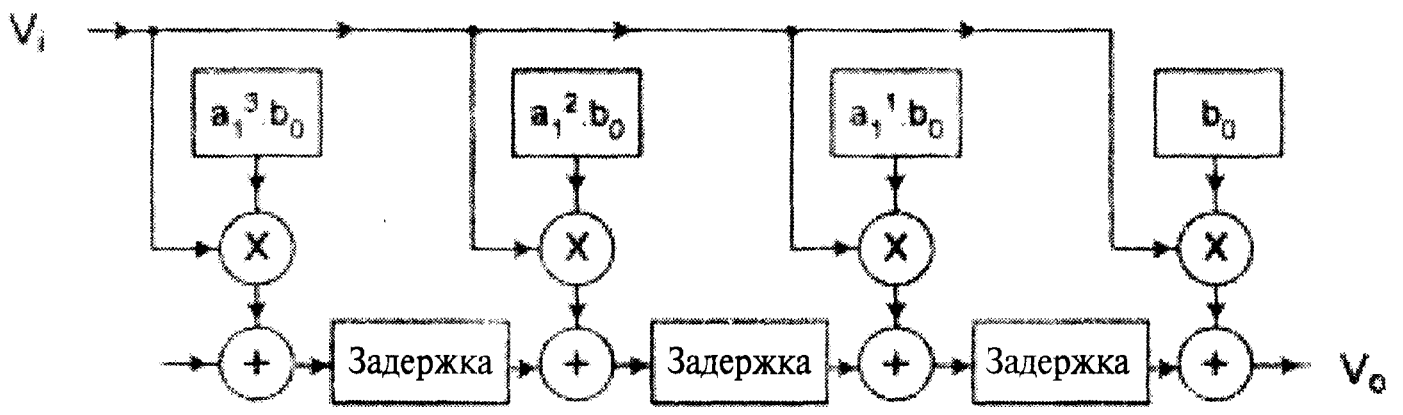


Рис. 2.12. Низкочастотный фильтр можно моделировать в цифровой форме рядом элементов умножения/сложения и линий задержки. Задавая требуемый уровень точности на выходе, элементы A100 легко связать в схему.

2.3.8. Корреляция и свертка

Имеются и другие применения элементов умножения/сложения и линий задержки для выполнения операций, часто встречающихся при построении и обработке изображения. Ядро свертки размером 3×3 для ближайшей окрестности пикселя может быть записано как

$$g(x,y)=\sum_{k=-1}^{1}\sum_{j=-1}^{1} h(j,k)f(x-j,y-k), \qquad (2.15)$$

где $h(j, k)$ – весовые коэффициенты, а $f(x-j, y-k)$ – интенсивности соседних пикселей относительно точки (x, y). Корреляционная функция в окрестности пикселя (x, y) на прямоугольной области размером (n, m) вычисляется по формуле:

$$g(x,y)=\sum_{k=-n/2}^{n/2}\sum_{j=-m/2}^{m/2} h(j,k)\,f(x+j,y+k) \qquad (2.16)$$

Обратим внимание на схожесть выражений (2.15) и (2.16), а также на наличие в них двойного суммирования произведений. Если умножение и сложение выполняет ЦПУ процессора, вычислить ядра значительных размеров в режиме реального времени не удается. Для выполнения этих действий идеально подходят DSP, использующие конвейерную обработку и имеющие элементы, выполняющие умножение.

2.3.9. Прогноз вычислительных возможностей

За прошедшие 30 лет тактовая частота микропроцессора возросла от 1 МГц до 2 ГГц, причем это было достигнуто путем уменьшения размеров транзисторных элементов микросхем. Рис. 2.13 иллюстрирует рост мощности вычислительной техники за последние 100 лет [10]. Такой рост не может быть очень длительным, и неизбежно будет достигнут физический предел, когда транзисторы будут расположены настолько близко, что квантовые эффекты сделают движение электронов непредсказуемым. Существуют два пути, обещающие еще более быстрый рост скорости в не самом удаленном будущем: фотоника и метод параллельного преобразования данных. Возможности параллельного преобразования уже обсуждались. В фотонике информацию несут не электроны, а фотоны. Скорость современных компьютеров лимитируется инерционностью электронов, создающих электрический ток. Инерционность электрона намного выше, чем фотона. Преимуществом этого направления является то, что преобразование изображения (например, преобразование Фурье) можно выполнять, просто пропуская оптическое изображение через линзу (преобразующую все пиксели параллельно). Отметим, что развитие этого направления требует разработки компактных оптических переключателей.

В перспективе возможны еще два пути увеличения скорости. Возможно, слияние биологической клеточной технологии и электроники (а также улучшение понимания принципов функционирования человеческого мозга) создаст гораздо более быстрые вычислительные методы анализа образов. Во-вторых, физики рассматривают возможность использования квантовых эффектов в истинно квантовом компьютере. Они исследуют параллельный характер квантовых состояний и их взаимодействие [11]. Если удастся создать квантовый компьютер, уменьшение размеров основных элементов еще более увеличит скорость вычислений.

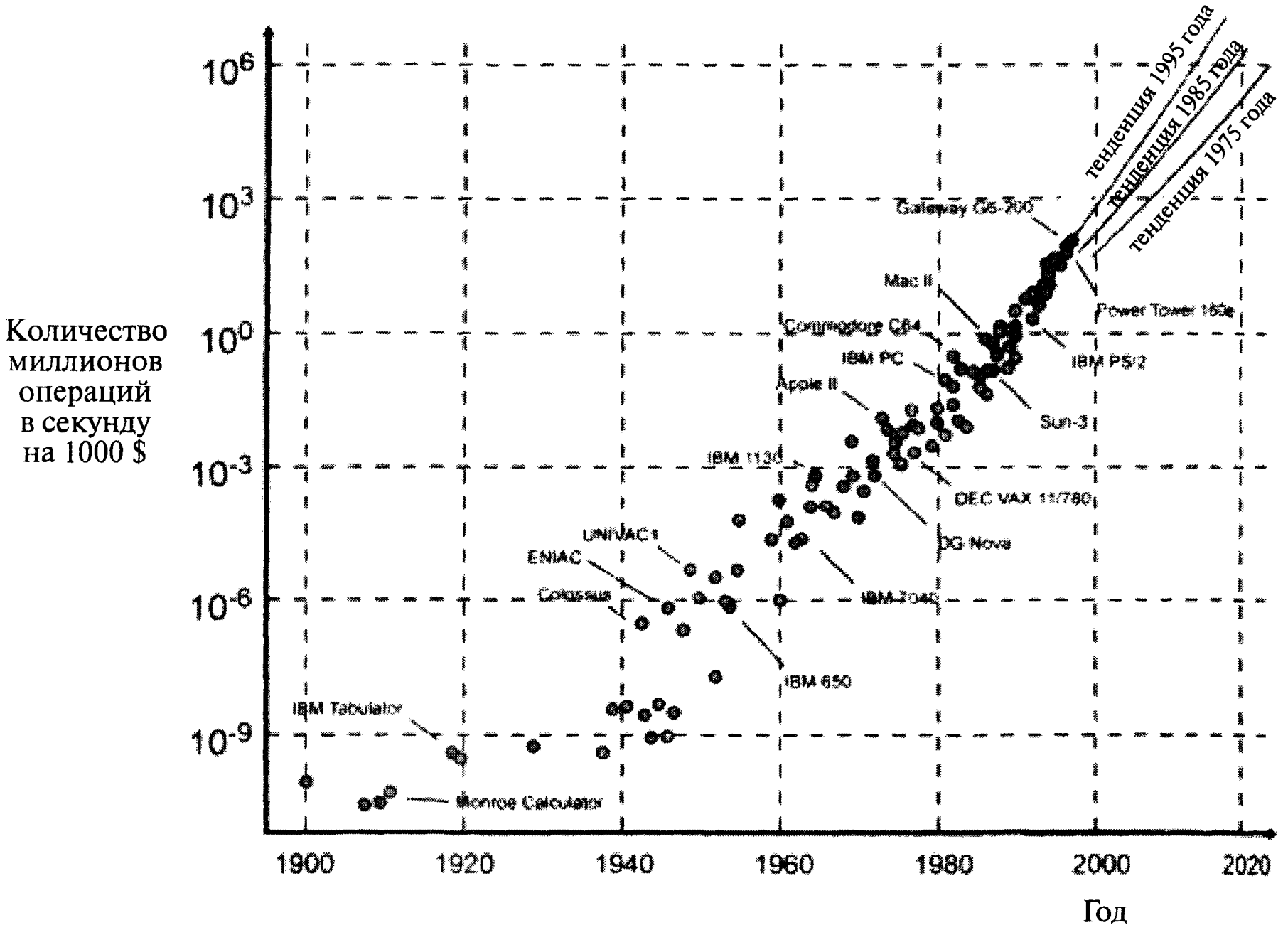


Рис. 2.13. В XX столетии постепенно увеличивалась мощь вычислительной техники (измеряемая в миллионах операций в секунду) в расчете на один потраченный доллар [10].

2.4. ПЗС-матрицы

ПЗС-матрица состоит из массива многоканальных кремниевых датчиков, структура которых аналогична полевому транзистору на основе пары металл – полупроводник. Каждый пиксельный элемент имеет три электрода, к которым прикладывают электрический потенциал. Электроды сделаны из слоя поликристаллического кремния, содержащего малые добавки специальных примесей для увеличения проводимости, покрытого слоем фоточувствительного полупроводникового кремния. Электроды отделены от поверхности кремния тонким слоем изолирующего диоксида кремния. Когда к электродам прикладывают напряжение, электростатический потенциал кремния изменяется и вокруг затвора с положительным потенциалом появляется зона отрицательного потенциала. Выбиваемые светом фотоэлектроны накапливаются на затворе. ПЗС-матрицы измеряют количество света посредством трехступенчатого процесса, иллюстрируемого рис. 2.14.

1. *Поглощение фотонов приводит к появлению электрон-дырочных пар.* Число родившихся электронно-дырочных пар пропорционально интенсивности света, но нелинейно зависит от длины волны. Заряд электронно-дырочных пар, появившихся в некотором пикселе, собирается на затворе.

2. *Передача собранного заряда следующему пикселю.* После экспозиции заряд, появившийся в каждом пикселе строки, передается к следующему по

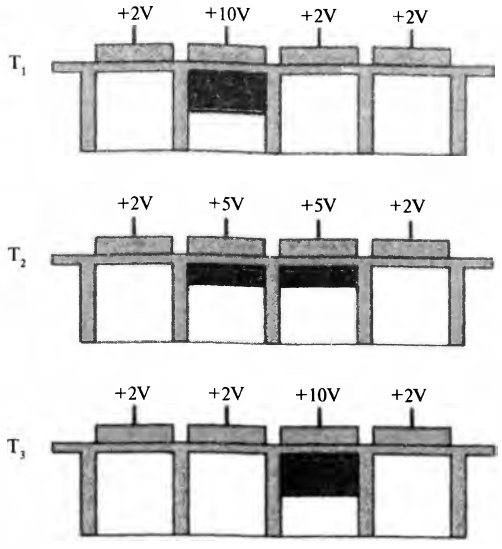


Рис. 2.14. Считывание информации с ПЗС-матрицы. Заряд, появившийся в некоторой ячейке, перемещается в соседний элемент путем изменения напряжения. Повторяя эту процедуру, заряд каждой ячейки (пикселя) последовательно передается на усилитель, создающий изменяющееся по координате напряжение (сигнал линии видеосканирования).

вертикали соседу, пока не достигнет регистра считывания, расположенного на краю микросхемы. Передача заряда выполняется изменением потенциала электродов. Заряд, накопленный в одной строке пикселей, одновременно передается пикселям следующей строки.

3. *Преобразование заряда в напряжение и усиление сигнала.* После параллельной передачи заряда строкой пикселей он накапливается на краю микросхемы и передается на выход, где преобразуется в электрический потенциал. Потенциал чувствительного элемента зависит от заряда. Полученный сигнал усиливается, причем его величина линейно связана с полученным зарядом.

В настоящее время существует множество ПЗС-устройств (например, двумерные и линейные устройства). Чувствительная область 2D-матриц равна всей поверхности микросхемы. В ПЗС-матрицах, используемых для спектроскопических исследований, регистры считывания расположены на нижней плоскости микросхемы. Сигнал подают на малошумящие усилители, измеряющие заряд каждого пикселя. Наиболее чувствительные и малошумящие ПЗС-матрицы имеют холодильники.

Выбор ПЗС-матрицы зависит от трех основных параметров:

1. Длины световой волны
2. Уровня освещенности
3. Ширины спектра и разрешения

Эти условия определяют тип микросхемы, способ охлаждения и размер пикселя. Однако имеются и другие факторы, которые нужно рассматривать при выборе

системы. Например, качество матрицы, характеризуемое максимально допустимым числом дефектных пикселей. Важен и диапазон измерений (определяемый уровнем шума и максимальным зарядом, накапливаемым на пикселе до достижения насыщения). Наконец, важна скорость считывания информации.

2.4.1. Спектральные характеристики

Спектральную чувствительность ПЗС-матрицы характеризуют квантовым выходом. Его определяют как долю падающих фотонов, преобразуемых в фотоэлектронные пары. Имеются различные типы ПЗС-матриц:

- с передней освещаемой поверхностью;
- с люминисцентным покрытием передней освещаемой поверхности;
- с открытым электродом;
- с задней освещаемой поверхностью;
- с передней освещаемой поверхностью и глубоким опорожнением.

В стандартной ПЗС-матрице «с передней освещаемой поверхностью» поликристаллические кремниевые электроды нанесены на переднюю поверхность датчика. Фотоны должны пройти через них и достигнуть фоточувствительной кремниевой подложки. Так как прозрачность кремния уменьшается при длине волны короче 500 нм, рабочий диапазон ПЗС-матрицы с передней освещаемой поверхностью равен 400 - 1100 нм, а максимальную квантовую эффективность она имеет при длине волны 680 нм (кривая *a* на рис. 2.15). При длине волны выше 1100 нм кремний оптически прозрачен, поскольку ширина запрещенной зоны превышает энергию фотона. Технология производства ПЗС-матриц с передней освещаемой поверхностью проста, и поэтому они самые дешевые. Они идеальны для видимого диапазона света. Их используют для фотометрии видимого света и в рамановской спектроскопии видимого диапазона. В этом случае возбуждение обычно осуществляют лазером с длиной волны 488, 514 или 532 нм.

Если требуется регистрировать ультрафиолетовую область (УФ), на поверхность ПЗС-матрицы с передней освещаемой поверхностью наносят тонкий слой фосфора, флуоресцирующего под действием ультрафиолетовых лучей. Например, под действием света длиной волны 200 нм органический фосфор излучает фотоны длиной волны 550 нм, регистрируемые датчиком. Спектральные характеристики фосфора показаны на рис. 2.15b. Отметим, что в видимом диапазоне он прозрачен.

Более высокий квантовый выход для УФ имеют ПЗС-матрицы с открытым электродом. Их недостатком является высокая цена. Получают их травлением части поверхности поликристаллического кремниевого покрытия, поглощающего УФ-лучи. В результате свет попадает сразу на значительную часть фоточувствительного слоя кремния. Типичная спектральная характеристика ПЗС-матрицы с открытым электродом показана на кривой *c* рис. 2.15. Обратим внимание, что в этом случае увеличивается и квантовый выход в ближней ИК-области. Недостатком таких элементов является пониженный заряд насыщения. Отметим, что на диапазон измерений это обычно не влияет, поскольку последний лимитируется аналого-цифровым преобразователем. ПЗС-матрица с открытым электродом

удобна для рамановской спектроскопии, когда возбуждающий лазер излучает красный (632 нм) или ближний ИК свет (785 нм). Такое возбуждение позволяет значительно снизить уровень флуоресценции.

ПЗС-матрицы с освещаемой задней поверхностью имеют более высокий квантовый выход, поскольку фотоны в этом случае не проходят через слой поликристаллического кремния. Поскольку УФ-свет поглощается близко к поверхности кремния, электронно-дырочные пары имеют повышенную вероятность рекомбинации до достижения затвора. Чтобы уменьшить вероятность рекомбинации, толщину таких устройств уменьшают до 10–15 микрон. При наличии дополнительного покрытия, подобранного для снижения отражения света в определенной области спектра, квантовый выход может достигать 90%. Спектральная характеристика ПЗС-матрицы с просветляющим покрытием показана на рис. 2.15d. Процедура уменьшения толщины сложна, и поэтому такие ПЗС-матрицы весьма недешевы.

Квантовый выход ПЗС-датчиков для ближней ИК-области может быть увеличен модификацией фоточувствительной кремниевой подложки. В ПЗС-матрицах с глубоким опорожнением для увеличения толщины чувствительного слоя толщина кремниевой подложки повышена. Это увеличивает вероятность поглощения ИК фотонов. Чтобы снизить рекомбинацию электронно-дырочных пар, часть подложки допируют элементами *p*–типа. На рис. 2.15 (кривая *e*) приведена спектральная характеристика такого устройства.

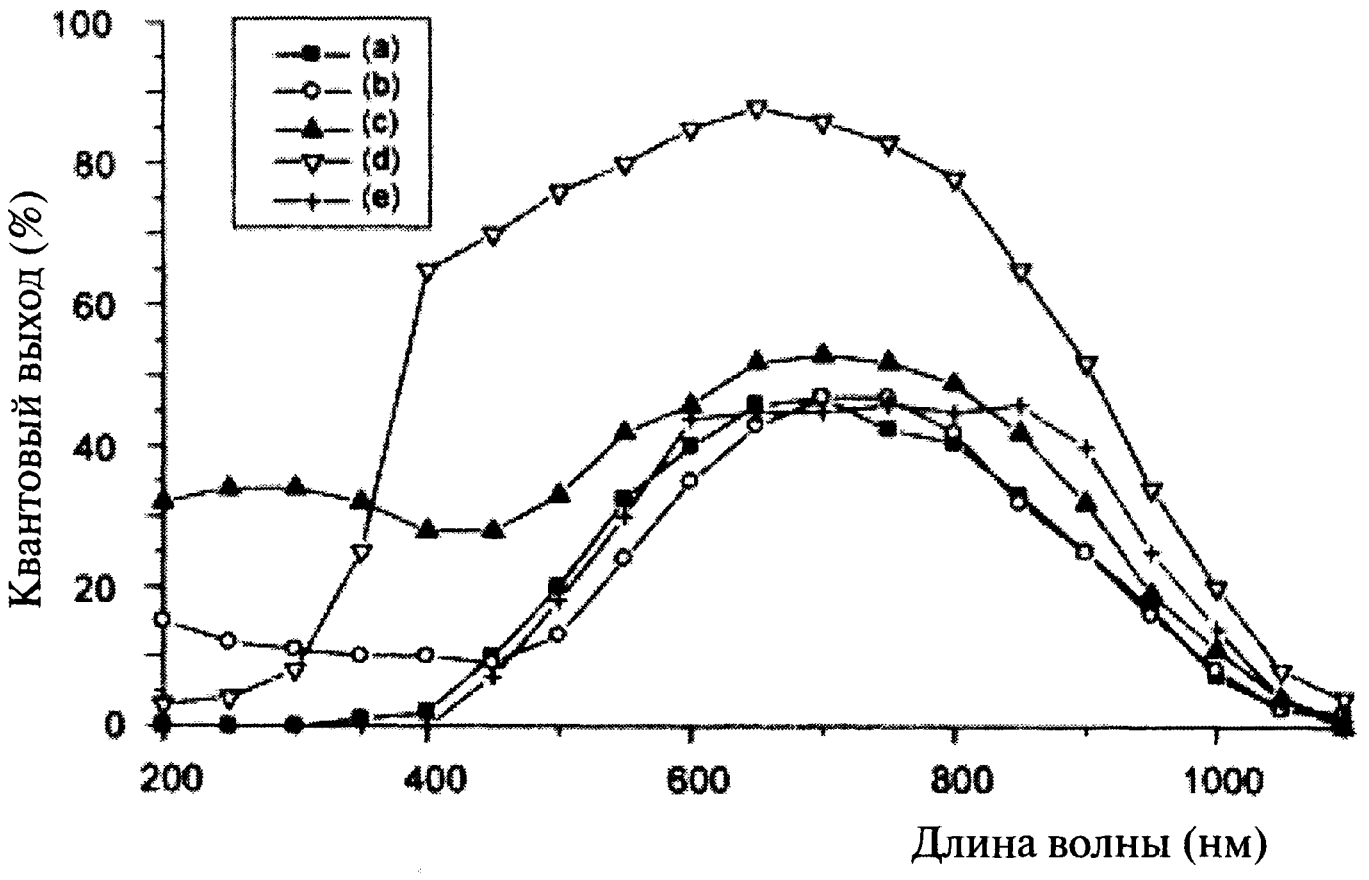


Рис. 2.15. Спектральные характеристики ПЗС-матриц. (a) – Матрица с освещаемой передней поверхностью; (b) – с передней освещаемой поверхностью и люминесцентным покрытием; (c) – с открытым электродом; (d) – с антиотражающим покрытием, оптимизированным для ближнего ИК-света; (e) – с глубоким опорожнением.

2.4.2. Температура эксплуатации

Для охлаждения ПЗС-матриц используют жидкий азот или термоэлектрическое охлаждение (четырехстадийное или двустадийное). Минимальное время экспозиции, необходимое для получения достаточного сигнала, определяется интен-

сивностью света. Минимальное время экспозиции в конечном счете определяется темновым током. Темновой ток описывают в единицах нА/см^2 или в А/с, приходящихся на один пиксель. Темновой ток обусловлен термоактивационным возбуждением электронов, и поэтому он уменьшается при снижении температуры. Зависимость темнового шума от температуры показана на рис. 2.16. Двустадийное термоэлектрическое охлаждение позволяет снизить температуру до -25°С, а темновой ток – до двух – пяти электронов на пиксель в секунду. Этого обычно вполне достаточно, за исключением случаев самой низкой освещенности и, соответственно, самых больших времен экспозиции.

2.4.3. Спектральное и пространственное разрешение

Спектральные устройства характеризуются спектральным и пространственным разрешением. Свет поступает в спектрограф через входную щель, и с помощью некоторого дисперсионного элемента (например, призмы или дифракционной решетки) расщепляется на компоненты с разной длиной волны. На выходе спектрографа величина отклонения пучка зависит от длины волны. Полная ширина анализируемой спектральной полосы $\Delta\lambda$ за одну экспозицию равна произведению дисперсии на ширину ПЗС-матрицы ($\Delta\lambda$ = дисперсия × ширину ПЗС) .

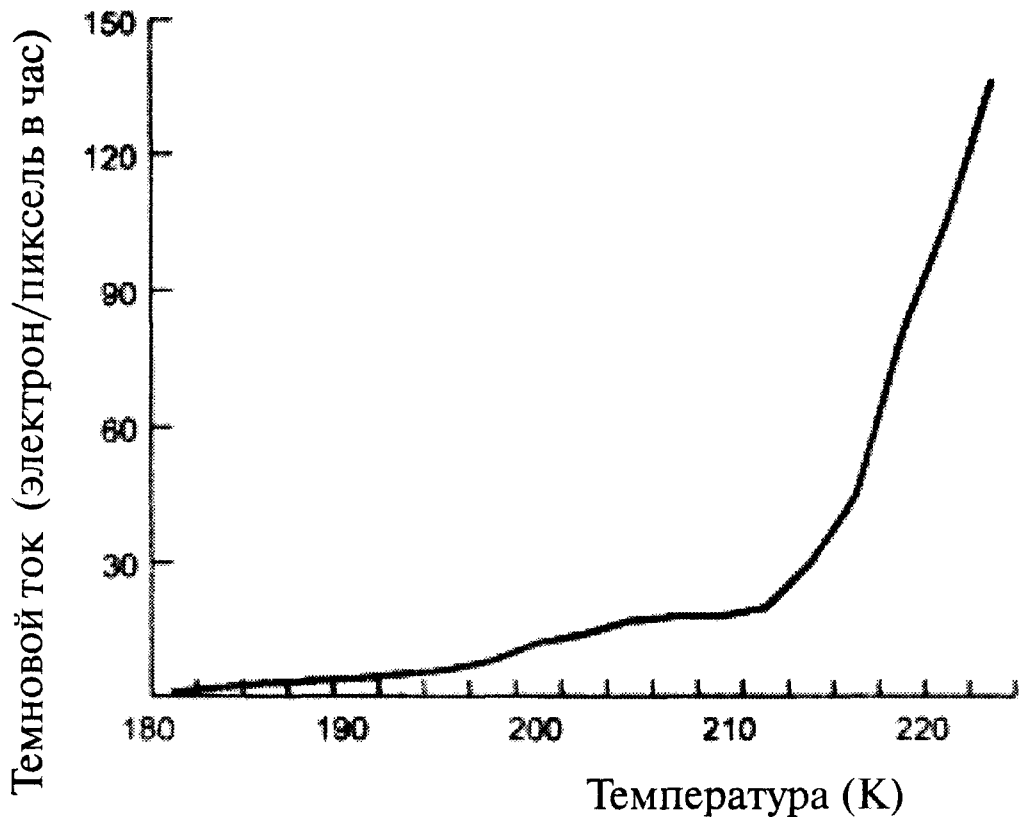


Рис. 2.16. Чувствительность ПЗС-матрицы увеличивают при помощи миниатюрного термоэлектрического охладителя. Понижение температуры снижает темновой шум и расширяет диапазон измерений.

В ПЗС-матрицу свет поступает на всей длине входной щели спектрографа. Увеличение длины щели позволяет принять большее количество фотонов. Вдоль щели можно разместить, например, несколько световолокон или оптических кабелей. В астрономии одновременный контроль нескольких источников и расположенного поблизости контрольного источника света может эффективно снизить фоновый шум. В случаях, когда свет источника фокусируют на небольшую область экрана, для снижения шума неосвещаемых пикселей лучше использовать небольшие ПЗС-матрицы.

Спектральное разрешение оптического прибора определяется формулой $\delta\lambda = \Delta\lambda/N$, где N – число пикселей в линии ПЗС-матрицы. Поскольку для опре-

деления пика требуются как минимум три пикселя, разрешение в три раза выше этого предела (3δλ). Ширина входной щели (как минимум 10 микрон) определяет количество входящего света, и поэтому уменьшение размера пикселя до ширины входной щели не улучшает спектральное разрешение. При низкой интенсивности света в некоторых ПЗС-матрицах суммируют сигнал нескольких групп пикселей, что увеличивает диапазон измерений и скорость работы.

Пространственное разрешение (а в спектрографах и спектральное разрешение) зависит от ширины датчика, его высоты и размера пикселя. Обычно используют ПЗС-матрицы со следующими характеристиками:

- Матрицы, состоящие из 512×512 пикселей с площадью пикселя 24 мкм², что соответствует активной области размером 12,3×12,3 мм.
- Матрицы из 2048×512 пикселей с площадью пикселя 13,5 мкм², что соответствует активной области размером 27,6×6,7 мм.

Все ПЗС-матрицы имеют дефекты, имеющие пониженную чувствительность или увеличенный темновой ток. Эти дефекты могут представлять собой индивидуальный пиксель, группу пикселей или даже целую строку матрицы. Матрицы характеризуют количеством дефектов, и более дорогие имеют меньшее количество дефектов.

2.4.4. Диапазон измерений и увеличение

По определению, диапазон измерений равен отношению максимального и минимального измеряемого сигнала. Для ПЗС-матрицы диапазон измерений равен отношению полной емкости пикселя к уровню темнового шума. В спектроскопических приборах, в которых вместе объединены несколько пикселей или даже целая колонка, максимальная интенсивность сигнала ограничена емкостью заряда регистров считывания. Диапазон измерений в этом случае больше.

Максимальную зарядовую емкость имеют крупные пиксели. Например, квадратный пиксель размером 26×26 мкм может накопить до 500 000 электронов, а пиксель размером 15×15 мкм – лишь 90 000. Обратим внимание, что изображение ПЗС-матрицы (2D-массив пиксельных данных) имеет диапазон измерений, определяемый аналого-цифровым преобразователем (АЦП) или видеокартой компьютера. Лучшие АЦП имеют 16-битовое разрешение, и оцифрованный сигнал может иметь 65 535 уровней интенсивности. Однако стандартные АЦП имеют 8-битовое разрешение, что соответствует 255 уровням интенсивности. В ближайшее время лимитирующим фактором станут периферийные устройства.

2.5. Оцифровка и АЦП-устройства

На рис. 2.17 показана схема действий типичного аналого-цифрового преобразователя (АЦП) при оцифровке сигнала. Помимо аналогового входного сигнала и восьми цифровых линий выхода (в 8-битовый АЦП) система имеет несколько линий управления. Вход управления CMD CNVT (команда «Преобразование») при приходе импульса напряжения сообщает АЦП, что нужно оцифровывать аналоговый сигнал. Пользователь может выбрать, нужно ли оцифровывать сигнал че-

рез определенный интервал времени или же при приходе очередного импульса. Также у АЦП имеется управляющий выход «не готов», состояние которого сообщает компьютеру или устройству памяти, находящемуся в состоянии ожидания, что сигнал оцифрован и с выходных линий можно считывать информацию. Эта линия находится в состоянии «1», когда АЦП занят оцифровкой, а при переходе в логическое состоянии «0» приемное устройство начинает считывать данные с 8-битовых линий выхода. Конструкция флэш-АЦП оказалась очень эффективной для видеоустройств. Отметим, что ниже для простоты будет рассмотрена работа трехбитовой конструкции (рис. 2.18).

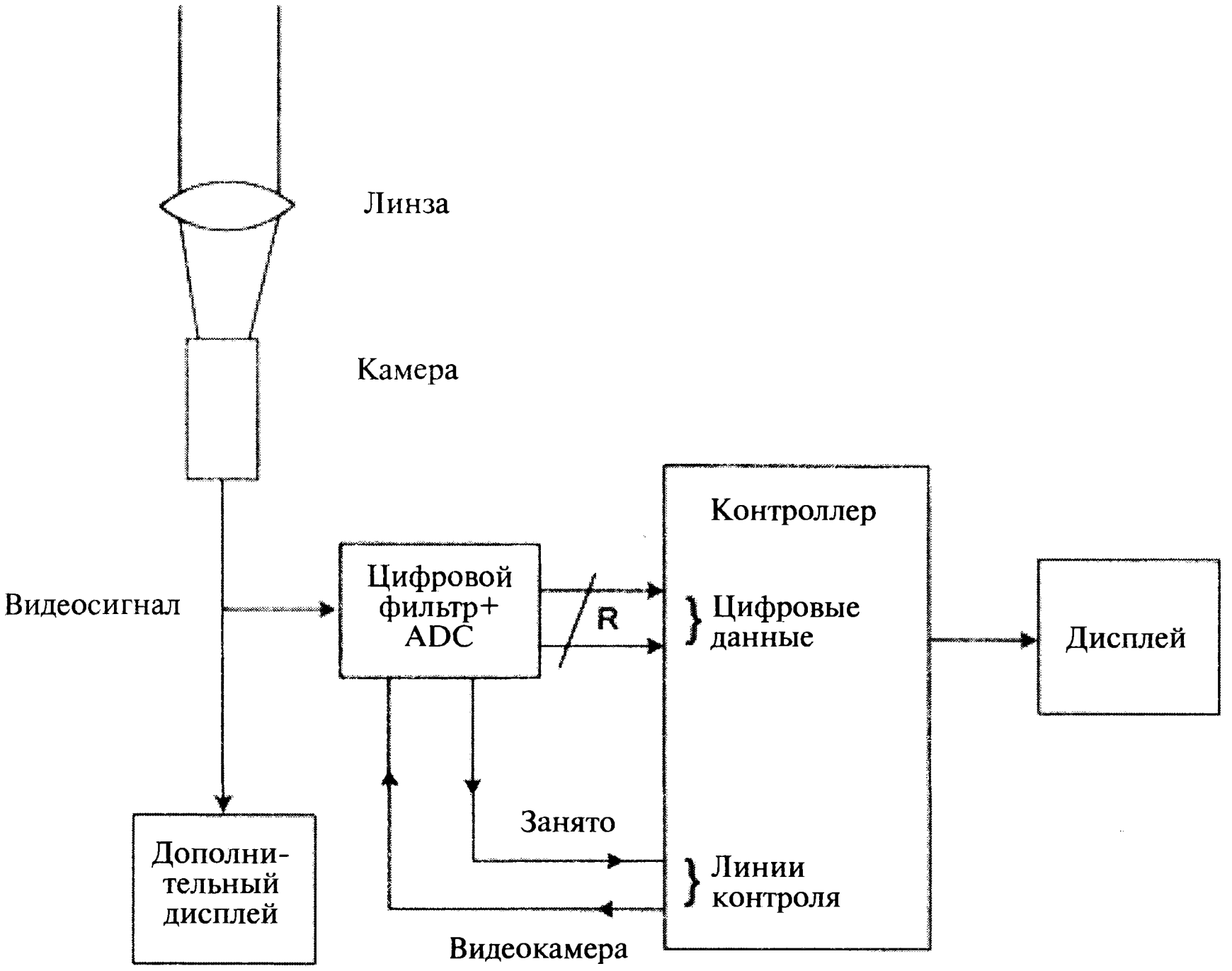


Рис. 2.17. Схема связей аналого-цифрового преобразователя (АЦП) с управляющим процессором. Процессор компьютера посылает командный импульс «Преобразование» (CMD CNVT) на АЦП. АЦП изменяет состояние выхода «не готов» на логическую «1» и начинает оцифровку входного сигнала и перевод его в двоичный код. Как только значения R линий выхода определены, АЦП изменяет состояние линии управления «не готов» на «0».
Это изменение состояния воспринимается процессором компьютера, и R–битовая информация передается в память. Когда процессор готов, он посылает повторный импульс на CMD CNVT, и цикл повторяется, пока не будет получено и сохранено требуемое количество данных. Этот процесс называют подтверждением связи, и он синхронизирует работу управляемого устройства (АЦП) и управляющего контроллера, даже если они работают с различной скоростью.

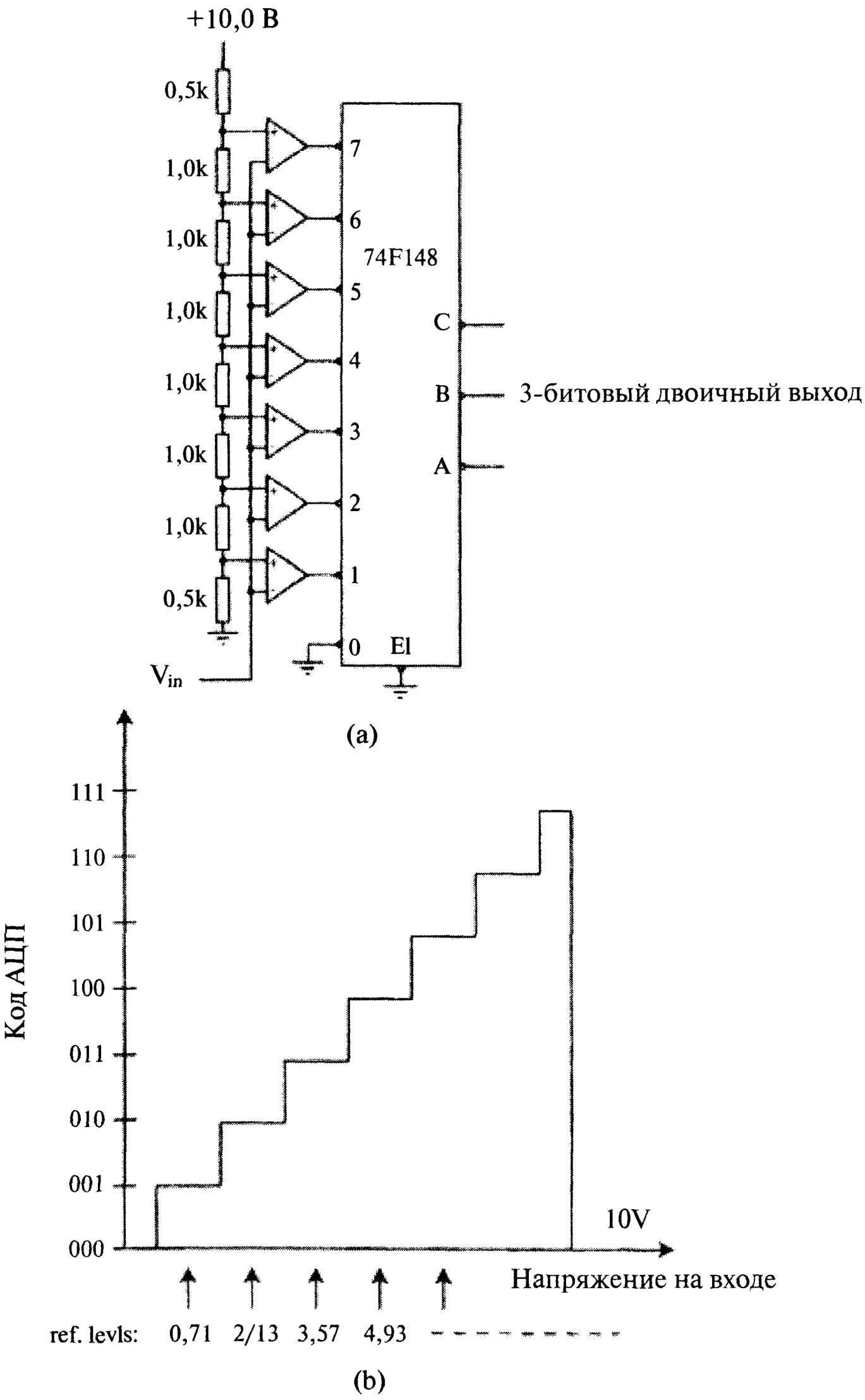


Рис. 2.18. Чтобы оцифровывать сигнал видеокамеры и построить на экране изображение размером 512×512, изменяющееся 32 раза в секунду, АЦП должен оцифровывать сигнал за 100 наносекунд. (a) – Схема быстрого трехбитового АЦП, называемого флэш-АЦП, сравнивающего входное напряжение со ступенчатым уровнем делителя напряжения. В зависимости от напряжения, входы кодирующего устройства находятся в логическом состоянии «1» или «0». (b) – Трехбитовые коды на выходе АЦП в зависимости от напряжения на входе.

Поступающий сигнал сравнивают с набором равноотстоящих друг от друга опорных напряжений. Опорные напряжения подаются на входы семи компараторов. Если напряжение сигнала ниже опорного, на выходе компаратора будет логическая единица. При превышении уровня контрольного напряжения на входе кодирующего устройства появляется двоичный код, значение которого линейно связано с напряжением сигнала. Кодирующее устройство действует подобно поисковой таблице, преобразующей один из восьми уровней напряжения в трехбитовые коды выходных линий A, B и C. Пусть входной сигнал имеет значение 2,5 В. Опорные напряжения на входах трех компараторов равны $0{,}5\times10/7 = 0{,}71$ В, $1{,}5\times10/7 = 2{,}13$ В и $2{,}5\times10/7 = 3{,}55$ В. Следовательно, 8-битовый код на входе кодирующего устройства будет 11111000, а на выходе будет 011 (это означает, что были превышены только три самых нижних уровня).

Восьмибитовый флэш-АЦП, в отличие от трехбитового, имеет 256 уровней опорного напряжения, которые сравниваются с величиной входного сигнала. Время преобразования сигнала в восьмибитовое число остается фактически тем же.

2.5.1. Медленное сканирование в режиме реального времени

Если требуются экономичные методы получения восьми- или шестнадцатибитовой информации для астрофизических исследований, когда возможна длительная экспозиция датчика, часто используют режим медленного сканирования каждой линии. Как показано на рис. 2.19a, оцифровка и сохранение информации требуют примерно 40–50 мкс. Через некоторое время получают следующий цифровой сигнал при той же координате x на следующей линии сканирования. Пиксельные колонки от n = 1 до n = m получают и показывают, как на рис. 2.19b. Хотя при шестнадцатибитовом разрешении для создания изображения требуется несколько секунд (и, следовательно, медленное сканирование), это может устроить исследователя. Например, если для спектрального исследования требуется длительная экспозиция астрономического объекта, построение изображения в течение нескольких секунд вполне приемлемо. Медленное сканирование позволяет использовать широкий динамический диапазон и низкий шум ПЗС-матрицы.

2.5.2. Ошибки, обусловленные дискретностью сигнала

АЦП принимает аналоговый сигнал амплитудой x_a и выдает сигнал x_d в виде M-битового двоичного кода. Величина x_d изменяется в пределах от 0 до $2^M - 1$ с шагом q. Максимальная величина принимаемого аналогового сигнала равна $(2^M - 1)q$, а минимальное регистрируемое изменение сигнала равно $\pm q$. Соотношение между входным и выходным сигналами x_a и x_d, а также их разница $e = x_d - x_a$ показаны на рис. 2.20a. Отметим, что ошибка измерения находится в интервале от 0 до -q. Если вход смещен на q/2, как показано на рис. 2.20b, то разница находится в диапазоне $-q/2 < e < q/2$. Можно предположить, что ошибка оцифровки является случайной величиной, однородно распределенной в интервале $0 < e < q$ или $-q/2 < e < q/2$. В интервале оцифровки q вероятность ошибки равна 1/q.

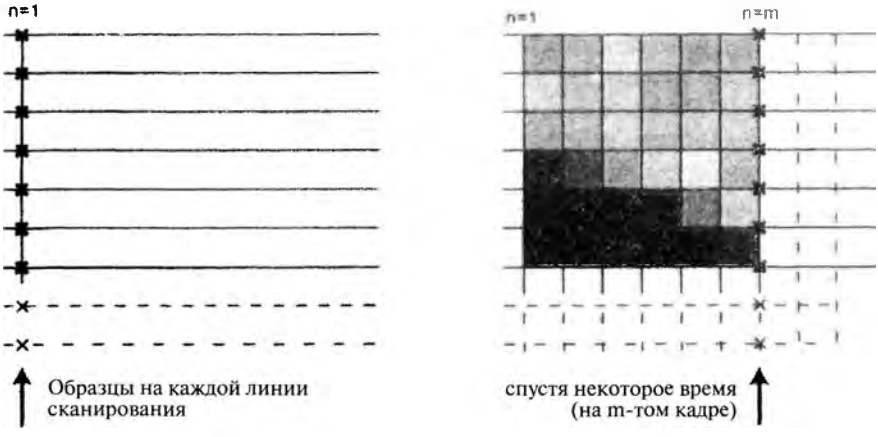


Рис. 2.19. Иногда необходимо с 16-битовой точностью оцифровывать сигнал, получаемый ПЗС-матрицей. АЦП оцифровывает сигнал за несколько микросекунд. Одна из возможностей получения изображения состоит в медленном сканировании. (a) – Одна линия сканирования строится за 53 мкс, как показано на рис. 2.21. (b) – Изображение строится постепенно, строка за строкой, в течение нескольких секунд.

Для двух случаев, показанных на рис. 2.20, средняя ошибка равна $-q/2$ и 0 соответственно. Средняя квадратичная ошибка σ^2 для обоих случаев вычисляется следующим образом:

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{\infty} (e-\bar{e})^2 p(x)dx = \int_{-\infty}^{\infty} (e-\bar{e})^2 \frac{1}{q} dx = q^2/12\,, \qquad (2.17)$$

где $p(x)$ – вероятность появления значения e. Таким образом, даже при отсутствии ошибки сигнала при оцифровке появляется ошибка.

2.5.3. Значения времени выборки

Камеры строят оптическое изображение в виде последовательности цифровых сигналов. Пусть видеокамера выдает сигнал в виде RS170 [12]. На рис. 2.21 показана первая линия видеовыхода, следующая за импульсом синхронизации кадра. Сигнал имеет переднюю ступеньку, горизонтальную часть и обратную ступеньку, а также аналоговый сигнал продолжительностью 53 мкс, описывающий изменение интенсивности вдоль горизонтальной линии сканирования. Если строка состоит из 512 пикселей, время оцифровки сигнала для одного пикселя должно быть равно 53/512 мкс $\approx$ 100 нс. Такая скорость сканирования позволяет обновлять кадры 32 раза в секунду, что соответствует получению видеоизображения в режиме реального времени.

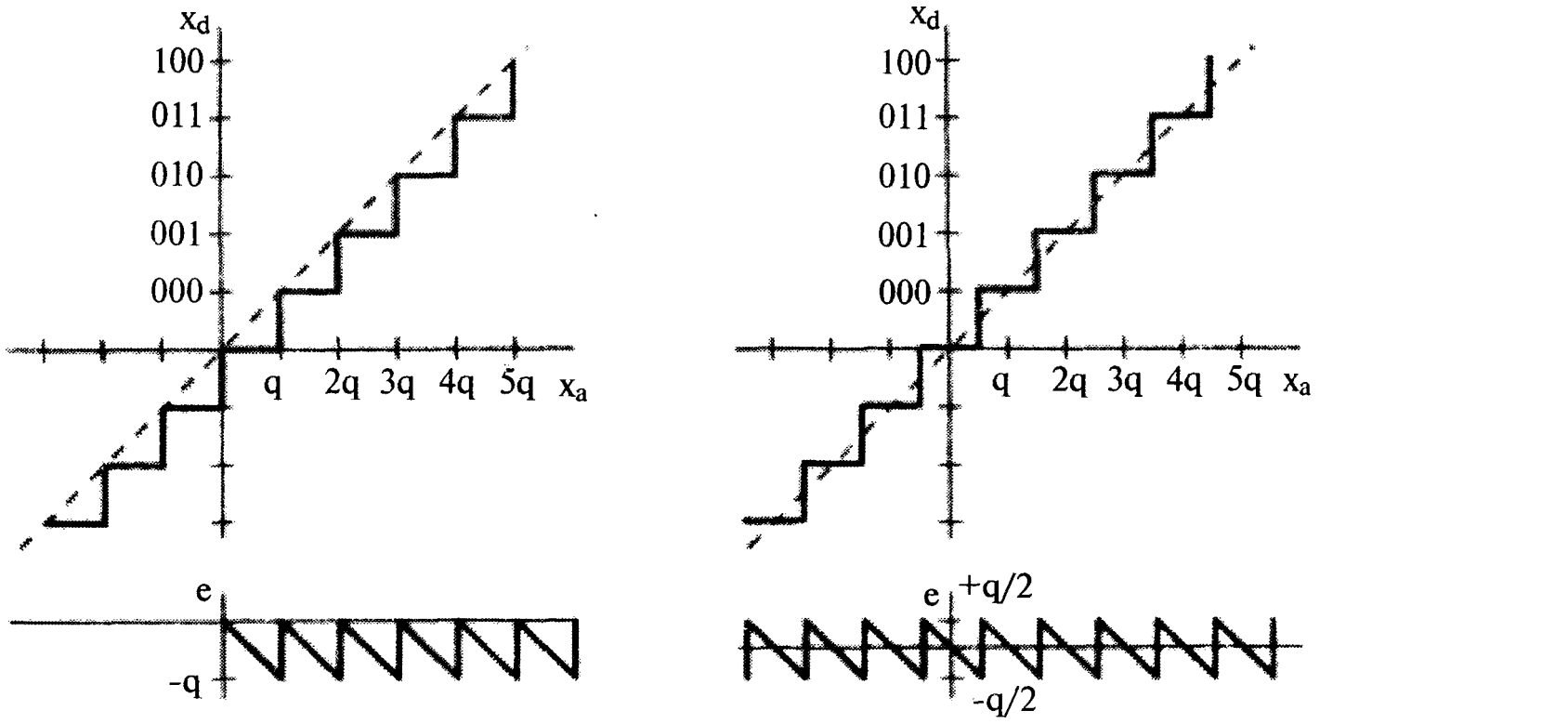


Рис. 2.20. (a) – Зависимость величины оцифрованного сигнала x_d от напряжения на входе x_a имеет вид «лестницы». Если длина шага оцифровки равна q, ошибка имеет вид пилы, показанной в нижней части рисунка. (b) – После введения сдвига величиной q/2 средняя ошибка становится равной нулю. Однако и в этом случае оцифровка приводит к появлению ошибки.

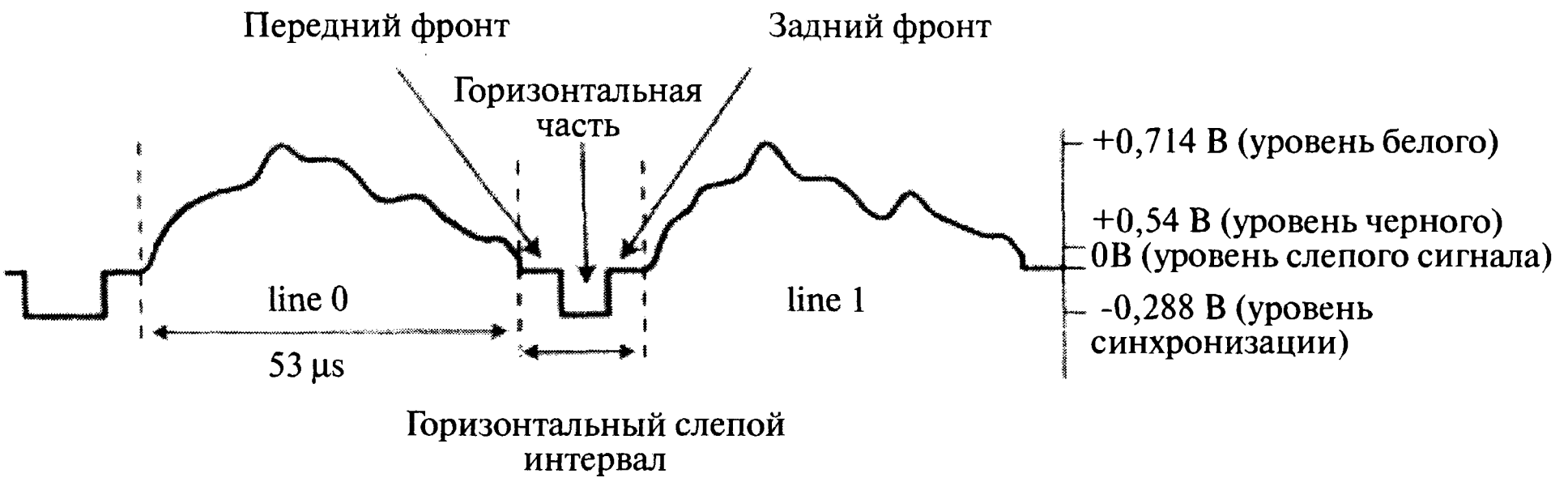


Рис. 2.21. Типичный сигнал первых двух линий сканирования видеокамеры. Кадр начинается с импульса отрицательного напряжения, длина которого больше длины импульсов, разделяющих линии сканирования. Увеличение аналогового сигнала от 0 до +0,714 В сигнализирует о приходе первой линии сканирования. После короткого нулевого напряжения подается отрицательный импульс напряжения, а горизонтальный импульс нулевого напряжения свидетельствует о начале следующей линии сканирования. Процесс повторяется, пока не будет построен весь кадр.

2.5.4. Теорема Котельникова о частоте съема информации

При получении видеофильма следует иметь в виду, что информация, изменяющаяся быстрее времени между кадрами, теряется. Чем ниже скорость сканирования, тем больше неопределенность сигнала. Рис. 2.22a иллюстрирует этот эффект на примере синусоидального сигнала частотой *f*. Если изображение получают с частотой *f*, регистрируемый сигнал будет постоянным (в пределах ±A, где A – амплитуда волны)! Если частота регистрации находится в интервале от *f*/2 до *f*, будет

получен искаженный сигнал в виде периодической функции с частотой, отличной от частоты входящего сигнала (рис. 2.22b). Теорема Котельникова утверждает, что для корректного восстановления сигнала с частотой f по последовательности его дискретных выборок частота дискретизации должна быть не ниже $2f$. Чтобы избежать появления искажений, многие системы преобразования изображения имеют фильтры нижних частот, имеющие частоту среза ниже $f_s/2$, где f_s – частота оцифровки кадров. После выбора скорости видеосъемки выходной сигнал пропускают через фильтр, не пропускающий гармоники частотой выше 5 МГц.

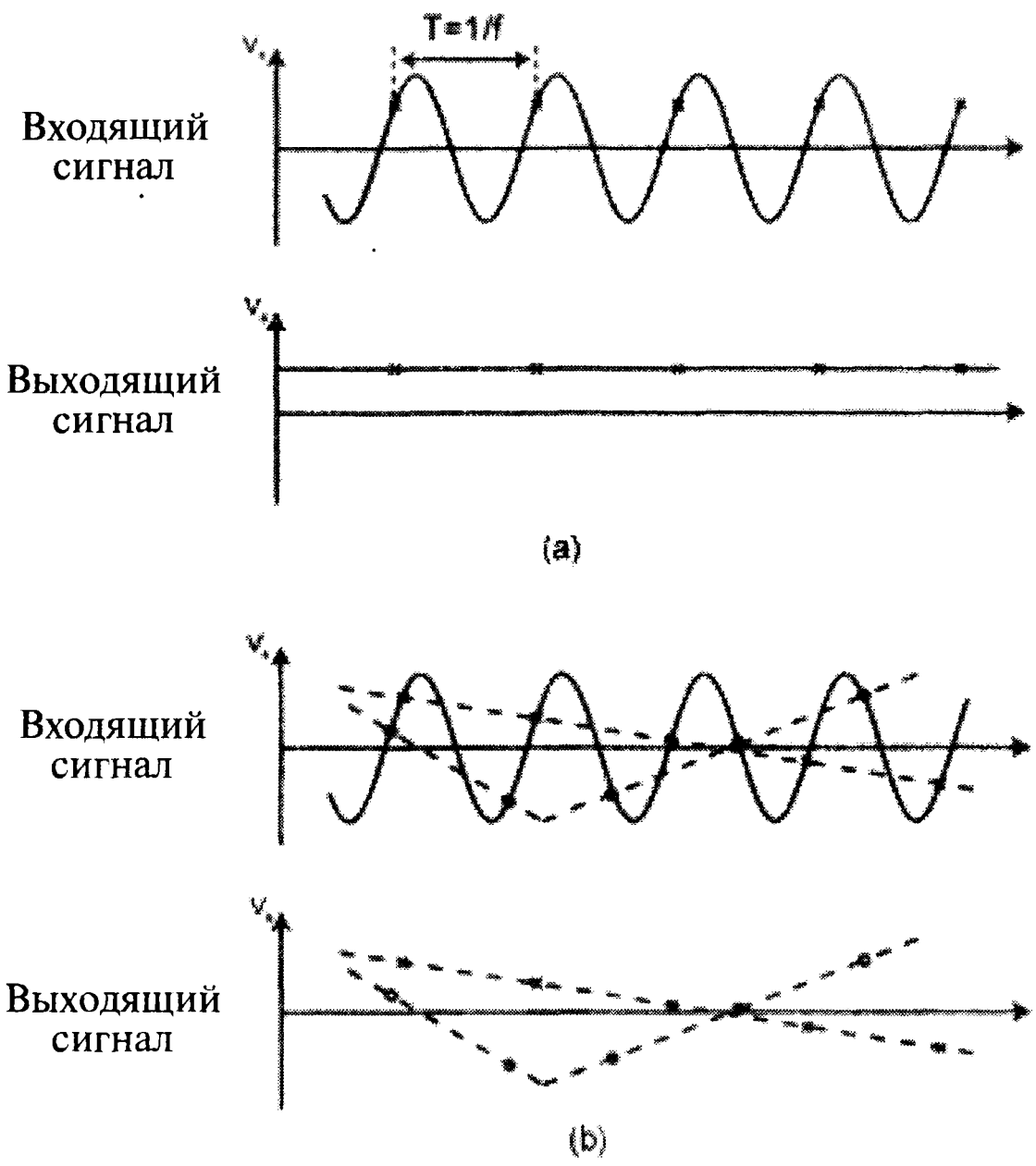


Рис. 2.22. Иллюстрация принципа, известного как теорема Котельникова. (a) – Если сигнал синусоидальной формы с периодом T снимается один раз за период, на выходе появляется сигнал постоянной величины. (b) – Если время между кадрами меньше T, на выходе образуется волна, частота которой не равна частоте входящего сигнала. Форма регистрируемого сигнала не отражает форму входящего сигнала!

2.5.5. Видеокарты C80 и «Genesis»

Схема сигнального процессора C80 фирмы Texas Instruments показана на рис. 2.23. Эта микросхема параллельно выполняет множество команд и обрабатывает несколько данных. Она состоит из следующих элементов:

- RISC процессора;
- блока переключения сети;
- четырех отдельных элементов памяти;
- четырех параллельных процессоров обработки сигналов;

- контроллера быстрого доступа к элементам внешней памяти;
- двух видеоконтроллеров.

Сеть взаимного доступа связывает каждый из четырех процессоров с любым блоком памяти, что позволяет одновременно обрабатывать содержащуюся в них информацию. В отличие от системы траспьютеров, в которой параллелизм обеспечивала быстрая связь различных транспьютеров, эта система осуществляет параллельную работу непосредственно на одной микросхеме.

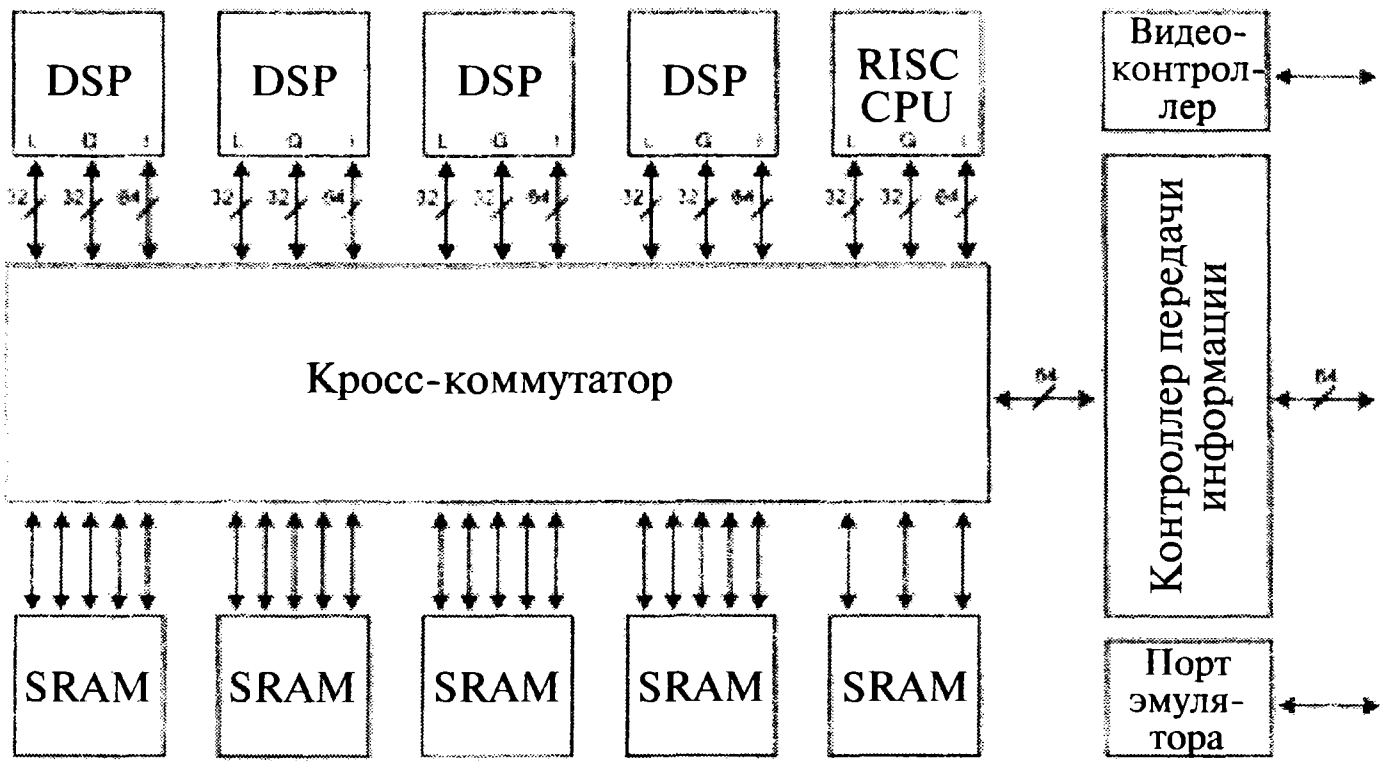


Рис. 2.23. Схема мультипроцессора обработки сигнала (DSP) C80 фирмы Texas Instruments. Эта микросхема имеет RISC-процессор, управляющий операциями и обменом данными между DSP-ядрами и банком статической памяти (SRAM). Блок кросс-коммутации обеспечивает эффективную связь любого DSP-процессора с любым блоком памяти.

Процессор C80 имеет особенности. Например, большую длину командных слов (64-битовых), что позволяет выполнять до пятнадцати операций за одну команду. Он имеет умножители 16×16 разрядов, 32-разрядное арифметико-логическое устройство (АЛУ), выполняющее арифметические действия и обеспечивающее доступ к ячейкам памяти микросхемы в течение одного тактового цикла. C80 позволяет одновременно обрабатывать информацию и осуществлять две передачи 32-битовых данных за один тактовый цикл. Он выполняет до двух миллионов RISC-операций и передает до 2,4 Гб информации за одну секунду.

Каждый из четырех блоков памяти имеет объем 8 кб. Кроме того, C80 имеет 18 кб дополнительной RAM-памяти. Поскольку доступ к памяти осуществляется за один цикл, при помощи программного обеспечения легко осуществить межпроцессорную связь, например, для последовательной обработки информации. Если два процессора одновременно пытаются получить доступ к элементу памяти, приоритет определяется блоком кросс-коммутации.

Два видеоконтроллера формируют сигналы синхронизации и обеспечивают циклы передачи видеосигнала. Каждый контроллер имеет кадровый таймер и связанную с ним схему, устраняющую потребность во внешних цепях, что уменьшает размер платы и число микросхем, необходимые для реализации всей системы. Тактовая частота C80 равна 50 МГц.

Одной из последних высокоэффективных видеокарт является «Genesis» фирмы Matrox, включающая микросхему C80 и показанная на рис. 2.24. Фирма Matrox также разработала микросхему для ускорения преобразования изображения (NOA). Эта видеокарта совместима практически с любой видеокамерой и может принять сигнал четырех стандартных монохромных видеокамер или сигнал одной цветной RGB камеры. Она имеет интерфейс синхронизации и управления TTLV RS-422, и может работать с устройством медленного сканирования. Она имеет низкочастотный фильтр и АЦП, позволяющий сканировать образец с частотой до 140 МГц. Таблицы поиска каждого канала управляют аналоговыми или цифровыми видеоданными до их передачи главному процессору компьютера.

Микросхема видеосвязи (VIA) на материнской плате компьютера позволяет получать цифровую информацию цветной RGB камеры об интенсивности цветовых компонент растрового изображения в последовательном режиме (одну компоненту за тактовый период). Видеокарта «Genesis» может производить 100 миллиардов операций в секунду. Она может иметь расширение с помощью дополнительного процессора на основе двойной C80, связанной с 32-битовой быстродействующей шиной периферийной связи (PCI).

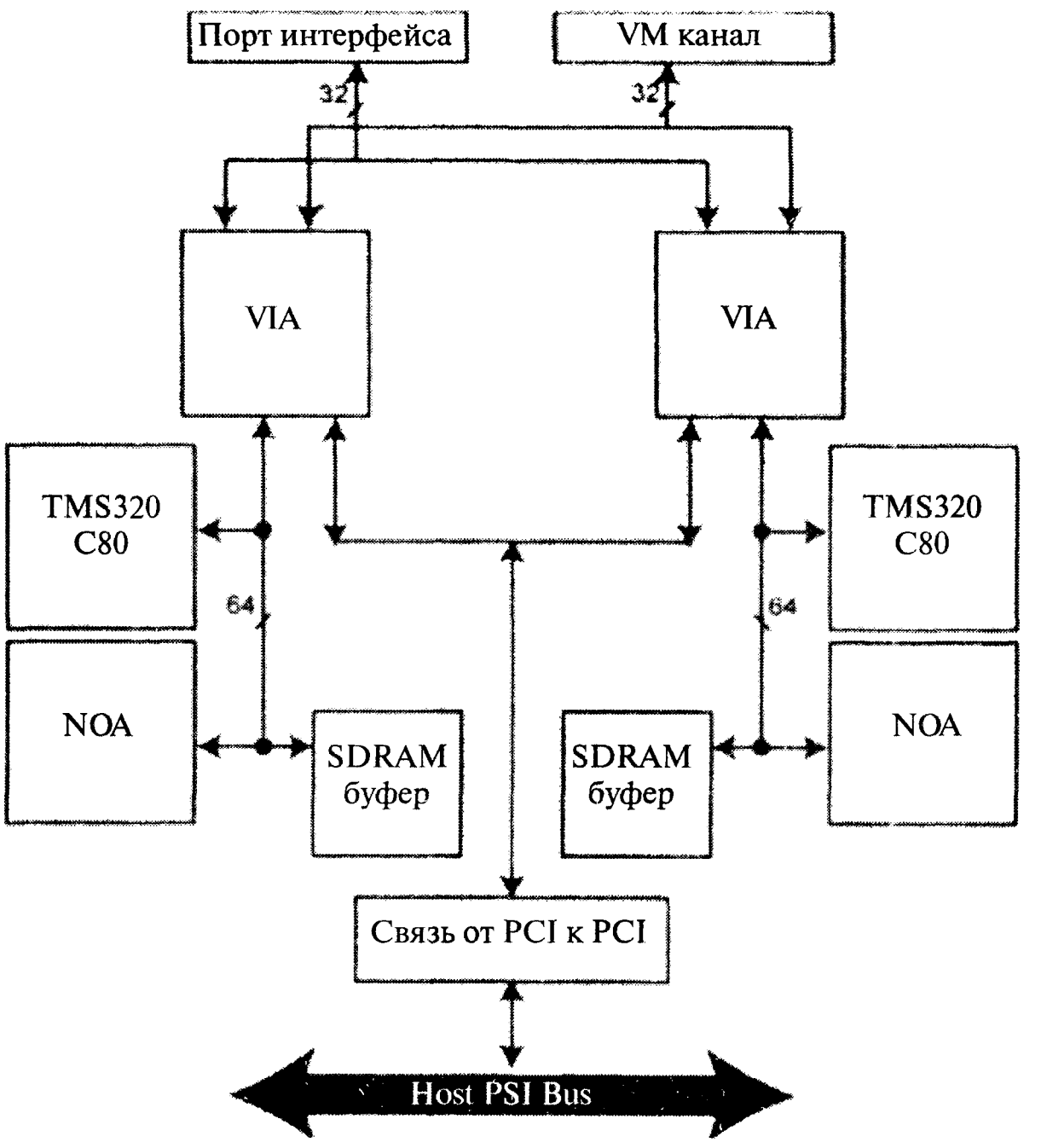


Рис. 2.24. Функции современной видеокарты Matrox фирмы «Genesis» для оцифровки сигнала видеокамеры. Она имеет два процессора сигнала (C80) и два ускорителя действий (NOA) для преобразования изображения с помощью фильтров размером n×n. Изображение сохраняется в элементах памяти SDRAM, а параллельная передача изображения осуществляется через быстродействующую PCI шину.

2.6. Цифровое изображение

Интерес к цифровому изображению возник задолго до появления компьютеров. В начале 1920-х годов для передачи газетных фотоснимков из Лондона в Нью-Йорк и обратно использовали электрический кабель. Изображение преобразовывали в цифровую информацию, но его качество было чрезвычайно низким, а передача занимала три часа. Тем не менее, это было огромным скачком вперед по сравнению с методом доставки фотографий обычной почтой, что требовало не меньше недели. Сегодня цифровая передача изображения используется в медицине, физике, астрономии, биологии и других отраслях науки и техники. Широкое распространение получили и недорогие бытовые цифровые фотокамеры.

Обработка изображения используется в самых различных устройствах. Ее можно определить как любое преобразование или интерпретацию цифрового изображения компьютером. Задачи получения цифрового изображения и его преобразования тесно связаны.

Обработка изображения может быть весьма сложной, и по этой причине многие исследователи стараются ее избегать. Однако в материаловедении изображение часто имеет высокий контраст, что упрощает преобразование. Выше описано получение изображения ПЗС-матрицей и его передача компьютеру. Поскольку изображение является цифровым, вся обработка выполняется компьютером.

2.6.1. Структура цифрового изображения

В микроскопе формируется двумерное изображение $f(x, y, B)$, где f — интенсивность цвета B в пикселе (x, y). Непрерывную функцию можно представить в дискретной цифровой форме, как показано на рис. 2.25. Рис. 2.26 иллюстрирует представление изображения в цифровой форме. Монохромное цифровое изображение можно представить как матрицу, индексы которой описывают номера строки и колонки, а численные значения элементов характеризует интенсивность пикселя. Элементы этой матрицы по-английски называют picture elements (элементы изображения), что сокращают до pixel (пиксель). Рис. 2.26 иллюстрирует левый верхний угол изображения в осях xy. Направление оси y может показаться странным, однако оно принято в большинстве компьютерных программ (хотя имеются и исключения). Качество цифрового изображения определяется количеством пикселей и высотой ступеней, характеризующих минимальную разницу уровня яркости.

Количество пикселей определяет разрешение изображения. Типичное цифровое изображение имеет размер 800x600, что соответствует 480 000 пикселям, но бывают и другие размеры. Большинство мониторов имеет отношение длины к высоте 4:3, и поэтому обычно цифровые изображения имеют это же отношение количества пикселей в строке к количеству строк. Выбор этого отношения был сделан в 1930-х годах, когда Академией киноискусств был принят первый стандарт размера кадров кинопленки. Это определило и выбор в 1950-х годах стандарта телевизионного изображения. Компьютерные мониторы явились развитием телеэкранов, и поэтому они также имеют отношение 4:3. Чтобы пиксель на мониторе был квадратным, цифровое изображение имеет это же отношение числа пикселей в строке к числу строк.

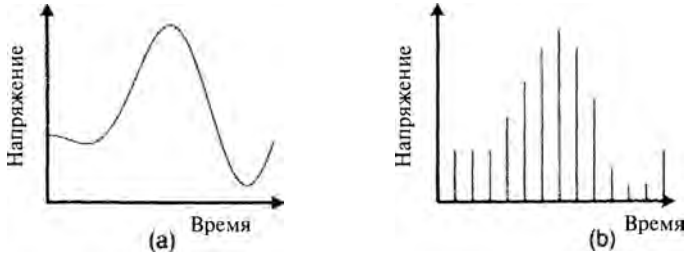


Рис. 2.25. (a) – Непрерывная зависимость от времени напряжения интенсивности света на датчике; (b) – оцифровка входного сигнала при помощи АЦП, характеризующая его амплитуду и время.

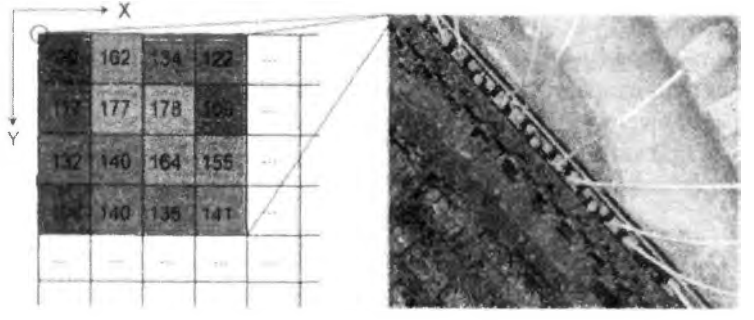


Рис. 2.26. Хранение цифрового изображения. В 8-битовом формате монохромного серого цвета интенсивность пикселя характеризуется значением в диапазоне от 0 до 255, где 0 соответствует черному, а 255 – белому цвету.

Число уровней интенсивности называют глубиной цвета, указываемой в битах. Например, пиксель 8-битового изображения имеет $2^8 = 256$ уровней яркости. Интервал возможных величин интенсивности называют динамическим диапазоном изображения. Стандартная единица памяти, байт, содержит 8 бит информации. Следовательно, пиксель 8-битового изображения можно сохранить в одном байте памяти (или в трех байтах в случае цветного RGB изображения). Человеческий глаз различает 20–30 уровней яркости монохромного изображения, и поэтому 8-битовая глубина более чем достаточна для визуального восприятия изображения. На протяжении многих лет однобайтовая память и 8-битовый диапазон интенсивности являются наиболее широко используемым форматом изображения. Однако обработка изображения может изменить его диапазон. Например, диапазон измерений может измениться в результате преобразования интенсивности или применения пространственного фильтра. Поэтому после преобразования изображения разница в уровне яркости может стать заметной, и некоторые современные видеокарты получают изображение с более высокой глубиной цвета.

В связи с проблемой хранения цифрового изображения важно его разрешение. Причины этого стали очевидными, когда были изучены причины получения некачественного изображения. Цифровое преобразование сигнала проводят до построения изображения, и поэтому проблемы хранения сигнала в аналоговой

и цифровой форме имеют много общего. Теорема Котельникова была описана выше. Стробоскопический эффект характерен для многих форм дискретной информации, примером чего является колесо автомобиля, которое на фотопленке может крутиться назад. Критерий Найквиста утверждает, что частота оцифровки по крайней мере вдвое должна превышать частоту сигнала. В противном случае высокочастотная компонента может привести к появлению искажений. Стробоскопический эффект состоит в появлении ложной информации низкой частоты. Рис. 2.27 иллюстрирует появление регулярных черно-белых полос при различных пространственных разрешениях цифрового изображения. Для цифрового изображения критерий Найквиста формулируется следующим образом: пространственное разрешение должно по крайней мере вдвое превышать размер изучаемых особенностей. Поэтому на рис. 2.27 для решетки разрешение, то есть ширина пикселя, не должна превосходить половины ширины полосы.

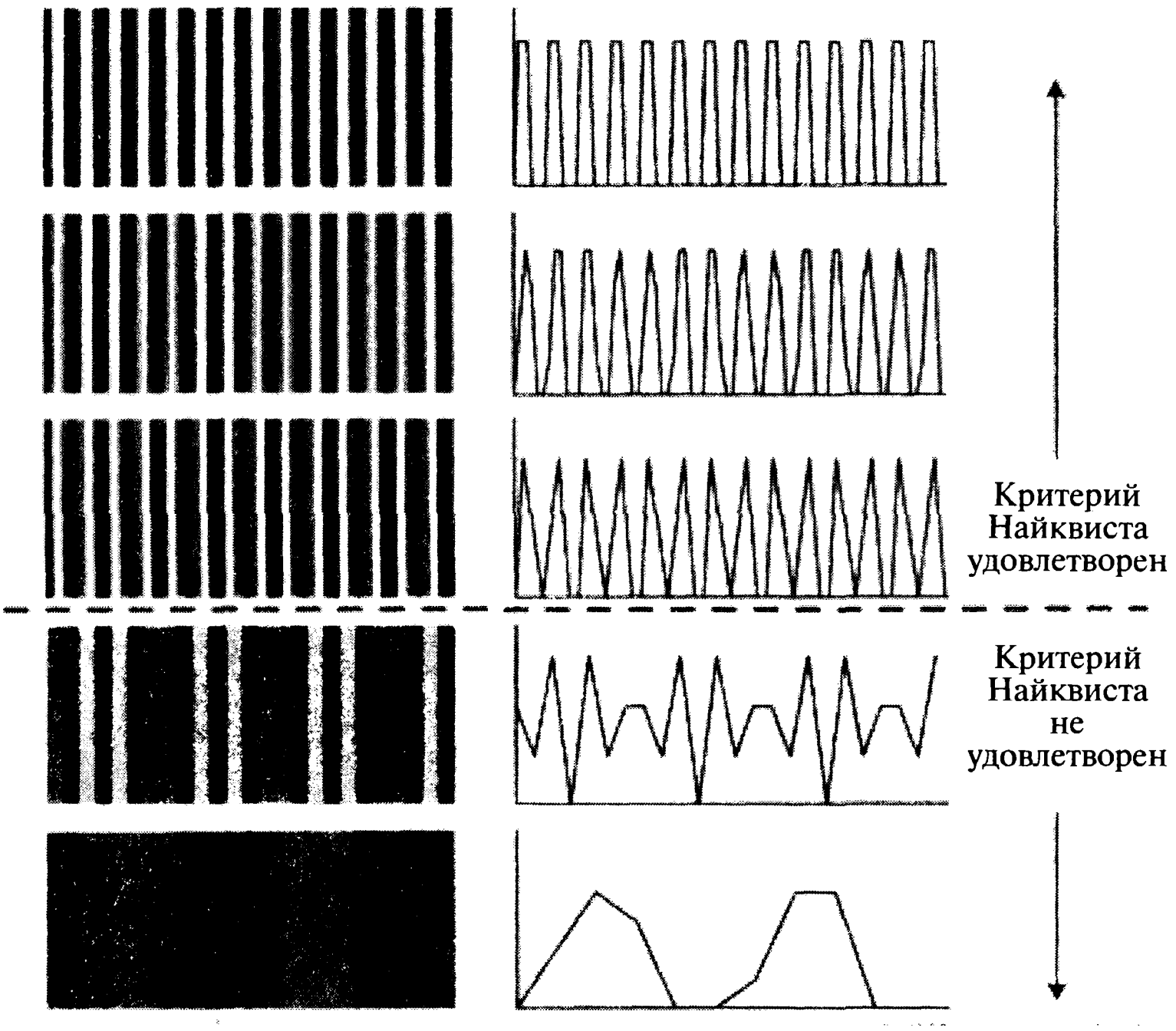


Рис. 2.27. Изображение дифракционной решетки при различных разрешениях. Если пространственное разрешение (размер пикселя) больше величины, определяемой критерием Найквиста, полоса на изображении кажется более широкой, чем она есть на самом деле. В результате теряется важная пространственная информация.

Существует несколько факторов, ограничивающих пространственное разрешение. Например, объем информации (хранимой на жестком диске или в оперативной памяти) зависит от разрешения. Развитие компьютерной техники привело к увеличению объема памяти, и поэтому теперь она, как правило, не лимитирует разрешение. Разрешение и глубина цвета теперь ограничиваются характеристиками ПЗС-матрицы и видеокарты.

2.6.2. Анализ изображения

Количественные измерения методом компьютерного анализа изображения имеют несколько особенностей. Рис. 2.28 иллюстрирует один из методов анализа изображения. Возможны и другие методы, но их используют значительно реже.

Сначала нужно правильно настроить микроскоп. Для получения качественных данных это очень важно. Любое увеличение скорости сканирования в конечном счете обязательно приведет к менее точным данным.

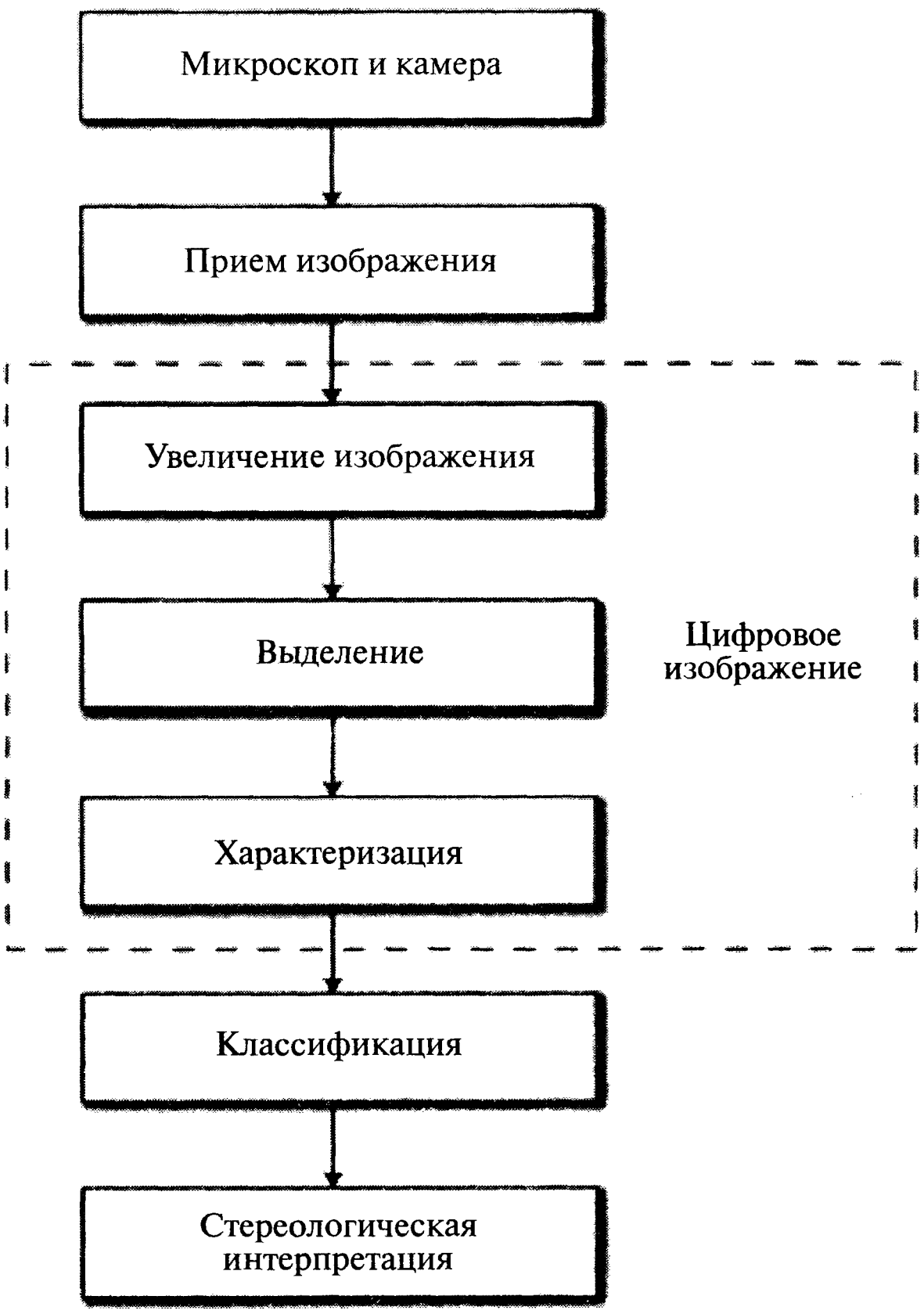


Рис. 2.28. Процедура преобразования и анализа цифрового изображения.

Получение цифрового изображения состоит в превращении полученного оптического изображения в цифровую форму. Различие цифрового и оптического изображений состоит в том, что первое не является непрерывным. Цифровое изображение состоит из массива мелких пикселей. Его можно сохранить в память и обработать при помощи некоторой компьютерной программы.

Преобразование изображения включает целый ряд операций. Для облегчения анализа оно может включать и изменение размера пикселя. Целью преобразования может быть увеличение контраста, снижение шума, исправление дефектов, обусловленных оптикой микроскопа или устройства оцифровки изображения, и т.д.

Выделение состоит в идентификации различных особенностей и определении границ между ними. Человек имеет большой опыт выделения в режиме реального времени, однако компьютер такой способности не имеет. При двоичной системе записи изображения эта операция состоит в установке порога интенсивности. Ярким областям приписывают значение «1», а пикселям, интенсивность которых ниже порога, приписывают «0». Успех столь простого метода разделения объектов зависит от предшествующей подготовки образца, получения и преобразования изображения.

В процессе характеризации берутся объекты, выделенные на стадии сегментации, и производятся измерения на каждом из них. Эти измерения зависят от цели работы. Например, может измеряться длина, площадь, степень эллиптичности волокна и т.д. После характеризации цифровое изображение больше не требуется.

Если на изображении выделяется несколько объектов различного типа, их делят на соответствующие классы. Характеристики всех объектов, выделенных на предыдущем шаге, должны дать требуемую информацию о них. Операцию классификации можно использовать, даже если изображение содержит только один интересующий тип объектов. Например, для удаления артефактов, появившихся при подготовке образца или при обработке изображения. Наконец, для получения статистически объективных данных применяют стереологические методы. Отметим, что на измеренные характеристики влияют как метод преобразования информации, так и способ получения изображения.

2.6.3. Преобразование изображения

После выбора метода преобразования изображения нужно принять несколько решений:

- Использовать ли последовательное или параллельное преобразование?
- Какую операционную систему использовать?
- Возможно, наиболее сложное решение состоит в выборе языка программирования.

К счастью, бюджет научно-исследовательских лабораторий облегчает ответ на эти вопросы. Отметим, что результат зависит от алгоритма преобразования, а эту зависимость нужно свести к минимуму.

В разделе 2.3 описано развитие современного компьютера и работа процессора. Программирование в машинных кодах (на языке ассемблер) очень трудоемкая задача. Количество доступных программисту индивидуальных команд зависит от типа процессора, но обычно оно не превышает 100. Более того, даже простейшие математические действия типа умножения и деления состоят из нескольких команд языка ассемблер.

Неудобства языка программирования низкого уровня были быстро преодолены, и теперь имеется несколько языков программирования более высокого уровня. Эти языки имеют больший выбор команд. Однако ЦПУ их не понимает, и поэтому они должны быть преобразованы в машинные коды. Это может быть сделано или компиляцией, переводящей всю программу в машинные коды за один шаг, или интерпретацией, в которой каждая строка операторов переводится в последо-

вательность команд. Очевидно, скорость работы программы зависит от качества компилятора или интерпретатора соответственно.

Первый шаг преобразования изображения состоит в вызове описывающей его информации. Большинство коммерческих видеокарт имеет библиотеку команд, которые позволяют вызвать изображение и перевести его в двумерную матрицу.

2.7. Хранение и редактирование изображений

До появления цифровых методов получение микрофотографий при помощи микроскопа было длительным процессом, включающим фотографирование и проявку фотопленки. Еще ранее, до изобретения фотоаппарата, наблюдаемое изображение зарисовывали, что было еще более трудоемкой задачей, требующей не только терпения, но и художественных способностей микроскописта. В XIX столетии рисунки были иллюстративными, а количественные измерения на их основе имели значительные ошибки.

Появление цифровой камеры в последнее десятилетие привело к настоящей революции в получении и хранении увеличенных изображений. Цифровое изображение строится почти мгновенно, в результате чего стало возможно получать сотни изображений в течение одного рабочего дня. Однако легкость фотографирования имеет и обратную сторону. Имеется множество графических форматов хранения изображения, неправильный выбор которого может сделать изображение фактически бесполезным. Кроме того, для корректной интерпретации полученных данных необходимо понимать принципы хранения информации в специфическом формате.

2.7.1. Структура файлов данных

Человеческий глаз отображает мир способом, похожим на ПЗС-матрицу, в которой роль пикселя исполняют палочки и колбочки, расположенные на сетчатке и представляющие собой элементарные чувствительные ячейки глаза. На сетчатке формируется перевернутое изображение и передается оптическими нервами мозгу. Для хранения изображения мозг использует различные абстракции. Точный цвет и форма объекта заменяются абстрактными понятиями типа «коричневый цвет» и «собака», сильно сокращающими количество информации, требуемой для запоминания определенной сцены. Концептуальная манера запоминания изображения позволяет «дурачить» человека при помощи оптических иллюзий. Современные компьютерные программы пока не имеют концептуальных понятий и используют прямые методы хранения информации. Имеется два метода хранения изображений:

- растровый метод;
- объектный метод, использующий элементы простейшей геометрической формы (или векторов), из которых строится изображение. При этом методе построения изображения линия, например, может быть описана вектором, его ориентацией, толщиной и цветом.

Растровые файлы хранят изображение в виде линейной последовательности пикселей некоторой интенсивности. Преимущества растрового метода хранения

изображения обусловлены тем, что ПЗС-матрица получает изображение именно в растровой форме. Объектный метод хранения изображения обычно используют в графических программах, строящих изображение из набора простых объектов типа отрезков прямых, квадратов и кругов. Однако даже в этом случае изображение иногда приходится преобразовывать в растровое, если, например, его нужно отпечатать на принтере или показать на мониторе компьютера.

Структура компьютерных файлов достаточно сложна и зависит от типа операционной системы. Файлы включают не только непосредственно данные, но и информацию, которая важна для операционной системы. Эта информация описывает тип данных (например, изображение, текст и т.д.), программное обеспечение, необходимое для открытия файла, и информацию об авторе. Эти компоненты файла обрабатываются операционной системой и обычно не доставляют беспокойства пользователю.

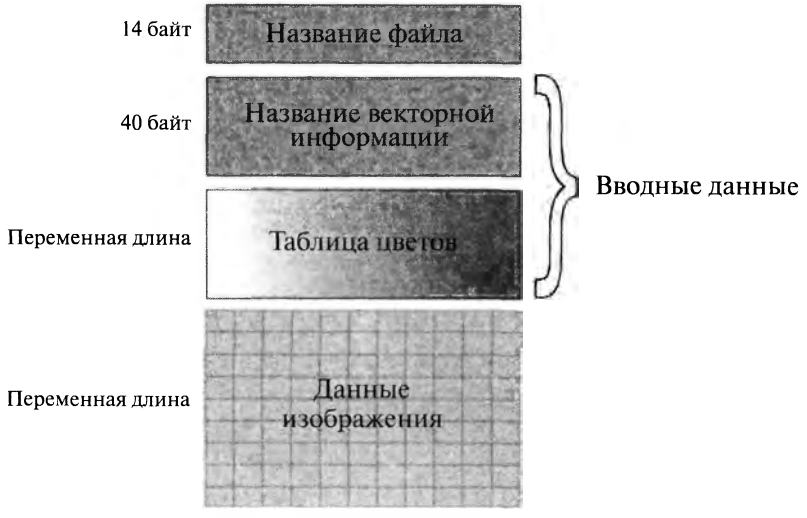


Рис. 2.29. Структура видеофайла программы Windows, в котором первые 14 байт представляют собой заголовок файла, а следующие 40 байт описывают детали информации заголовка. До информации об интенсивности пикселей дана таблица, характеризующая цвет изображения.

Не вдаваясь в детали операционной системы, структуру видеофайла можно разделить на две части, а именно вводные данные и информацию, описывающую пиксели изображения. Чтобы проиллюстрировать связь этих частей, в качестве примера будет использован файл цветного изображения Windows. Схема вводной части Windows-файла показана на рис. 2.29. Вводные данные (Bitmap Info) состоят из двух частей, а именно заголовка вводимых данных и цветовой таблицы. Вводные данные представлены в Таблице 2.4.

За вводными данными следует таблица (LUT), определяющая выбор одного из 256 возможных цветов. В случае изображения «истинного цвета» таблица LUT отсутствует, и каждый пиксель характеризуется своим цветом. За вводными данными следует информация, описывающая интенсивность пикселей.

Вводные данные операционной системы Windows представлены в относительно простом формате, и по этой причине заголовок весьма краток. Без вводной информации нельзя определить размер и глубину цвета. Для правильного извлечения информации компьютер должен понимать информацию заголовка. Структура заголовка зависит от формата изображения, но в любом формате она содержит элементы, аналогичные описанному выше формату Windows.

Таблица 2.4. Вводные данные операционной системы Windows

Переменная	Описание
biSize:	Размер растровой структуры Заголовка Информации
biWidth, biHight	Размеры изображения в пикселях
biPlanes	Количество плоскостей цели, оно должно быть установлено как «1»
biBitCount	Количество бит на пиксель, в пределах от 1 для монохромного изображения до 32, что соответствует максимум 232 цветам
biCompression	Тип сжатия (если имеется) хранимого изображения
biSizeImage	Размер изображения в байтах
biXPelsPerMeter	Размер изображения в пикселях на метр цели по X
biYPelsPerMeter	Размер изображения в пикселях на метр цели по Y
biClrUsed	Количество цветов изображения
biClrImportant	Количество цветов, требуемых для показа вводных данных (Bitmap Info)

2.7.2. Формат изображения

Цифровые изображения строят для двух целей:

1. Для зрительного восприятия, не требующего количественной информации.
2. Для количественной характеризации структуры материала. Измерения в этом случае могут состоять как в простом определении длины особенностей, так и в сложных многостадийных процедурах преобразования.

В первом случае изображение должно создавать ощущение истинности. Изучаемая деталь может быть уменьшена, и тогда мозг может интерпретировать изображение, как описано выше. Во втором случае требования к изображению зависят от методов измерения и анализа. Например, банки часто хранят и обмениваются цифровыми изображениями чеков. Наиболее важной частью чека является печатный или рукописный текст черного цвета на белом фоне. Второстепенные печатные детали чека имеют меньший контраст. Они несут меньше информации, но и их можно сохранить в соответствующем формате.

Формат изображения характеризуется набором данных типа глубины цвета и объема. Они определяют размер растрового изображения (в байтах) и память, требуемую для их хранения. Например, если размер изображения равен 1024×1024 пикселям, а глубина цвета равна 24 битам, то для хранения изображения требуется память 3 Мб. Сейчас типичный объем памяти жесткого диска компьютера равен 20 Гб[1], и он способен хранить приблизительно 6 000 изображений. Если изображение снимается периодически, этого может оказаться недостаточно. Если его передают при помощи портативного устройства или по линии связи, ограниче-

[1] В настоящее время объем жесткого диска рабочего компьютера более 80 Гб.

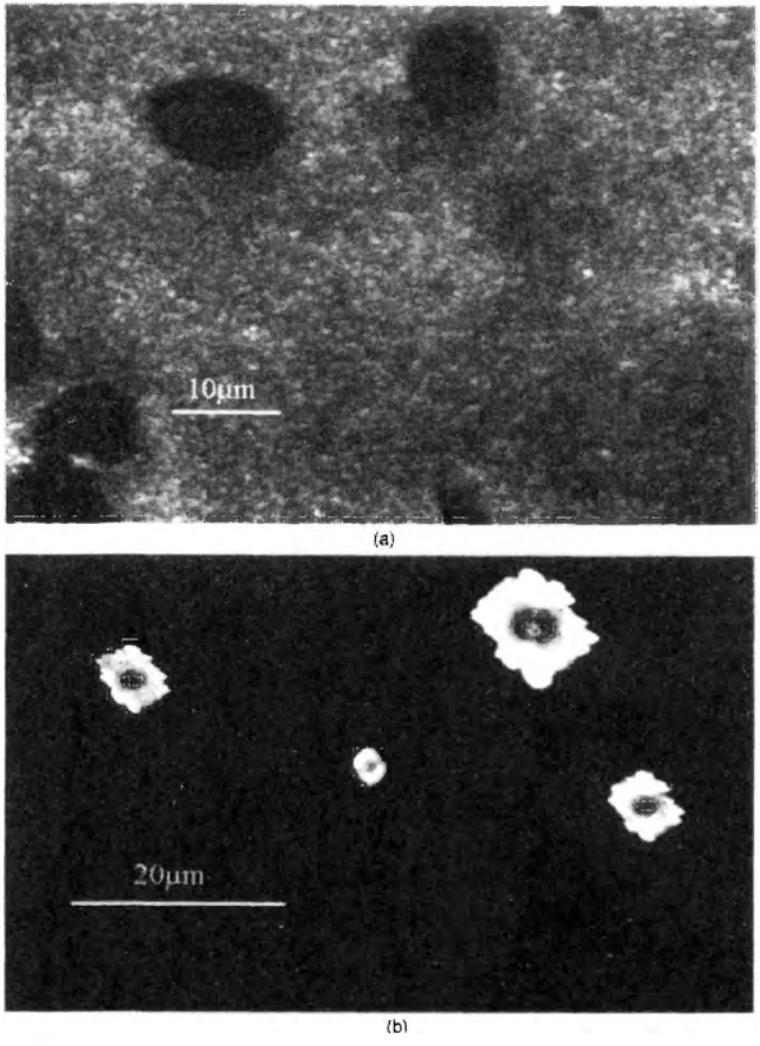


Рис. 2.30. Эффективность процедуры сжатия зависит от характера изображения. Объем информации изображения (a) сжимается методом RLE лишь на 34%; а изображение (b), имеющее крупные области одного цвета – на 91%.

ния на объем передаваемой информации могут оказаться еще более строгими. Для уменьшения объема информации используют процедуру сжатия.

Существует несколько методов сжатия объема информации изображения, подробно описанных в обзоре [14]. Когда сжатое изображение восстанавливается, его формат нужно сохранить еще раз. При этом может ухудшиться качество изображения или появиться артефакты. Методы сжатия делятся на приводящие и не приводящие к потере качества изображения.

2.7.3. Сжатие без потери качества

Растровое изображение часто содержит последовательность нескольких идентичных пикселей. Например, 8-битовое изображение серого цвета может содержать последовательность из 23 пикселей, интенсивность каждого из которых равна «186». Вместо хранения 23 идентичных пикселей, можно сохранить информацию о количестве одинаковых пикселей и их интенсивности («186»), что занимает меньший объем памяти. Эту процедуру можно применить ко всему изображению. Она позволяет сильно снизить объем памяти для изображений, имеющих значительные области одинаковой интенсивности. Чтобы раскрыть сжатое изображение, программа должна восстановить интенсивность пикселей. Это является стандартным методом сжатия, называемым RLE.

Эффективность процедуры сжатия оценивают отношением объема первоначальной информации к ее объему после сжатия. Эффективность RLE-сжатия зависит от характера изображения. Изображения с плавным изменением цвета и интенсивности сжимаются очень хорошо, а изображения с резким изменением интенсивности соседних пикселей – плохо (рис. 2.30). В таких случаях более эффективными оказываются сложные алгоритмы сжатия, оперирующие не отдельными пикселями, а повторяющимися блоками различной длины.

2.7.4. Сжатие с потерей информации

Точное воспроизведение изображения требуется далеко не всегда, и часто достаточной оказывается его более грубая версия. В этом случае восстановленное изображение отличается от первоначального. Это называют сжатием с потерей информации.

В Интернете очень широко используется JPEG-метод сжатия с потерей информации [15]. Он имеет две стадии. На первой информация разделяется на сведения о яркости и цвете изображения. Цветовое разрешение уменьшается вдвое, потому что человеческий глаз более чувствителен к изменению яркости, а не цвета. На второй стадии рассматриваются блоки пикселей размером 8×8. Глаз не очень чувствителен к сигналу высокой частоты, и поэтому высокочастотная информация удаляется. Количество потерянной информации определяется степенью сжатия, выбираемой оператором. Совместное уменьшение цветовой и высокочастотной информации позволяет получить гораздо более компактное изображение.

Метод JPEG-сжатия основан на понимании механизма восприятия человеком зрительных образов. Поэтому он хорош для изображений, используемых в иллюстративных целях. Если сжатое JPEG-изображение преобразуется для получения количественной информации, могут появиться нежелательные артефакты. Рис. 2.31 иллюстрирует применение описанного ниже лапласовского фильтра размером 3x3 для определения границы круга. Применение фильтра к исходному изображению выявляет границу круга, однако в случае сжатого JPEG-изображения происходит размытие границы.

2.8. Преобразовавние изображения

Способ преобразования и выбор формата изображения зависит от цели его использования. Если изображение предназначено для визуальной демонстрации,

преобразование может выявить мелкие особенности. Преобразование изображения стало обычной операцией после появления цифровых видеокамер, сканеров и недорогих домашних компьютеров. Операции типа увеличения контраста, удаления эффекта «красных глаз» и восстановления фотографий используют довольно часто. Если изображение предназначено для выделения определенных особенностей, его предварительная обработка может облегчить выполнение последующих операций. Различные методы преобразования изображения имеют общие операции. Например, они обязательно заканчиваются возвратом к исходному изображению.

При обсуждении методов преобразования изображения будут рассмотрены четыре вопроса. Во-первых, влияние метода преобразования на конечное изображение (важно, чтобы конечный результат был объективным). Во-вторых, будут рассмотрены методы изменения интенсивности. В-третьих, будут описаны пространственные фильтры. Наконец, будет дан краткий обзор частотных фильтров.

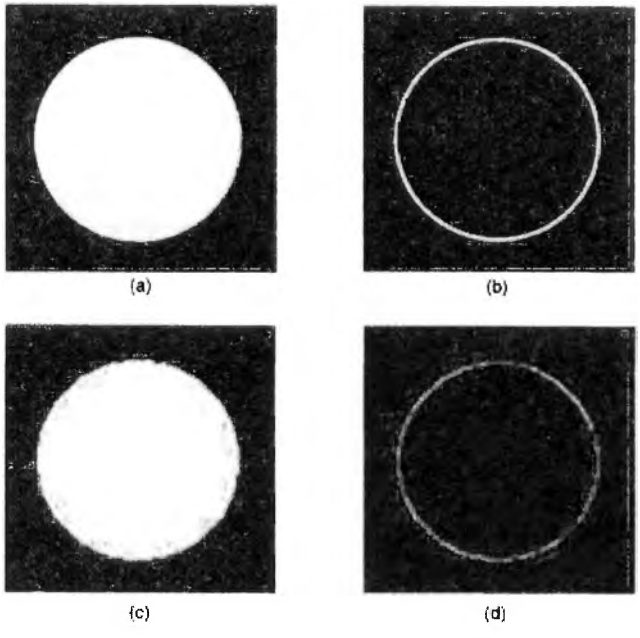


Рис. 2.31. Появление артефактов при преобразовании JPEG-изображения; (a) – первоначальное изображение, (b) – то же изображение после применения процедуры определения края, (c) – сжатое JPEG-изображение и (d) – результат применения алгоритма определения края к сжатому изображению.

2.8.1. Коррекция изображения

Изображение объекта в микроскопе должно быть пространственно инвариантным. Иными словами, интенсивность, форма и размер особенностей не должны изменяться при перемещении образца в пределах поля зрения. Оптика современного микроскопа вполне позволяет решить эту задачу. Однако неправильное

использование микроскопа может привести к ухудшению качества изображения. Например, при неравномерном освещении образца перемещение предметного столика приводит к изменению интенсивности объекта. Оператор микроскопа, имеющий интеллектуальную систему преобразования изображения (мозг), понял бы, что это обусловлено неравномерностью освещения. Однако машинные алгоритмы преобразования изображения этого не понимают. Следовательно, получаемые характеристики объекта будут зависеть от его положения на предметном столике. Это подчеркивает важность правильной настройки микроскопа.

Путь от светового сигнала, отраженного от поверхности образца, до конечной цифровой информации включает передачу и хранение сигнала в различных формах. Конечное изображение имеет дефекты и, в частности, оно пространственно неинвариантно. К счастью, имеются методы устранения дефектов изображения.

Первый способ состоит в усреднении сигнала. Полученная информация состоит из истинного сигнала и наложенного на него случайного шума. Термином *шум* описывают случайные флуктуации интенсивности сигнала. Искажения, обусловленные неправильной фокусировкой микроскопа, имеют принципиально иную природу. Изображение на пути от отражающей поверхности образца до цифрового сигнала преобразуется несколько раз и изменяет свою форму. При каждом преобразовании возникает шум, в том числе и при оцифровке аналогового сигнала (параграф 2.5.2). И хотя современные методы способны снизить уровень шума, полностью устранить его невозможно.

Так как шум статистически случаен, его относительную величину можно уменьшить усреднением. Сложение N идентичных изображений увеличивает интенсивность шума в N раз. Интенсивность истинного сигнала при этом возрастает в N раз, и поэтому отношение сигнал/шум увеличится согласно следующей формуле:

$$S_N = \frac{N}{\sqrt{N}} \tag{2.18}$$

Рис. 2.32 иллюстрирует относительное уменьшение интенсивности шума при накоплении сигнала. Вторым методом улучшения качества изображения является коррекция уровня фона. Типичным дефектом цифрового изображения является тень. Она возникает в областях сильной неравномерности освещенности образца. Неравномерность освещенности может возникнуть вследствие неидеальности системы освещения, что иллюстрирует рис. 2.33.

Самое простое решение этой проблемы состоит в калибровке системы освещения путем получения контрольного фонового изображения. Метод получения контрольного изображения зависит от типа микроскопа. Для микроскопа проходящего света фоновая картина может быть получена в отсутствие образца путем создания изображения источника в фокальной плоскости. В микроскопе отраженного света используют плоское зеркало, и фоновую картину искажают царапины на зеркале. Их влияние можно уменьшить, если сделать несколько изображений, перемещая зеркало перед каждой съемкой. Усреднение полученного сигнала дает распределение интенсивности фонового освещения.

Метод корректировки интенсивности фона зависит от причины неравномерности. Если неравномерность фона обусловлена недостаточным контрастом изображения, лучший метод исправления состоит в вычитании сигнала. Если же

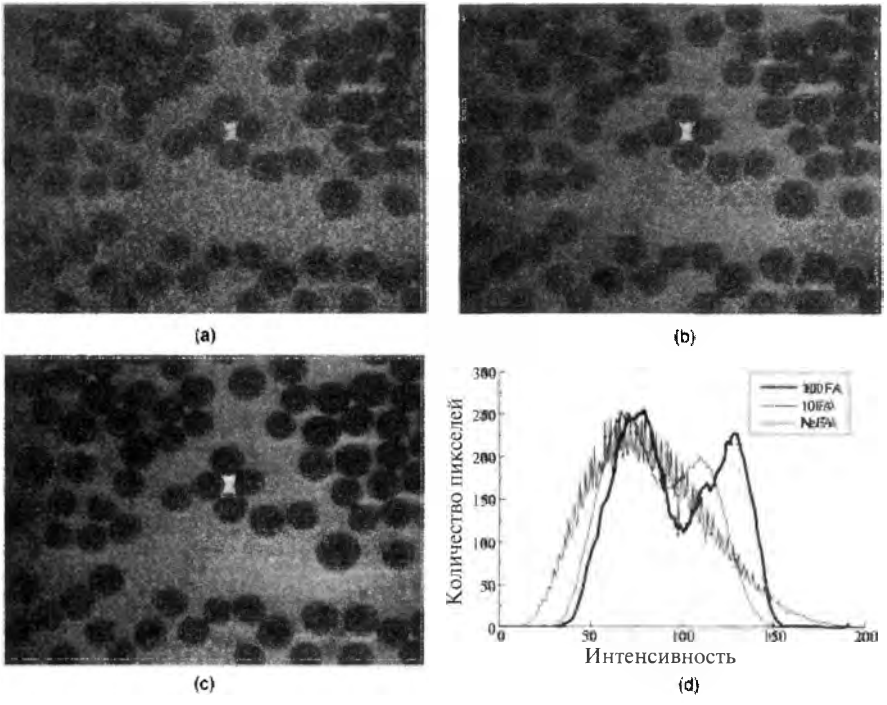


Рис. 2.32. Улучшение качества изображения путем усреднения сигнала. (a) – Один кадр; (b) – усреднение 10 кадров; (c) – усреднение 100 кадров; (d) – распределения интенсивности пикселей для этих случаев. Размер поля зрения 100×75 мкм.

причина обусловлена поглощением или отражением света в образце, лучшим методом коррекции является деление интенсивности. Часто имеются обе причины. Уравнение (2.19) описывает корректировку интенсивности пикселей:

$$I_c(x,y) = \frac{I_o(x,y) - B_e(x,y)}{B_r(x,y) - B_e(x,y)} \langle I_o \rangle \tag{2.19}$$

Здесь $I_o(x, y)$ – начальная интенсивность пикселя изображения, $I_c(x, y)$ – откорректированная интенсивность, $B_r(x, y)$ – интенсивность фона, $B_e(x, y)$ – фоновая интенсивность при отсутствии освещения и $< I_o >$ – средняя интенсивность первоначального изображения.

Третий метод коррекции изображения называют геометрической коррекцией. Одним из первых шагов при выполнении количественных измерений является калибровка поля зрения. Она состоит в получении нескольких калибровочных изображений, позволяющих определить размер индивидуального пикселя. Если оптическая система искажает форму образца, на изображении особенности одинаковой длины будут иметь различную длину. Геометрическое искажение может привести к серьезным проблемам при дальнейшей обработке изображения. Например, нельзя будет получить панораму крупной области путем наложения изображений соседних областей.

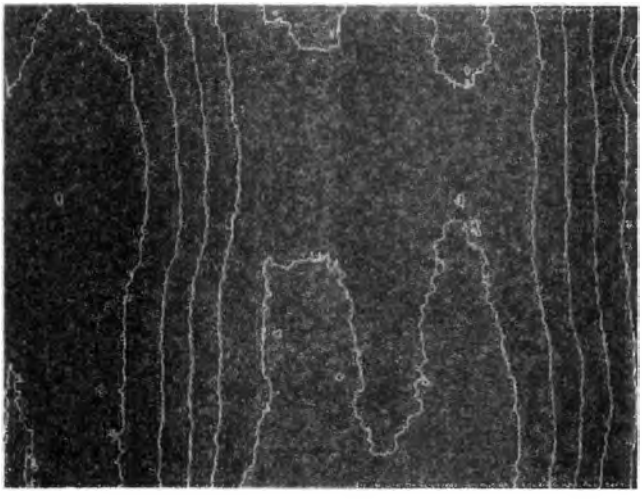


Рис. 2.33. Изображение отражающего зеркала демонстрирует неравномерность освещенности. Контуры соответствуют разности интенсивности, равной 10 единицам.

Геометрические искажения, состоящие как в растяжении/сжатии, так и в изменении углов, обычно имеют гладкий характер. Гладкое преобразование может быть описано уравнением, связывающим истинное положение исходной точки $s(x, y)$ с положением пикселя t(x,y) на изображении посредством двух функций $i(x, y)$ и $j(x, y)$:

$$t(x, y) = s[i(x,y), j(x, y)] \tag{2.20}$$

Если функции $i(x, y)$ и $j(x, y)$ известны, можно восстановить неискаженное изображение. На практике эти функции заранее неизвестны, и их нужно определять экспериментально.

2.8.2. Преобразование распределения интенсивности

Распределение интенсивности характеризует количество пикселей определенной интенсивности. Преобразование распределения интенсивности состоит в монотонном изменении интенсивности пикселей изображения. В результате получают новое распределение интенсивности пикселей, причем конечная интенсивность пикселя зависит только от его начальной интенсивности и функции преобразования. Напротив, при применении пространственного и частотного фильтров интенсивность пикселя зависит и от интенсивности его соседей.

Рис. 2.34 иллюстрирует результат преобразования интенсивности пикселей. В отличие от распределения интенсивности оптического изображения, гистограмма распределения цифрового изображения дискретна, поскольку интенсивность пикселя характеризуется натуральным значением. После преобразования интенсивность округляют до целого значения, что может привести к появлению разрывов на гистограмме.

В принципе преобразование можно описать почти любой гладкой функцией, но на практике используют лишь некоторые функции. На рис. 2.35 показаны

первоначальное изображение и три изображения, полученные в результате следующих преобразований: 1) логарифмического, 2) обратного и 3) выравнивания распределения интенсивности. Последнее преобразование состоит в получении равной частоты появления пикселей различной интенсивности (насколько это возможно). Детали данного преобразования можно найти в работе [16].

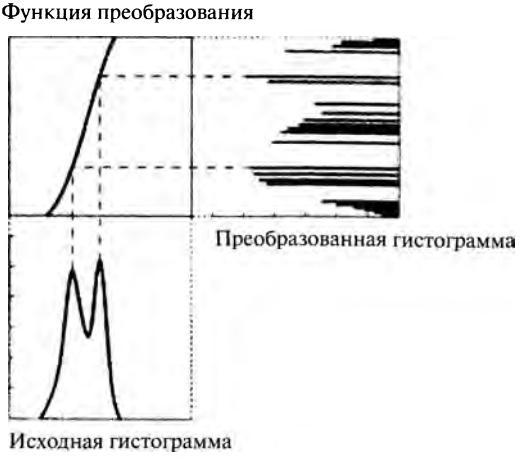


Рис. 2.34. Распределение интенсивности пикселей до и после преобразования выравнивания функции распределения. Обратим внимание на наличие разрывов в преобразованной гистограмме распределения.

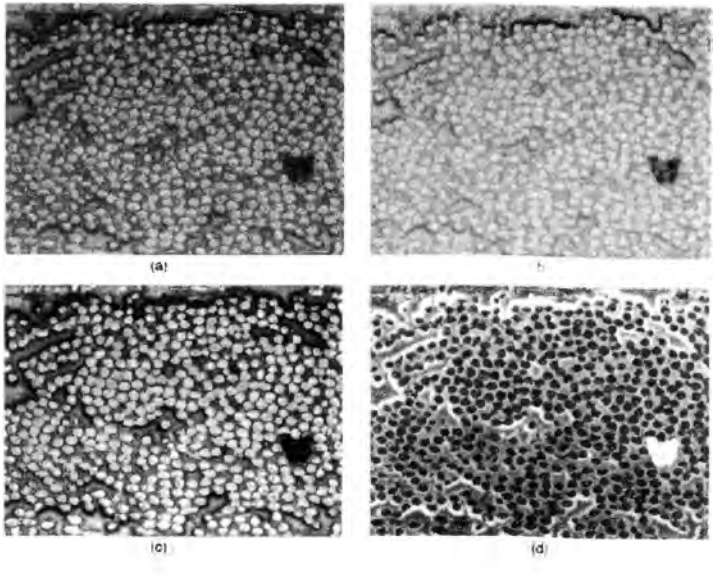


Рис. 2.35. Изображения волокнистого композита после преобразования интенсивности пикселей. (a) – Первоначальное изображение; (b) – после логарифмического преобразования; (c) – после обратного преобразования и (d) – после выравнивания распределения интенсивности пикселей. Размер поля зрения 150 ×100 мкм.

К изображению серого цвета можно применить преобразование псевдоокрашивания, придающее ему красные, зеленые и синие компоненты. Этот метод особенно эффективен для подчеркивания границ особенностей[1]. Человеческий глаз различает приблизительно 30 уровней интенсивности, что гораздо меньше количества уровней яркости современных мониторов. Соответственно, человеческий глаз должен различать 30^3 уровней цвета, и поэтому псевдоцветное изображение дает глазу больше информации.

Изменение интенсивности пикселей не должно изменять объема информации. К сожалению, реально при преобразовании информация может теряться, например, вследствие появления разрывов на распределении интенсивности. И если изображение предназначено не для визуальной демонстрации, а для количественного анализа, желательно изменять метод анализа, а не само изображение.

2.8.3. Пространственные фильтры

Пространственные фильтры отличаются от описанных выше точечных преобразований тем, что конечная интенсивность пикселя зависит от интенсивности соседних пикселей. После преобразования, описываемого ядром $h(x, y)$ размером sxs, интенсивность $f(x, y)$ пикселя (x, y) становится равной:

$$g(x, y) = c_h \sum_{i=x-s}^{j=x+s} \sum_{i=y-s}^{j=y+s} h(x-i, y-j) f(x, y), \tag{2.21}$$

где c_h – постоянная. Этот процесс применяют ко всему массиву пикселей. Поскольку математические операции типа уравнения (2.21) называют свертками, описываемые преобразования называют фильтрами свертки.

Каждый элемент ядра $h(x, y)$ является весовым коэффициентом, определяющим влияние свертки на конечное изображение. В качестве примера рассмотрим фильтр усреднения по окрестности:

$$h(x, y)\begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{pmatrix} \tag{2.22}$$

Этот фильтр определяет среднее значение интенсивности в ближайшей окрестности преобразуемого пикселя. Ниже описаны некоторые ядра свертки размером 3x3 и их влияние на изображение. Типичным фильтром размером 3x3 является преобразование Лапласа, которое часто используют для подчеркивания границ особенностей, примером чего служит рис. 2.36. При применении некоторого фильтра свертки нужно учитывать два момента.

Во-первых, на краю изображения пиксели имеют меньшее количество соседей, чем центральные, вследствие чего к ним уравнение (2.21) применять нельзя. Имеется несколько решений этой проблемы. Например, крайние пиксели можно игнорировать, в результате чего немного уменьшится размер изображения. Второй способ состоит в создании дополнительных пикселей, которым приписывается некоторая интенсивность. Еще одна возможность состоит в изменении ядра,

---

[1] Метод получил широкое применение в многоцветной люминесцентной микроскопии.

чтобы оно учитывало физический размер изображения.

Во-вторых, при применении фильтра свертки нужно учитывать, что вычисленная по уравнению (2.21) интенсивность может выходить за пределы динамического диапазона изображения. Постоянная c_h определяет изменение средней интенсивности изображения. Например, каждый элемент ядра (2.22) равен единице, и его применение приводит к девятикратному увеличению средней интенсивности изображения. Это обусловлено тем, что конечная интенсивность каждого пиксела равна сумме интенсивностей девяти соседей. Среднюю интенсивность можно оставить неизменной, если постоянную c_h сделать равной 1/9.

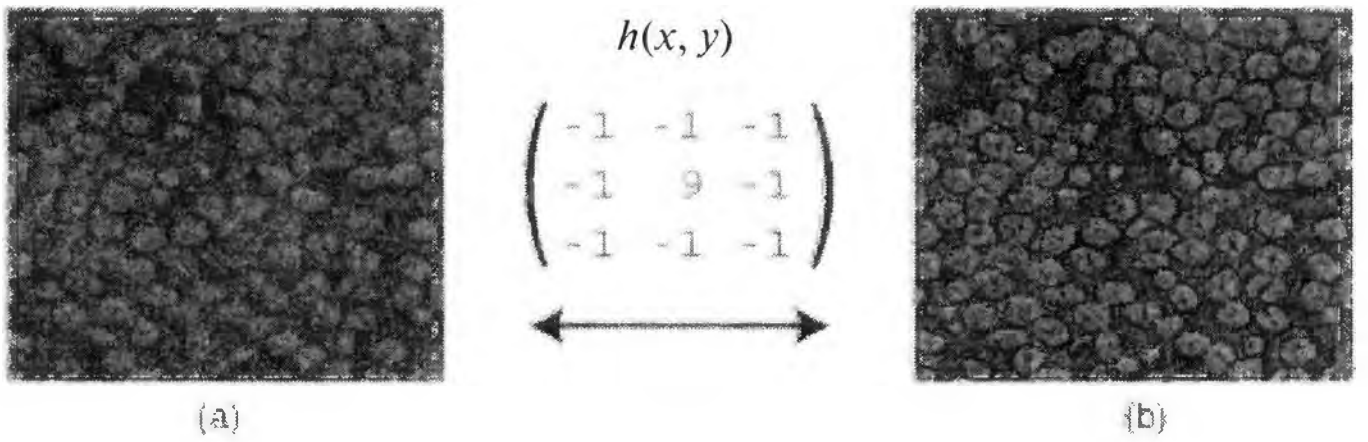


Рис. 2.36. (a) – Первоначальное изображение волокнистого композита; (b) – результат применения пространственного фильтра размером 3×3, увеличивающего резкость границ особенностей.

2.8.4. Частотный фильтр

Результаты применения пространственного фильтра определяются интенсивностью нескольких соседних пикселей. Еще одним широко используемым преобразованием является частотный фильтр. Обычно он содержит преобразование Фурье, хотя имеются и исключения. Интегральный Фурье-образ $F(u,v)$ изображения $f(x, y)$ описывается формулой:

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} f\ (x, y)\ exp^{-i2\pi(ux+vy)}\, dxdy \qquad (2.23)$$

Фурье-образ дискретного изображения, состоящего из $N \times N$ пикселей, имеет вид:

$$F(u,v) = \frac{1}{N^2}\sum_{x=0}^{N-1}\sum_{y=0}^{N-1} f(x,y) exp^{[-2\pi i(ux+vy)/N]} \qquad (2.24)$$

где $u, v = 0, 1, 2,...N - 1$. Фурье-образ F содержит всю информацию об изображении, которое может быть восстановлено обратным Фурье-преобразованием. Пространственные частоты F являются комплексными величинами, содержащими реальную и мнимую части. В иллюстративных целях величину F обычно представляют в виде трехмерного графика на комплексной плоскости. Низкочастотные гармоники имеют вид пиков, расположенных вблизи начала системы координат $F(0,0)$, а высокие частоты – удаленных пиков.

Вычисление Фурье-образа состоит в выполнении N^4 операций с комплексными величинами, и поэтому при увеличении размера изображения время преобра-

зования сильно возрастает. В большинстве программ используют быстрое преобразование Фурье (БПФ), уменьшающее время вычислений. Оптимизированные БПФ-алгоритмы описаны во многих работах и, например, в [7].

Преобразование изображения при помощи пространственного фильтра с ядром $h(x, y)$ описано в предыдущем параграфе. Такую же свертку можно использовать и в пространстве частот:

$$G(u, v) = H(u, v) \cdot F(u, v), \tag{2.25}$$

где F, G и H – Фурье-образы исходного изображения, конечного изображения и ядра свертки соответственно. Частотное Фурье-преобразование намного проще, чем пространственное преобразование. Преобразование изображений часто включает несколько фильтров свертки. Если анализируется несколько изображений или требуется обработка в режиме реального времени, частотное преобразование дает превосходные результаты.

На рис. 2.37 показано цифровое изображение морды мандрила (a) и его Фурье-спектр (b). Изображение содержит как высокочастотную информацию (волосы на морде), так и низкочастотную (области около носа и глаз). Для ослабления соответствующих деталей изображения можно удалить или ослабить различные области Фурье-спектра. Рис. 2.37c иллюстрирует применение высокочастотного фильтра, удалившего центральную область Фурье-образа в указанном на рисунке круге. Хотя это изображение сохранило тонкие детали первоначального изображения, потеря низкочастотной информации значительно снизила качество изображения. Рис. 2.37d иллюстрирует применение фильтра, удалившего высокочастотную информацию за пределами отмеченного круга. На преобразованном изображении особенности, соответствующие низкочастотной информации (нос и глаза), сохраняются довольно хорошо. Однако мелкие детали утеряны. Этот пример показывает, что удаление высоких частот в областях, где определяющей является низкочастотная информация, позволяет сильно уменьшить объем необходимой памяти, сохранив при этом качество изображения, вполне приемлемое для зрительного восприятия.

Фурье-преобразования особенно эффективны для анализа изображений, содержащих периодические структуры. На рис. 2.38a показан регулярный массив латексных сфер размером примерно 5 мкм. Образец содержит несколько дефектов, затрудняющих восприятие регулярной структуры. Фурье-спектр этого изображения (рис. 2.38b) имеет радиальный набор пиков, соответствующих этим структурам. Спектральные компоненты, находящиеся за пределом центрального круга, были удалены, а в результате обратного Фурье-преобразования было получено изображение, представленное на рис. 2.38c. Преобразованное изображение подчеркивает наличие латексных сфер, а Фурье-спектр позволяет определить расстояние между периодическими структурами и их ориентацию. На рис. 2.39 показано изображение, имеющее периодическую помеху. Удаление соответствующих пиков Фурье-спектра явилось очень эффективным методом ее устранения.

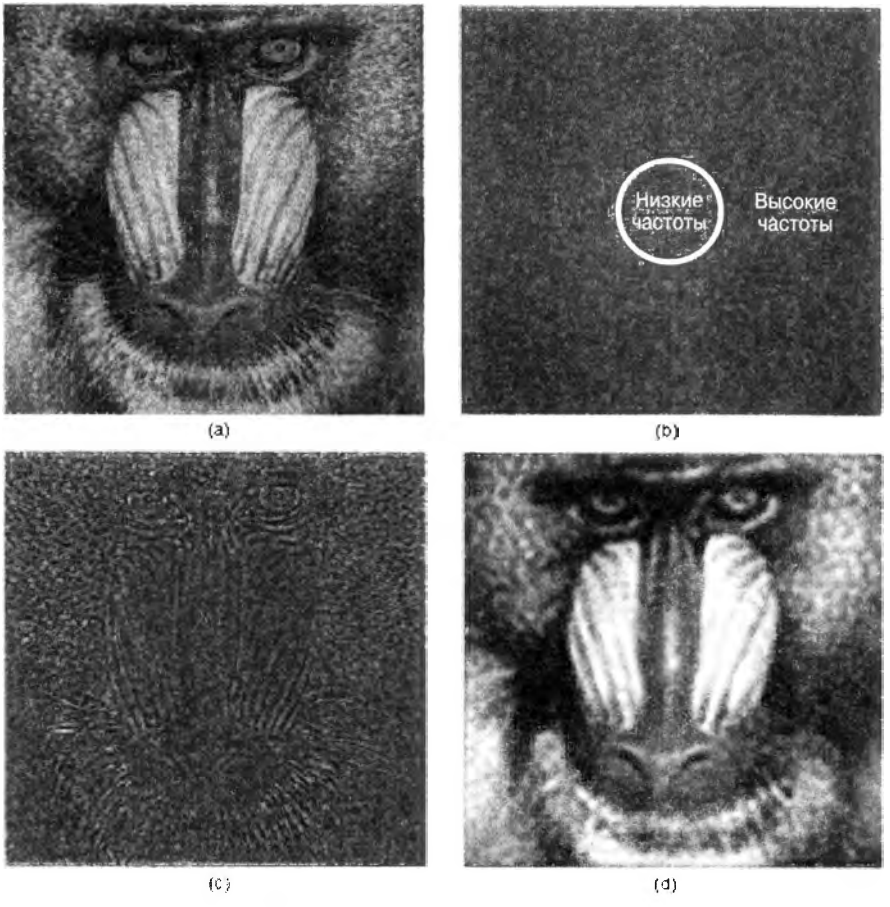


Рис. 2.37. Цифровое изображение морды мандрила (a) и его Фурье-образ (b). (c) и (d) – Результаты применения высокочастотного и низкочастотного Фурье-фильтров соответственно.

2.8.5. Преобразование Хоуга

В 1962 Пауль Хоуг запатентовал преобразование, предназначенное для «машинного распознавания сложных линий на фотографиях»[18]. Теперь преобразование Хоуга широко применяют для автоматизированного обнаружения прямых линий, кругов и более сложных кривых. Оно особенно эффективно для устранения шума и восстановления частично утраченной информации.

Рассмотрим n пикселей границы некоторого объекта. Если мы хотим найти подмножество пикселей, лежащих на одной прямой, можно определить уравнения, описывающие все возможные прямые, и выяснить, сколько пикселей удовлетворяют каждому из этих уравнений. Сложность состоит в том, что имеется огромное количество возможных прямых (порядка n^2, где n –количество пикселей). Преобразование Хоуга решает эту проблему иначе. Вместо того, чтобы рассматривать прямые, соединяющие все пары пикселей, последовательно рассматривают каждый пиксель, и определяются все возможные линии, проходящие через него.

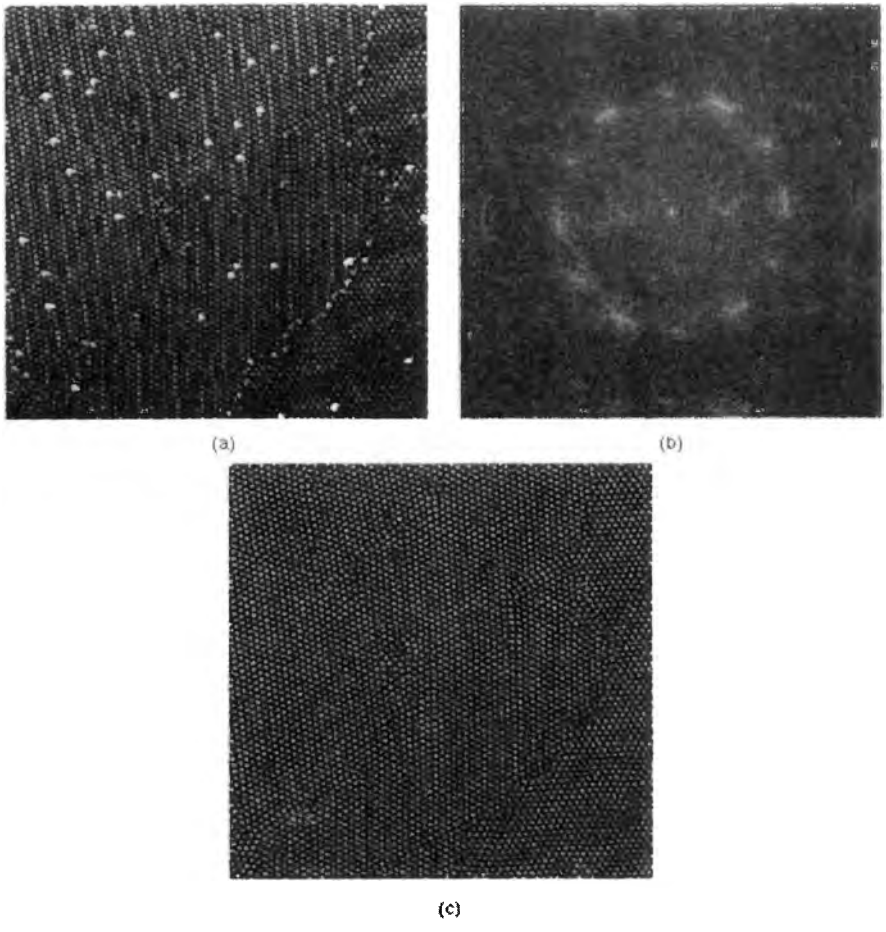


Рис. 2.38. Спектральное фильтрование Фурье-образа подчеркивает наличие периодических особенностей. (a) – Регулярный массив латексных сфер диаметром 5 мкм. Латекс получили из раствора, испарив растворитель. (b) – Фурье-спектр выявил наличие периодичности, демонстрируемой набором пиков, лежащих на окружности. (c) – Восстановленное изображение после применения Фурье-фильтра подчеркивает наличие периодичности.

В параметрической форме прямая линия описывается уравнением:

$$y \cos \theta - x \sin \theta = \rho, \tag{2.26}$$

где ρ - длина нормали из начала координат до прямой, θ – угол между прямой и осью x. В этой задаче координаты пикселя (x_i, y_i) известны и являются постоянными уравнения, а θ и ρ – искомые неизвестные.

Для выбранного пикселя с помощью уравнения (2.26) определяют величины (θ, ρ), описывающие все возможные прямые, проходящие через точку (x_i, y_i). В координатах параметров Хоуга их график имеет вид синусоиды. На рис. 2.40a показаны три пикселя, а рис. 2.40b демонстрирует соответствующие синусоиды в координатах параметров Хоуга. Три пикселя коллинеарны, и имеется единствен-

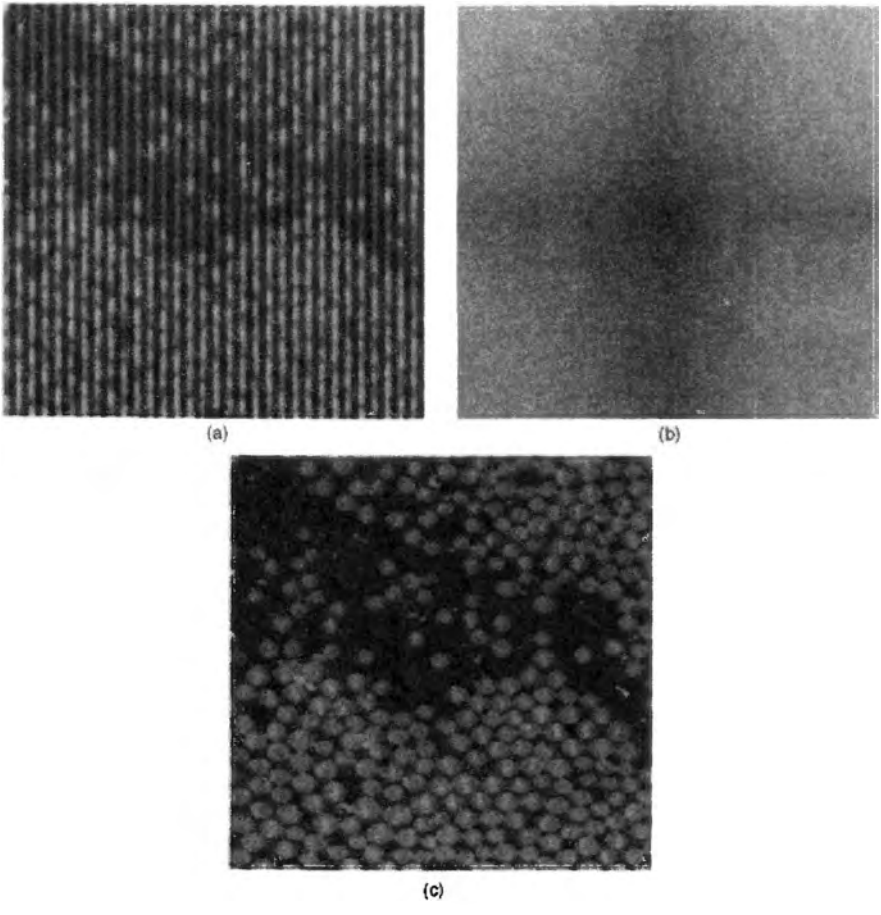
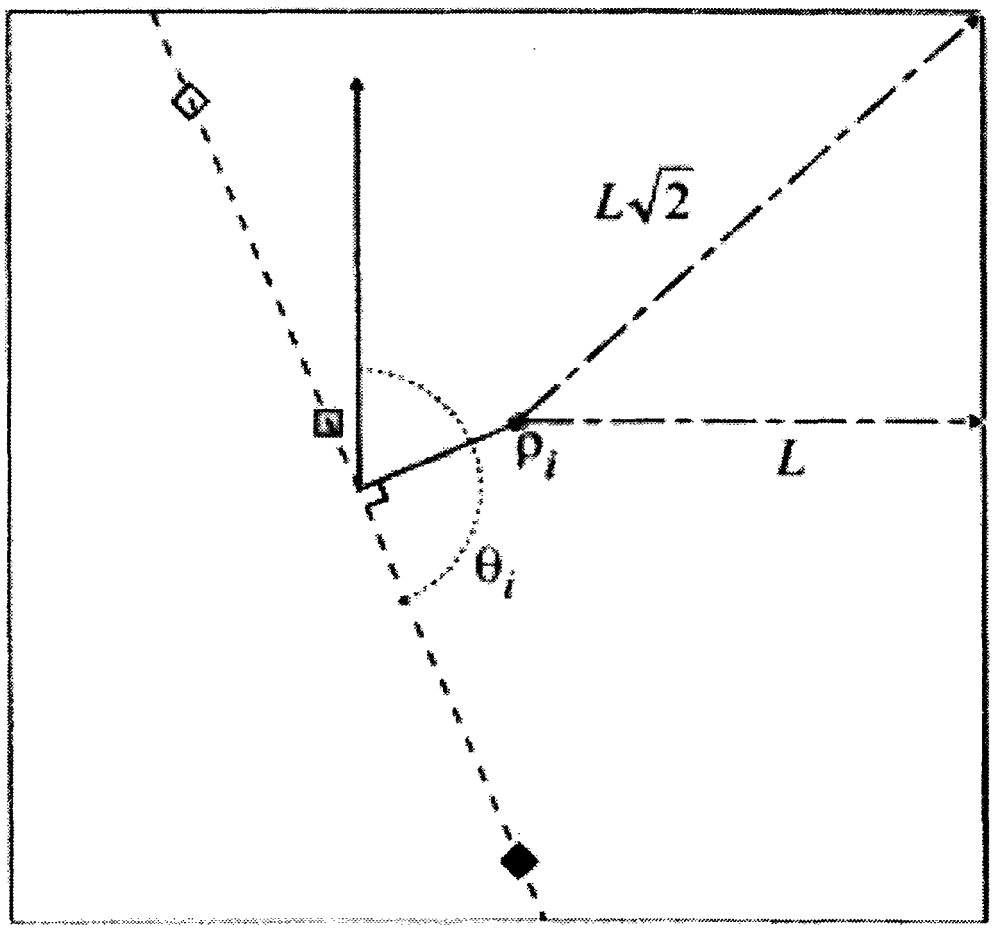


Рис. 2.39. (a) – Изображение, содержащее периодический шум; (b) – из Фурье-спектра можно удалить два пика; (c) – периодический шум устраняется, подавляя эти пики и применяя обратное Фурье-преобразование.

ная прямая (θ_i, ρ_j), проходящая через все три точки. Поэтому все синусоиды в пространстве Хоуга проходят через точку (θ_i, ρ_j). Коллинеарные пиксели на изображении могут быть найдены поиском пересечений в пространстве Хоуга.

Уравнение (2.26) определяет непрерывную функцию, соответствующую параметрам (θ, ρ) для одного пикселя. На практике параметрическое пространство делят на конечные элементы, и для линейного преобразования Хоуга этому соответствует двумерный массив элементов в пространстве параметров (θ, ρ). Массив первоначально зануляют. По мере работы алгоритма каждый пиксель изображения преобразуется в дискретную кривую (θ, ρ), и в соответствующие ячейки параметрического пространства добавляется единица. Совпадающие синусоиды, как на рис. 2.40b, приводят к появлению пиков в массиве (θ, ρ), свидетельствующих, что на изображении имеются прямые линии.

Рис. 2.41a демонстрирует цифровое изображение корпуса Паркинсона университета Лидса. Грани различных деталей (b) были обнаружены при помощи



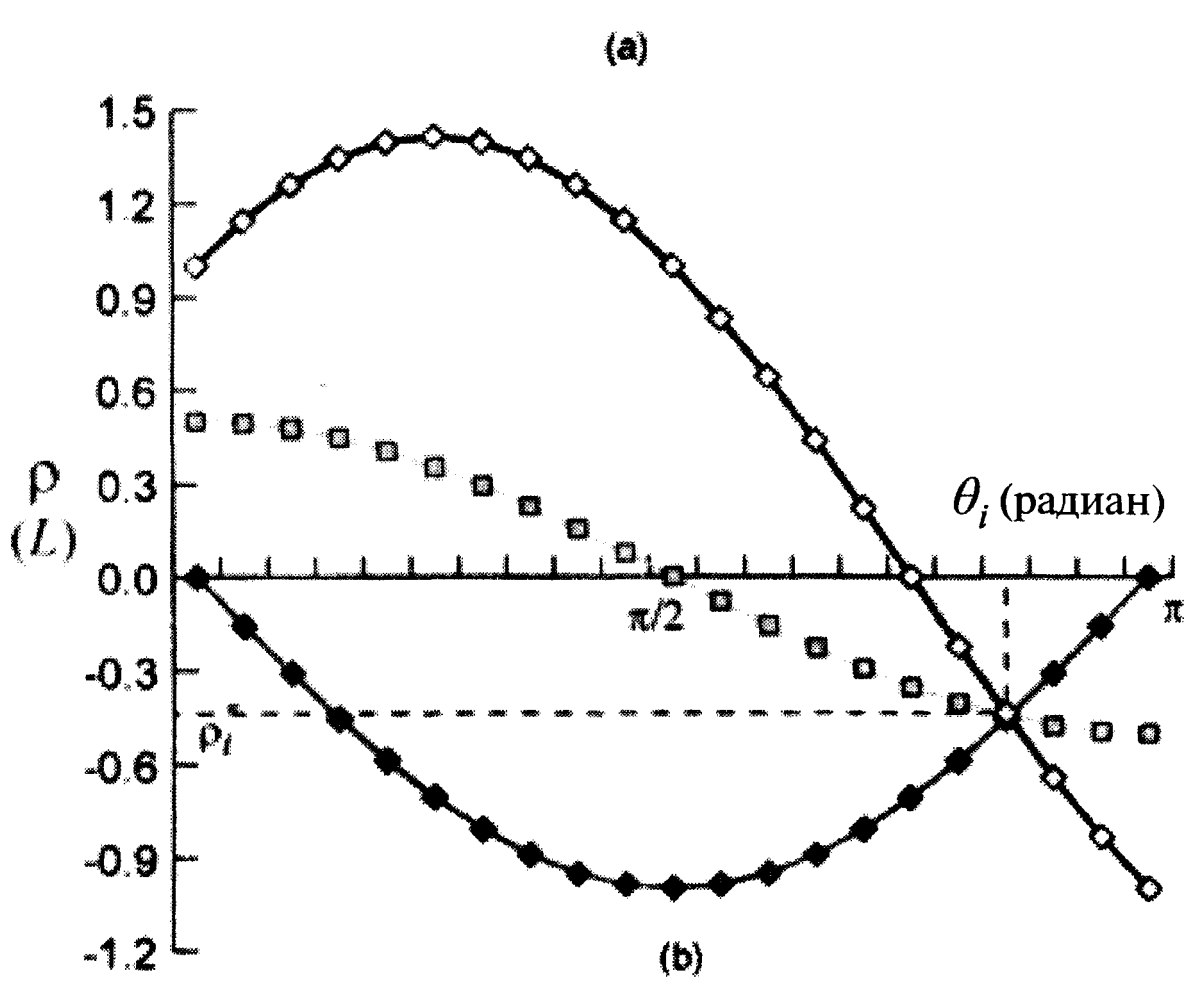


Рис. 2.40. Иллюстрация линейного преобразования Хоуга. (a) – На изображении выбираются три точки, лежащие на одной прямой; (b) – применение преобразования Хоуга ко всем прямым, которые могут проходить через каждую из этих трех точек, образует в пространстве параметров (θ, ρ) три кривые. Точка их пересечения определяет параметры (θ_i, ρ_i) прямой, проходящей через все три выбранные точки.

лапласовского фильтра свертки размером 3×3. Каждый пиксель изображения с интенсивностью выше пороговой был преобразован в кривые в параметрическом пространстве. Значение каждой ячейки в массиве параметрического пространства (θ, ρ) отражается ее интенсивностью (c), что позволяет визуализировать массив. В пространстве (θ, ρ) видна небольшая группа пиков. Рис. 2.41d демонстрирует линии перспективы исходного изображения, соответствующие этим пикам. Отметим, что пики выявляют наиболее длинные отрезки прямых на исходном изображении. Менее интенсивные пики соответствуют более коротким отрезкам.

Начало координат в уравнении (2.26) можно выбрать произвольно. Чтобы оно совпало с началом координат цифрового изображения, его можно поместить в

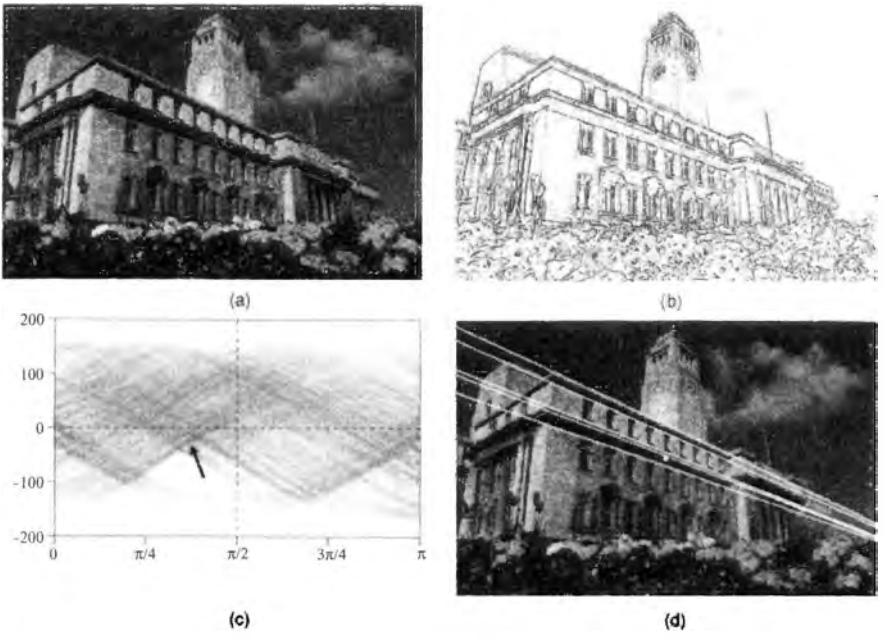


Рис. 2.41. Иллюстрация метода поиска прямых линий при помощи преобразования Хоуга. Прямые линии на изображении (a) обнаружены с использованием преобразования Лапласа размером 3×3. (b) – Результаты применения преобразования Лапласа. (c) – Применение преобразования Хоуга к (b). (d) – Отмеченные стрелкой наиболее плотные области в координатах параметров (θ, ρ) выявляют основные линии на исходном изображении.

левый верхний угол. Во многих учебниках, описывающих преобразование Хоуга, так и делается. Однако это накладывает ограничение на параметрическое пространство, и ни одна синусоида не попадает в верхний правый квадрант, приводя к несимметричности графика. В примере, иллюстрируемом рис. 2.41, начало системы координат поместили в центре изображения, что дает равномерно распределенное параметрическое пространство.

Преобразование Хоуга можно использовать для определения распределения прямых по ориентации. В качестве примера можно взять приведенную в главе 5 рентгеновскую микротомографию и работу [19]. Хотя в данном параграфе описывается линейное преобразование Хоуга, этот подход можно использовать и для анализа кривых. Например, окружность описывается уравнением:

$$(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 = r^2, \tag{2.21}$$

где r – радиус окружности и (x_0, y_0) – координаты ее центра. Это уравнение имеет три параметра, и параметрическое пространство является трехмерным. Каждая точка (x_i, y_i) в параметрическом пространстве преобразуется в конус. Рис. 2.42 иллюстрирует применение преобразования Хоуга к изображению мыльных пузырей. Поперечное сечение трехмерного параметрического пространства для постоянного значения радиуса r показано на рис. 2.42b.

Исходя из приведенных примеров, можно подумать, что преобразование Хоуга применимо лишь в случаях, когда имеется уравнение, описывающее форму искомых особенностей. В случаях, когда такое уравнение отсутствует, можно применять обобщенное преобразование Хоуга, в котором особенность описывается таблицами расстояний и парами направлений [20].

2.8.6. Выделение областей

Описанные выше преобразования предназначены для выделения различных особенностей. Однако такие преобразования ничего не говорят об их характере. Анализ изображения всегда проводится с априорным знанием их природы. Например, применение Фурье-фильтра к изображению, приведенному на рис. 2.38, было направлено на выявление периодических особенностей, наличие которых было установлено визуально. Следующий логический шаг состоит в идентификации различных особенностей изображения и выделении их из фона. Процесс выделения является одним из наиболее важных шагов любой программы распознавания образов.

Для выделения областей можно использовать различные свойства изображения. Самый простой метод состоит в делении изображения на области различной интенсивности. Для выявления областей различной интенсивности очень важна тщательная подготовка образца, включающая его разрезание и полировку. В этом смысле задача материаловеда гораздо легче, чем его коллег-биологов, имеющих дело с объектами, границы которых определены настолько плохо, что их трудно выделить даже человеческому глазу.

Для выделения областей различной интенсивности необходимо выбрать порог (если имеется несколько областей, то несколько порогов), который делит изображение на различные области. Эту операцию называют определением порога. Выбор порога становится более очевидным, если построить распределение интенсивности пикселей. Рис. 2.43 демонстрирует изображение волокнистого композита и соответствующее распределение интенсивности пикселей. На распределении видны три пика, соответствующие порам, волокнам и матрице. Если интерес представляют волокна, выбирают диапазон интенсивности, соответствующий их пику. Всем пикселям в этом диапазоне приписывают значение «0» (черный цвет), а остальным – интенсивность «1» (белый цвет). Это позволяет выделить волокна.

После выделения пикселей, соответствующих сечению волокон, можно измерить их относительную долю, однако иногда требуется определить более сложные характеристики, например, форму волокон. Различные объекты можно определить как области связанных пикселей. Если два пикселя принадлежат одному объекту, между ними можно найти путь, целиком лежащий внутри этого объекта. Для идентификации объектов можно использовать процесс, называемый ростом области.

Опишем алгоритм роста области. Во-первых, в пределах выбранного объекта выбирается «зародыш». Затем анализируют соседние пиксели. Каждый из этих пикселей оценивается по «критерию членства». Если интенсивность пикселя равна «0», его считают членом семейства. Критерий членства может быть и более сложным. Любой пиксель, удовлетворяющий этому критерию, также становится

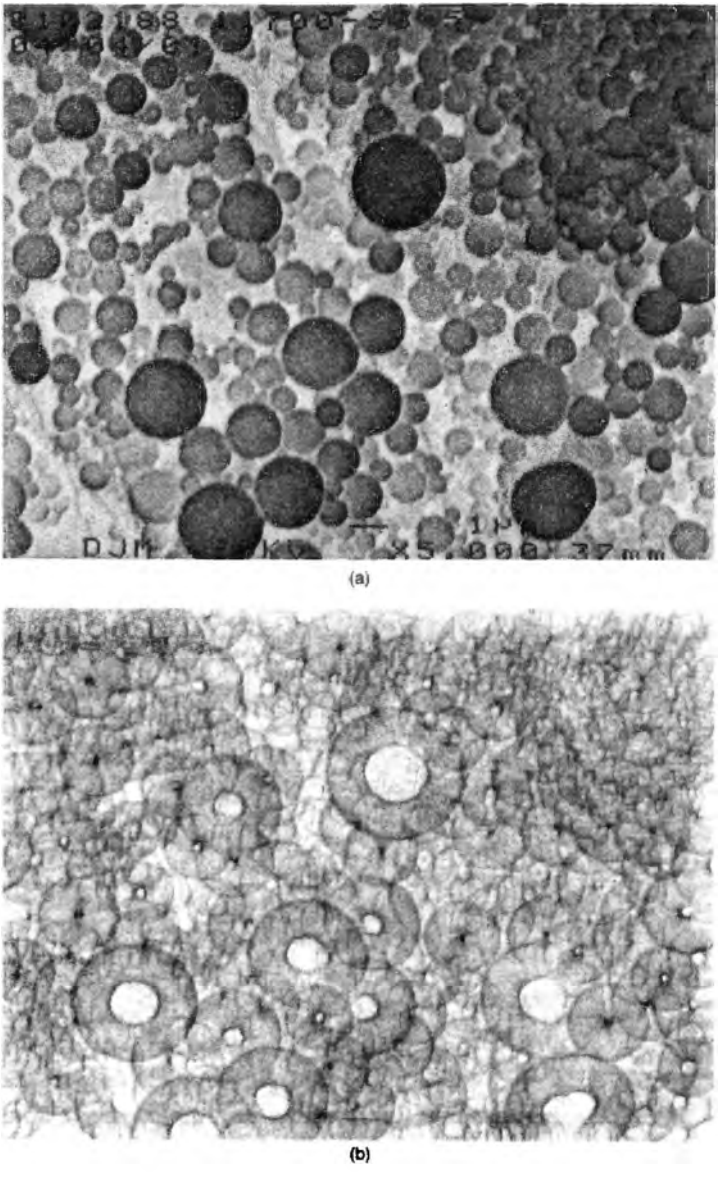


Рис. 2.42. Окружности на изображении можно идентифицировать, используя преобразование Хоуга. Пузырям на изображении (a) соответствуют темные пятна в параметрическом пространстве (b).

«зародышем», и процесс повторяется. Эта процедура приводит к «расплыванию» области до тех пор, пока не будут определены все пиксели границы волокна. Рис. 2.44 иллюстрирует, как формируется область в результате объединения пикселей. На первом рисунке показан зародыш, а последующие иллюстрируют рост области. Черные пиксели указывают направление роста. Когда во всех направлениях достигается граница, область считают определенной.

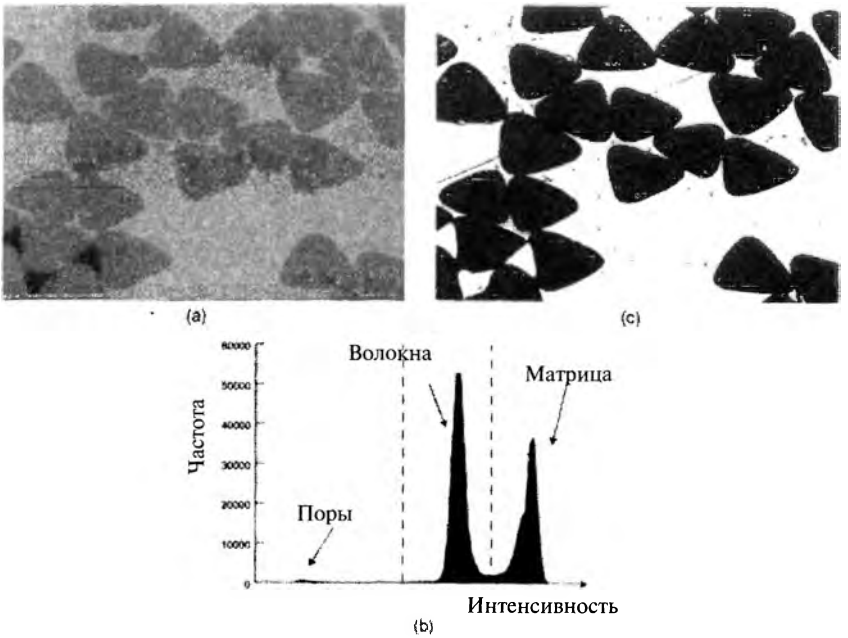


Рис. 2.43. Выделение областей состоит в делении поля зрения на области различной интенсивности. (a) – Для получения контрастного изображения образец был тщательно отполирован; (b) – распределение интенсивности пикселей позволяет выделить различные особенности; (c) – определяя порог интенсивности, делящий матрицу и волокна, получаем изображение, дальнейшая обработка которого позволяет определить объемную долю волокон.

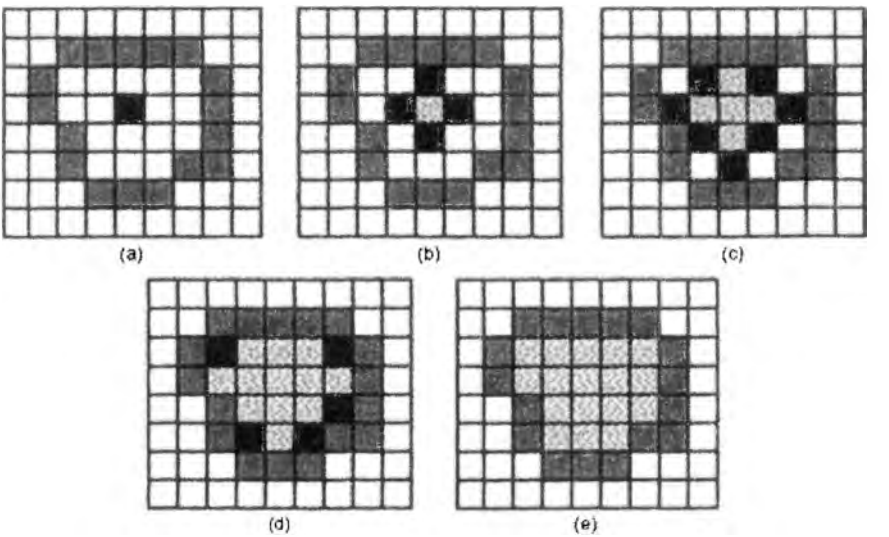


Рис. 2.44. Иллюстрация алгоритма «роста» области. Алгоритм состоит в последовательном движении от (a) к (e). Черные пиксели «активны».

2.8.7. Характеризация и классификация

После выделения областей объекты на изображении идентифицированы, однако их характер не установлен. Характеризация состоит в описании каждой особенности несколькими параметрами. Выбор характеристик зависит от природы образца. Например, при исследовании длины волокон их характеризуют длиной. При исследовании ориентации волокон их сечение характеризуют координатами и степенью эллиптичности (чтобы можно было рассчитать углы ориентации).

Решение о природе каждого объекта может быть сделано на основании анализа полученных характеристик. Например, при исследовании ориентации волокон особенности делят на «сечение волокон» и «другие объекты» (поры и осколки волокон, появившиеся в процессе разрезания и полировки образца).

2.9. Ошибки и стереология

> Характер ошибок зависит от того, кем они сделаны. Посмотрев на ошибки, можно узнать, обладает ли человек человеколюбием.
>
> *Конфуций. Суждения и беседы IV.7*

Экспериментальные характеристики, полученные при помощи микроскопа, обязательно должны сопровождаться указанием их точности. Примером могут служить следующие утверждения:

1. Невозможно сделать абсолютно точное измерение.
2. Поэтому все экспериментальные результаты неточны.
3. Степень неточности зависит от ошибок, допущенных в эксперименте. Данные утверждения могут показаться излишне пессимистичными, но они соответствуют «принципу неопределенности» Гейзенберга, одному из краеугольных камней современной физики [21]. Погрешности любого эксперимента делятся на случайные и систематические.

- *Случайная ошибка* – это случайная вариация результатов, которую экспериментатор не может контролировать. Так как ошибки равновероятно приводят к завышению и занижению измеряемой величины, усреднение результатов измерений улучшает оценку «истинной» величины.
- *Систематическая ошибка* – неслучайная ошибка, определяемая методом измерения. Ошибки этого типа приводят к регулярному завышению или занижению истинного значения. Они не могут быть уменьшены увеличением количества измерений [22].

Например, при использовании линейки случайная ошибка обусловлена неточным соответствием концов образца и меток шкалы. Систематическая ошибка появляется, если Вы купили пластиковую линейку, сделанную в Китае, а расстояние между метками равно 0,9 мм вместо положенного миллиметра. Или если измерения делаются при повышенной температуре, потому что при этом расширяются древесина или пластик, из которого сделана линейка.

Многие измерения осуществляют несколькими приборами. Для определения точности результата должна быть оценена ошибка каждого измерения. Выше было

описано устранение геометрического искажения и периодических помех изображения. Вместе с правильной калибровкой увеличения микроскопа это должно гарантировать правильное измерение размеров. Однако это не значит, что экспериментальные результаты совсем не имеют ошибок. Метод измерения длины и выбор образа также не должны значительно влиять на результат измерения. Эти вопросы изучает стереология, она же обеспечивает «инструментальный набор» математически корректных методов измерения. Она изучает множество вопросов, в том числе методы выборки сечения, правила подсчета объектов и способы определения размеров трехмерных особенностей исходя из их двумерных сечений.

Важность выбора изучаемой области иллюстрируется следующим примером. При анализе прозрачного материала объемом 10 мм^3 весь эксперимент может включать изучение 10 полей зрения в 10 различных сечениях с глубиной резкости 5 мкм. Если использовать типичный объектив, объем осмотренного материала будет равен приблизительно одной миллионной части всего объема образца. При выборе сечения нужно использовать следующие правила. Во-первых, сечение должны выбираться случайно. В нашем примере нужно случайно выбирать сечения на глубине от 0 до 1 мм и последующие оптические сечения через каждый миллиметр. Во-вторых, наугад нужно выбирать изображения, полученные в выбранном сечении. К сожалению, в природе человека выбрать изображение, которое выглядит или более интересным, или имеет ожидаемый вид. Поэтому, чтобы результаты были корректными, поле зрения нужно выбирать наугад, хотя и это не гарантирует полную корректность измерения.

Эксперимент часто состоит в подсчете количества особенностей в пределах поля зрения, если, к примеру, требуется определить их общее число или плотность. Если мы случайно выбрали сечение и область образца, подсчет объектов в пределах поля зрения приведет к некоторой ошибке. Ее причину иллюстрирует рис. 2.45, на котором представлены два объекта различного размера. Для учета объект должен полностью находиться в пределах поля зрения, и поэтому центр крупного объекта должен находиться дальше от края кадра. Вероятность учета крупного объекта меньше, чем мелкого. Это означает, что наш метод подсчета приводит к ошибке и нужно скомпенсировать ее. Рис. 2.46 демонстрирует рамку подсчета, в пределах которой объект учитывается, если он находится целиком в ее пределах или пересекает сплошную «линию приема», но не пересекает «линию запрета». Если в поле зрения нет объектов, выходящих за пределы рамки подсчета, этот метод дает корректные результаты независимо от размера, формы и плотности объектов [23].

В следующих главах будут рассмотрены два метода оптической микроскопии. Оба позволяют определять структуру и анализировать большие области поверхности образца (оптическая отражающая микроскопия) или объема (конфокальная сканирующая лазерная микроскопия). Применяя показанный на рис. 2.28 метод преобразования изображения, объем анализируемых данных может быть значительно уменьшен, а параметры изучаемых особенностей описаны достаточно корректно.

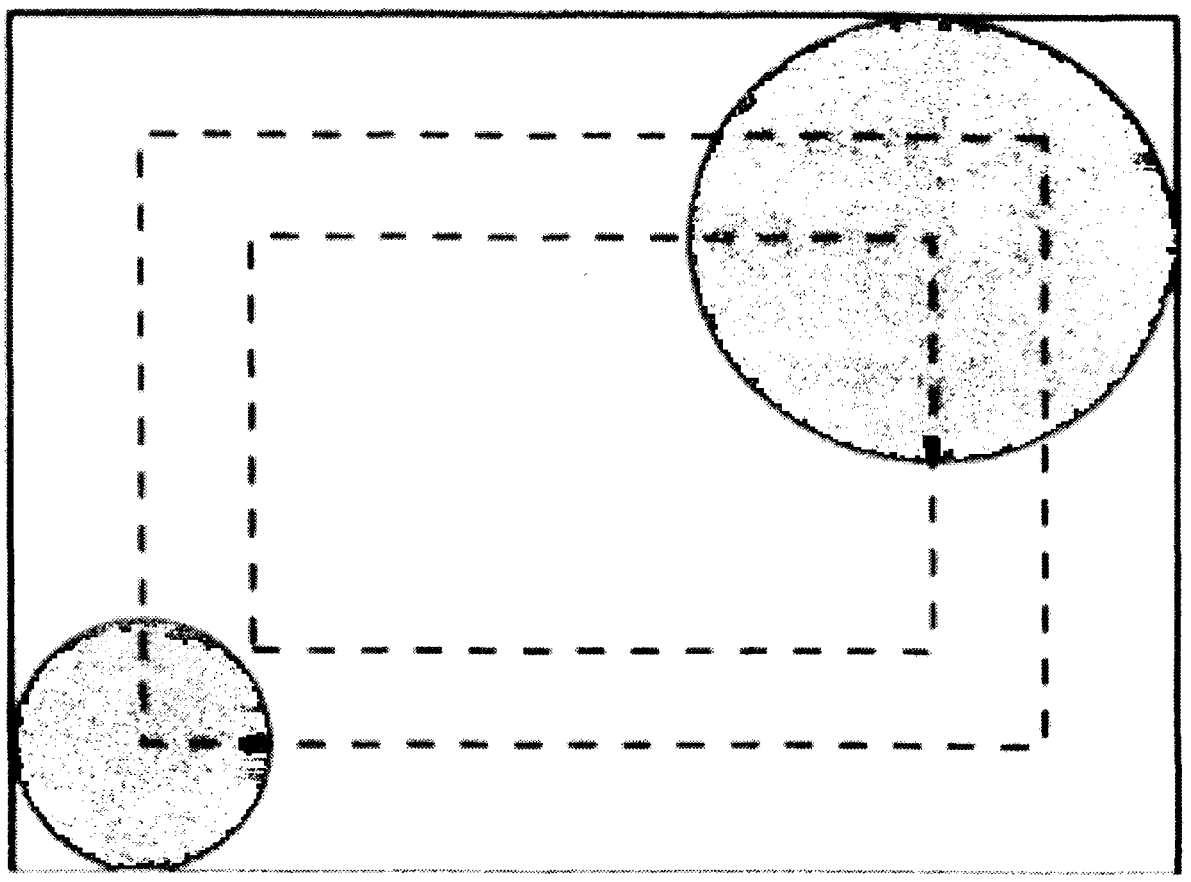


Рис. 2.45. Иллюстрация ошибки измерения, обусловленной краевыми эффектами. Чтобы меньший объект полностью находился в пределах поля зрения, его центр должен быть в пределах внешнего пунктирного прямоугольника. Центр крупного объекта должен быть в пределах внутреннего пунктирного прямоугольника.

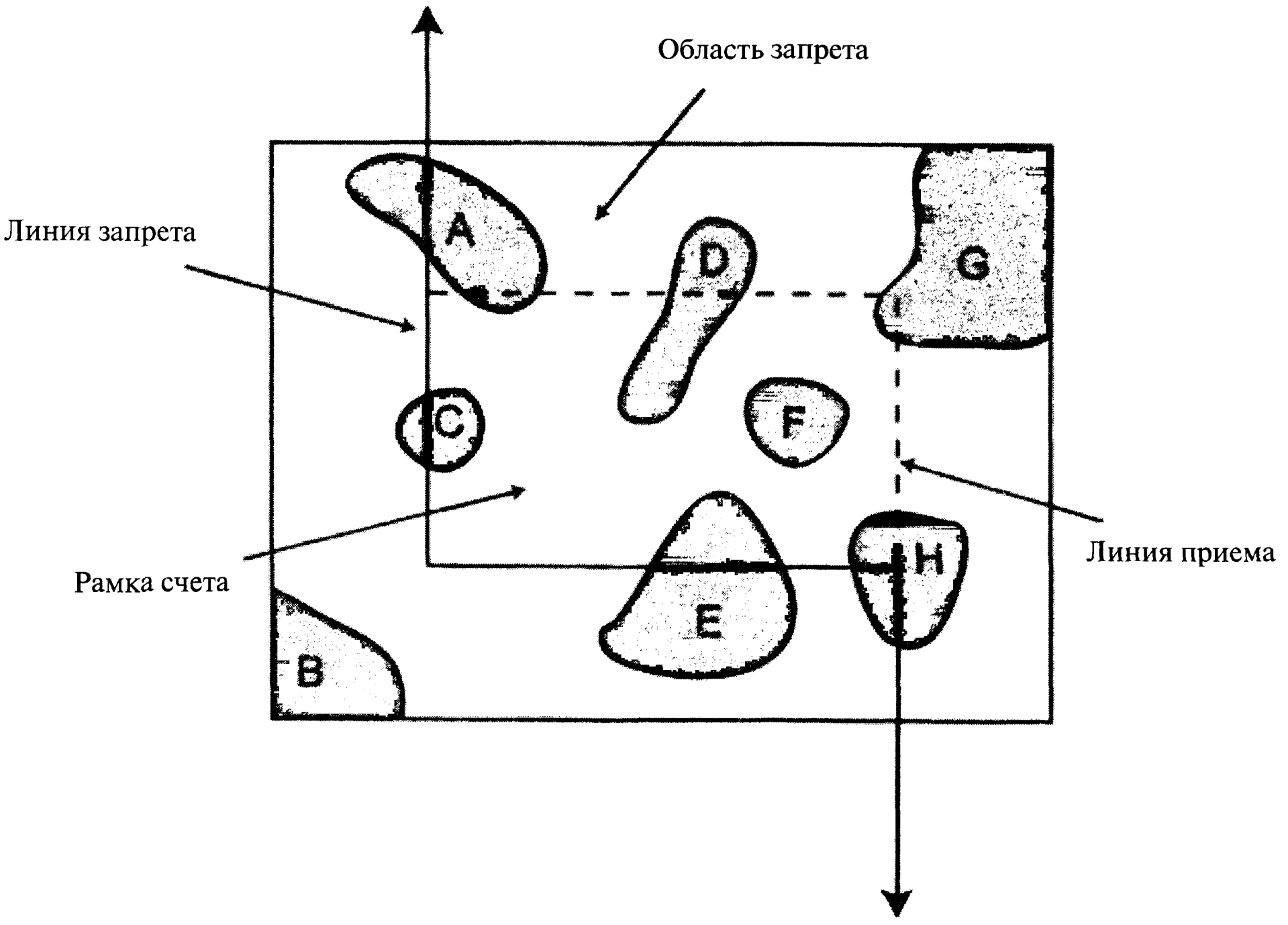


Рис. 2.46. Рамка подсчета количества объектов. Объект учитывают, если он попадает в пределы рамки или пересекает пунктирные линии, но не пересекает край изображения или сплошные линии. В данном случае должны быть учтены только объекты D и F.

2.10. Литература

1. Bolter J.D. (1984), *Tarings Man: Western Culture in the Computer Age,* The North Carolina University Press.
2. Zadeh L.A. (1965), Fuzzy Sets, *Information & Control,* **8**, 338-352.
3. Shannon C.E. and Weaver W. (1949), *The Mathematical Theory of Communication*, Illinois University Press.
4. Bucci W. and Scrupski S. (1968) Special Report: The Transistor, *Electronics*, **41**(4), 71-130.
5. Kilby J.S. (1959), Semiconductor Solid Circuits, *Electronics,* **32**, 110-111.
6. Clarke A.R. (1983), *Vela Software Reference Book*, E.J. Arnold Publishers.
7. Johnson G.W. and Jennings R. (2001), *LabVIEW Graphical Programming*, McGraw-Hill.
8. Ifeacheor E.C. and Jervios B.W. (1997), *Digital Signal Processing: A practical approach*, Addison-Wesley.
9. Strum R.D. and Kirk D.E. (1989), *First Principles of Discrete Systems and Digital Signal Processing*, Addison-Wesley.
10. Moravec H. (1998), When will computer hardware match the human brain?, *Journal of Transhumanism*, **1**, March.
11. Berman G.P., Doolen G.D., Mainierie R. and Tsifrinovich V.I. (1998), *Introduction to Quantum Computers*, World Scientific.
12. Russ J.C. (1992), *Computer-Assisted Microscopy: The Measurement and Analysis of Images*, Plenum Press.
13. Huang J., Wang Y. and Wong E.K. (1997), *Check Image Compression: A Comparison of JPEG, Wavelet and Layered Coding Methods*, IEEE.
14. Murray J.D. and van Ryper W. (1994), *Encyclopaedia of Graphic File Formats*, O»Reilly & Associates, Sebastopol, CA, USA.
15. Pennebaker W.B. and Mitchell J.L. (1992), *Jpeg: Still Image Data Compression Standard*, Chapman & Hall.
16. Gonzalez R.C. and Wintz P. (1987), *Digital Image Processing*, Addison-Wesley.
17. Press W.H., Teukolsky A.S., Vetterling W.T. and Flannery B.P. (1992), *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press.
18. Hough P.V.C., Methods and Means for Recognizing Complex Patterns, US Patent 3,069,654.
19. Xu B.G. and Yu L. (1997), Determining fiber orientation distribution in nonwovens with Hough transform techniques, *Text. Res. J.*, **67**(8), 563-571.
20. Ballard D.H. (1981), Generalizing the Hough transform to detect arbitrary shapes, *Pattern Recogn.*, **13**(2), 111-122.
21. Heisenberg W. (1925), Uber quantentheoretische Umdeutung kinematischer und mechanischer Beziehungen, *Z. Phys.*, **33**, 879-893.
22. Topping J. (1962), *Errors of Observation and their Treatment*, Science Paperbacks, Chapman & Hall.
23. Gundersen H.J.G. (1977), Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect, *J. Microsc-Oxford*, **111**, 219-223.

Часть II

Микроскопия отраженного света и конфокальная растровая лазерная микроскопия

Глава 3

Микроскопия отраженного света

Эксперт – это человек, совершивший все возможные ошибки
в очень узкой области.
Нильс Бор

3.1. Введение

Основная задача оптической микроскопии состоит в создании увеличенного изображения плоской поверхности образца. Типичным примером такого микроскопа является Olympus BH2[1], основные компоненты которого показаны на рис. 3.1. До появления компьютерной микроскопии изображение регистрировали на фотопленку шириной 35 мм. Данный микроскоп предназначен для изучения прозрачных образцов. Отметим, что в материаловедении чаще используют микроскопы отраженного света[2], в которых осветитель расположен над образцом[3], а не под ним, как на данной схеме.

---

[1] Микроскоп мод. BH2 (ф. Olympus, Япония) в настоящее время снят с производства. Микроскоп относится к классу универсально-исследовательских моделей. Вместо него выпускается новая серия микроскопов BX51/BX61, аналогичная мод. AxioImagerA1m/M1m/D1m/Z1m (ф. Carl Zeiss, Германия), мод. DM 4000/5000/6000 (ф. Leica, Германия) и мод. ME600L (ф. Nikon, Япония).

[2] Чаще всего эти микроскопы называются металлографическими микроскопами.

[3] Речь идет о прямом микроскопе отраженного света, а не об инвертированном микроскопе проходящего света, где расположение осветительной системы как раз над образцом.

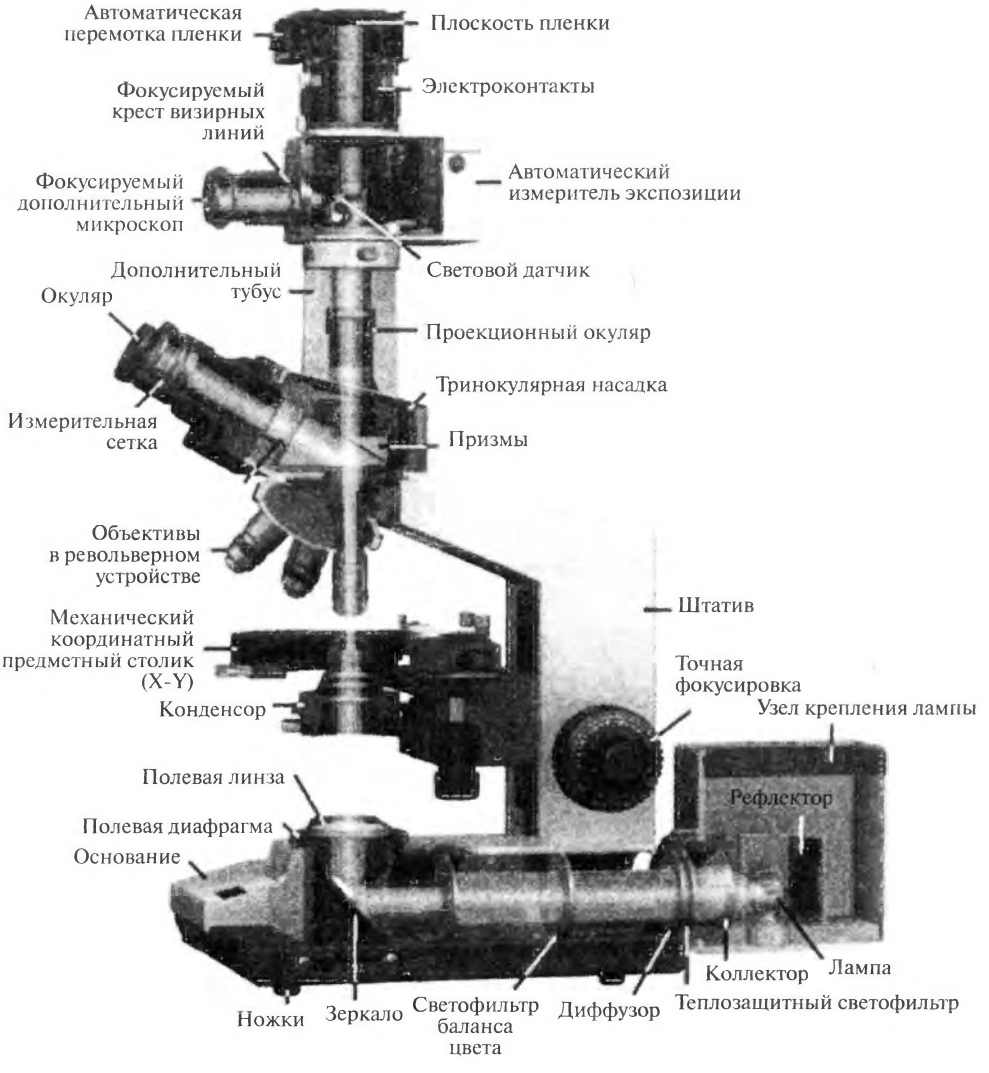


Рис. 3.1. Схема фотомикроскопа проходящего света мод. Olympus BH2. Фотокамера показана в разрезе.

Традиционный микроскоп не был предназначен для получения количественных данных, что начали делать только с конца XIX века (вместо простой зарисовки того, что видели в микроскопе). Позднее появились микроскопы, снабженные фотокамерой для пленки шириной 35 мм (как показано на рис. 3.1) или больших фотопластинок для повышения точности и разрешения. Недостаток фотомик-

---

В то же время в инвертированном микроскопе отраженного света осветительная система находится под образцом. В данном случае главным является наблюдение, т.е. в микроскопах отраженного света и осветительная система и наблюдательная система находятся с одной стороны (над образцом или под ним).

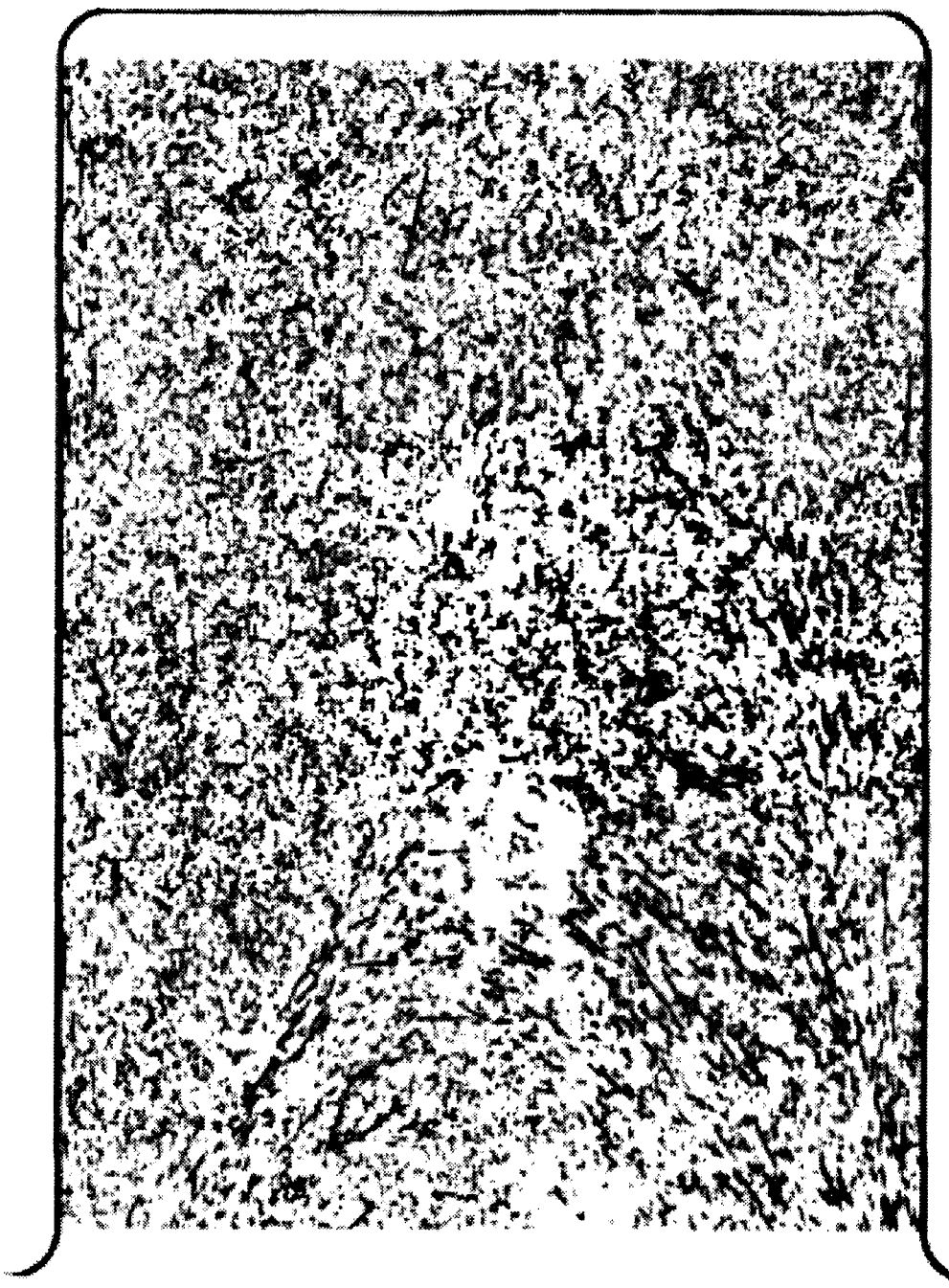


Рис. 3.2. Одна из задач современного компьютерного микроскопа состоит в создании панорамы поверхности большой площади путем объединения нескольких кадров соседних областей. Размер зуба шестерни коробки передач равен 4 ×7 мм.

рографии состоял в появлении артефактов при проявлении пленки и необходимости цифровой шкалы для количественных измерений.

Возможность быстрого получения фотографий с помощью цифровой камеры появилась только в последние десять лет. Объединение компьютера и микроскопа открыло массу новых возможностей, в том числе и для изучения структуры крупных образцов. Типичный пример результатов изучения большой области образца показан на рис. 3.2. Что нельзя по достоинству оценить из данного рисунка – это пространственное разрешение изображения, которое было получено объединением сотен кадров, подобных приведенному на рис. 3.3. Поскольку авторы настоящей книги в течение последних двенадцати лет работали преимущественно с композиционными материалами, большинство представленных изображений будет демонстрировать структуру армированных волокнистых композитов. Отметим, что волокнистые композиты на основе полимерной матрицы (имеющие несколько различных фаз – матрицу, волокна и поры) отлично иллюстрируют возможности современных микроскопов.

Композиционные материалы являются гетерогенными системами. Наличие очень жестких волокон, хрупкой матрицы и пор, а также непостоянство доли волокон превращает этот материал в настоящий кошмар для моделирования методом конечных элементов. Еще нескольких лет назад экспериментальное исследование трехмерной структуры этого материала было большой редкостью, хотя возможность физического сечения и изучения структуры волокон и пор при помощи

оптического микроскопа появилась уже лет двадцать назад. Однако рутина неавтоматизированного получения статистически достоверных данных только недавно была заменена компьютерным анализом. Чтобы прогнозировать механические, тепловые и другие свойства композиционного материала, нужно иметь модель его структуры. Чтобы оценить качество технологии, нужно иметь информацию о пространственном распределении волокон и пор. Еще одной задачей является получение надежной теории, связывающей технологию с макроскопическими свойствами материала. Эта задача не может быть решена без качественных данных о трехмерной мезоструктуре материала (мезоуровень соответствует масштабному уровню от десятков микрон до сантиметров [1]).

Контраст изображения в оптическом микроскопе отраженного света определяется коэффициентом отражения различных фаз в пределах поля зрения. Если контраст недостаточен, цифровая обработка изображения, скорее всего, приведет к большой ошибке измерения. Поэтому микроскописты ищут способы увеличения разницы коэффициентов отражения, вследствие чего качество подготовки поверхности образца имеет первостепенное значение.

3.1.1. Подготовка образца

Если микроскопист изучает тонкий и мягкий материал (когда топология поверхности не важна), образец можно микротомировать на тонкие сечения, и эти сечения помещают между предметным и покровным стеклами. В таком случае нужно использовать объективы, предназначенные для работы с покровным стеклом, как описано в главе 1.

В отличие от биологических объектов, материаловеды обычно имеют дело с твердыми материалами, существенно отличающимися от мягких биологических тканей. За один прием под микроскопом изучают лишь небольшую часть поверхности размером порядка нескольких сантиметров. Образец нужно подготовить так, чтобы его было легко брать в руки, а изучаемая поверхность была параллельна поверхности перемещаемого предметного столика (плоскости XY). Если предполагается использовать оптический микроскоп отраженного света и методы автоматического анализа, образец нужно очень тщательно подготовить (разрезать и отполировать). Отметим, что при разрезании могут вытаскиваться короткие волокна, и на поверхности при этом появляются их фрагменты, как показано на рис. 3.3.

Для разрезания очень твердых материалов необходы абразивные или алмазные диски, а в случае мягких материалов более удобно микротомирование. На рис. 3.4 показана машина «Rotopol-11» фирмы Struers, используемая для полировки образцов. Подготовку небольших образцов начинают с их заливки в блок эпоксидной смолы (рис. 3.35), чтобы с ними было легко обращаться при разрезании и полировке. После отверждения смолы заднюю поверхность образца нужно грубо отполировать, чтобы поверхность, помещаемая на предметный столик, была достаточно плоской. Поверхность образца полируют с помощью ряда наждачных бумаг или тканей на основе частиц карбида кремния (SiC), начиная с самых крупных частиц (№300) и постепенно переходя к мелким (№4000). Рекомендации по методам подготовки образцов композиционных материалов даны в работах [2, 3, 4]. На рис. 3.5 показан типичный образец, залитый в блок эпоксидной смолы.

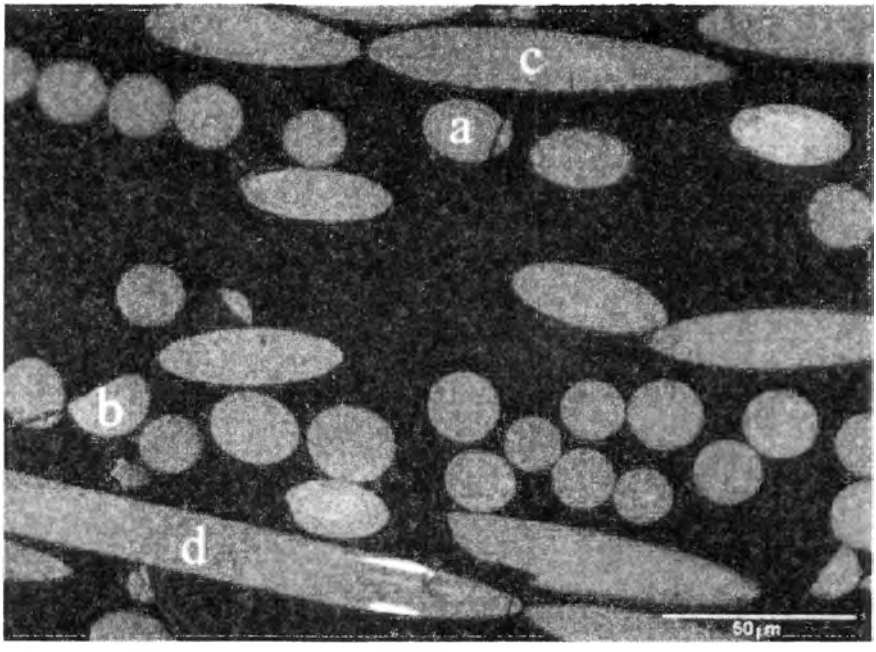


Рис. 3.3. Панорама объекта большой площади на предыдущем рисунке построена объединением сотен кадров высокого увеличения. На данном кадре (размер поля зрения 226×174 мкм) наблюдаются (a) расщепленное волокно, (b) кончик дефектного волокна, (c) волокна неэллиптического сечения (что свидетельствует об их изгибе) и (d) волокно, ориентированное в плоскости изображения.

Контраст в оптической микроскопии отраженного света достаточно высок для композитов на основе углеродных волокон и кевлара, потому что коэффициент отражения этих волокон существенно отличается от полимерной матрицы. Напротив, стеклянные волокна имеют малый контраст с полимерной матрицей из-за близости показателей преломления и, следовательно, близких коэффициентов отражения. Поэтому для увеличения контраста необходима специальная обработка полированной поверхности стеклопластика. Для этого можно окислить матрицу. Рис. 3.6 демонстрирует аппарат, использованный авторами настоящей книги для окисления матрицы.

Для подготовки поверхности композита мы использовали устаревшее устройство для плазменного напыления металла. Однако камеру заполняли кислородом (вместо вакуума), чтобы выбитые из анода ионы платины сталкивались с молекулами кислорода до удара о поверхность образца. В результате поверхность образца бомбардируется ионами кислорода, которые окисляют матрицу быстрее, чем армирующие волокна. Как следствие, более грубая поверхность матрицы имеет меньшее отражение, чем стекловолокна, и увеличивается контраст.

Некоторые образцы требуют химического травления. Подробный список химикатов для травления поверхности описан в книге [1]. Результаты определения ориентации стеклянных волокон с помощью автоматизированной системы анализа изображения зависят от качества подготовки поверхности образца.

Рис. 3.4. Устройство Struers Rotopol-11 для полировки образцов. Эта машина позволяет одновременно полировать три образца.

3.1.2. Микроскоп Olympus BH2

На рис. 3.7 показаны основные элементы системы автоматизированного анализа изображения. Основой этой системы является микроскоп Olympus BH2. Обратим внимание на различное положение системы освещения в микроскопах, показанных на рис. 3.7 и рис. 3.1. Это обусловлено тем, что показанный на рис. 3.7 микроскоп работает в режиме отраженного света. Существует более современная модель микроскопа Olympus (BX41F), но и BH2 доказал свою высокую эффективность и надежность. Начинающим для получения изображения вполне подойдет любой микроскоп, снабженный перемещаемым предметным столиком и цифровой камерой.

Микроскоп имеет рукоятку изменения интенсивности источника света, а цифровая камера Sony XC-77 установлена на штативе микроскопа. Для исследования ориентации волокон в композите использовали следующий набор объективов: Olympus MDPlan 5 (с длиной тубуса «бесконечность») A= 0,1 (IC5); MDPlan 10, A= 0,25 (IC10); MDPlan 20, A= 0,4 (IC20) и MDPlan 50, A= 0,75 (IC50). Аббревиатура «IC» с числом обозначает увеличение объектива. Этот микроскоп позволяет одновременно рассматривать через окуляры сравнительно большую площадь образца, а на мониторе в режиме реального времени наблюдать увеличенную деталь образца.

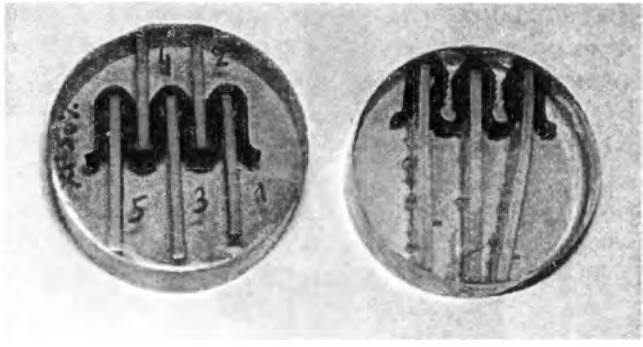


Рис. 3.5. После разрезания образцы помещают в зажим и заливают эпоксидной смолой для удобства полировки и размещения на предметном столике.

Рис. 3.6. Установка для окисления полимерной матрицы с целью увеличения контраста изображения.

Рис. 3.7. Фотография установки на основе микроскопа Olympus BH2, в которой предметный столик перемещается в плоскости XY и по оптической оси Z, а цифровая камера Sony установлена на микроскоп и соединена с ним через адаптер MTV-3.

В плоскости XY предметный столик перемещается двумя шаговыми двигателями. Двигатель перемещения образца по оптической оси Z обеспечивает автоматизированную тонкую регулировку фокуса, что необходимо для изучения крупных областей, потому что даже небольшой перекос образца при перемещении приводит к потере резкости. На предметном XY столике расположено приспособление, позволяющее поворачивать образец.

3.1.3. Измерения на единичном кадре

Получение фотографий и анализ данных являются в некотором смысле искусством. Весьма раздражают публикации, в которых результаты автоматизированного анализа изображений обсуждаются без какого-либо анализа ошибок измерений. Существует несколько причин появления систематических и случайных ошибок при использовании автоматизированного микроскопа. Для примера рассмотрим измерение ориентации волокон в композите. Начиная с конца 1980-х и в 1990-х годах в статьях, за исключением [5-11], при определении ориентации волокон ошибки не обсуждались. Отметим, что без обсуждения природы ошибок результаты исследования распределения волокон по ориентации при помощи коммерческого программного обеспечения в лучшем случае будут неточными, а в худшем – полностью ошибочными! В этом разделе описаны источники ошибок при изучении волокон, ориентированных в плоскости сечения композита.

Предположим, что волокна имеют форму идеального цилиндра, как показано на рис. 3.8. Форма эллипса позволяет оценить диаметр волокна d_i и углы ориентации φ_i и θ_i в сферических координатах. Диаметр d_i равен меньшей оси эллипса b_i, угол φ_i определяется ориентацией главной оси эллипса (a_i) в плоскости XY, а угол ориентации оси волокна относительно плоскости сечения θ_i (широта) дается следующим уравнением:

$$\theta_i = \arccos(b/a) \tag{3.1}$$

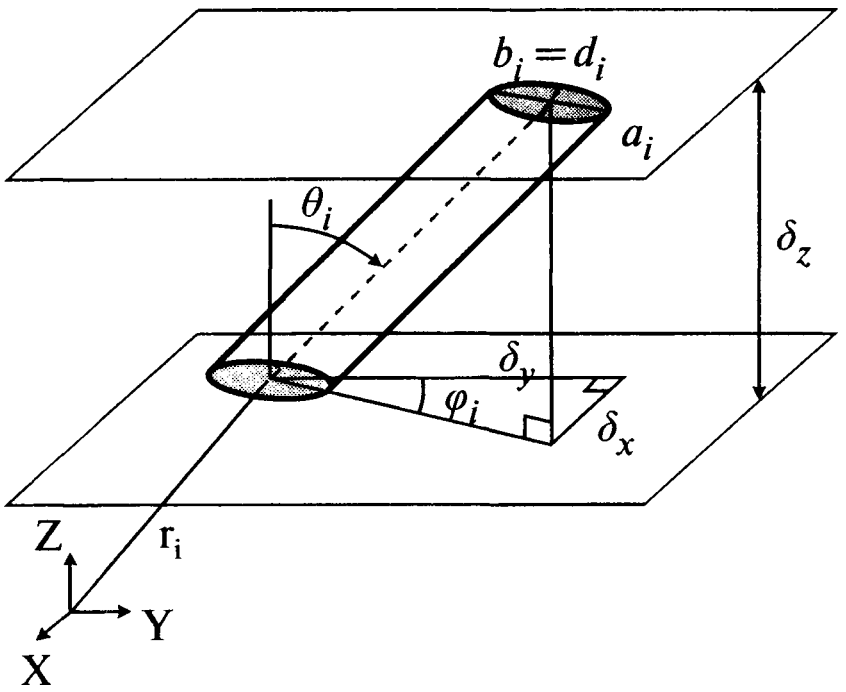


Рис. 3.8. Волокно в сферической системе координат. Для определения ориентации волокна должны быть известны все указанные параметры, включая его длину.

Обратим внимание, что угол φ_i определяется неоднозначно, потому что волокно имеет тот же вид при повороте на 180° (рис. 3.37). Как правило, эта неоднозначность не является серьезной проблемой. Методика определения степени эллиптичности волокна и, следовательно, его ориентации, обсуждается в разделе 3.3. Однако, прежде чем «крутить ручки», нужно выполнить несколько предварительных операций.

Во-первых, нужно настроить осветительную систему. Условием получения хорошего качества изображения является равномерное освещение образца. В основном степень равномерности освещения определяется юстировкой конденсора и источника света, высотой неровностей и качеством ориентации образца относительно оптической оси микроскопа. При разработке анализатора изображения были выявлены источники ошибок определения площади сечения волокна (и, следовательно, погрешности определения степени эллиптичности волокна). Если уровень освещенности непостоянен, выбор постоянного порога интенсивности (определяющего пиксели изображения, принадлежащие сечению волокна) приводит к систематической ошибке определения ориентации волокна. Замена образца плоским зеркалом показывает, насколько равномерно освещение. Влияние неравномерности освещения и методы ее коррекции обсуждаются в разделе 2.8.1.

Во-вторых, нужно рассмотреть шум цифровых данных и проанализировать, как он может повлиять на величину измерений. Как было отмечено в главе 2, шум можно уменьшить, получив несколько изображений одной области и усреднив

сигнал. Рассмотрим влияние шума интенсивности пикселей на определение степени эллиптичности волокна. Неопределенность в определении пикселей, принадлежащих сечению волокна, приводит к систематической ошибке определения широты θ_i. Как показано на рис. 3.9, квадратными пикселями нельзя идеально воспроизвести сечение круглого волокна. При большем увеличении микроскопа изображение сечения волокна будет состоять из большего количества пикселей и, следовательно, будет получено лучшее приближение круга. К сожалению, при большом увеличении для изучения крупной области требуется большее количества кадров и снижается скорость работы.

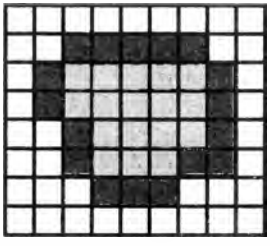


Рис. 3.9. Процесс оцифровки ограничивает точность определения формы поперечного сечения волокна. В случае квадратных пикселей трудно отличить идеально круглое волокно от слегка эллиптичного.

Еще одна задача состоит в проверке того, не искажает ли монитор размеры поля зрения. Пиксели цифровой камеры должны иметь идеальную квадратную форму. Отметим, что пиксели некоторых камер имеют прямоугольную форму, соответствующую форме монитора. В этом случае экран показывает фактическое поле зрения прямоугольной формы. При получении количественных данных нужно учитывать, что расстояние между пикселями в вертикальном направлении может отличаться от расстояния в горизонтальном направлении! На рис. 3.10 показано влияние пятипроцентной ошибки этого отношения на величину ошибки определения широты θ_i ориентации волокна. Это отношение может быть найдено с помощью идеальной квадратной сетки. Второй подход состоит в измерении длины калибровочной линейки в двух направлениях, до и после поворота на 90°. Это позволило получить показанное на рис. 3.11 отношение размеров.

На рис. 3.12 представлены типичные распределения волокон по углам ориентации, полученные методом автоматизированного анализа образов. Хотя ориентация волокон в анализируемом образце была изотропной, на распределении по широте (b) наблюдается довольно резкий пик в области $\theta \approx 15°$. Заметим, что этот пик фиктивен. Он наблюдался бы, даже если бы все волокна были ориентированы в одном направлении, перпендикулярно плоскости сечения. Существует три причины этого эффекта:

- деление круглого объекта на множество квадратных (или прямоугольных) пикселей;
- эффект телесного угла, обсуждаемый ниже и иллюстрируемый рис. 3.13;
- ошибка высоты, появляющаяся при сечении волокна плоскостью (рис. 3.14).

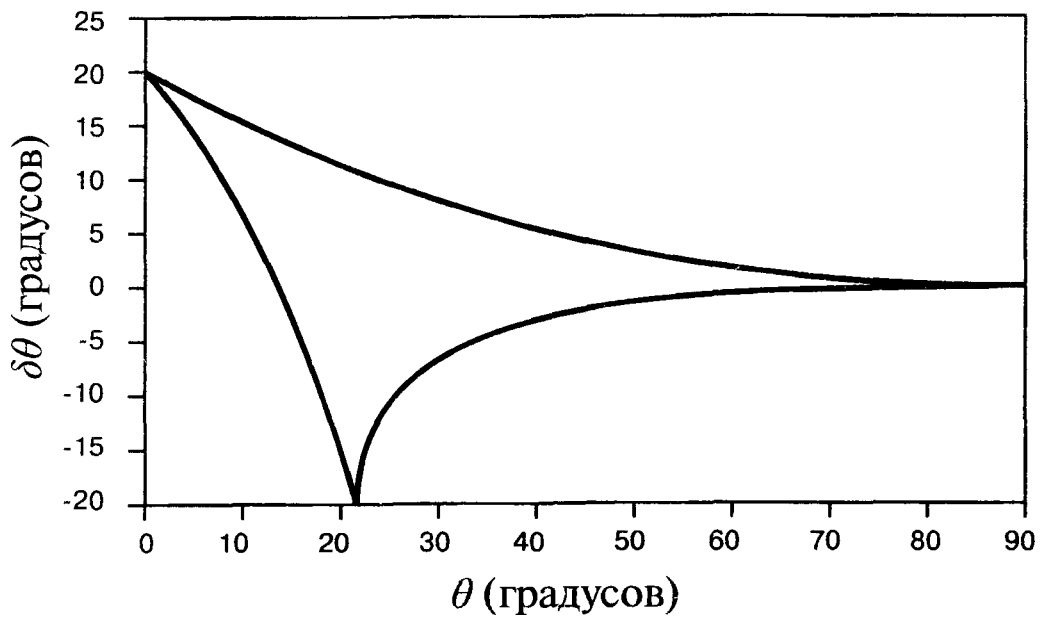


Рис. 3.10. Погрешность определения отношения высоты к ширине пикселя приводит к появлению ошибки определения широты θ_i, зависящей от ориентации волокна относительно плоскости сечения. Расчеты приведены для ошибки отношения высоты к ширине пикселей, равной пяти процентам.

Рис. 3.11. Один из методов определения отношения высоты к ширине пикселя состоит в сканировании крупной области и определении распределения ориентации тысяч волокон. Затем образец поворачивают на 90°, проводят повторное сканирование и получают второе распределение волокон по ориентации. Зависимость разницы этих распределений от отношения длины к ширине показана на рисунке, а минимум соответствует искомому отношению.

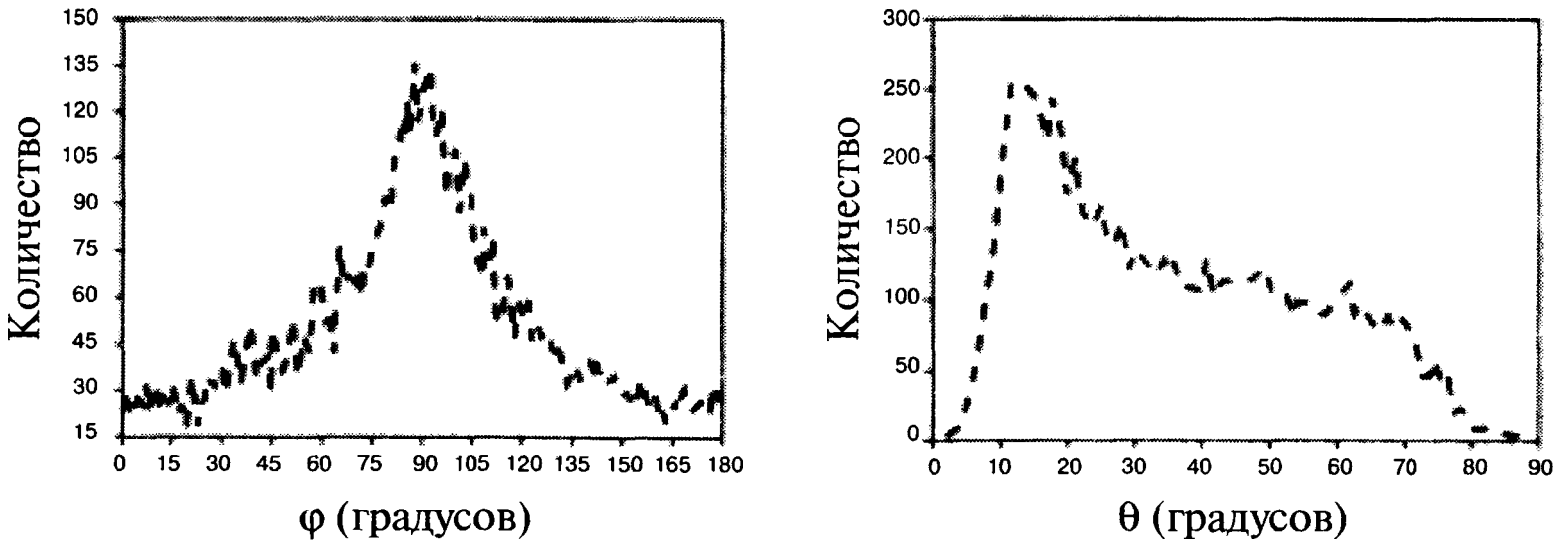


Рис. 3.12. Типичное распределение угла ориентации стеклянных волокон в композите на основе полиоксиметиленовой матрицы. (a) - Распределение волокон по широте θ; (b) - хотя волокна ориентированы практически изотропно, распределение по долготе имеет максимум вблизи 15-20°

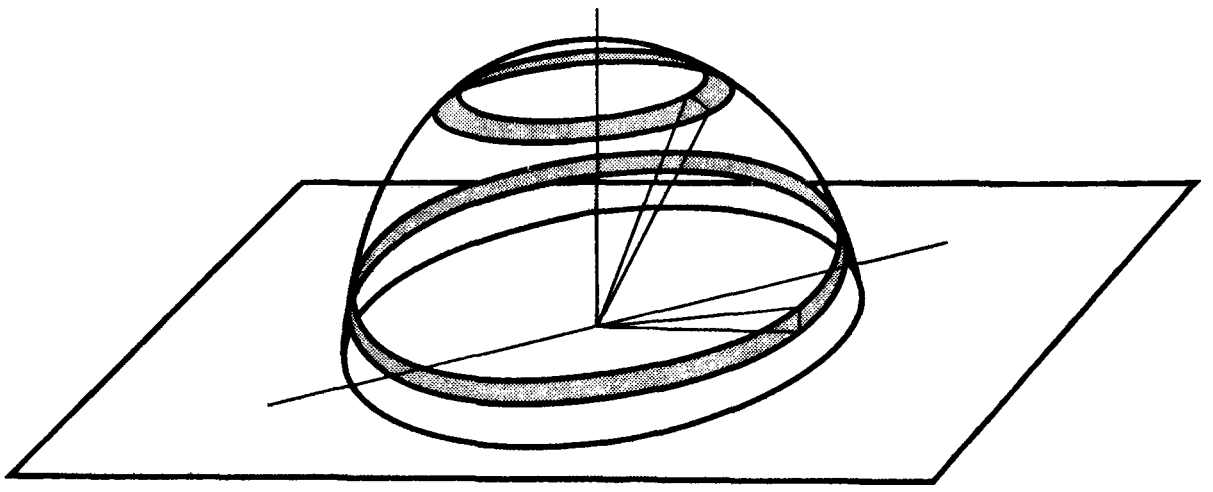


Рис. 3.13. При определении распределения ориентации волокон нужно учитывать величину телесного угла. При изменении широты от θ до $\theta+\delta\theta$ телесный угол $\delta\Omega$ (показан штриховкой) резко возрастает от нуля (когда волокна перпендикулярны плоскости) до максимального значения, когда волокна параллельны плоскости сечения.

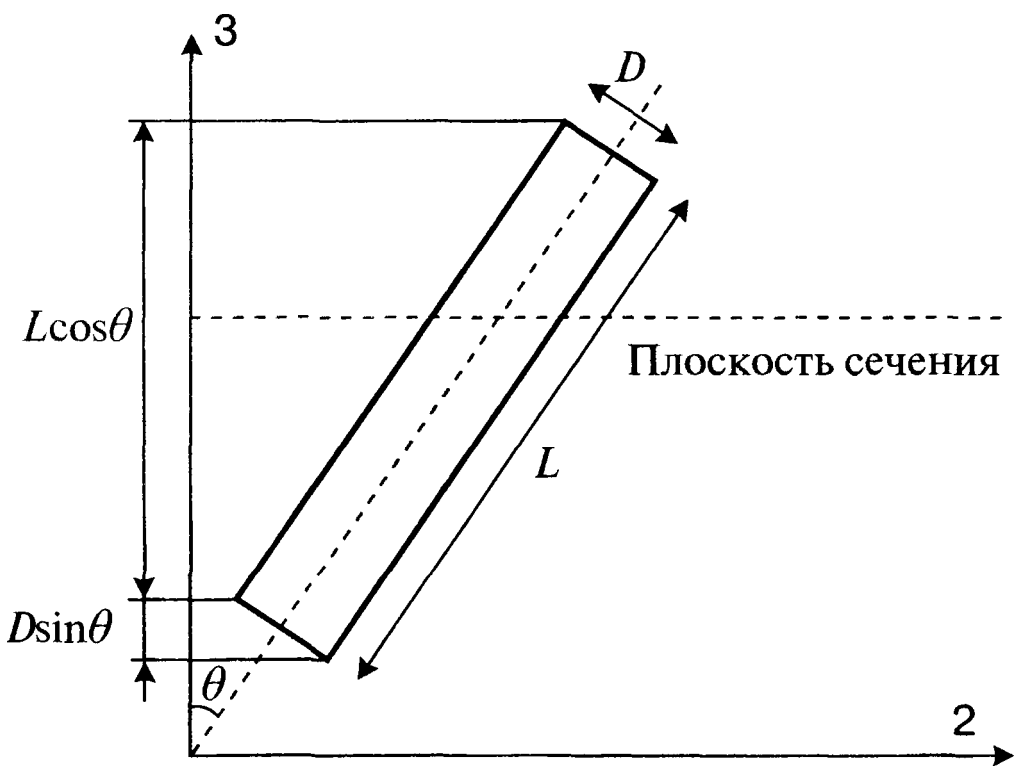


Рис. 3.14. Вероятность пересечь волокно некоторой плоскостью зависит от его длины и ориентации. Вероятность пересечения максимальна, если волокно перпендикулярно плоскости.

Хотя неправильное решение о принадлежности пикселя волокну или матрице приводит к ошибке степени эллиптичности, оценить ошибку ориентации волокна исходя из двумерного сечения весьма трудно. В статье [12] исследовали ошибку определения ориентации волокна. Вопреки здравому смыслу ошибка минимальна, если волокно имеет эллиптическое, а не круглое сечение. Точность определения угла ориентации в однонаправленном композите максимальна, если образец разрезается под углом 45° или даже 60° к оси волокон цилиндрической формы [13]. После этого распределение можно пересчитать на плоскость, перпендикулярную оси ориентации. Соответствующие уравнения имеют вид:

$$\theta = \arccos\left(\sin\alpha \sin\theta' \sin\phi' + \cos\alpha \cos\theta'\right); \tag{3.2}$$

$$\phi = \operatorname{arctg}\left(\frac{\cos\alpha \sin\theta' \sin\phi' - \sin\alpha \cos\theta'}{\cos\theta' \cos\phi'}\right), \tag{3.3}$$

где α - угол между нормалью к плоскости сечения и осью волокон (рис. 3.15). Неверное решение вопроса о принадлежности пикселя к волокну или матрице в этом случае приводит к меньшей ошибке степени эллиптичности. Проблема возника-

ет, если волокна имеют очень широкое распределение по углу ориентации (>45°) или если они очень короткие. В этом случае необходимо использовать другой метод определения ориентации, например, конфокальную сканирующую лазерную микроскопию (КСЛМ, глава 4) или рентгенотомографию (глава 5).

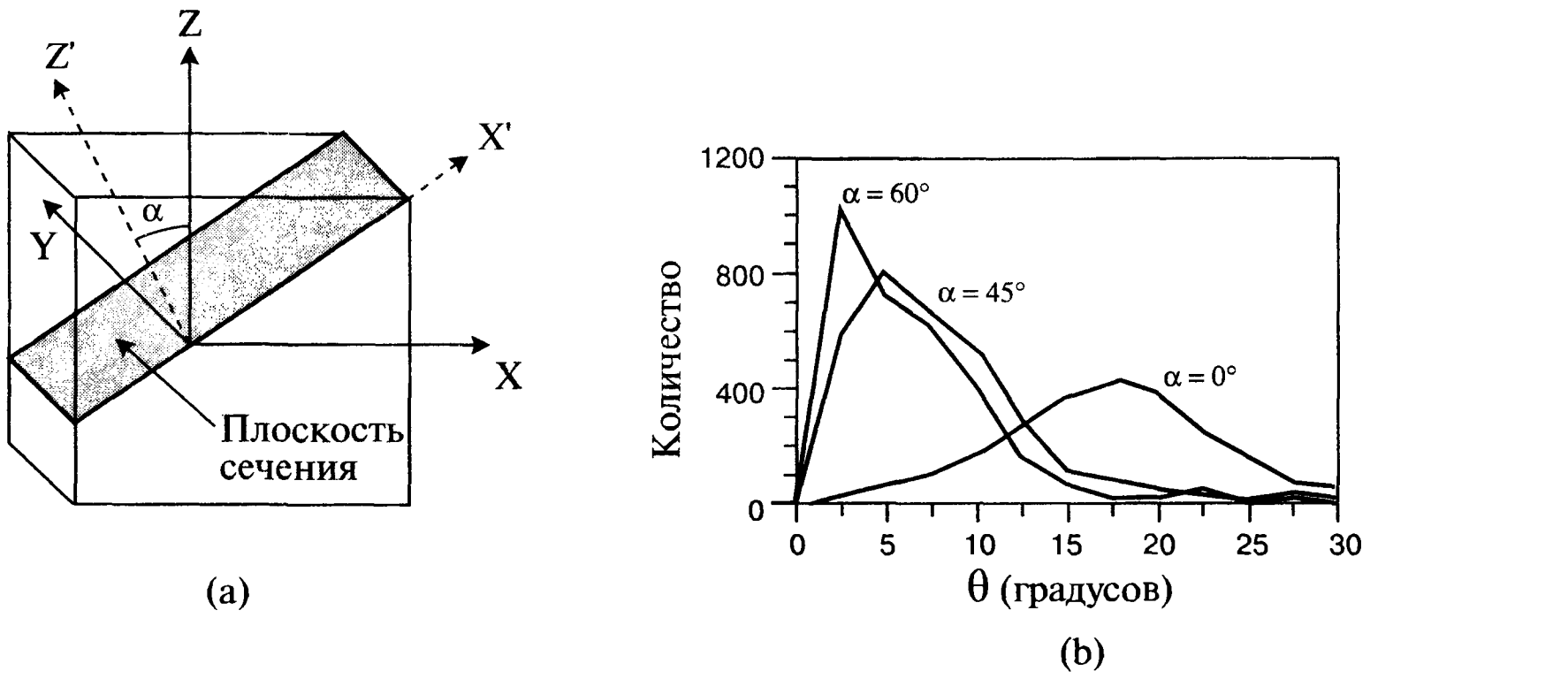


Рис. 3.15. (a) – Точность определения ориентации волокон в однонаправленном композите максимальна, если образец разрезан под некоторым углом α к направлению укладки волокон. В этом случае сечение волокон имеет эллиптическую форму, а степень эллиптичности может быть определена с большей точностью. После этого проводится математическое преобразование ориентации волокон к системе координат XYZ. (b) – Степень ориентации волокон измеряется более точно при $\alpha = 60^\circ$.

Таким образом, к коммерческим программам определения степени эллиптичности волокон нужно относиться с осторожностью и желательно понимать принцип их работы. Наконец, нужно учитывать предположения, заложенные при разработке программы. Практически все автоматизированные программы анализа изображений предполагают, что волокна являются идеальными цилиндрами. Если это условие не выполнено, значения степени эллиптичности волокна будут зависеть от его исходной эллиптичности. Примером волокон с некруглым поперечным сечением является углепластик, показанный на рис. 3.16. Одни волокна на этой фотографии имеют «рифленую» почти круглую форму, а другие – бобовидную форму. Попытка описать эллипсом такие волокна приведет к большой ошибке их ориентации. При определении ориентации волокон часто предполагают, что они равновероятно распределены по широте (углу θ). Вероятность обнаружить волокно с широтой θ в интервале $\Delta\theta$ пропорциональна величине телесного угла $\Delta A = 2\pi r^2 \sin\theta\Delta\theta$ (рис. 3.13). Вероятность обнаружить волокно в пределах $\Delta\theta$ вблизи $\theta = 0$ фактически нулевая, а для $\theta \approx 90^\circ$ вероятность высока, что иллюстрируется рис. 3.13. Это называют «эффектом телесного угла».

После анализа эффекта телесного угла естественно рассмотреть стереологические идеи определения 3D-структуры композита, исходя из набора плоских сечений. До 1970-х годов материаловеды и биологи были не слишком осторожными и делали выводы о 3D-структуре образцов, основываясь на неточных данных. Как пример применения стереологических принципов, рассмотрим распределение волокон по широте. Любая попытка определить распределение ориентации волокон, исходя из единственного плоского сечения, дает лишь грубую оценку такого

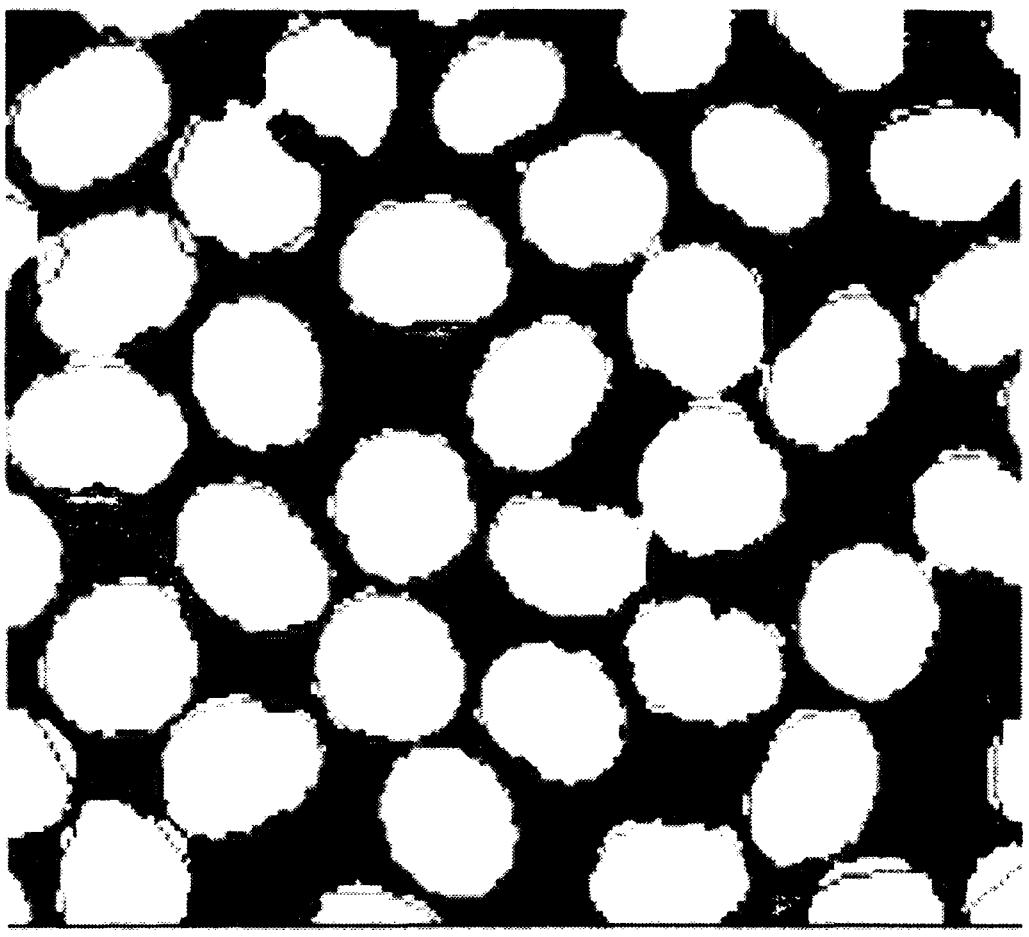


Рис. 3.16. До сих пор мы предполагали, что волокна имеют цилиндрическую форму. Однако некоторые углеродные волокна имеют бобовидную форму, и при определении ориентации таких волокон из степени их эллиптичности следует проявлять осторожность

распределения [14-16]. Рассмотрим вероятность пересечения волокна с некоторой случайно проведенной плоскостью. Вероятность пересечения пропорциональна длине проекции волокна на перпендикуляр к плоскости сечения, что иллюстрируется рис. 3.14. Если все волокна имеют одинаковую длину L, вероятность пересечения с волокном, ориентированным под углом θ к плоскости сечения, пропорциональна $\cos\theta$. Следовательно, полученное распределение ориентации волокон можно исправить, если учесть, что вероятность пересечения пропорциональна $\cos\theta$.

За эти годы в литературе были предложены и более сложные формулы [5, 17]. Чтобы учесть изменение длины волокон и отношения длины волокна l_i к диаметру d_i, Могингер и Эйрер ввели весовую функцию $g(\beta,r,l_n)$:

$$g(\beta,r,l_n)=\frac{r}{\sqrt{r^2\sin^4\beta+\left[\left(\frac{r+d}{l_n+d}\right)^2+\left(\frac{r(l_n+d)}{r+d}\right)^2\right]\sin^2\beta\cos^2\beta+\cos^4\beta}}, \quad (3.4)$$

где $\beta = \pi/2 - \theta$, θ - среднее отношение длины к диаметру волокна и l_n - расстояние между волокнами, зависящее от их объемной доли. Бэй и Такер рассмотрели проблему определения ориентации коротких волокон, имеющих небольшой угол с плоскостью сечения [5]. Если длина и диаметр волокон равны L и d, существует предельный угол θ_c, выше которого плоскость сечения обязательно пересечет торец волокна. Значение предельного угла определяется формулой $\theta_c = \arccos(d/L)$. По этой причине они в уравнения (3.5) и (3.6) ввели коэффициент F_n:

$$\frac{F_n}{F_{90}}=\frac{1}{\frac{L}{d}\cos\theta} \quad \text{при } \theta \le \theta_c, \quad (3.5)$$

где F_{90} – коэффициент при 90°.

$$\frac{F_n}{F_{90}} = 1 \quad \text{при } \theta > \theta_c \tag{3.6}$$

В более поздней работе Такер уточнил вероятность пересечения при углах выше критического θ_c. В разделе 3.3.2 обсуждается альтернативный подход к решению этой проблемы.

Такие корректировки приводят к ошибкам двух типов. Во-первых, они основаны на некоторой модели, предполагающей определенное распределение волокон по длине. Поэтому невозможно оценить точность получаемой ориентации волокон. Как уже отмечалось, ошибка определения ориентации меньше, если плоскость сечения имеет значительный угол с осью волокон. И если волокна имеют широкое распределение по ориентации, ошибка возрастает. Кроме того, если волокно сечется под очень большим углом и искривлено, его сечение имеет неэллиптическую форму. Во-вторых, ошибки, обусловленные «неидеальностью» вероятности пересечения, малы по сравнению с ошибками вследствие невысокого качества поверхности образца.

Худшим случаем является изотропное распределенные коротких волокон. В этом случае нельзя использовать технику сечения под большим углом к направлению волокон, поскольку преимущественного направления ориентации просто не существует. Обратим внимание на снижение плотности распределения (рис. 3.12) вблизи $\theta = 0$ (из-за эффекта телесного углового). Функция распределения снижается также вблизи $\theta = 90^\circ$ (что обусловлено прямоугольной или неполностью эллиптичной формой сечения коротких волокон). Если сделать два дополнительных сечения образца в плоскостях, ортогональных к первому сечению, получим аналогичные распределения. Данные этих трех графиков указывают на относительную изотропию образца, но не определяют степень отклонения от нее. Если образец прозрачен, для проверки изотропии можно использовать метод КСЛМ [18].

3.2. Автоматизированная микроскопия крупных областей

3.2.1. Введение

Несомненно, быстрое сканирование большой области (сантиметрового размера) при высоком (субмикронном) разрешении очень эффективно для изучения мезоструктуры материала. Имеется ли альтернатива автоматизированной микроскопии при изучении образцов большой площади? Ответ – да. Изображение тонкой пленки с неплохим пространственным разрешением можно получить с помощью обычного сканера. На рис. 3.17 представлено изображение слоя углепластика. Пространственное разрешение современного сканера уже приближается к разрешению микроскопа. Типичное разрешение сканера сейчас равно 1200 пикселям на дюйм, что соответствует размеру 20 микрон. Однако в будущем разрешающая способность сканера, без сомнения, достигнет разрешения оптического микроскопа.

Компьютер и система анализа изображения позволяют строить панораму объекта большой площади объединением сотен (а в некоторых случаях и многих тысяч) изображений высокого разрешения, полученных при помощи оптического микроскопа отраженного света. Текущее состояние методов автоматизированного анализа изображения для характеризации композитов на основе полимерных матриц описано в работе [19].

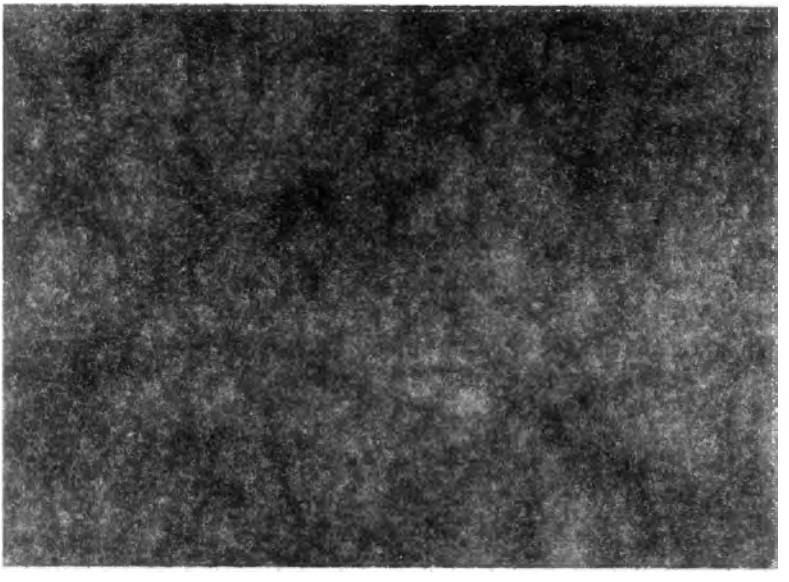


Рис. 3.17. Изображение объекта большой площади может быть получено при помощи сканера. Изображение слоя углепластика имеет разрешение 1200 точек на дюйм. Размер области 6×4 мм. Индивидуальные волокна не разрешены, но видны их кластеры.

Для исследования длины и ориентации волокон авторы разработали анализатор 2D-изображений. Раньше для ручного измерения длины волокон использовали мышь и специальный коврик [20, 6, 8]. В результате разработки коммерческих компьютерных программ анализа изображений теперь такие измерения делаются намного быстрее. Например, для определения ориентации волокон в композитах, полученных методом литья под давлением [9], или для определения угла разориентации волокон в композитах на основе тканей [21].

На рис. 3.18 показана система автоматизированного анализа образов, в которой монохромная камера установлена сверху на штативе микроскопа отраженного света. Монитор демонстрирует видеосигнал в режиме реального времени. Размер поля зрения зависит от увеличения окуляра[1] и объектива. При использовании объектива с увеличением 20× и окуляра с увеличением 6,7× размер поля зрения равен приблизительно 150 ×150 мкм.

---

[1] В данном случае речь идет о промежуточной увеличительной системе (типа дополнительного объектива камеры или адаптера) между объективом и камерой (а не между объективом и наблюдателем, где используется нормальный окуляр 10×).

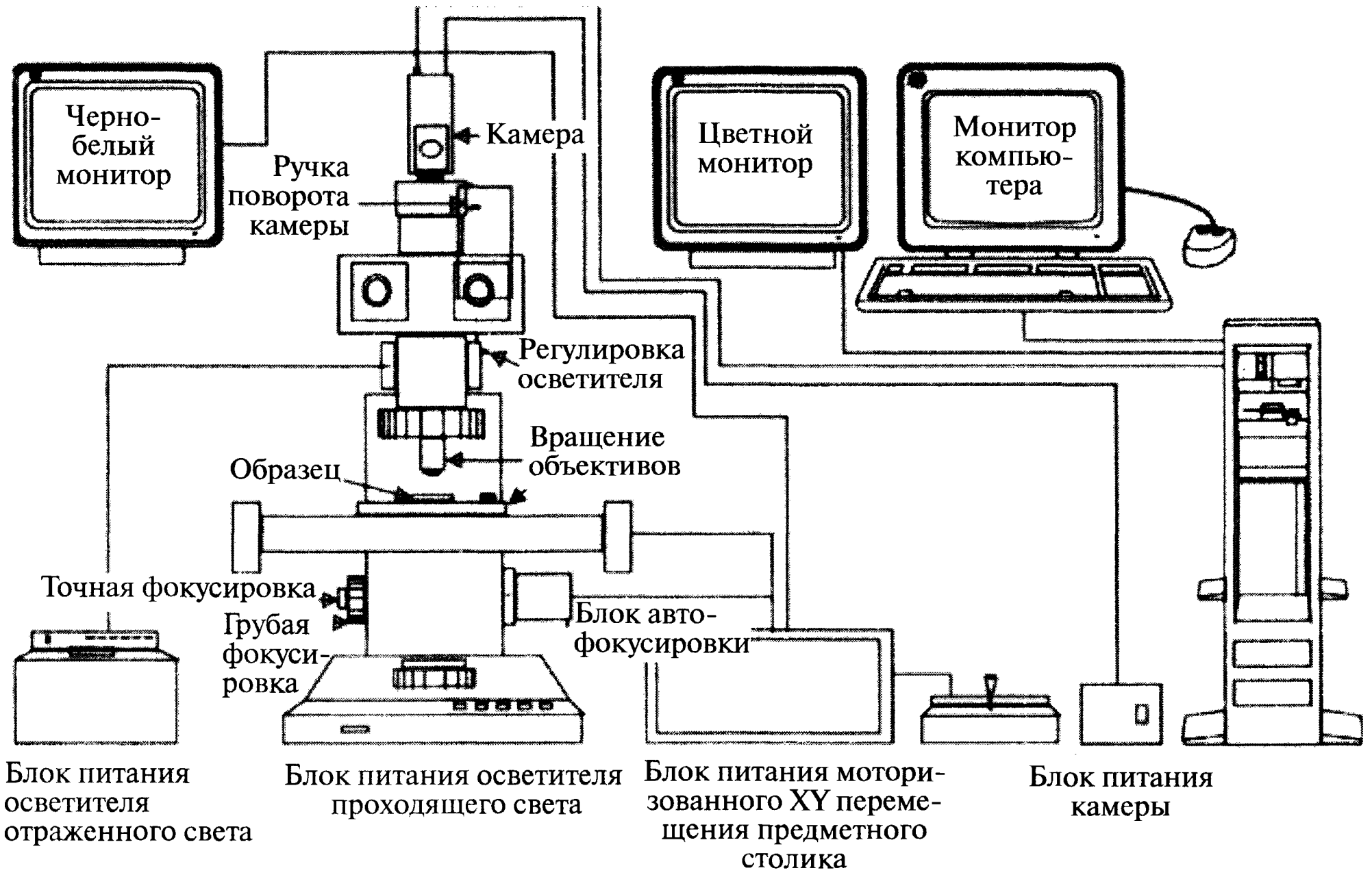


Рис. 3.18. Схема оптической системы анализа изображений. Источник света расположен в задней части микроскопа отраженного света. Черно-белый монитор позволяет контролировать поле зрения в режиме реального времени. Второй монитор использовали для оценки доли уже исследованной части объекта. В самой последней версии системы монитор показывает как текущее изображение, так и ранее отснятые кадры (рис. 3.26).

Быстродействующая видеокарта DT3155 компьютера преобразует оптический сигнал в цифровое изображение с разрешением 512×512 пикселей. Это изображение сохраняется в памяти случайного доступа компьютера (VRAM) в формате, пригодном для применения цифровых методов обработки.

Для изучения больших площадей использовали систему автоматизированного сканирования по осям X и Y. Автофокусировка микроскопа осуществлялась при помощи двигателя, перемещающего образец по оси Z до получения максимального контраста. Система автофокусировки обязательна для изучения больших площадей из-за ограниченной глубины резкости объектива и неидеальной ориентации поверхности образца. Фокусировку контролировали при помощи монитора.

В продаже имеется несколько программ анализа изображений, например, Quantimet и Kontron. Хотя они имеют превосходные средства обработки изображения, определять ориентацию волокон они не позволяют. В процессе развития систем автоматизированного анализа изображений конструкция микроскопа, компьютера и программное обеспечение сильно изменились. Первый компьютер был основан на небольшой сети транспьютеров и использовал язык программирования OCCAM. Позднее установку пришлось перепроектировать для процессора Пентиум, а программу переписали с языка OCCAM на C++.

3.2.2. Система на основе транспьютеров

Автоматизированная система анализа изображения на основе транспьютеров описана в работах [22-24]. Четыре транспьютера T800 имели систему быстрой последовательной связи (глава 2) для параллельной обработки сигнала, как показано на рис. 3.19. Система имела следующие характеристики, которые сохранились и в ее более поздних версиях:

- При получении каждого XY изображения производилась автофокусировка.
- Для каждого кадра автоматически устанавливался порог интенсивности (чтобы учесть изменения контраста).
- Автоматически идентифицировались изображения волокон.
- Автоматически совмещались изображения соседних кадров.
- Форму каждого волокна характеризовали «коэффициентом соответствия», оценивающим, насколько хорошо форма волокна соответствует эллипсу.

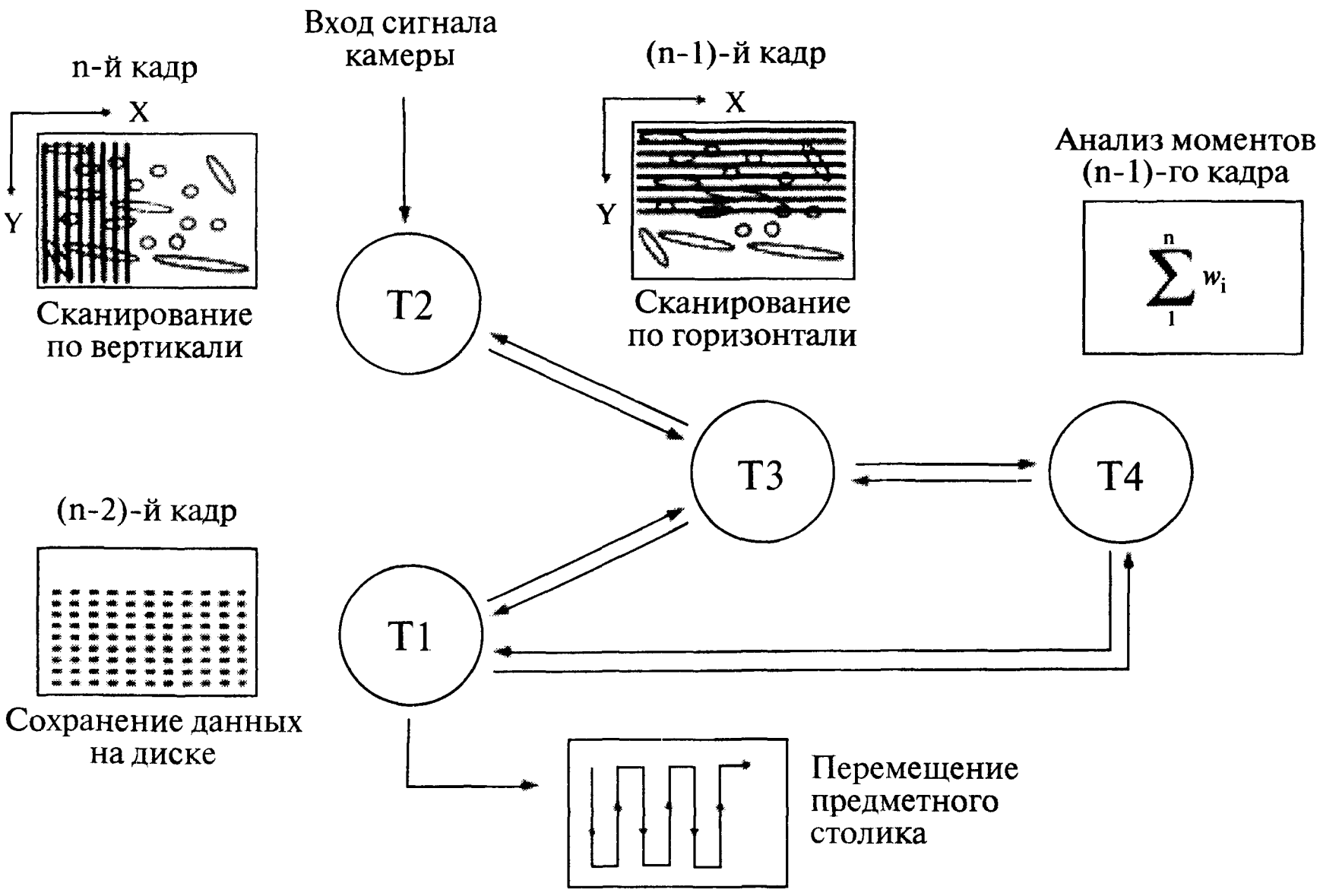


Рис.3.19. Для ускорения определения ориентации волокон первая система автоматического анализа изображения использовала несколько транспутеров. На схеме показаны функции каждого транспьютера. Транспьютер T2 выполняет вертикальную расшифровку пикселей n-го кадра, а транспьютер T3 расшифровывает пиксели строки предыдущего изображения. Это облегчает идентификацию касающихся волокон. Данные транспьютеров T2 и T3 передаются на T4 для вычисления моментов каждого волокна (в данном примере он обрабатывает данные (n-1)-го кадра. Транспьютер T1 управляет сканированием в плоскости XY и передает полученные данные на диск.

Поскольку транспьютеры работали параллельно, система была чрезвычайно быстрой (тактовая частота T800 в то время была лишь 20 МГц). Аппаратные средства и программное обеспечение были разработаны так, чтобы успеть обработать информацию изображения за время перемещения предметного столика в следующее положение. Система сканировала площадь размером несколько квадратных миллимеров (содержащую до 20 000 волокон) с субмикронным разрешением приблизительно за 30 минут. После сканирования автоматически определялась степень эллиптичности волокон, а распределение ориентации волокон получали в течение нескольких секунд. К сожалению, транспьютеры с более высокой тактовой частотой разработать не удалось, и с середины 1980-х годов их перестали производить. К счастью, компания Интел систематически увеличила тактовую скорость процессора Пентиум, и к моменту написания этой книги она достигла 2 ГГц. Как следствие, для достижения требуемой скорости работы достаточной оказалась и последовательная обработка информации.

3.2.3. Калибровка поля зрения

Изображения больших площадей получают путем автоматического перемещения предметного столика и наложения нескольких кадров. При перемещении образца на многие сантиметры в направлениях X и Y его поверхность выходит из плоскости фокусировки. Для автофокусировки микроскопа необходимо перемещать образец в направлении оптической оси Z. Перемещение по осям XY обычно осуществляют шаговыми двигателями, но в последнее время для этого начали применять и пьезоэлектрические двигатели.

При приложении к обмоткам статора шагового двигателя электрического импульса ротор поворачивается на определенный угол (рис. 3.20). Величина шага может быть различной, но обычно она равна 1,8; 2,5; 3,75; 7,5; 15 или 30°. Полный угол поворота ротора пропорционален количеству поступивших импульсов. Перемещение ротора можно контролировать очень точно, и такие моторы часто используют в системах управления с обратной связью. Вал редуктора преобразует вращательное движение ротора в поступательное. Моторизованный предметный столик микроскопа перемещают в плоскости XY с помощью двух высокоточных шаговых двигателей. Существует несколько типов шаговых двигателей, но самую высокую точность и скорость имеет двигатель, основанный на постоянном магните.

В продаже имеются специальные микросхемы, переводящие последовательность маломощных компьютерных импульсов в регулярные управляющие сигналы высокой мощности, прикладываемые к четырем обмоткам шагового двигателя. Линия управления микросхемы определяет направление вращения, определяемое фазой сигналов. Частота импульсов определяет скорость вращения ротора. Отметим, что частота импульсов не должна быть слишком высокой, поскольку время поворота ротора при одном импульсе конечно.

Компьютер посылает на шаговый двигатель определенное количество импульсов (чтобы переместить образец в направлениях X или Y). Перемещение образца по осям X или Y не совсем пропорционально количеству импульсов из-за небольшой эллиптичности винтового вала двигателя. Этот эффект заметен только при больших увеличениях, и типичная зависимость длины перемещения от количества импульсов показана на рис. 3.21. По этой причине производители предпочитают

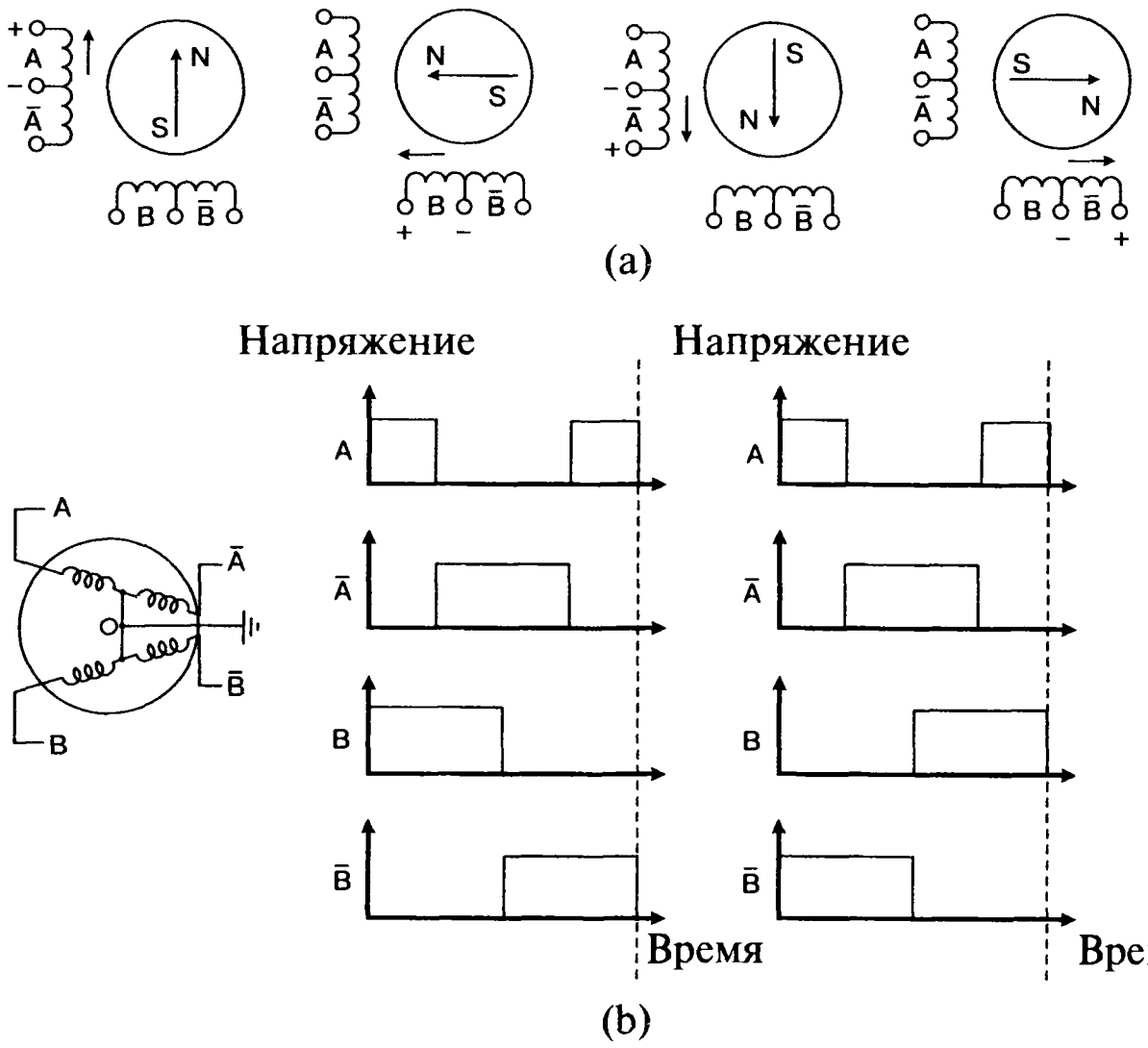


Рис. 3.20. Принцип работы шагового двигателя. Рассмотрим четыре обмотки, управляемые импульсами напряжения. Когда полярность каждой катушки двигателя соответствует показанной на схеме, ротор перемещается на один шаг вперед или назад. Во многих шаговых двигателях шаг угла поворота равен одному или двум градусам на один импульс. Для получения более мелкого шага вращения можно использовать редуктор или полушаговые вращения (0.5-1°), вызываемые перекрывающимися сигналами.

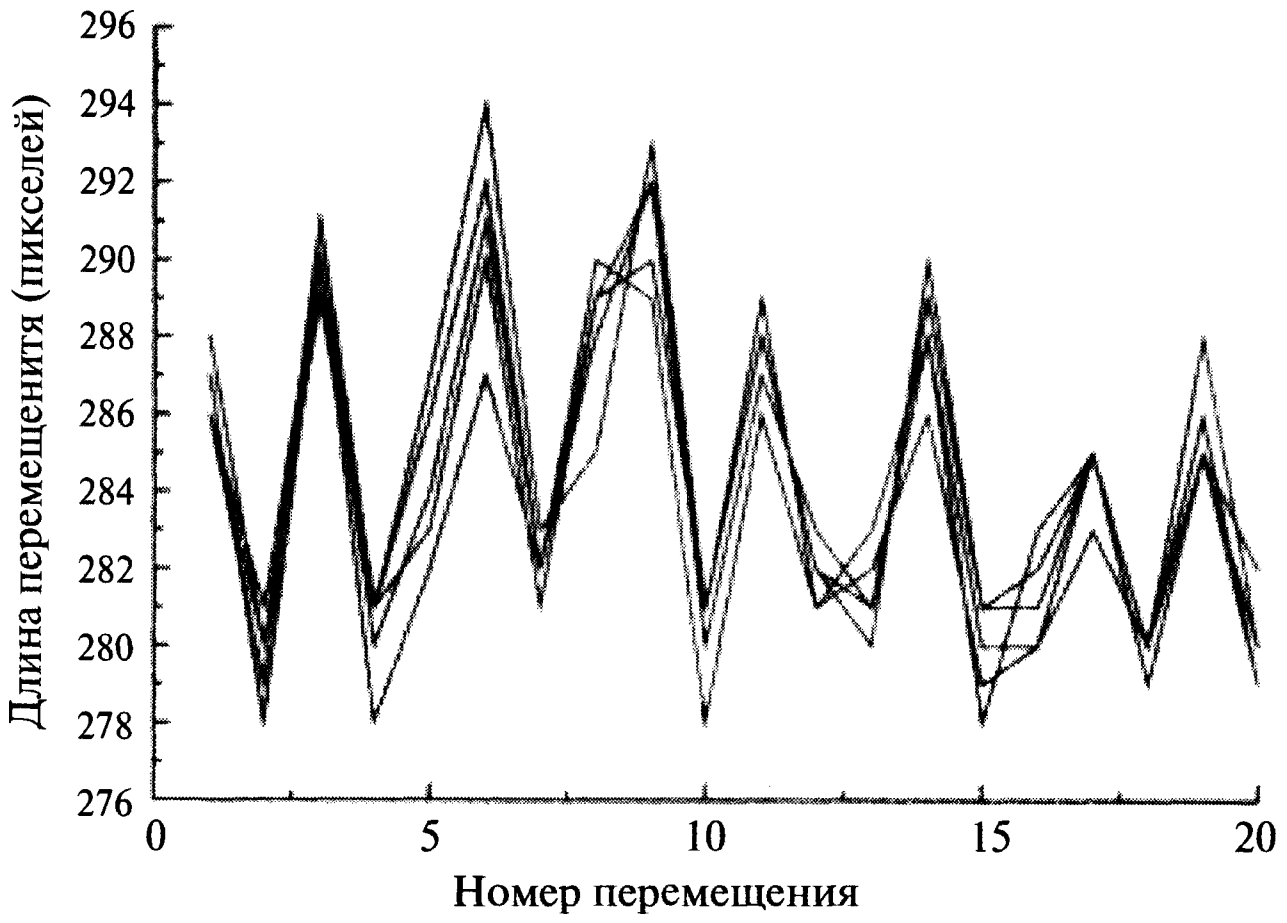


Рис. 3.21. Винтовой вал преобразует вращательное движение шагового двигателя в поступательное движение. Если вал не является идеальным цилиндром (имеет небольшую эллиптичность), линейное перемещение не будет строго пропорционально углу поворота ротора. На графике построена зависимость числа пикселей, на которое передвигается образец, от количества импульсов, приходящих на шаговый двигатель. Обратим внимание на регулярный характер зависимости. Непостоянство перемещения можно учесть, если сканирование начинается из одной точки в плоскости XY.

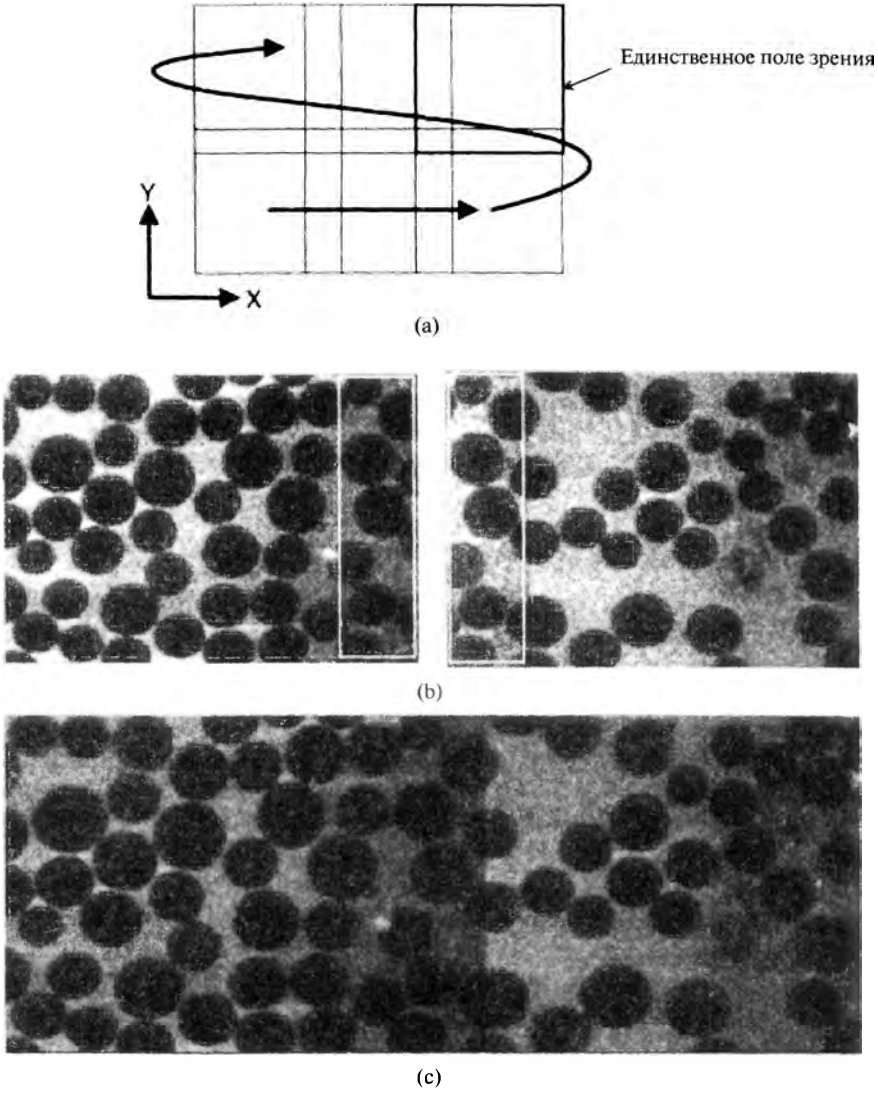


Рис. 3.22. Методика совмещения цифровых изображений

указывать точность перемещения между двумя точками (x_a, y_a) и (x_b, y_b), а не абсолютную точность позиционирования относительно любой начальной точки (x_i, y_i)! Обратим внимание, что периодическую ошибку перемещения по осям X и Y в первом приближении можно описать гармонической фунцией и $\delta X = a_1 \sin(b_1 X)$, $\delta Y = a_2 \sin(b_2 Y)$. При сканировании большой площади ошибка может существенно отклоняться от этой функции, и поэтому при корректировке этого эффекта нужно проявлять осторожность.

Существуют три возможности контроля перемещения образца по осям X и Y при сканирования больших площадей. Наиболее дорогой метод состоит в контроле движения шагового мотора при помощи лазерного интерферометра, измеряющего абсолютные координаты! Эту методику использовали в Эдинбургском

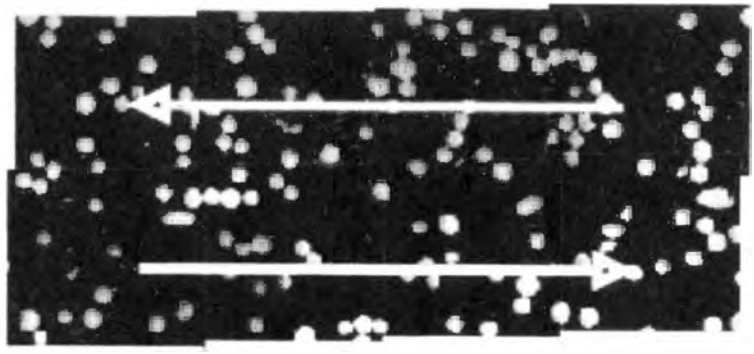


Рис. 3.23. Построение панорамы из большого количества перекрывающихся кадров высокого разрешения. Панорама площади объекта размером в несколько сантиметров может состоять из нескольких сотен кадров высокого разрешения

университете для анализа астрономических данных на фотопластинах большого размера [25]. Второй (менее дорогой) метод состоит в совмещении изображения волокон на кадре высокого разрешения с теми же волокнами на следующем кадре (рис. 3.22). Эту методику нельзя использовать, если в области перекрывания вблизи края кадра отсутствуют особенности. Однако при анализе волокнистых композитов это маловероятно. Изменения перемещения вследствие эллиптичности ведущего винта, показанные на рис. 3.21, были получены именно этим методом. Рис. 3.23 иллюстрирует, как строится панорама детали большой площади из большого количества кадров.

Однако бывают случаи (например, при изучении края детали сложной формы), когда в поле зрения волокна отсутствуют. В этом случае можно использовать третий метод, состоящий в создании «таблицы поиска» линейного перемещения для фиксированного набора импульсов шагового двигателя. Этот метод предполагает, что сканирование всегда начинается из одной точки (X, Y), и после сканирования предметный столик возвращается в эту же точку. Если предметный столик оказывается случайно сбитым, оператор должен снова откалибровать его перемещение и создать новую таблицу поиска.

3.2.4. Определение ориентации волокна

В сферической системе координат ориентация волокна описывается широтой (углом θ_i) и углом ϕ_i, определяющим его положение относительно плоскости сечения XY. Эти углы вычисляли методом моментов [25], описанным в параграфе 3.3.3. Однако это не единственный метод определения степени эллиптичности сечения волокна [26,11]. Преимущество метода моментов состоит в том, что все вычисления проводятся сразу же после получения изображения. Его недостаток состоит в необходимости игнорировать дефектные и разрушенные (неэллиптичные) волокна, поскольку в этом случае степень эллиптичности определяется неправильно, что иллюстрирует рис. 3.24. В этом отношении предпочтительнее метод наименьших квадратов, потому что он позволяет учитывать и дефектные волокна (рис. 3.25). Ошибки метода моментов и метода наименьших квадратов обсуждаются в работе [12].

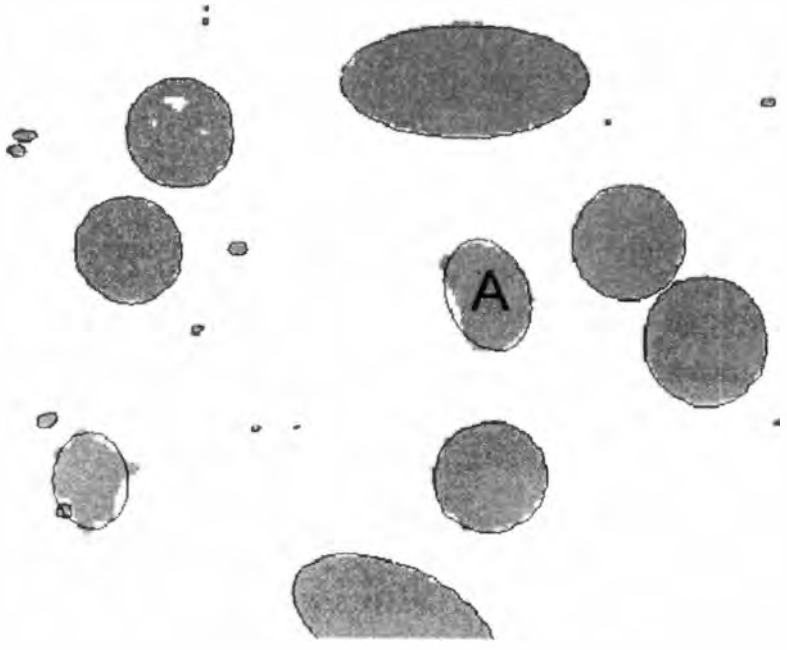


Рис. 3.24. Параметры эллипсов определяли методом вторых моментов. При аппроксимации фрагментов волокон эллипсами (объект А) появляются ошибки.

Из-за наличия на изображении дефектных и разрушенных волокон (а также торцов коротких волокон) важно оценить степень совпадения сечения волокна и аппроксимирующего эллипса. Коэффициент соответствия F_f, оценивающий степень совпадения эллипса и формы волокна, описан в разделе 3.3.3. Построив корреляционную зависимость половины длины малой оси аппроксимирующего эллипса b от величины коэффициента соответствия, можно выделить касающиеся волокна, дефектные волокна и их концы, а также волокна действительно эллиптической формы. Поэтому после сканирования система строит график распределения по диаметру волокон. Волокна характеризуются значениями малой и большой оси эллипса. Затем на экране показываются начальное изображение вместе с аппроксимирующими эллипсами.

Типичное сечение волокнистого композита представлено на рис. 3.26. Графики в нижней части экрана показывают распределения по углам ориентации θ_i и ϕ_i для волокон эллиптической формы. В рамке слева показано текущее изображение, а в более крупной правой рамке демонстрируется предыдущий кадр вместе с аппроксимирующими эллипсами.

Система автоматизированного анализа больших площадей позволяет очень быстро изучать композиты, армированные углеродными, органическими и стеклянными волокнами. Единственный недостаток автоматизированной системы обработки изображения состоит в неоднозначности определения угла ϕ, что иллюстрируется рис. 3.37. Однако во многих случаях это не является проблемой. Целью многих исследователей является определение степени ориентации волокон, а не распределения по ориентации.

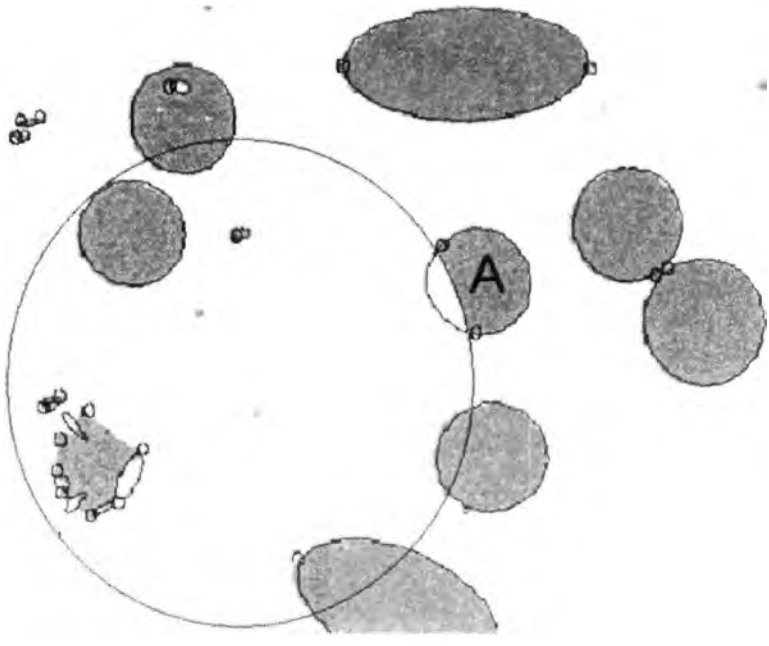


Рис. 3.25. Аппроксимирующие эллипсы на том же изображении (рис. 3.24) определялись методом наименьших квадратов. Обратим внимание на разную аппроксимацию объекта «А» методами вторых моментов и наименьших квадратов. Метод вторых моментов аппроксимирует эллипсом весь объект, в то время как метод наименьших квадратов делит периметр на части и находит соответствующий эллипс для каждой из них. Артефакты (слишком большие или слишком маленькие эллипсы) можно выявить путем сравнения длины малой оси с диаметром волокон.

Параметры, которые используют для описания степени ориентации волокон в композитах, определяются возможностями оптических измерений. Композит можно изучать при помощи оптического микроскопа отраженного света, снабженного автоматизированной системой анализа изображения. Ориентацию волокон характеризовали несколькими параметрами. Одним из них является коэффициент ориентации Германа [20, 27]:

$$H_e = \frac{1}{2}\left(3\frac{\sum_i N(\theta_i)\cos^2\theta_i}{\sum_i N(\theta_i)} - 1 \right) = \frac{1}{2}\left(3 < \cos^2\theta_i > -1\right), \qquad (3.7)$$

где θ_i - угол между волокном и осью Z и <...> - знак усреднения. Недостатком этого метода является то, что при несимметричном относительно оси Z распределении волокон различные распределения могут характеризоваться одной величиной H_e.

Ориентацию волокон и ее влияние на модуль упругости композита изучали также в работах [28-30]. Степень ориентации описывали функциями P_n. Например, функция $< P_4(\cos\theta) >$ определяется формулой:

$$< P_4(\cos\theta) >= (35 < \cos^4\theta > - 30 < \cos^2\theta > +3)/8 \qquad (3.8)$$

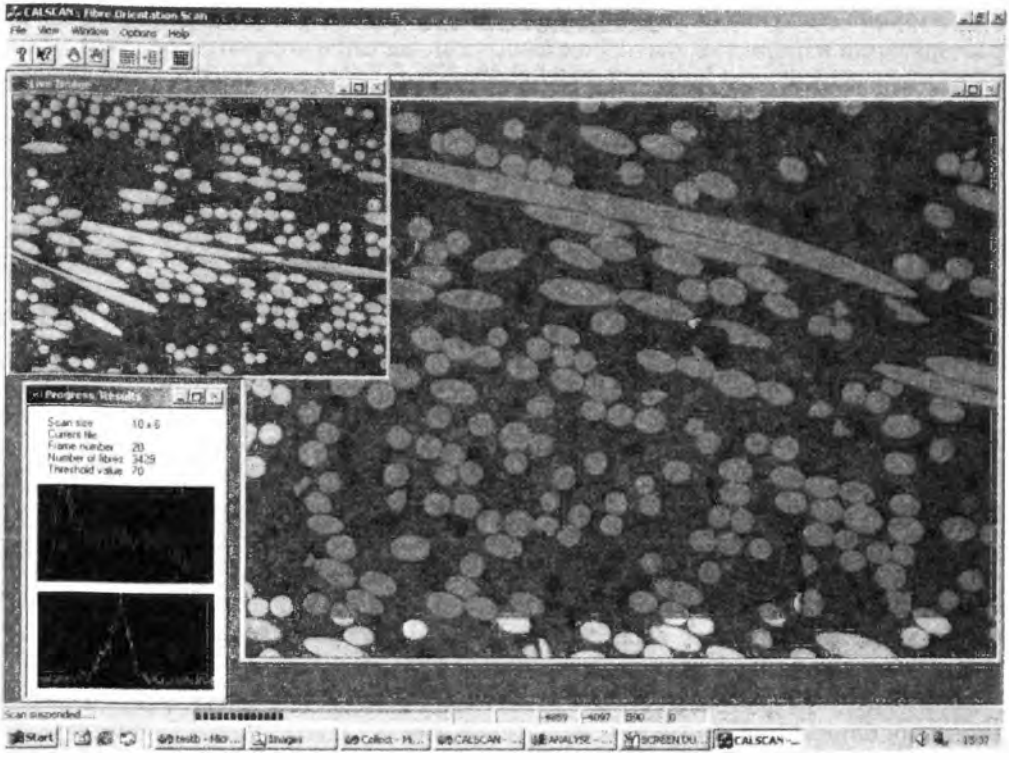


Рис. 3.26. Монитор оптического микроскопа. В меньшей прямоугольной рамке слева показано текущее изображение, а в более крупной – предыдущий кадр. Светлые волокна внизу соответствуют области перекрывания кадров. На верхнем графике представлено распределение ориентации волокон по широте (углу θ), а на нижнем – распределение по углу ϕ. Распределения построены на основании анализа формы сечения 3 429 волокон, изображение которых было получено за несколько минут.

Степень ориентации волокон характеризовали также тензором второго порядка [31, 32]. Элементы тензора даются уравнением (3.9). Тензоры ориентации более высокого порядка могут быть определены аналогично.

$$a_{ij} = \int_p p_i p_j \Psi(p) dp, \tag{3.9}$$

где $\Psi(p)$ - вероятность ориентации волокна в направлении вектора p. При изотропном распределении волокон тензор ориентации имеет вид:

$$a_{ij} = \begin{bmatrix} 1/3 & 0 & 0 \\ 0 & 1/3 & 0 \\ 0 & 0 & 1/3 \end{bmatrix} \tag{3.10}$$

Некоторые исследователи рассматривали характеристики, описывающие распределение волокон в композите. Некоторые из этих характеристик обсуждаются

ниже. Группа японских исследователей [33] предложила фрактальный подход к характеризации наполнителей (главным образом, частиц и коротких волокон). Этот подход применим, если число волокон (или частиц) N связано с размером изучаемой области L соотношением $N(L) = \alpha L^{D_f}$, где α - постоянная и D_f – фрактальная размерность. Они ввели три морфологических параметра, первый из которых (ξ) характеризует степень однородности распределения, а два других – анизотропию распределения. Эти параметры определяются формулами:

$$\xi = \frac{d_p}{\sqrt{A/N}} \tag{3.11}$$

$$\eta = \frac{\sum_i m_i \cos 2\varepsilon_i}{\sum_i m_i} \tag{3.12}$$

$$\phi = \frac{\sum_i m_i \cos 2\varepsilon_i}{\sum_i m_i} \tag{3.13}$$

η и ϕ называют параметрами анизотропии первого и второго рода соответственно, A - площадь изучаемой области и d_p - наиболее вероятное расстояние между частицами. Хотя выражения для параметров анизотропии первого и второго рода совпадают, углы ε_i определяются различно.

В работе [34] однонаправленные композиты характеризуются углами между центрами ближайших волокон (рис. 3.27). В работе [35] для исследования корреляции ориентации соседних волокон использовали систему автоматического анализа образов, причем координаты центров волокон определяли методом моментов (раздел 3.3.3). Для исследования связи прочности и микроструктуры композита Пирц [36] изучал расположение центров волокон в плоскости, перпендикулярной направлению преимущественной ориентации. Он рассмотрел многогранники Вороного и проанализировал параметры, характеризующие образование кластеров. Корреляционная функция второго порядка $K(r)$, характеризующая распределение волокон на плоскости, определяется формулой:

$$K(r) = \frac{A}{N^2} \sum_{k=1}^{N} w_k^{-1} I_k(r), \tag{3.14}$$

где N - количество точек, A – площадь изучаемой области, $I_k(r)$- количество точек в пределах круга радиуса r (с центром в одной из точек) и w_k – весовой коэффициент, учитывающий края области изображения. Например, для круга радиусом r_1 на рис. 3.28a весовой коэффициент равен единице, а для круга радиуса r_2 он равен отношению длины штриховой линии окружности, приходящейся на изучаемую часть, к полной длине окружности. Рис. 3.28b демонстрирует зависимость корреляционной функции K от величины радиуса r для различных пространственных распределений, например, для кластеров и регулярной решетки волокон. Реальное пространственное распределение волокон в композите вряд ли будет соответствовать этим моделям, но график $K(r)$ указывает на наличие корреляции и образование кластеров или на случайное распределение волокон.

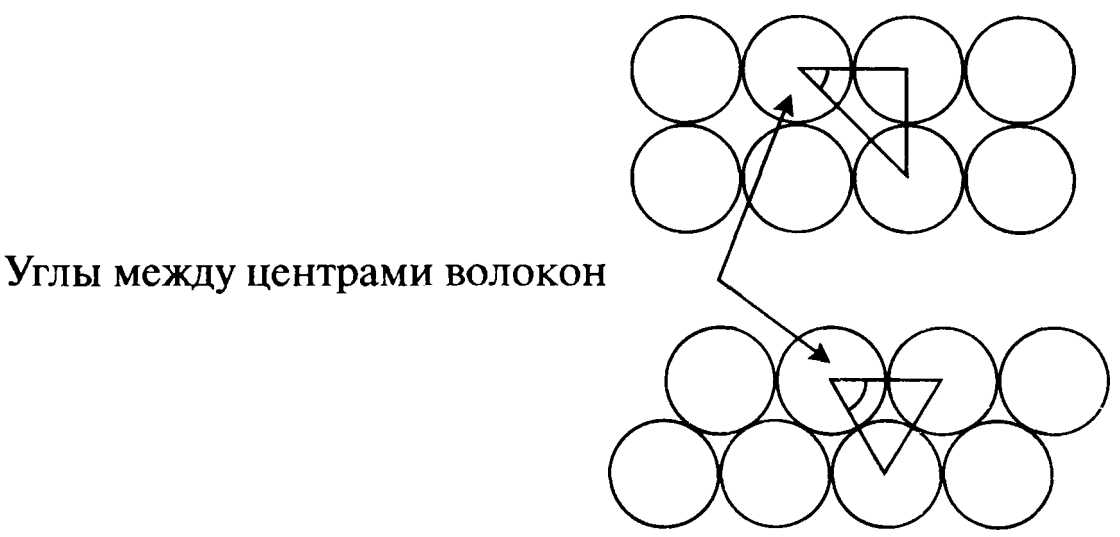


Рис. 3.27. Пространственную структуру волокнистого композита можно описывать углами между центрами соседних волокон.

Хотя некоторые системы автоматизированного анализа образов вычисляют описанные выше геометрические коэффициенты, наиболее полно степень ориентации характеризуется тензором ориентации. Для определения пространственного распределения волокон прежде всего нужно подготовить поперечное сечение композита и разделить площадь сканирования на множество малых площадей (скажем, размером 1×1 мм). После этого для каждой области можно вычислить тензор ориентации волокон (рис. 3.44). Такой анализ позволяет исследовать поверхностные и внутренние области композитов, например, полученных литьем под давлением (рис. 3.45).

Можно определить и другие характеристики структуры. Оптические методы использовали для определения волнистости волокон и разориентации слоев в многослойных композиционных материалах [37]. Однако лучшим методом определения волнистости волокон (в достаточно прозрачных образцах) является метод конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (глава 4) и метод рентгеновской микротомографии (глава 5).

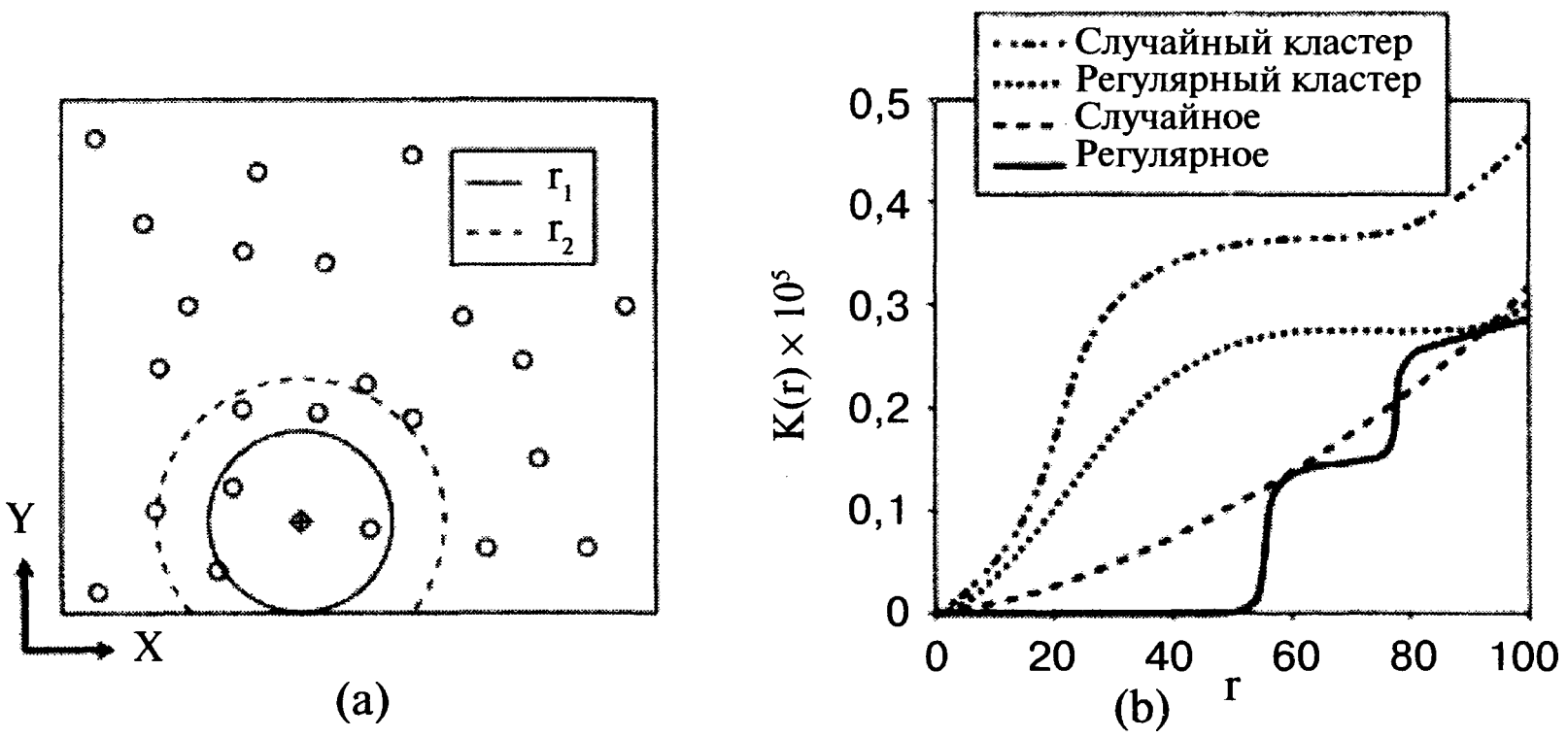


Рис. 3.28. (a) - Корреляционная функция K(r) учитывает конечный размер изображения; (b) - графики функции K(r) для некоторых распределений волокон.

3.2.5. Волокна необычной формы

Выше предполагалось, что волокна имеют цилиндрическую форму. В настоящее время производят волокна и более экзотической формы, например, треугольные и полые стеклянные волокна. Задача определения ориентации волокон в композиционном материале остается и в этом случае. Ниже будет описано решение этой

задачи при помощи оптического микроскопа отраженного света и системы автоматизированного анализа изображения.

В случае полых волокон можно использовать алгоритм, описанный в разделе 2.8.6, а затем применить метод моментов или какой-то другой способ определения степени эллиптичности волокон. На рис. 3.29 представлены исходное (a) и преобразованное (b) изображения полых волокон после введения порога интенсивности пикселей. На рис. 3.29c показан конечный результат преобразования, готовый для использования методов определения ориентации волокон обычной формы. Обратим внимание, что центры полых волокон, имеющих незамкнутую границу, после операции роста области остались черными.

Случай некруглых волокон сложнее. Сечение композита, армированного стеклянными волокнами треугольного сечения, показано на рис. 3.30. Интенсивность пикселей, соответствующих матрице, волокнам и порам, различна. Поры на изображении имеют вид черных областей, волокна имеют серый цвет, а матрица светлая. Образец разрезали под углом 45° и 90° к направлению укладки волокон. Ориентацию приблизительно 70 волокон определяли ручной идентификацией углов вписанного треугольника на поперечном сечении каждого волокна (светлый треугольник на рисунке).

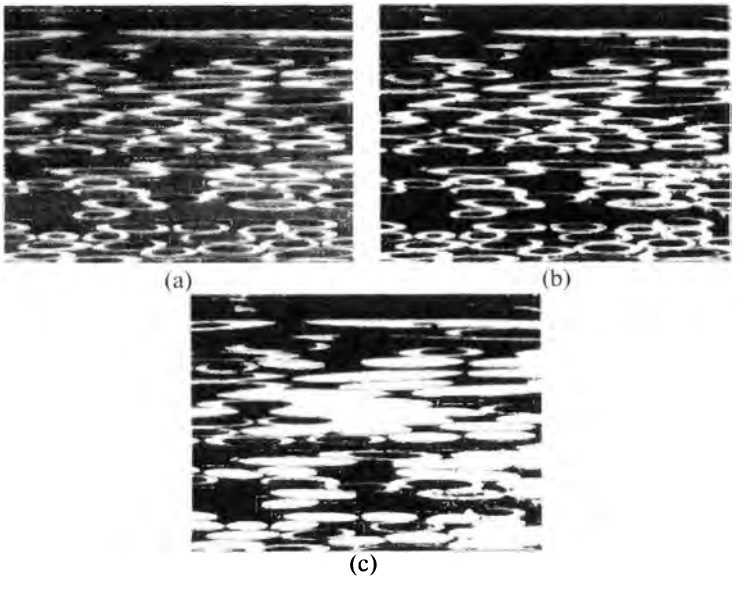


Рис. 3.29. Преобразование изображения полых стекловолокон. (a) - Исходное и (b) - преобразованное изображение после введения порога интенсивности. (c) - Изображение после операции роста центральной области. Обратим внимание, что рост был успешным лишь для волокон с замкнутым периметром. Размер поля зрения 566 × 434 мкм.

Рассмотрим волокно, поперечное сечение которого представляет собой равносторонний треугольник, ориентированный под углом β к плоскости сечения и повернутый на угол α, как показано на рис. 3.31. Нормали к плоскости граней волокна описываются формулами:

$$A = (\sin\alpha, 0, \cos\alpha)$$
$$B = (\sin(\alpha+\pi/3), 0, \cos(\alpha+\pi/3)) \quad (3.15)$$
$$C = (\sin(\alpha+2\pi/3), 0, \cos(\alpha+2\pi/3))$$

Плоскость сечения ориентирована под углом β к оси Y. Ее можно описать уравнением:

$$E = (0, \sin\beta, \cos\beta) \quad (3.16)$$

Линии, образуемые пересечением этих плоскостей, формируют поперечное сечение волокна. Линия пересечения двух плоскостей ортогональна нормалям каждой из них, а ее направление определяется их векторным произведением. Поэтому угол θ_{ab} равен:

$$\cos\theta_{ab} = \frac{([\mathbf{B},\mathbf{E}],[\mathbf{A},\mathbf{E}])}{|([\mathbf{B},\mathbf{E}],[\mathbf{a},\mathbf{E}])|} \quad (3.17)$$

Отсюда получаем:

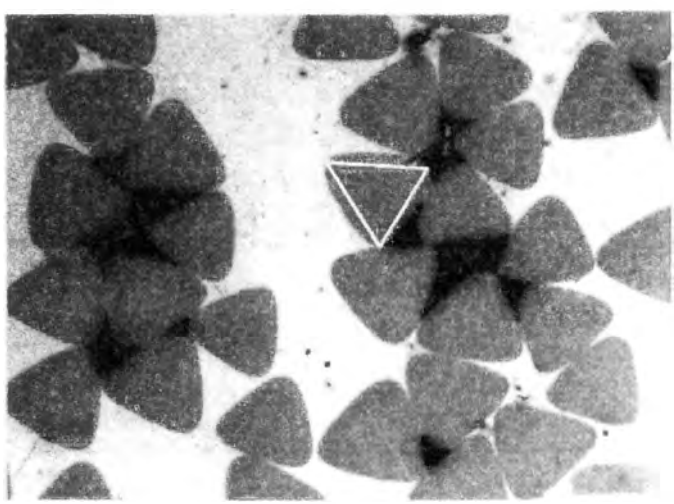
$$\theta_{ab} = \pi - a\cos\left(\frac{\cos(\alpha+\pi/3)\cos\alpha[\cos^2\beta - 1] - \sin(\alpha+\pi/3)\sin\alpha}{\sqrt{1-\cos^2(\alpha+\pi/3)\cos^2\beta}\ \sqrt{1-\cos^2\alpha\cos^2\beta}}\right) \quad (3.18)$$

Соотношение между θ_{ab}, α и β показано на рис. 3.32. Угол θ_{ab} определяется однозначно. Напротив, два других угла θ_{ac} и θ_{bc} определяются неоднозначно и возможные значения даются формулой:

$$(\alpha; -\alpha; \pi - 2\alpha/3; 2\alpha/3 - \pi; 2\alpha/3; -2\alpha/3) \text{ и } \beta \quad (3.19)$$

Например, если углы θ_{ab}, θ_{ac} и θ_{bc} равны 0,521; 1,994 и 0,626 соответственно, возможны следующие значения углов (α, β):

$\alpha = 34{,}38; -34{,}38; 85{,}68; 94{,}32; -25{,}56; 25{,}56;$
$\beta = 21{,}6.$



Сечение под углом 90°

Рис. 3.30. Волокна треугольной формы. Плоскость сечения перпендикулярна оси волокон. Размер поля зрения 566 × 434 мкм.

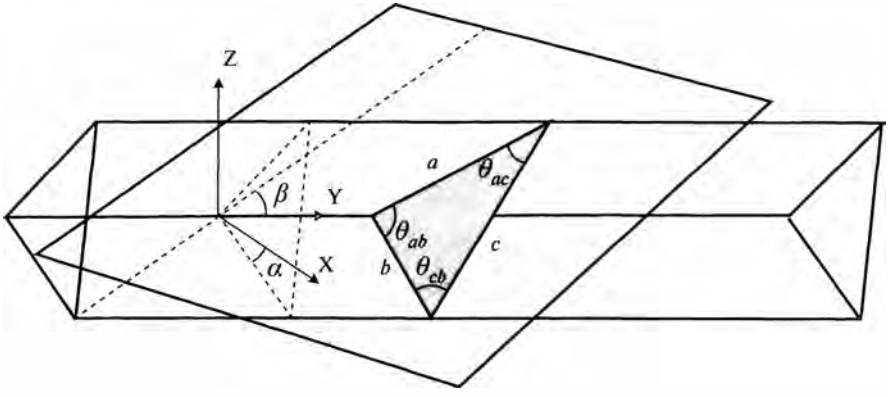


Рис. 3.31. Плоскость сечения, ориентированная под углами (α, β) к оси волокна треугольной формы.

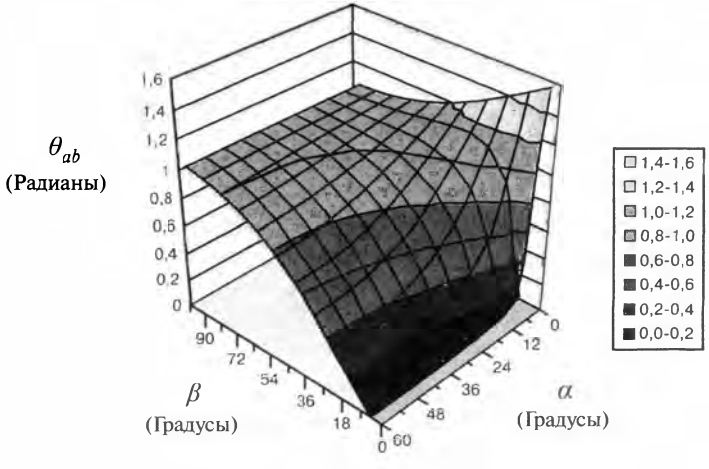


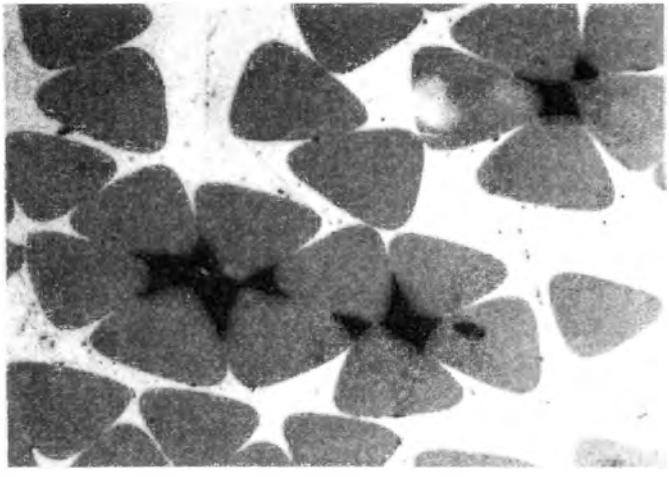
Рис. 3.32. Соотношение между углами θ_{ab}, α и β для волокон треугольной формы. Значения угла θ_{ab} даны в радианах.

На рис. 3.33 показано сечение композита, ориентированного под углом 45° к оси волокон. Форма поперечного сечения волокон не описывается равносторонними вписанными треугольниками. Результаты расчетов ориентации волокон приведены на рис. 3.34 и свидетельствуют о значительной разориентации волокон.

Таблица 1. Внутренние углы (градусов) для трех волокон треугольной формы

	θ_{ab}	θ_{bc}	θ_{ca}	Ориентация
Волокно 1	63,1	60,8	56,0	66,6
Волокно 2	60,3	60,2	59,6	78,0
Волокна 3	62,5	60,6	58,1	73,5

Замечание: Точность всех измерений равна ±1°.



Сечение под углом 45°

Рис. 3.33. Сечение композита на основе волокон треугольной формы плоскостью, ориентированной под углом 45° к оси укладки. Размер поля зрения 566×434 мкм

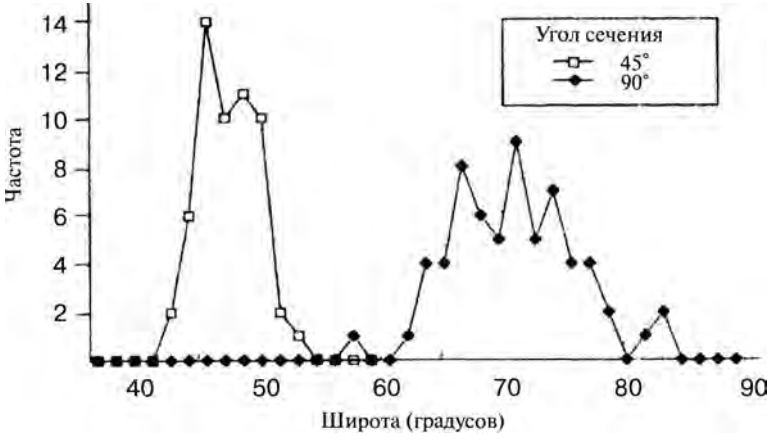


Рис. 3.34. Распределение ориентации волокон треугольной формы. Образец разрезали нормально (90°) и под углом 45° к направлению ориентации волокон. Более узкое распределение волокон на сечении под углом 45° свидетельствует о меньшей ошибке определения угла ориентации

3.3. Ориентация волокон в композитах, полученных литьем под давлением

3.3.1. Краткое описание

В этом разделе описано исследование ориентации волокон в стеклопластиках, полученных литьем под давлением. Волокна на сечениях образцов имеют форму эллипсов, степень вытяжки которых определяется их ориентацией. Поскольку даже небольшие детали из композиционных материалов содержат миллионы во-

локон, для определения статистически достоверного распределения ориентации необходима автоматизация процесса анализа. В этом разделе приведен пример изучения ориентации волокон и описаны стереологические аспекты определения 3D- структуры композита исходя из набора последовательных 2D-сечений.

3.3.2. Введение

Важнейшей особенностью волокнистых композитов, их raison d'etre, является их анизотропия. Свойства волокнистого композита определяются как его составом (содержанием матрицы и волокон), так и его структурой. В частности, свойства композита зависят от концентрации, длины и ориентации волокон (раздел 3.4), концентрации пор, а также искривленности волокон (раздел 4.7.6). Наиболее существенное влияние на свойства композита (прочность при растяжении и сжатии, модуль упругости, теплопроводность и т.д.) оказывают концентрация и ориентация волокон.

Ориентация волокон и другие характеристики структуры композита определяются технологией его производства. Оптимизация технологии может быть длительным процессом, включающим неоднократное производство детали и изучение ориентации волокон при различных технологических условиях. Прогресс компьютерной техники и методов моделирования позволяет теперь предсказывать ориентацию волокна без выполнения длительных и дорогостоящих экспериментов. Однако развитие компьютерных методов моделирования не устранило потребности в экспериментальном исследовании ориентации волокон. Напротив, количество исследователей, занимающихся компьютерным моделированием, постоянно возрастает, и потребность в экспериментальной проверке их результатов только увеличила необходимость в таких измерениях!

Количество волокон в детали может измеряться миллионами, и определить ориентацию всех волокон невозможно. Их ориентацию можно определить введением в материал небольшого количества волокон, имеющих высокий контраст изображения. Для оптических методов можно использовать углеродные волокна [38] (раздел 3.5.2), а для рентгеновских – тонкую свинцовую проволоку [39]. Углеродные волокна и свинцовая проволока ясно видны на фоне окружающей матрицы и других волокон. Предполагается, что их ориентация в материале отражает ориентацию основных волокон. К сожалению, введение высококонтрастных волокон в материал является трудоемкой и дорогостоящей процедурой. Поэтому предпочтительнее методы, не требующие введения специальных волокон.

Наиболее широко для изучения ориентации волокон в композиционных материалах используют оптический микроскоп отраженного света. На рис. 3.35 показана поверхность стеклопластика, подготовленная несколькими этапами полировки. Окисление матрицы повышает контраст волокон. Если волокно имеет цилиндрическую форму (что выполняется для большинства стеклянных волокон), на поперечном сечении оно имеет вид эллипса, большая ось которого определяется его ориентацией относительно плоскости сечения (рис. 3.36). Представление о степени разориентации волокон дает само изображение при не очень высоких увеличениях. Однако для получения количественных данных требуется аккуратный анализ изображения.

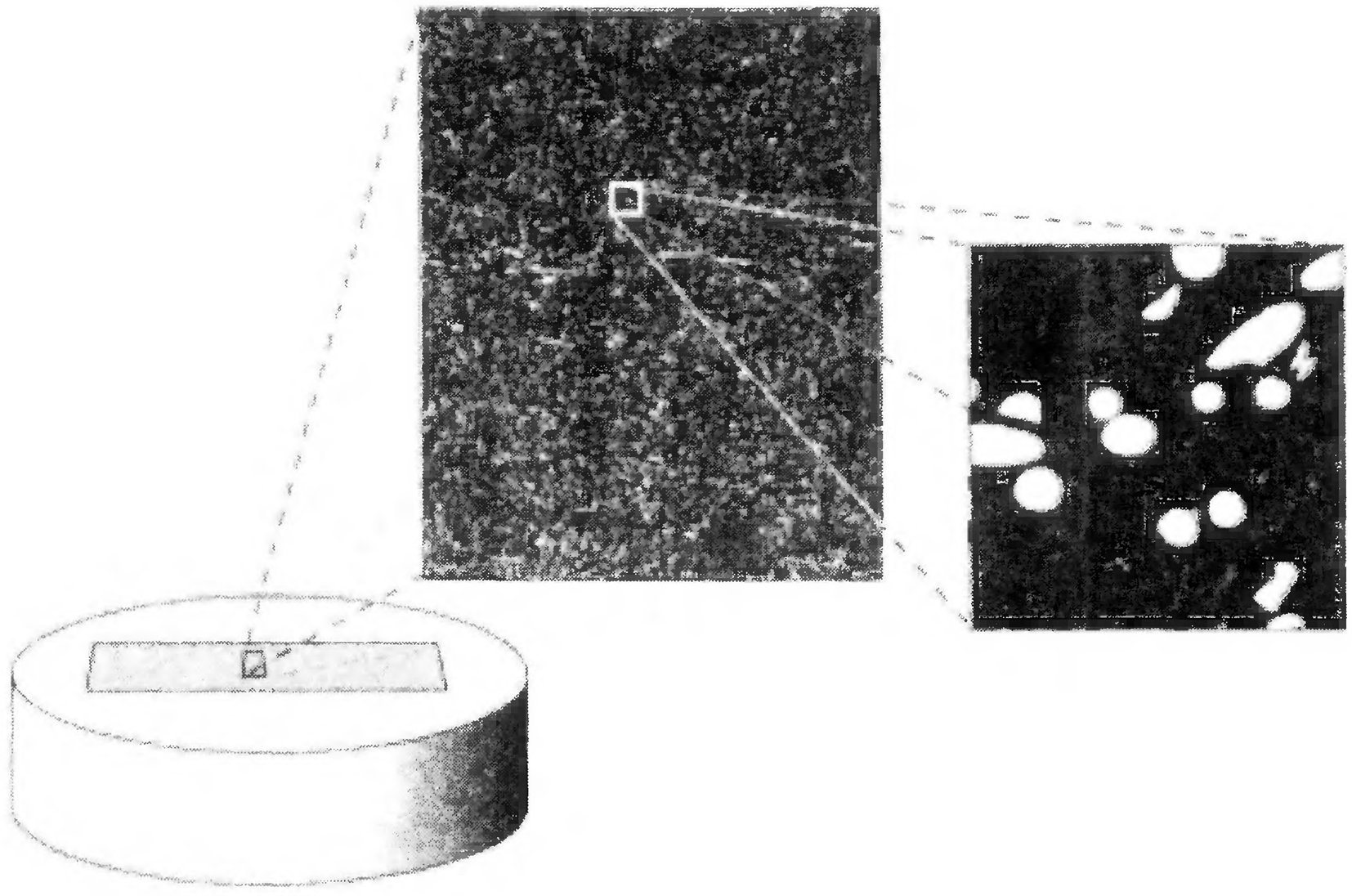


Рис. 3.35. Для удобства работы с образцом его фиксируют в эпоксидной смоле. Панораму крупной области получают объединением сотен (или тысяч) изображений, полученных при высоком увеличении.

Эллипс однозначно характеризуется координатами фокуса (x_c, y_c), длинами большой и малой осей a и b, а также углом между большой осью эллипса и осью координат ϕ (рис. 3.37). Ориентация волокна в сферических координатах описывается углами θ_i и ϕ_i, которые можно определить из формы эллипса по формулам:

$$\begin{aligned} \theta_i &= \arccos(b/a); \\ \phi_i &= \phi \end{aligned} \qquad (3.20)$$

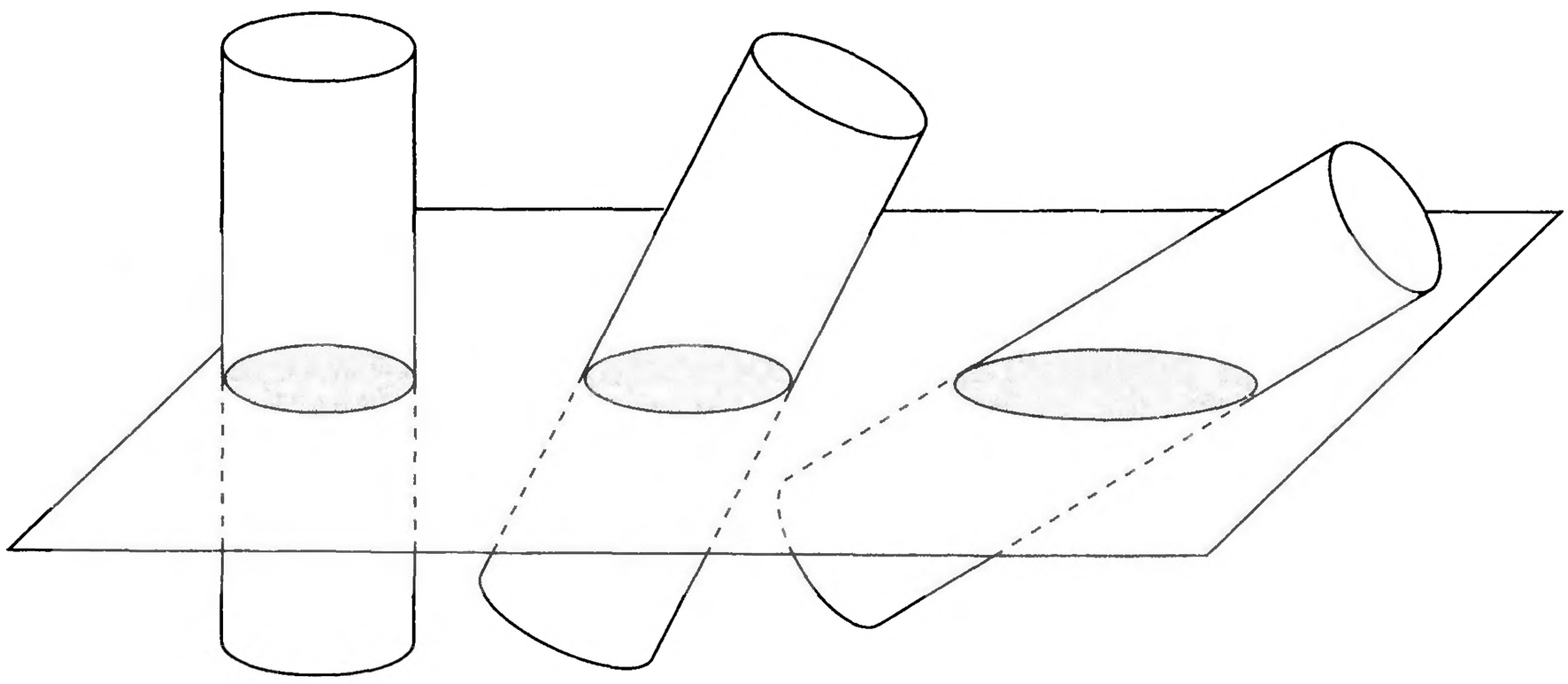


Рис. 3.36. Степень эллиптичности волокна зависит от его ориентации относительно плоскости сечения.

Таким образом, задача определения ориентации волокна сводится к измерению длин осей и ориентации главной оси эллипса. Волокна с углами ориентации ϕ и $\phi+\pi$ имеют идентичные поперечные сечения, и поэтому всегда имеется два возможных значения угла ϕ_i.

В самых первых работах ориентацию волокон определяли ручным измерением длины осей эллипсов на микрофотографиях при помощи нониуса. Этот метод

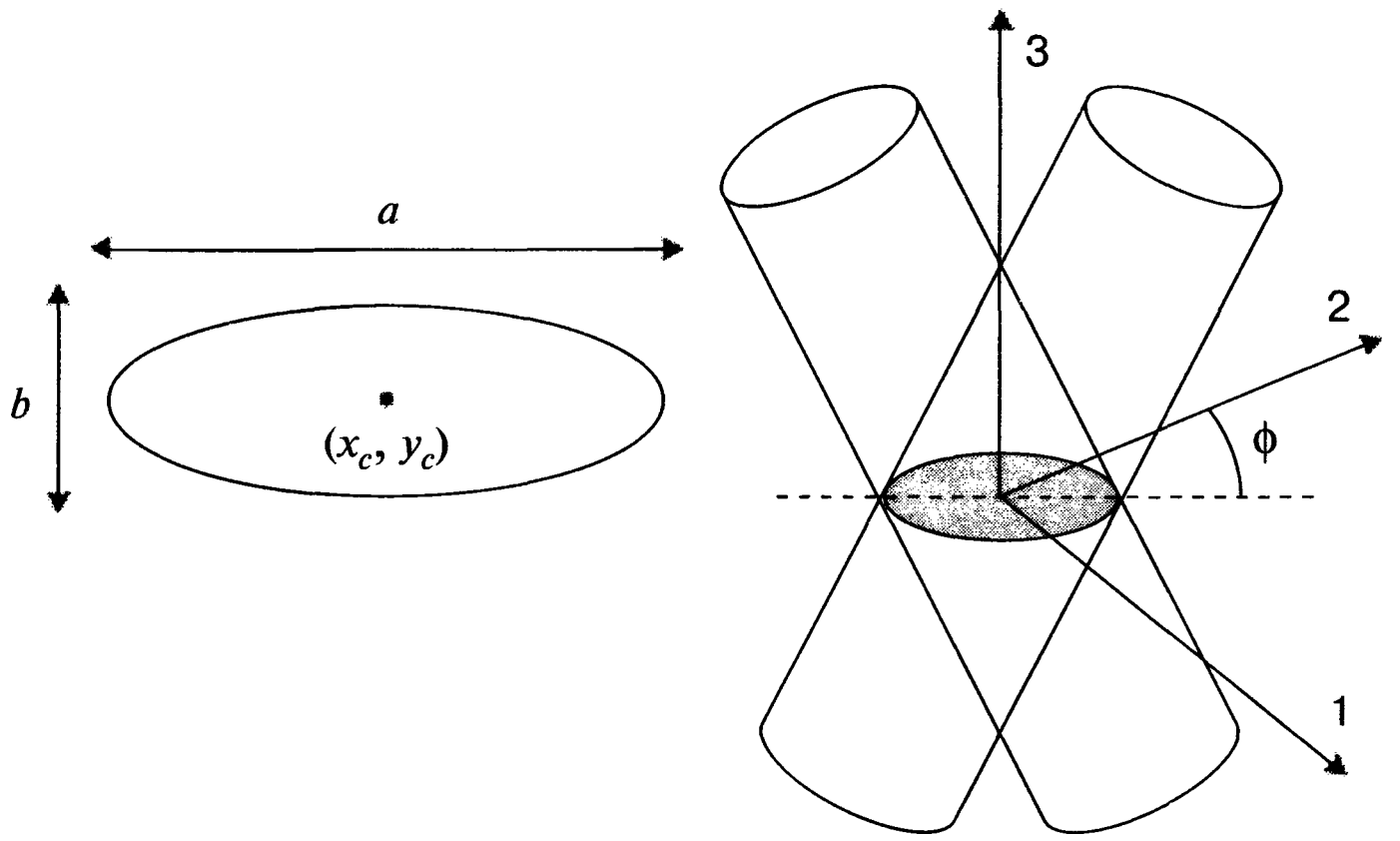


Рис. 3.37. Угол ориентации волокна определяется неоднозначно, но в большинстве случаев это неважно.

очень трудоемок, и с его помощью можно изучить лишь относительно небольшое количество волокон. Ручной метод измерений усовершенствовали после появления первых компьютеров [5], и исследователи стали определять лишь четыре вершины осей эллипса, а компьютер вычислял длины осей. Растущая мощь компьютеров стимулировала появление методов автоматического распознавания и анализа образов, в частности, автоматических методов определения ориентации волокон [9, 11, 22, 40, 41].

При рассматривании под углом круг выглядит как эллипс. Методы идентификации и анализа эллиптических объектов используются весьма широко. Для распознавания образов широко используется преобразование Хоуга. Как показано в разделе 2.8.5, это преобразование позволяет восстановить частично отсутствующие детали и устранить шум. Его недостатком является необходимость громоздких вычислений и графического представления каждого пикселя изображения в виде кривой в параметрическом пространстве. Например, в случае объектов эллиптической формы параметрическое пространство пятимерно [42]. Диаметр волокон обычно лежит в сравнительно небольшом интервале величин, и это существенно уменьшает объем параметрического пространства и облегчает анализ. Этот метод успешно использовали для определения ориентации волокон, исходя из микрофотографий, полученных в микроскопе отраженного света [43].

Окисление поверхности обеспечивает превосходный контраст волокон и матрицы, а введение порога выделения позволяет разделить волокна и матрицу (раздел 2.8). Введение порога, делящего пиксели на «черные» и «белые», значительно ускоряет вычисления по сравнению с соответствующими методами (типа преобразования Хоуга), действующими на изображениях серого цвета. Поэтому деление пикселей на два класса значительно ускоряет анализ поперечного сечения материала с большим количеством волокон. Метод, который первоначально использовали для анализа астрономических фотографий [25], модифицировали для описания объектов эллиптической формы.

3.3.3. Автоматизированная система определения ориентации волокон

При хорошем контрасте волокон и матрицы распределение интенсивности пикселей является бимодальным (раздел 2.8), и порог интенсивности определяется очень легко. Порог делит пиксели на «принадлежащие волокнам» и «принадлежащие матрице». После этого запускается процедура расплывания (описанная в разделе 2.8.6), и на изображении выделяются сечения волокон. Пикселям, соответствующим сечению волокон, приписывают значение «1», а всем остальным - значение «0». Эту процедуру называют выделением объектов. В процессе работы процедуры слияния пикселей для каждого объекта (волокна) вычисляют следующие суммы:

$$\begin{aligned} S_N &= n \\ S_X &= \sum x_i \\ S_Y &= \sum y_i \\ S_{XX} &= \sum x_i^2 \\ S_{YY} &= \sum y_i^2 \\ S_{XY} &= \sum x_i y_i, \end{aligned} \tag{3.21}$$

где x_i, y_i – координаты текущего пикселя при выполнении процедуры роста области (начало координат выбирается произвольным образом) и n – общее количество пикселей сечения волокна. Первые моменты для каждого сечения волокна рассчитывают следующим образом:

$$\begin{aligned} x_c &= S_X / S_N \\ y_c &= S_Y / S_N \end{aligned} \tag{3.22}$$

Первые моменты определяют координаты центра волокна x_c и y_c. Вторые моменты вычисляют следующим образом:

$$M_{XX} = \frac{S_{XX}}{S_N} - \frac{S_X^2}{S_N^2} \tag{3.23}$$

$$M_{YY} = \frac{S_{YY}}{S_N} - \frac{S_Y^2}{S_N^2}$$

$$M_{XY} = \frac{S_{XY}}{S_N} - \frac{S_X S_Y}{S_N^2}$$

После этого определяют аппроксимирующий эллипс (имеющий те же значения нулевого, первого и второго моментов):

$$\begin{aligned} a^2 &= 2(M_{XX} + M_{YY}) + 2\sqrt{(M_{XX} - M_{YY})^2 + 4M_{XY}^2} \\ b^2 &= 2(M_{XX} + M_{YY}) - 2\sqrt{(M_{XX} - M_{YY})^2 + 4M_{XY}^2} \\ 2\phi &= arctg\left(\frac{2M_{XY}}{M_{XX} - M_{YY}}\right) \end{aligned} \tag{3.24}$$

Затем с помощью уравнения (3.20) рассчитывают ориентацию волокна. Метод вторых моментов основан на предположении, что волокно имеет идеальную цилиндрическую форму. Для большинства стеклянных волокон это предположе-

ние вполне обоснованно. Экспериментальные измерения степени эллиптичности стекловолокон при помощи электронной микроскопии показали, что она не превышает 0,011 (ее вычисляют из отношения длин малой и большой осей эллипса по формуле $e = 1 - b/a$).

На сечении композита могут появиться дефектные и короткие волокна. Чтобы устранить нежелательные объекты, особенности нужно классифицировать. Длина малой оси аппроксимирующего эллипса равна диаметру волокна. Если известны верхняя и нижняя границы диаметра волокон, их можно использовать для устранения артефактов, появляющихся при полировке поверхности. Параметр, называемый коэффициентом соответствия f, позволяет оценить, насколько хорошо сечение волокна соответствует эллипсу:

$$f = \frac{\pi ab - n}{n}, \tag{3.25}$$

где πab - площадь аппроксимирующего эллипса и n – суммарная площадь пикселей, соответствующих сечению волокна. Площадь идеально эллиптичного волокна равна площади аппроксимирующего эллипса, и в этом случае $f = 0$. Сечения волокон, имеющие дефекты типа грязи или царапин, обычно описываются коэффициентом соответствия $0 < f < 0{,}1$, а для фрагментов волокон неэллиптичной формы коэффициент f превышает 0,1.

На рис. 3.38 штриховые линии показывают допустимые интервалы коэффициентов соответствия f и интервала диаметров волокон, в пределах которого объекты представляют собой волокна эллиптического сечения. Эти интервалы были выбраны после ручной обработки 552 объектов на сечении одного образца. Эти интервалы позволяют использовать автоматизированную систему идентификации волокон. Все объекты можно классифицировать по принадлежности к одной из шести прямоугольных областей на рис. 3.38. Доля объектов в каждом прямоугольнике дает оценку качества подготовки образца. Положение вертикальных линий, ограничивающих допустимые значения длины малой оси аппроксимирующего эллипса, зависит от разброса диаметра волокон. Его нужно регулировать в соответствии с исследуемым материалом. Напротив, коэффициент соответствия не зависит от диаметра, и значение $f = 0{,}1$ сохраняется для любого образца.

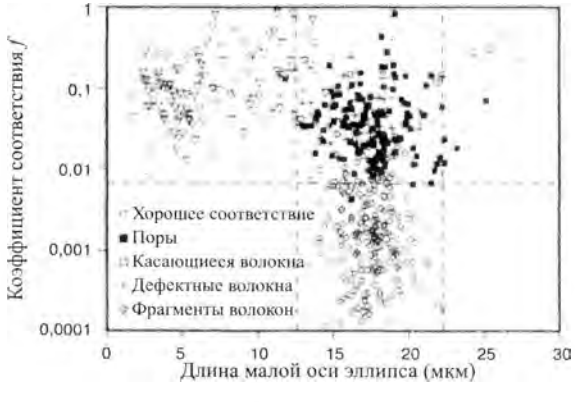


Рис. 3.38. Важно оценить, насколько хорошо поперечное сечение волокна описывается эллипсом. Построив корреляционную зависимость величины коэффициента соответствия от длины малой оси волокна, можно удалить дефекты, торцы волокон и неудачно разделенные группы волокон.

3.3.4. Стереология

Чтобы получить объективные количественные данные, сечение должно быть выбрано случайно. По возможности нужно выявить причины появления систематических ошибок и откорректировать измеряемую величину. В описанном методе волокна анализируют, если они имеют форму эллипса. Вероятность, что плоскость пересечет волокно длиной L, зависит от его ориентации, как показано на рис. 3.39. Например, вероятность пересечения волокна, направленного под углом $\theta = 10°$ к плоскости сечения, гораздо выше, чем для волокна той же длины, ориентированного под углом $\theta = 50°$.

Из простых геометрических соображений получаем, что вероятность пересечения волокна длиной L и диаметром D плоскостью, ориентированной под углом θ к его оси, дается формулой [45]:

$$P(\theta) = L\cos\theta + D\sin\theta \qquad (3.26)$$

В описанном методе учитываются лишь волокна с эллиптическим поперечным сечением. Поэтому данную формулу нужно изменить, чтобы учитывать лишь волокна, сечение которых является полным эллипсом:

$$P(\theta) = L\cos\theta - D\sin\theta \qquad (3.27)$$

При определении распределения по ориентации данные для каждого волокна нужно разделить на вероятность его пересечения плоскостью сечения. Для вычисления вероятности пересечения требуется длина волокна. К сожалению, она неизвестна, поскольку второй конец волокна уходит вглубь материала. На практике в уравнение (3.27) вместо L подставляют среднюю длину волокон $\langle L \rangle$. Кроме того, если волокно не слишком короткое, величиной $D\sin\theta$ можно пренебречь.

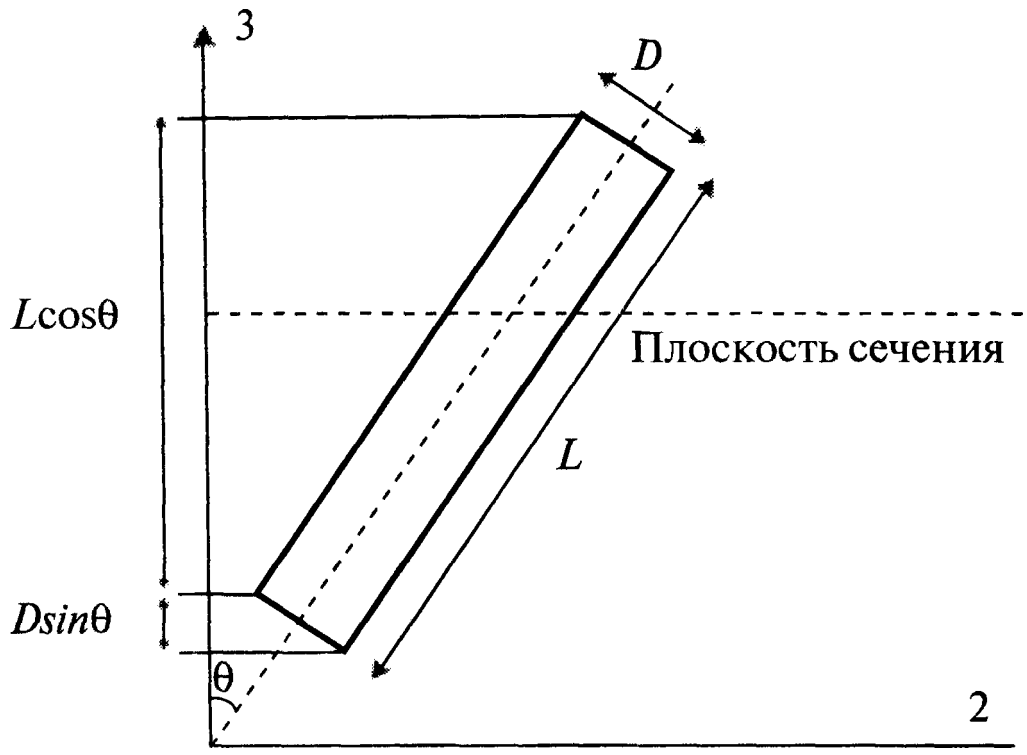


Рис. 3.39. Вероятность пересечения волокна зависит от его ориентации по отношению к плоскости сечения, что приводит к появлению стереологической ошибки.

3.3.5. Разделение касающихся волокон

Описанный в разделе 3.3.3 метод определения ориентации волокон основан на введении порога интенсивности и выделении объектов эллиптической формы. В образцах с большой объемной долей волокон велика вероятность касания соседних волокон. Касающиеся волокна нужно разделить до применения метода

моментов. Эллиптическая кривая является вогнутой во всех точках. Напротив, в точках контакта периметр двух касающихся эллипсов выпуклый (рис. 3.40). Поэтому знак кривизны периметра можно использовать для идентификации касания и определения точек контакта волокон.

Пиксель, имеющий соседей с интенсивностью ниже порога, является пикселем границы особенности. Поэтому пиксели границы легко находятся в процессе роста области. Процедуру определения границы можно начать в произвольном исходном пикселе границы. Затем пиксель за пикселем определяется вся граница, пока не будет достигнута отправная точка. На рис. 3.40 показаны пиксели границы двух касающихся волокон. Процедура определения границы была инициирована в отмеченном пикселе. Соседние пиксели рассматриваются в направлении часовой стрелки, как показано на рисунке, до тех пор, пока не достигнут исходного пикселя границы (4). Этот пиксель становится следующим «активным» пикселем, и процесс повторяется. Указанный порядок посещения соседних пикселей гарантирует, что граница всегда пересекается в том же направлении. Отметим, что эта процедура не работает, если ширина объекта меньше трех пикселей. В этом случае краевые пиксели объекта сомкнутся. Решение этой проблемы состоит в расширении всех объектов изображения путем добавления одного пикселя вокруг каждого пикселя границы, что увеличивает размер всех объектов.

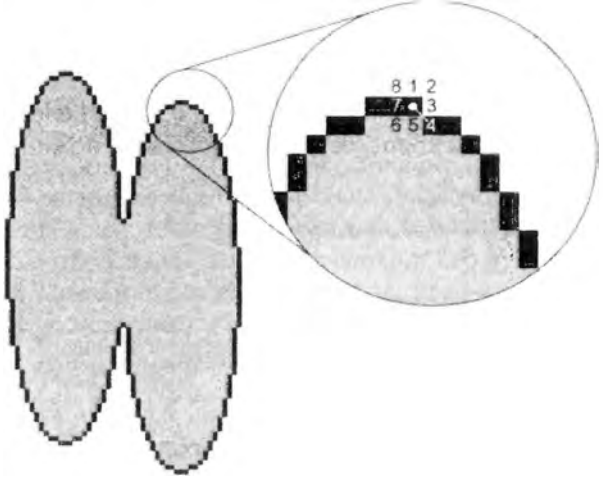


Рис. 3.40. Поперечное сечение двух касающихся волокон с выделенной черным цветом границей. Справа указан алгоритм рассмотрения пиксеклей

Кривизну границы в некоторой точке можно определить, вычислив секанс угла для пикселя границы, находящегося на расстоянии *l* от анализируемого пикселя (рис. 3.41). При последовательном рассмотрении пикселей границы регистрируются точки, в которых отрицательная кривизна. При контакте двух волокон таких точек две. Если контактируют три волокна, точек отрицательной кривизны четыре и так далее. Эти точки объединяют в пары и между ними проводят линии, разделяющие волокна. Данную процедуру иллюстрирует рис. 3.42, на котором имеется большое количество касающихся волокон.

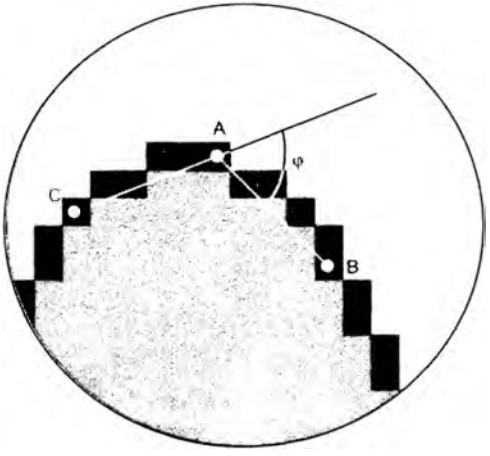


Рис. 3.41. Метод определения знака кривизны границы волокна.

3.3.6. Характеристики степени ориентации волокон

Описанный в этом разделе метод применим для анализа больших объемов данных. Имеется несколько возможностей описания и показа трехмерной информации [46] (раздел 3.2.4). В материаловедении часто используют метод трехмерных частотных графиков, иллюстрируемый рис. 3.43. Если сравнивают два образца или оценивают ориентацию волокон, то требуется более точное описание. Было предложено несколько методов описания степени ориентации волокон, обзор которых приведен в работе [47]. В последнее время наиболее популярным стал тензорный метод [31].

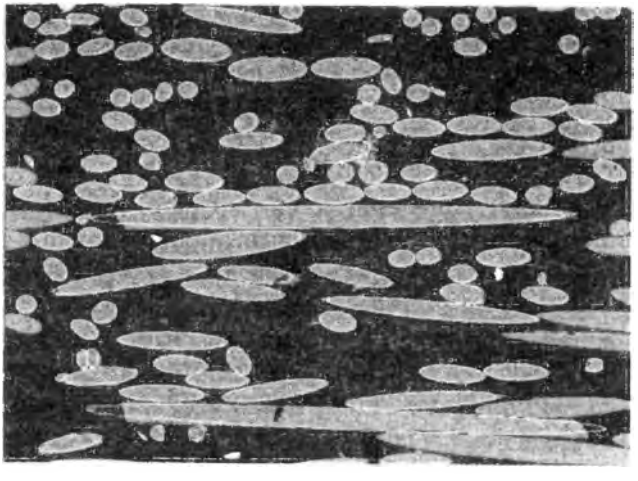


Рис. 3.42. Изображение области размером 566×434 мкм демонстрирует эллиптическую форму волокон. Обратим внимание, что автоматизированная система хорошо справляется с разделением касающихся волокон. Коэффициент соответствия плох лишь для двух волокон в плоскости сечения. Эллипсом не описываются лишь неполные волокна, выходящие за границы кадра, но они станут эллипсами после перемещения образца в плоскости XY.

Пространственная ориентация волокна определяется двумя углами (θ_i, ϕ_i) или вектором единичной длины **p**, ориентированным вдоль его оси:

$$\mathbf{p} = \begin{pmatrix} \sin\theta\,\cos\phi \\ \sin\theta\,\sin\phi \\ \cos\theta \end{pmatrix} \tag{3.28}$$

Группа из n волокон может быть описана тензором ориентации a_{ij}, определяемым парными произведениями для всех индивидуальных волокон:

$$a_{ij} = \frac{1}{n}\left(\sum_{k=1}^{n} p_i^k p_j^k\right) = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} \tag{3.29}$$

На рис. 3.44 приведены типичные распределения ориентации волокон и соответствующие тензоры ориентации.

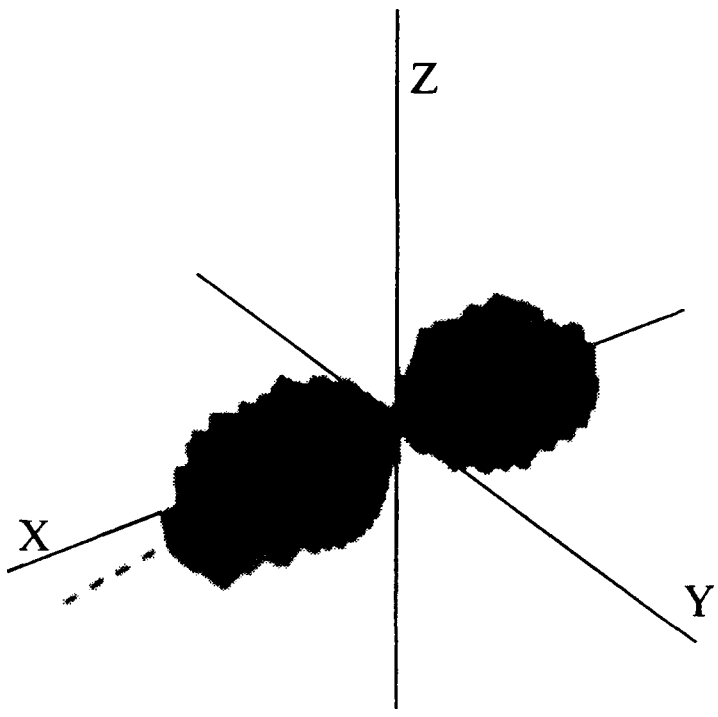


Рис. 3.43. Графическое представление трехмерного распределения ориентации волокон. Симметрия функции распределения относительно начала системы координат обусловлена неоднозначностью определения угла ϕ. Для данного образца разориентация волокон по оси X равна примерно десяти градусам.

Тензорное описание степени ориентации волокон оказалось успешным по ряду причин. Во-первых, в отличие от предшествующих методов, тензор ориентации характеризует распределение в трех измерениях. Для демонстрации ранг тензора может быть уменьшен, как на рис. 3.44. Во-вторых, для более точной характеризации системы ранг тензора может быть увеличен. В-третьих, программное обеспечение часто использует тензоры для описания и других свойств материала. Наконец, тензор ориентации легко интерпретировать.

3.3.7. Анализ процесса многократной инжекции расплава

Важнейшей особенностью слоистых волокнистых композиционных материалов является их анизотропия. В последнее время проявлялся большой интерес к композитам, производимым методом литья под давлением. Анизотропия деталей, получаемых этим методом, менее выражена из-за случайной ориентации волокон в расплаве. Для оптимизации процесса литья и ориентации волокон в нужных

направлениях были разработаны новые технологические методы. Один из них состоит в многократной инжекции расплава [48]. При сдвиге материал постепенно упрочняется вследствие ориентации волокон.

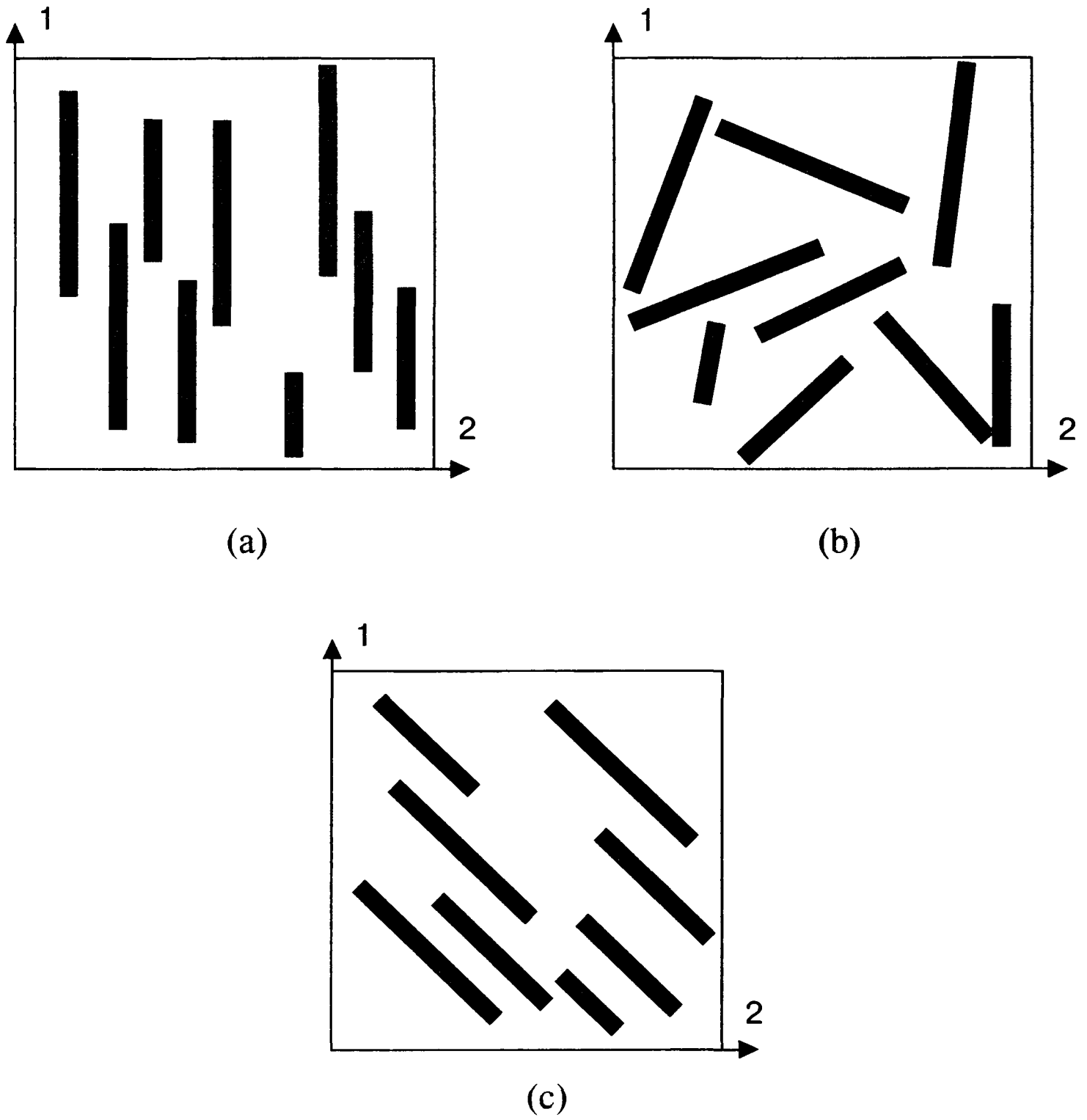


Рис. 3.44. Три примера распределения волокон и соответствующие тензоры распределения. (a) – Однонаправленный композит, $a_{ij} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}$; (b) – изотропная ориентация волокон, $a_{ij} = \begin{pmatrix} 0{,}5 & 0 \\ 0 & 0{,}5 \end{pmatrix}$; (c) - однонаправленный композит, $a_{ij} = \begin{pmatrix} 0{,}5 & 0{,}5 \\ 0{,}5 & 0{,}5 \end{pmatrix}$.

Чтобы оценить эффективность метода многократной инжекции, было изготовлено несколько образцов, один из которых сделали методом однократной инжекции расплава, а остальные – многократной инжекцией с различным количеством циклов. Все образцы разрезали одинаковым образом, после чего изучали распределение ориентации волокон. В каждом образце анализировали ориентацию приблизительно 100 000 волокон, на что требовалось четыре часа работы. Рис. 3.45 иллюстрирует изменение компоненты a_{zz} тензора ориентации в двух образцах. Оказалось, что волокна ориентированы преимущественно в одной плоскости и $a_{yy} \approx 0$. Третий диагональный компонент тензора может быть найден из формулы $a_{xx} = 1 - a_{zz}$. Распределение ориентации волокон в образце, полученном однократной инжекцией расплава (рис. 3.45a), демонстрирует цетральную и две ориентированных поверхностные области, что типично для композитов, полу-

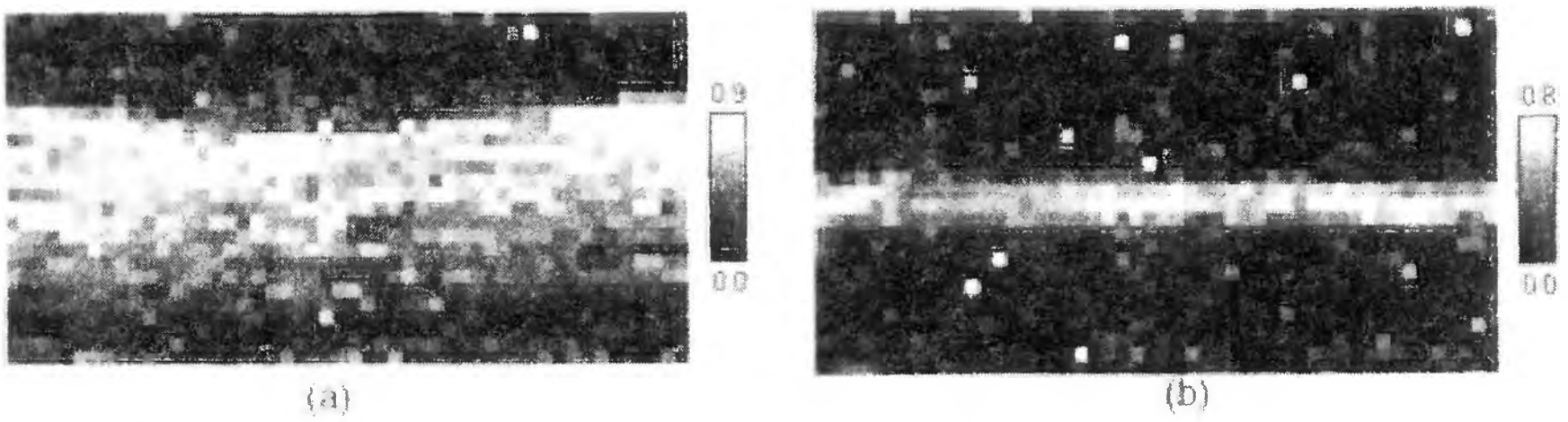


Рис. 3.45. Сканирование по толщине волокнистого композита, полученного литьем под давлением (размером 9,12×5,25 мм). Интенсивность каждого квадрата демонстрирует среднее значение величины <cos $2\theta z$>, характеризующей ориентацию волокон в области размером 0,2×0,2 мм. Обратим внимание, что изолированные белые квадраты, окруженные темными квадратами, соответствуют областям, в которых отсутствуют волокна. В образце, полученном однократной инжекцией расплава (a), наблюдается широкая центральная область, в которой волокна ориентированы перпендикулярно волокнам в поверхностных слоях. После восьми циклов инжекции (b) центральная область становится очень тонкой, а поверхностные области – широкими.

ченных литьем под давлением. Многократная инжекция расплава (рис. 3.45b) увеличивает степень ориентации волокон, и после 9 циклов центральная зона становится узкой.

3.3.8. Заключительные замечания

Выше показано, как автоматический анализ изображения позволяет увеличить эффективность получения данных по сравнению с ручными методами. Однако мы не рассмотрели некоторые особенности автоматизированного анализа изображения композита. Во-первых, если волокно почти параллельно плоскости сечения, пересекающего оба его конца, то сечение будет иметь прямоугольную форму. Описанный выше метод определяет ориентацию волокон, имеющих эллиптическое сечение. По этой причине существует предельный угол θ_c, выше которого волокна не анализируются. При $\theta > \theta_c$ эллипс плохо аппроксимирует прямоугольное сечение волокна, и коэффициент соответствия f выше 0,1. Поэтому нужно проявлять осторожность при разрезании образца, чтобы избежать появления большого количества волокон с высоким значением коэффициента f. Альтернативный подход состоит в изменении программы анализа изображения для учета волокон с почти прямоугольным сечением [45]. Во-вторых, мы не рассматривали точность определения ориентации волокон. Уравнение, определяющее ориентацию волокна, нелинейно, а ошибки измерения особенно велики при a ≈ b, когда волокна почти перпендикулярны плоскости сечения [12].

3.4. Измерение длины волокон

3.4.1. Краткое описание

В этом разделе описан метод измерения длины волокон, размер которых превышает размер поля зрения. Это достигается путем построения панорамы из не-

скольких сотен кадров. Ниже описан образец, армированный тысячами достаточно длинных волокон. Часть волокон не помещалась в поле зрения, а некоторые из них пересекались. Обе эти проблемы удалось решить, что позволило найти распределение длины волокон.

3.4.2. Введение

Волокнистые композиты имеют высокую прочность лишь при достаточно большой длине волокон. Их часто делают ручной укладкой жгутов, что является весьма трудоемкой и дорогостоящей процедурой. В случае коротких рубленых волокон можно использовать менее трудоемкие технологические методы типа литья под давлением. Этот метод заключается в том, что деталь изготавливают, заливая в форму смесь расплава полимера и волокон. Хотя исходную длину волокон можно контролировать, в процессе литья они дробятся, и конечная длина волокон в детали оказывается неизвестной.

При деформировании детали из композиционного материала полимерная матрица и волокна работают совместно. Эффективность армирования зависит от того, насколько удалось нагрузить волокна путем передачи напряжения от матрицы. На рис. 3.46 показано распределение напряжения в длинном и коротком волокнах, окруженных блоком матрицы, к которой приложено одинаковое растягивающее напряжение. Растягивающее напряжение в волокнах рассчитывали в сдвиговом приближении, согласно которому волокна несут нагрузку, а матрица перераспределяет напряжение между ними [49]. В случае длинного волокна напряжение в широкой области плато вблизи середины волокна постоянно. В этой области волокно полностью нагружено и работает аналогично волокну бесконечной длины. Вблизи концов напряжение снижается. Напряжение в коротком волокне значительно ниже, и, следовательно, оно менее эффективно несет нагрузку. Очевидно, длина волокон существенно влияет на прочность композиционного материала.

Длину волокон можно оценить исходя из свойств детали. Однако такая оценка ненадежна, потому что на те же свойства могут независимо влиять и другие параметры микроструктуры композита. Прямое измерение длины волокон гораздо надежнее. Метод последовательного оптического сечения композита, используемый для определения ориентации волокон, применим и для измерения их длины. Недостатком этого метода является его трудоемкость. Существует менее трудоемкий стереологический подход, позволяющий вычислить среднюю длину волокон исходя из одного [45] или двух сечений [50]. Однако определить распределение длины волокон этим методом нельзя.

Длину волокон можно измерить, удалив матрицу путем растворения или пиролиза. На рис. 3.47 показаны стеклянные волокна после выжигания полимерной матрицы в печи при температуре 450-500°С в течение 3 часов. Отметим, что в случае углеродных волокон матрицу выжечь нельзя и ее нужно растворять кислотой. Длину волокон можно измерить из оптических фотографий после удаления артефактов методом выделения областей.

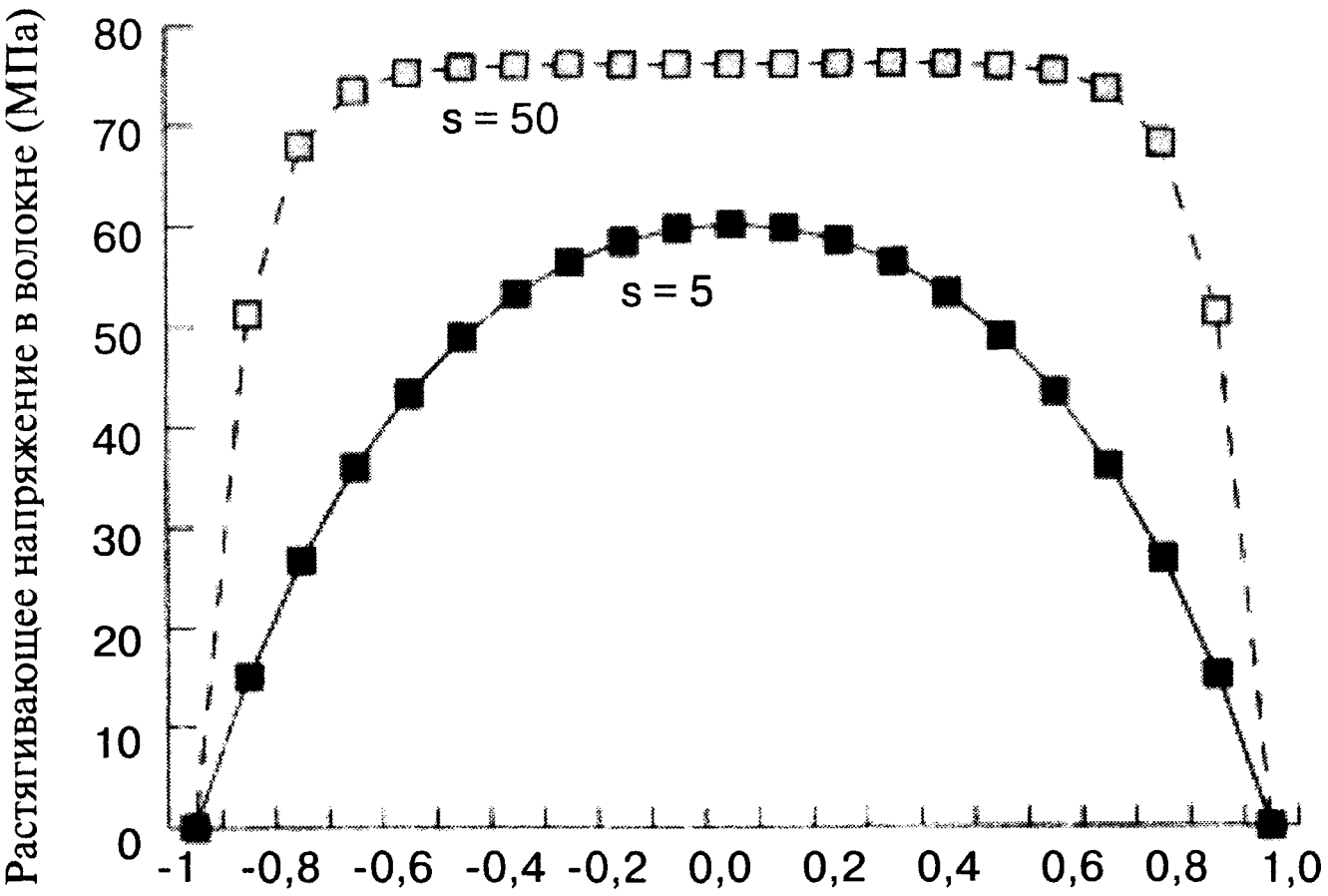


Рис. 3.46. Профиль напряжения в длинном (s = 50) и коротком (s = 5) волокнах; s - отношение длины к диаметру волокна. Вычисления выполнялись в сдвиговом приближении [49] для стеклопластика на основе матрицы нейлон-66 при объемной доле волокон 30%.

3.4.3. Области детекции

В данном конкретном случае проблема выделения областей проста. В режиме проходящего света объекты представляют собой или волокна, или фон, явно различающиеся по интенсивности (рис. 3.47). Это позволяет выбрать порог, который при постоянной интенсивности освещения может быть постоянным для всех кадров. После введения порога объекты можно определить методом роста области. Если можно избежать пересечения волокон на предметном стекле или в чашке Петри, анализ изображения прост. При выполнении процедуры объединения пикселей определяются координаты концов каждого волокна, из которых вычисляется их длина. Однако это условие можно выполнить, если вручную разделять каждое волокно. Объекты на рис. 3.47 представляют собой отдельные и пересекающиеся волокна. Следовательно, требуется анализ изображения, позволяющий разделить различные волокна.

При автоматизированном анализе образов задача идентификации края объектов и учет их пересечений возникает довольно часто. Например, если робот видит неизвестный объект, он может идентифицировать его как куб, определив его грани [51]. Задачу автоматизированной идентификации волокон решили аналогично, описав каждое волокно прямыми линиями, формирующими его границы. Если имеется множество пересекающихся волокон, их границы будут составлены из нескольких отрезков прямых линий. При этом нужно определить, какому волокну принадлежит каждый отрезок (рассмотрев его координаты и ориентацию).

Прямая линия описывается уравнением:

$$x \cos \theta + y \sin \theta = \rho, \tag{3.30}$$

где ρ - расстояние от прямой до начала системы координат, а угол θ описывает ориентацию прямой. На рис. 3.48а показаны два пересекающихся волокна, которые

Рис. 3.47. Изображение волокон в оптическом микроскопе проходящего света после пиролиза матрицы. Обратим внимание на наличие пересекающихся волокон.

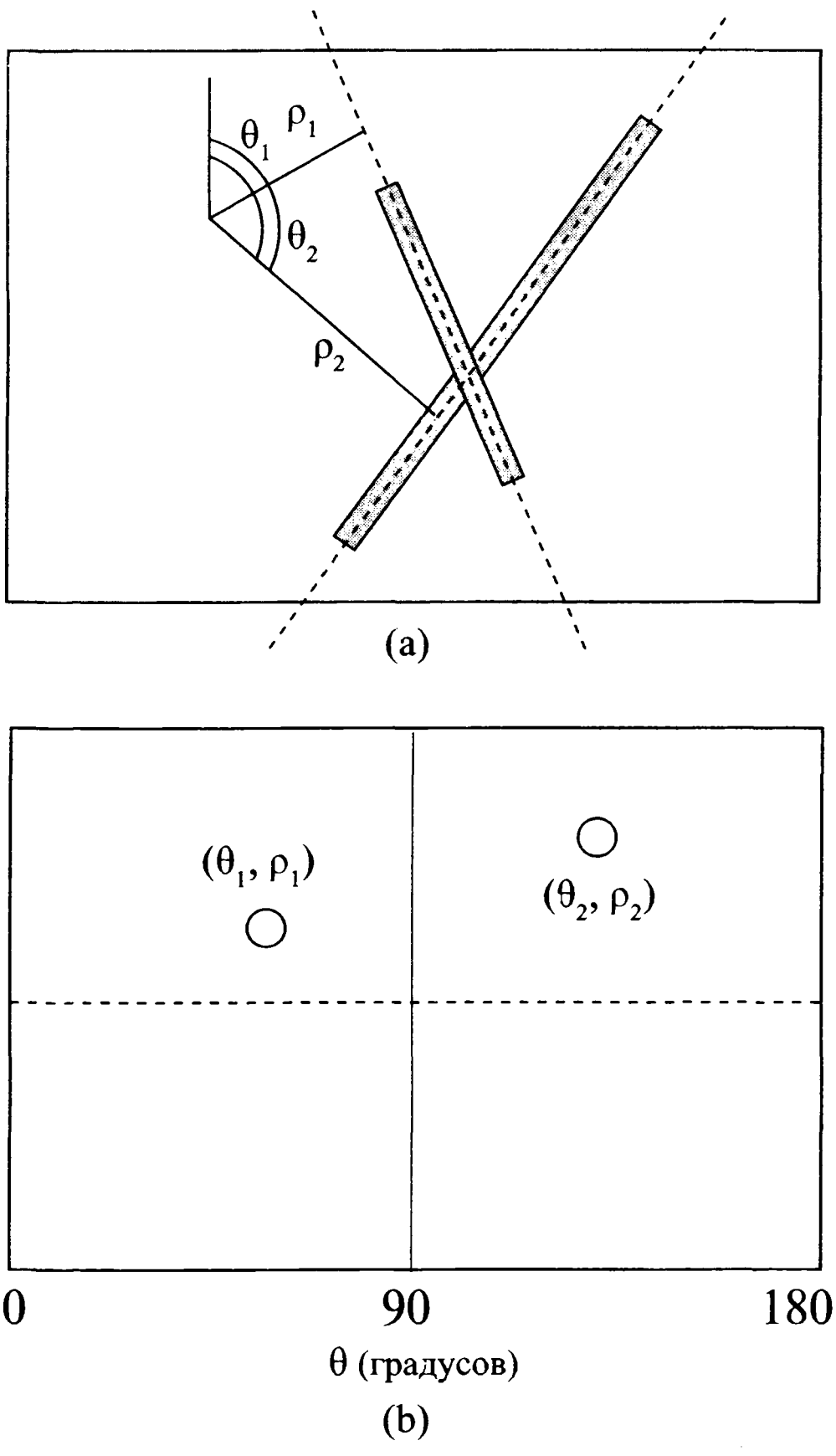


Рис. 3.48. (a) - Система координат, используемая для определения ориентации волокна; (b) - группы волокон в координатах (θ, ρ).

методом роста области идентифицируются как один объект. Игнорируя короткие линии, соответствующие концам волокон, границы объекта состоят из восьми отрезков прямых. Четыре отрезка, описанные параметрическим уравнением (3.30), соответствуют одному волокну, если они имеют одинаковый угол ориентации θ, а расстояние от них до начала системы координат равно ρ или $\rho + \Delta\rho$, где $\Delta\rho$ – диаметр волокна. Описание границы волокон в координатах θ и ρ (рис. 3.48b) позволяет разделить пересекающиеся волокна. Этот способ является основой метода измерения длины волокон.

3.4.4. Метод

В описываемом здесь методе используется двойное преобразование цифрового изображения, позволяющее определить координаты индивидуальных волокон и их групп. Идентифицируются пиксели краев каждого объекта, и определяется периметр объектов. После этого периметр каждого объекта делится на прямолинейные отрезки, характеризуемые расстоянием до начала системы координат ρ и углом ориентации θ. Эти параметры используют для определения отрезков границы одного волокна. Наконец, длину каждого волокна определяют из длины этих отрезков.

Рис. 3.47 имеет превосходный контраст волокон и фона, что облегчает выбор порога интенсивности. Все объекты определяли методом роста области, описанным в разделе 2.8.6. В разделе 3.3.5 касающиеся волокна были разделены путем определения точек отрицательной кривизны на периметре. Множественные пересечения волокон разделяли методом идентификации отрезков. На рис. 3.49 показаны четыре пересекающихся волокна. Программа определяла границу объекта и вычисляла кривизну в каждом пикселе. График кривизны границы представлен на рис. 3.49. Он позволяет идентифицировать отрезки прямых, составляющих периметр.

После идентификации прямолинейных отрезков программа запоминает значения координат θ и ρ, соответствующих уравнению (3.30). Однако это уравнение не позволяет определить длину волокна, и поэтому в памяти сохраняются начальные и конечные координаты каждого сегмента. Если координаты θ и ρ двух или нескольких отрезков практически совпадают, это означает, что они являются сегментами одного волокна. Полученные величины координат находятся в двух группах (θ, ρ) и (θ, $\rho+\Delta\rho$), где $\Delta\rho$ - диаметр волокна. Ориентацию волокна определяли усреднением величин θ и ρ для отрезков, являющихся сегментами одного волокна. Найдя начальную и конечную точки отрезков, определяли две наиболее удаленные точки и вычисляли длину волокна.

Данный анализ предполагает, что волокно идеально прямое, хотя это условие может и не выполняться. Искривление волокна можно заметить, если его длина достигает нескольких миллиметров. Однако искривление волокна не может привести к появлению дополнительных пиков на графике кривизны, аналогичных представленному на рис. 3.50. Поэтому границу волокна можно аппроксимировать рядом отрезков (рис. 3.51). Однако искривление может приводить к занижению длины волокон. Решение этой проблемы состоит в ограничении максимальной длины любого отрезка, как показано на рис. 3.51. Значения θ и ρ для отрезков изогнутого волокна отличаются не слишком сильно, и поэтому искривление удается отличить от пересечения волокон. В случае изогнутых волокон полная длина рассчитывается суммированием длин смежных отрезков.

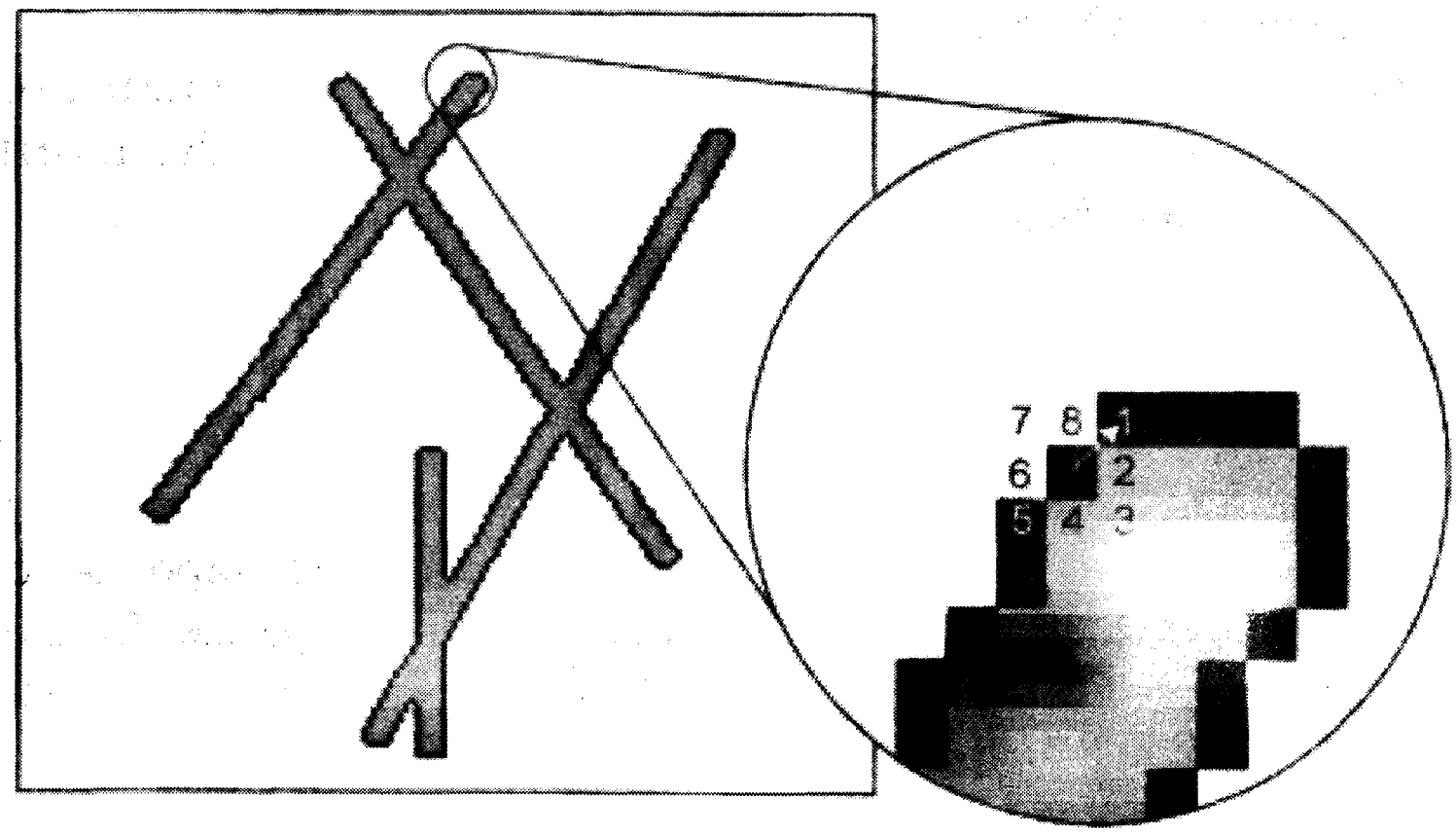


Рис. 3.49. Схема, демонстрирующая пересекающиеся волокна и метод определения угла наклона линии границы.

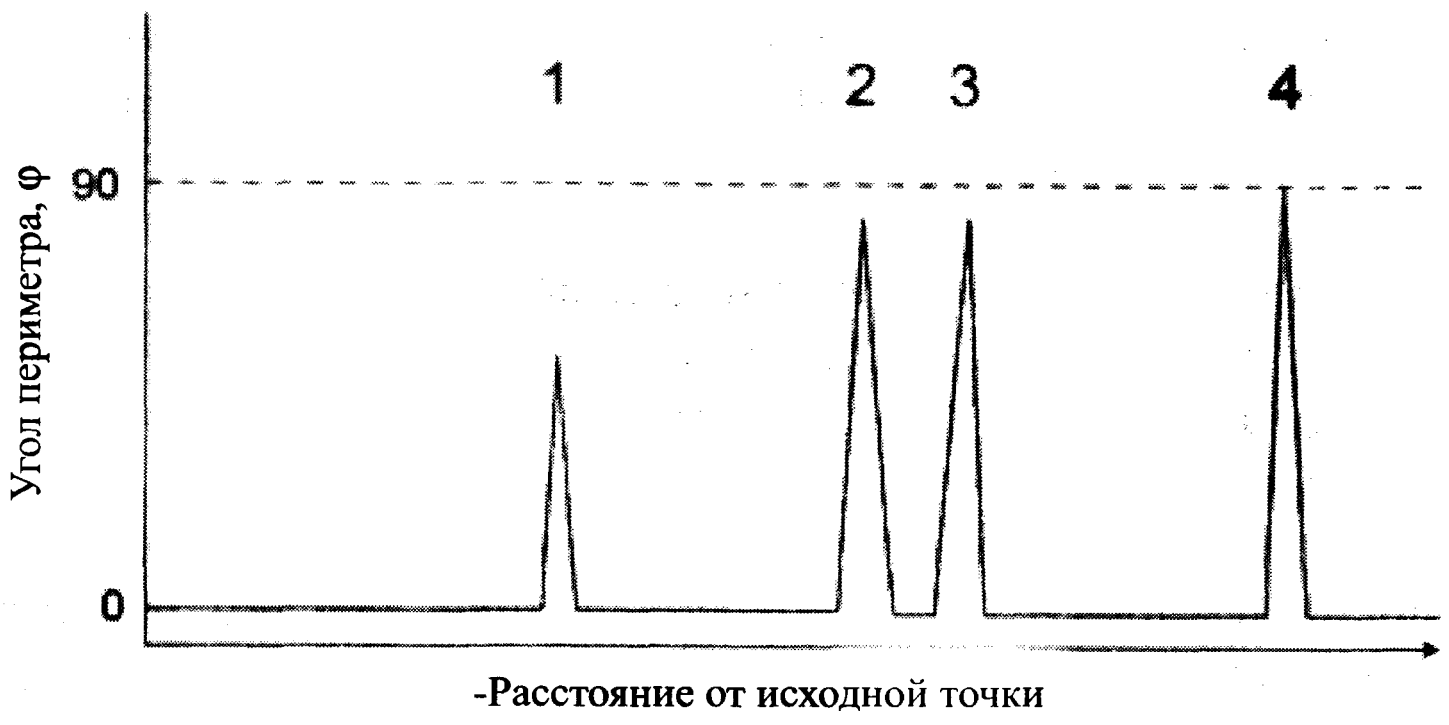


Рис. 3.50. Типичные значения кривизны для пересекающихся волокон.

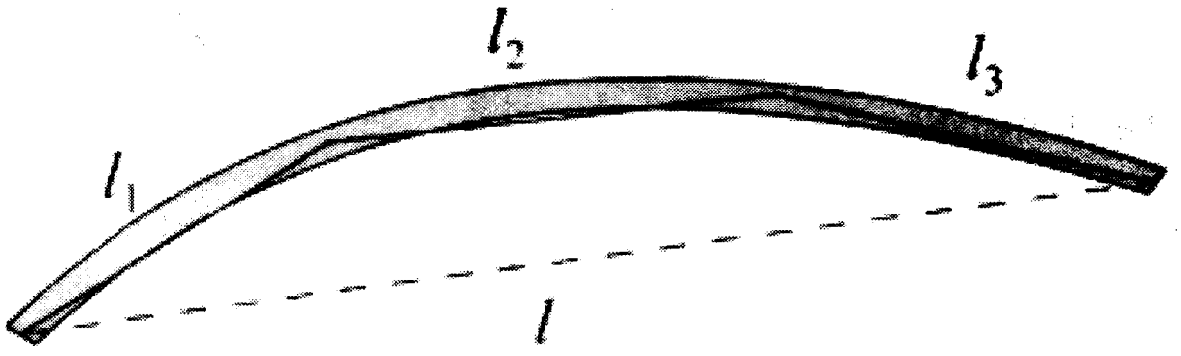


Рис. 3.51. Длину изогнутого волокна определяют, суммируя длины множества коротких прямолинейных фрагментов.

Для определения границы микроскоп должен иметь достаточное увеличение, и диаметр волокна должен быть равен длине нескольких пикселей, чтобы избежать необходимости в искусственном увеличении толщины, о чем говорилось выше. В используемой авторами системе поле зрения имело размер 1,2×1,1 мм при увеличении 16,5×. При этом увеличении диаметр волокна (≈10 мкм) соответствует длине 5 пикселей. Максимальная длина волокна на одном кадре не превышает 1,6 мм. Измерение длины на отдельных кадрах, не объединенных в единую панораму,

приводит к существенной недооценке длины волокна. Если длина волокна не превышает 300 мкм, эту задачу можно решать методом «дисекции», описанным в главе 2. Однако кластеры перекрещивающихся волокон могут иметь намного больший размер, что неизбежно приводит к ошибке.

3.4.5. Результаты

При развитии любого метода автоматизированной обработки изображения необходимо сравнение полученных результатов с измерениями, полученными другим способом. Проверка метода может состоять и в автоматизированном анализе образца, для которого измеряемые параметры известны заранее. Еще одной возможностью является сравнение с результатами, полученными ручными измерениями.

Для проверки метода композит, армированный непрерывными стеклянными волокнами, разрезали на части длиной приблизительно 5 мм, матрицу выжгли, а волокна рассеяли на чашке Петри. После этого сканировали площадь размером 70×70 мм и определили длину приблизительно 2 000 волокон. На рис. 3.52 приведено полученное распределение длины волокон. На распределении наблюдается пик при длине 5,2 мм, а ширина распределения равна приблизительно 0,5 мм, что демонстрирует правильную работу алгоритма автоматизированного определения длины.

Чтобы продемонстрировать работу данного метода на образце с неизвестным распределением длины волокон, исследовали композит, полученный методом литья под давлением. Образец разрезали, а затем разделили центральную и поверхностную области. После этого выжгли матрицу и исследовали эти области композита. Полученные результаты представлены на рис. 3.53. В центральной области композита волокна немного длиннее. Это можно объяснять тем, что при заполнении формы в поверхностных областях сдвиговые напряжения выше, что приводит к более сильному дроблению волокон.

3.5. Последние достижения

3.5.1. Последовательные 2D-сечения

Следующий логический шаг состоит в переходе от анализа одиночной полированной поверхности к анализу последовательности сечений образца, что позволяет исследовать 3D-структуру композита. К сожалению, это очень трудоемкая задача, и имеется лишь несколько публикаций, в которых описано использование этого метода!

Имеется несколько публикаций, в которых анализировали два или несколько соседних изображений в одной плоскости [53, 54]. Однако авторам данной книги известно лишь несколько успешных попыток последовательного физического сечения образца с целью исследования его 3D-структуры. Это делают, устанавливая соответствие изображений волокон на последовательных сечениях образца [55, 56]. Палуч [55] предпринял попытку определить изогнутость волокон в однонаправленном углепластике. Он получал при большом увеличении единственное изображение, после чего удалял слой материала толщиной 20 мкм и снова поли-

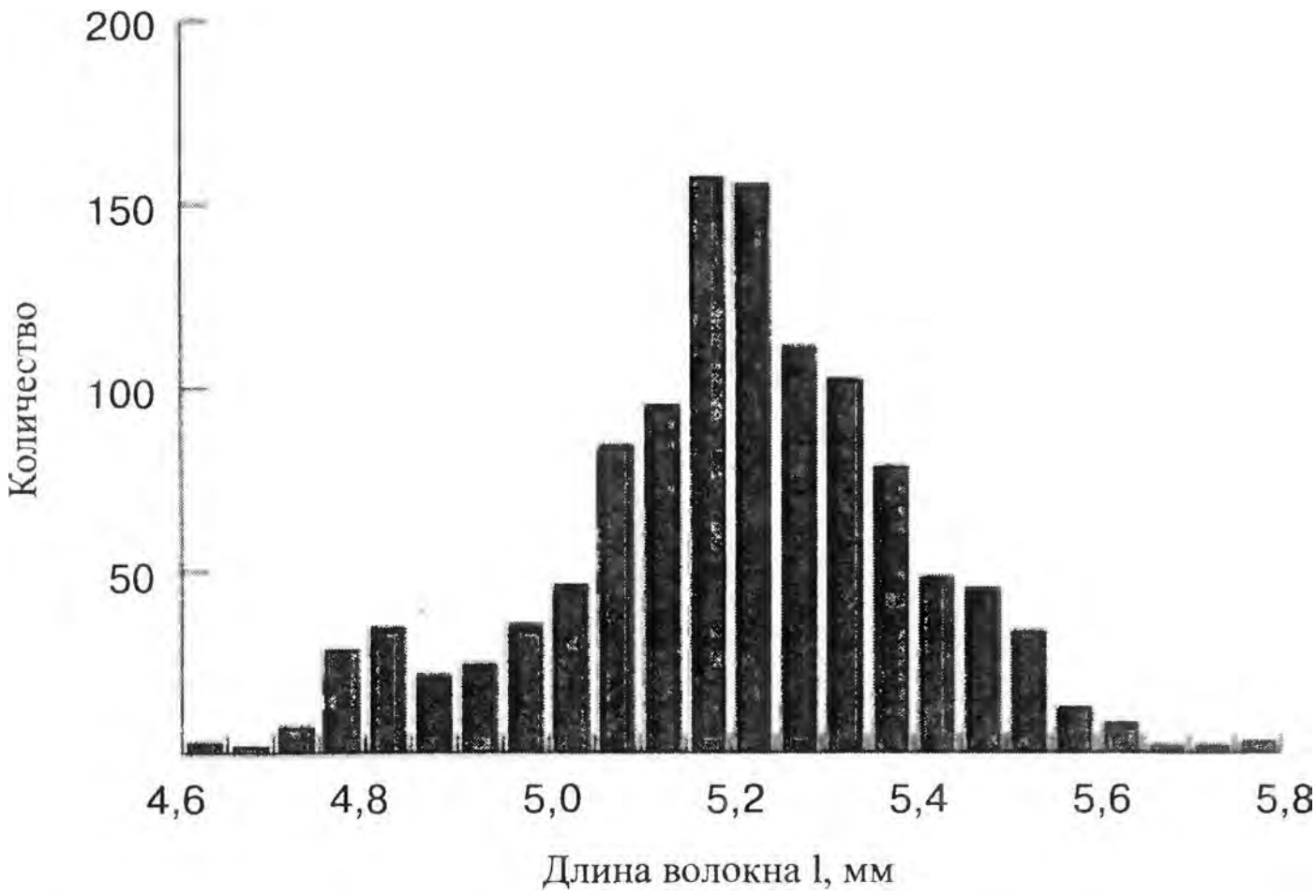


Рис. 3.52. Гистограмма распределения длины волокон в образце однонаправленного материала длиной 5 мм. Длина волокон описывается нормальным распределением со средним значением 5,2 мм, как и ожидалось.

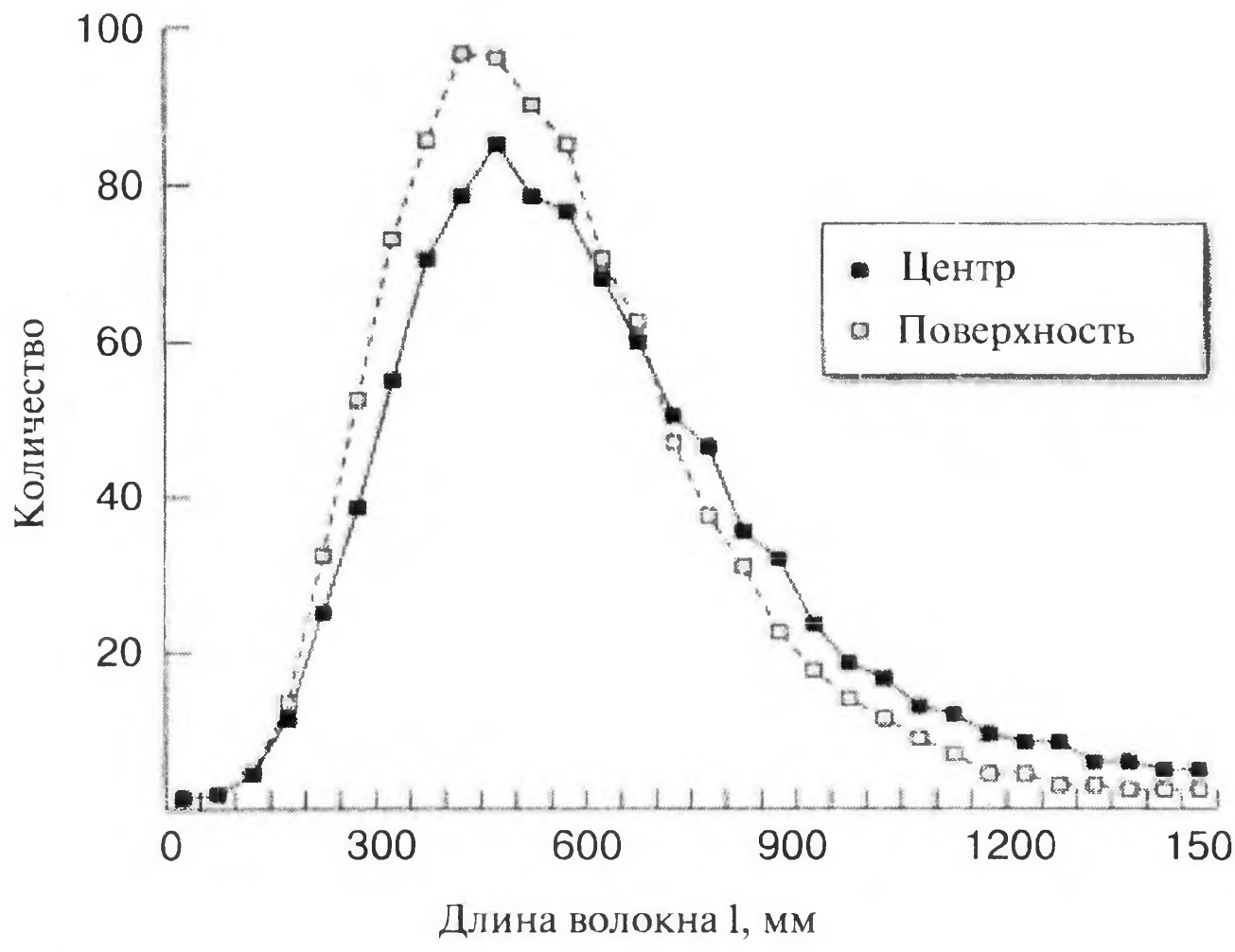


Рис. 3.53. Распределение длины волокон в подповерхностной и центральной областях композита, полученного литьем под давлением. Кривые демонстрируют широкое распределение по длине. Нормировка результатов показывает, что в центральной области длинных волокон больше.

ровал ту же поверхность. Эта процедуру повторяли 40 раз через каждые 20 мкм. Проблема состояла в получении хорошего соответствия последующих кадров. Ее решение было основано на минимизации «случайных» движений центра волокон на последовательных сечениях, как показано на рис. 3.54а. Недостатком этой методики является то, что при коррелированной волнистости волокон она имеет тенденцию к занижению кривизны волокон. Кроме того, проблемой является определение с субмикронной точностью толщины Δz удаленного материала.

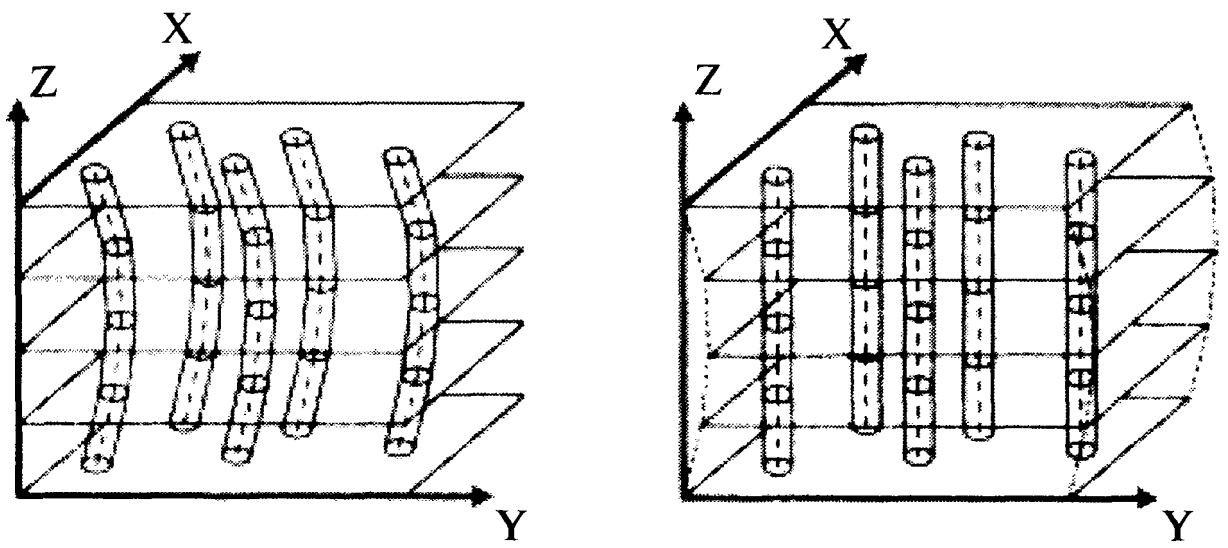


Рис. 3.54. (a) - Метод определения кривизны волокон путем последовательного удаления слоев определенной толщины. Если волокна изогнуты совместно (b), этот метод приводит к недооценке кривизны волокон.

Палуч [55] пытался найти соответствие последовательных изображений небольшой области, полученных с высоким пространственным разрешением. Анализ большой области может значительно улучшить соответствие различных областей образца. Задача состоит в получении высококачественного изображения волокон и точном определении координат их центров. Анализ последовательности оптических сечений позволяет исследовать объемную структуру полупрозрачных волокнистых композитов. При этом также устраняется неоднозначность определения угла ϕ.

Рассмотрим площадь размером 5×5 мм в плоскости XY, изображение которой получено в сечении A. После удаления слоя материала и полировки образца ту же площадь сканировали в сечении B. При повторной установке образца на предметный столик появляется небольшой сдвиг (Δx, Δy) и вращение (ψ) образца, как показано на рис. 3.55.

Связь между соответствующими точками в системах координат A(x, y) и B(x', y') дается формулами:

$$x_i' = x_i \cos\psi - y_i \sin\psi + \Delta x \qquad (3.31)$$

$$y_i' = x_i \sin\psi + y_i \cos\psi + \Delta y \qquad (3.32)$$

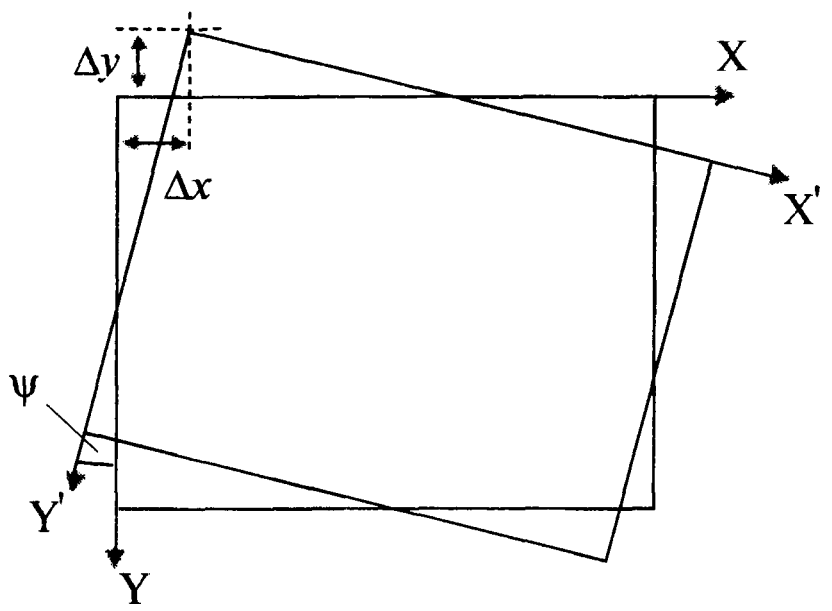


Рис. 3.55. После физического сечения образца он может сдвинуться на величину (Δx, Δy) и повернуться на угол ψ. Следовательно, при сканировании большой площади координаты центров волокон будут связаны преобразованием систем координат (X, Y) и (X', Y').

На изображении важно найти особенности, ясно видные на соседних сечениях. Если найдено n контрольных точек на обоих сечениях, величину сдвига и угол поворота можно найти методом наименьших квадратов, минимизирующим сумму квадратов ошибок. Для этого приравняем нулю частные производные по Δx, Δy и ψ и получим линейную систему уравнений:

$$\cos\Psi = \frac{n\sum_{i}^{n}(y_i y_i' + x_i x_i') - \sum_{i}^{n} x_i \sum_{i}^{n} x_i' - \sum_{i}^{n} y_i \sum_{i}^{n} y_i'}{C} \tag{3.33}$$

$$\sin\Psi = \frac{n\sum_{i}^{n}(x_i y_i' - x_i' y_i) + \sum_{i}^{n} y_i \sum_{i}^{n} x_i' - \sum_{i}^{n} x_i \sum_{i}^{n} y_i'}{C} \tag{3.34}$$

$$\Delta x = \frac{-\sum_{i}^{n} x_i \sum_{i}^{n}(y_i y_i' + x_i' x_i) + \sum_{i}^{n} y_i \sum_{i}^{n}(x_i y_i' - x_i' y_i) + \sum_{i}^{n}(x_i^2 + y_i^2)\sum_{i}^{n} x_i'}{C} \tag{3.35}$$

$$\Delta y = \frac{-\sum_{i}^{n} y_i \sum_{i}^{n}(y_i y_i' + x_i' x_i) - \sum_{i}^{n} x_i \sum_{i}^{n}(x_i y_i' - x_i' y_i) + \sum_{i}^{n}(x_i^2 + y_i^2)\sum_{i}^{n} y_i'}{C} \tag{3.36}$$

$$C = n\sum_{i}^{n}(x_i^2 + y_i^2) - \left(\sum_{i}^{n} x_i\right)^2 - \left(\sum_{i}^{n} y_i\right)^2 \tag{3.37}$$

Однонаправленный композит можно разрезать нормально направлению укладки волокон, и контрольными особенностями в этом случае являются волокна. Поскольку сечение размером 5×5 мм может содержать более 15 000 волокон, на диагонали изображения выделили n групп, состоящих из шести ближайших волокон (рис. 3.56). Предположили также, что на расстоянии порядка диаметра (10–20 мкм) волокна сохраняют свое относительное расположение в группе.

Каждую выбранную группу в сечении A характеризовали набором углов l_n и расстояний l_n между элементами группы, как показано на рис. 3.57. Эти данные

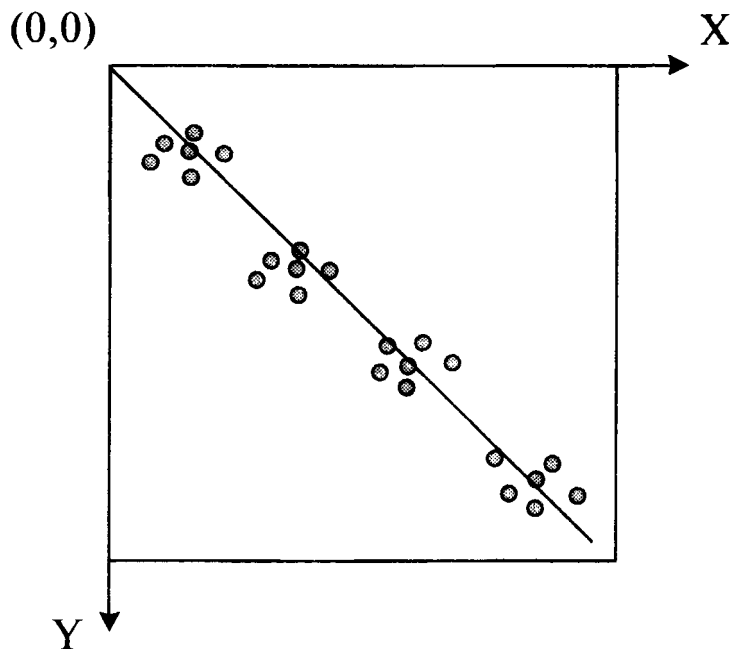


Рис. 3.56. Чтобы определить величину сдвига и угол поворота двух последующих изображений, можно рассмотреть положение групп волокон, находящихся на диагонали области сканирования

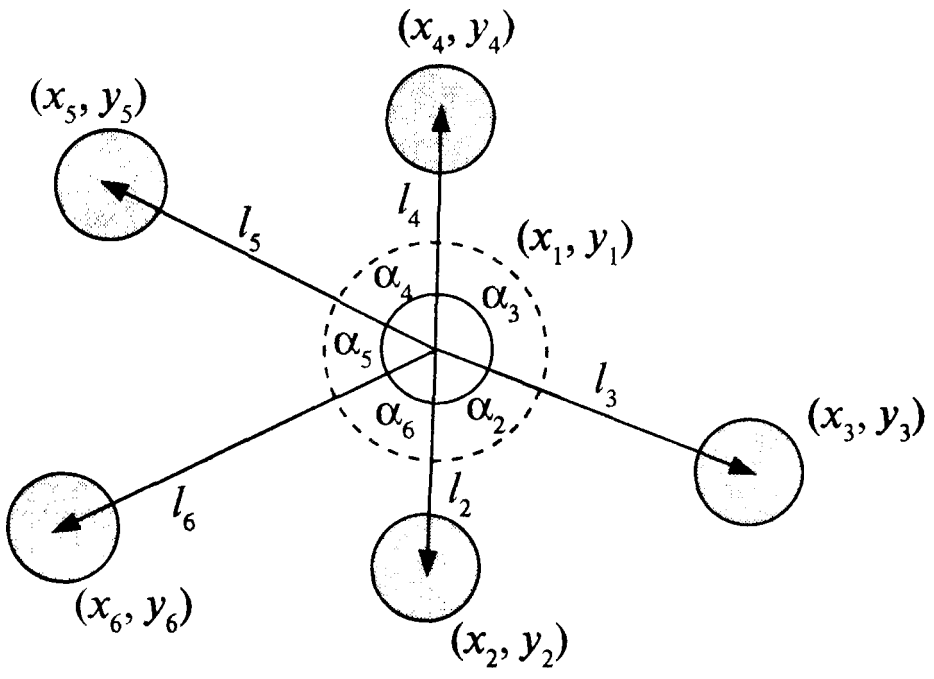


Рис. 3.57. Для анализа важно выбрать некоторые легко узнаваемые особенности, общие для соседних оптических сечений. Удобным началом системы координат является центр небольшой группы волокон.

дают ориентационно-независимое определение каждой группы в сечении B. Как следствие, определяются величины относительного сдвига и угла вращения сечений A и B. После этого преобразуются координаты центров всех волокон на плоскости B, чтобы устранить сдвиг и поворот относительно системы координат сечения A. Первые результаты, полученные при помощи этого метода, представлены в работе [40].

3.5.2. Изучение трехмерной структуры композита

Изучение 3D-структуры композита путем объединения сотен или тысяч кадров требует много времени и терпения. Было бы лучше определить 3D-мезоструктуру композиционного материала изучением одного полированного сечения. Один из способов решения этой задачи описан в следующей главе. Он состоит в использовании конфокального сканирующего лазерного микроскопа. Однако имеется и другое решение этой задачи, которое было опубликовано совсем недавно, состоящее в получении последовательных оптических сечений материала. Этот метод позволяет получать изображение в режиме реального времени, и его можно использовать для изучения полупрозрачных материалов типа стеклопластика.

В работе [38] исследовали 3D-структуру композита на основе 30 вес.% стеклянных волокон и термопластичной матрицы, показатель преломления которой близок к показателю преломления волокон. Для определения ориентации волокон в композит вводили 0,1 вес.% непрозрачных углеродных волокон. Микроскоп легко сфокусировать на углеродные волокна, находящиеся на различной глубине. Если перемещать объектив по оси Z, плоскость фокусировки перемещается вглубь образца. В отличие от рассмотренного выше метода Палуча, плоскости оптического сечения гарантированно параллельны, что обеспечивает однозначное определение координат волокон.

Пространственное разрешение этого метода равно нескольким микронам для осей X и Y и приблизительно 10 мкм для оси Z. Необходимость различия показателей преломления волокон и матрицы ограничивает диапазон материалов, которые можно исследовать этим методом. Тем не менее, он позволяет определить 3D-ориентацию волокон даже на существенной глубине от поверхности (1,3 мм)

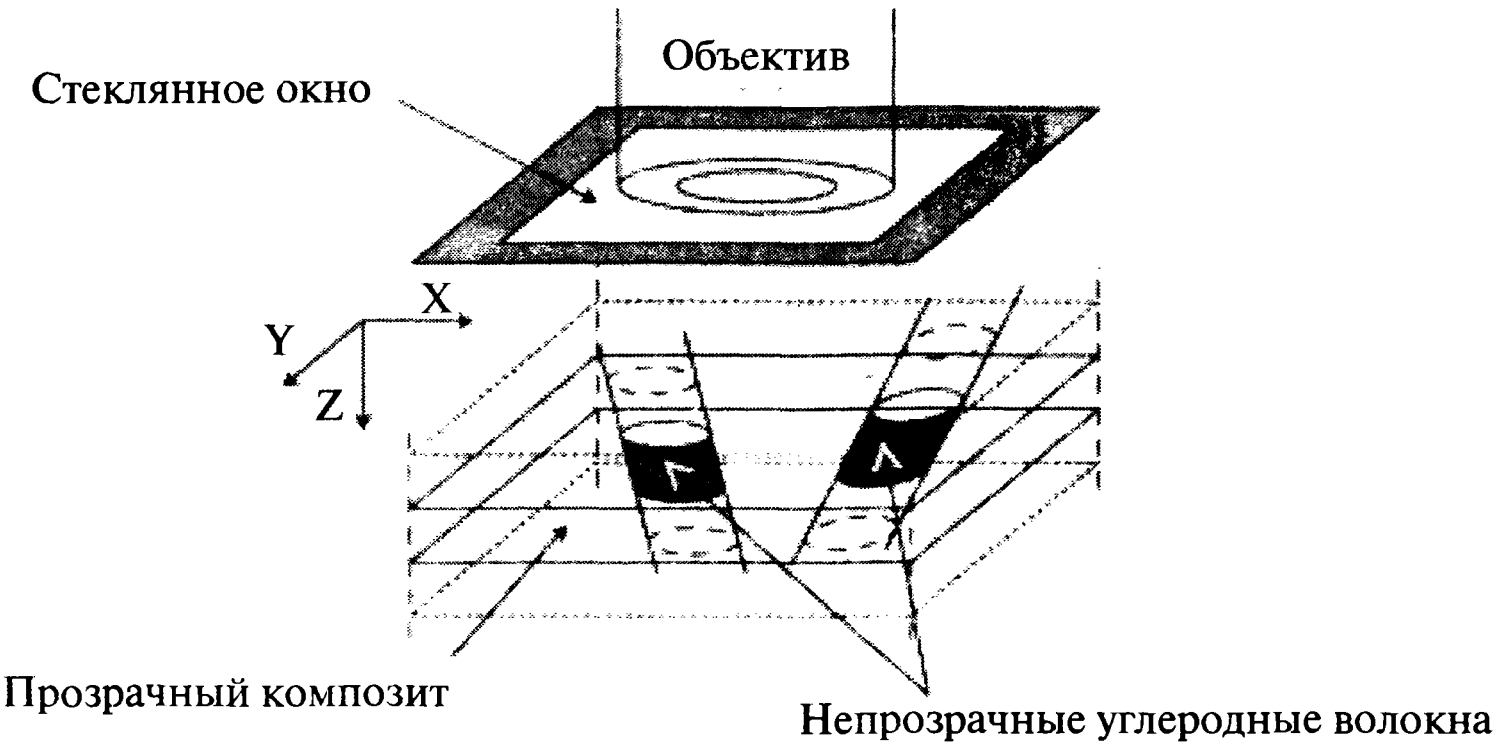


Рис. 3.58. Метод оптических сечений Мак-Графа и Вилли, позволяющий получать оптические сечения композита на значительной глубине, используя углеродные волокна для увеличения контраста при больших глубинах.

при высокой скорости работы системы (1–10 мм^3/мин). Рис. 3.58 иллюстрирует принцип работы этого метода. Прозрачное окно на боковой поверхности пресс-формы позволяет исследовать движение волокон и оценить ошибки измерения. Обратим внимание, что пространственное разрешение этого метода не достигает субмикроннных значений метода КСЛМ, описываемого в следующей главе.

Самый последний метод изучения 3D-структуры, исходя из двумерных оптических сечений материала, описан на веб-сайте 3dRESOLVE. Для повышения контраста матрицы и волокон образцы поместили в темную эпоксидную смолу. Последовательным оптическим сечением получили тысячи плоских сечений, отстоящих друг от друга на десятки микрон, определили соответствующие области образца и построили 3D-структуру. Авторы назвали эту процедуру *цифровым построением объемного изображения*.

3.6. Литература

1. Piggott M.R. (1994), The effect of fibre waviness on the mechanical properties of unidirectional fibre composites, *Proc. Conf. on Mesostructures and Mesomechanics in Fibre Composites*, ed M R Piggott, Univ. of Toronto, pp 145-158.
2. MlekuschB., Lehner E.A. and GeymayerW. (1999), Fibre orientation in short-fibre-reinforced thermoplastics I: Contrast enhancement for image analysis, *Comp. Sci. Tech.*, **59**, 543-545.
3. Haynes R. (1984), *Optical Microscopy of Materials*, Blackie & Son Ltd, pp 94-110.
4. Fynn G.W. and Powell J.A. (1983), *Cutting and Polishing Optical and Electronic Materials*, 2nd edn, Adam Hilger, Bristol.
5. Bay R.S. and Tucker III C.L. (1992), Stereological measurement and error estimates for three-dimensional fibre orientation, *Polym. Eng. Sci.*, **32**(4), 240-253.
6. Yurgartis S.W. (1987), Measurement of small angle fibre misalignments in continuous fibre composites, *Comp. Sci. Tech.*, **30**, 279-293.

7. Hine P.J., Duckett R.A., Davidson N.C. and Clarke A.R. (1993), Modelling of the elastic properties of fibre reinforced composites, 1: orientation measurement, *Comp. Sci. Tech.*, **47**, 65-73.
8. Toll S. and Andersson P-O. (1991), Microstructural characterisation of injection moulded composites using image analysis, *Composites*, **22**(4), 298-306.
9. Fischer G. and Eyerer P. (1988), Measuring the spatial orientation of short fibre reinforced thermoplastics by image analysis, *Polym. Comp.*, **9**(4), 297-304.
10. Clarke A.R., Davidson N.C. and Archenhold G. (1993), Measurements of fibre directions in reinforced polymer composites, *J. Microsc-Oxford*, **171**, 69-79.
11. Miekusch B. (1999), Fibre orientation in short-fibre-reinforced thermoplastics II: Quantitative measurements by image analysis, *Comp. Sci. Tech.*, **59**, 547-560.
12. Eberhardt C.N., Clarke A.R., Vincent M., Giroud T. and Fluoret S. (2001), Fibre orientation measurements in short-glass-fibre composites II: a quantitative error estimate of the 2D image analysis technique, *Comp. Sci. Tech.*, **61**, 1961-1974.
13. Hine P.J., Duckett R.A., Davidson N. and Clarke A.R. (1993), Modelling of the elastic properties of fibre reinforced composites, 1: orientation measurement, *Comp.-Sci. Tech.*, **47**, 65-73.
14. Gundersen H.J.G., Bagger P., Bendtsen T.F., Evans S.M., Korbo L., Marcussen N., Moller A., Nielsen K., Nyengaard J.R., Pakkenberg P., Sorensen F.B., Vesterby A. and West M.J. (1988), The new stereological tools: diseclor, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS 96*, 857-881.
15. Cruz-Orive L.M. and Weibel E.R. (1990), Recent stereological methods for cell biology: brief survey, *Amer. J. Physiol*, **258**, L148-L156.
16. Howard V. (1990), Stereological techniques in biological electron microscopy, Chapter 13, *Biophysical Electron Microscopy*, Academic Press.
17. Moginger B. and Eyerer P. (1991), Determination of the weighting function $g(\beta, r, v)$ for the fibre orientation analysis of the short fibre reinforced composites, *Composites*, **22**, 394-398.
18. Mattfeldt T., Clarke A.R. and Archenhold G. (1994), Estimation of the directional distribution of spatial fibre processes using stereology and confocal scanning laser microscopy, *J. Microsc-Oxford*, **173**(2), 87-101.
19. Guild F.J. and Summerscales J. (1993), Microstructural image analysis applied to fibre composite materials: a review, *Composites*, **24**, 383-393.
20. Fakirov S. and Fakirova C (1985), Direct determination of the orientation of short glass fibers in an injection-molded poly(ethylene terephthalate) system, *Polymer Composites*, **6**, 41-46.
21. Yurgartis S.W., Morey K. and Jortner J. (1993), Measurement of yarn shape and nesting in plain-weave composites, *Comp. Sci. Tech.*, **46**, 39-50.
22. Davidson N.C. (1993), Image analysis for fibre orientation measurement, PhD Thesis, Department of Physics and Astronomy, University of Leeds.
23. Clarke A.R., Davidson N.C. and Archenhold G. (1990), A multiтранспутер image analyser for 3D fibre orientation studies in composites. In H.Y. Elder (ed.), *Trans. Royal Microscopical Sac.*, Adam Hilger Publishers, 1, 305-309.
24. Clarke A.R., Davidson N.C. and Archenhold G. (1991), A large area, high resolution, image analyser for polymer research, *Proc. Int. Conf Transputing* '**91**,1, 31-47.
25. Stobie R.S. (1986), The COSMOS image analyser, *Pattern Recogn. Lett.*, **4**(5), 317-324.

26. Wu W-Y. and Wang M-J.J. (1993), Elliptical object detection by using its geometric properties, *Pattern Recognition*, **26**(10), 1499-1509.
27. O'Donnell B. and White J.R. (1991), Young's Modulus variation within glass-fibre-filled nylon 6,6 injection mouldings. *Plastics & Rubber Institute, Proc. 1st Conf. on Deformation and Fracture of Composites*, UMIST Manchester, 24.1-24.6.
28. Ward I.M. (1977), The measurement of molecular orientation in polymers by spectroscopic techniques, / *J. Polym. Sci.: Polymer Symposium*, **58**, 1-21.
29. Ward I.M. (1962), Optical and mechanical anisotropy in crystalline polymers, *Proc. Phys. Soc*, **80**, 1176-1188.
30. Hine P.J., Duckett R.A. and Ward I.M. (1993), Modelling the elastic properties of fibre reinforced composites: II theoretical predictions, *Comp. Sci. Tech.*, **49**, 13-21.
31. Advani S.G. and Tucker C.L. (1987), The use of tensors to describe and predict fiber orientation in short fiber composites, *Polym. Eng. Sci.*, **31**(8), 751-784.
32. Ludwig H-C, Fischer G. and Becker H. (1994), A quantitative comparison of morphology and fibre orientation in push-pull processed and conventional injection moulded parts, *Proc.Conf. on Mesostructures and Mesomechanics in Fibre Composites*, ed. M.R. Piggott, Univ. of Toronto, pp 223-232.
33. Taya M., Muramatsu K., Lloyd DJ. and Watanabe R. (1991), Determination of distribution patterns of fillers in composites by micromorphofogical parameters, *JSME International Journal*, **34**(2), 80-91.
34. Yurgartis S.W.(1994), Techniques for the quantification of composite mesostructure, *Proc.Conf. on Mesostructures and Mesomechanics in Fibre Composites*, ed. MR. Piggott, Univ of Toronto, pp 32-55.
35. Clarke A.R., Davidson N.C. and Archenhold G. (1995), The measurement and modelling of fibre directions in composites, *IUTAM Symposium on Microstructure' Property Interactions in Composite Materials*, ed. R. Pyrz, Kluwer Academic Publishers, pp 77-88.
36. Pyrz R. (1994), Quantitative description of the microstructure of composites. Part 1: morphology of unidirectional composite systems, *Comp. Sci. Tech.*, **50**, 197-208.
37. Camponeschi E.T. (1991), Lamina waviness levels in thick composites and its effect on their compression strength, *Proc. Int. Conf. on Composite Materials, ICCM8*, Honolulu, pp 3O-E-1-3O-E-13.
38. McGrath J.J. and Wille J.M. (1995), Determination of 3D fiber orientation distribution in thermoplastic injection molding, *Comp. Sci. Tech.*, **53**, 133-143.
39. Denton D.L. and Munson-McGee S.H. (1985), The use of X-radiographic tracers to measure fiber orientations in short fiber composites, *High Modulus Fiber Composites in Ground Transportation and High Volume Applications*, Wilson D.W. (ed.), ASTM, Philadelphia.
40. Davidson N.C, Clarke A.R. and Archenhold G. (1997), Large-area, high-resolution image analysis of composite materials, *J. Microsc-Oxford*, **185**(2), 233-242.
41. Wetherhold R.C. and Scott P.D. (1990), Prediction of thermoelastic properties in short-fiber composites using image analysis techniques, *Comp. Sci. Technol*, **37**(4), 393-410.
42. Daul C, Graebling P. and Hirsch E. (1998), From the Hough transform to a new approach for the detection and approximation of elliptical arcs, *Comput. Vis. Image. Und.*, **72**(3), 215-236.
43. Yurgatis S.W. and Purandare M.N. (1991), Describing fiber spatial distribution in

unidirectional composite materials, *Journal of Computer-Assisted Microscopy*, **3**(3), 117-125.
44. O'Connell P.A. and Duckett R.A. (1991), Measurements of fibre orientation in short-fibre-reinforced thermoplastics. *Comp. Sci. Tech.*, **42**, 329-347.
45. Zhu Y.T., Blumenthal W.R. and Lowe T.C. (1997), Determination of non-symmetric 3D fiber-orientation distribution and average fiber length in short-fiber composites, *Journal of Composite Materials*, **31**(13), 1287-1301.
46. Fisher N.I.. Lewis T. and Embleton B.J.J. (1998), *Statistical Analysis of Spherical Data*, Cambridge University Press.
47. Papathanasiou T.D. and Guell D.C. (1997), *Flow-induced Alignment in Composite Materials*, Woodhead Publishing Limited.
48. Becker H., Fischer G. and Muller U. (1993), Push-pull injection moulding of industrial products, *Kunstoffe German Plastics*, **83**(3), 3-4.
49. Cox, H.L. (1952), The elasticity and strength of paper and other fibrous materials, *Brit. J. Appl. Phys.*, **3**, 72-79.
50. Zak G., Haberer M., Park C.B. and Benhabib B. (2000), Estimation of average fibre length in short-fibre composites by a two-section method, *Comp. Sci. Tech.*, **60**, 1763-1772.
51. Sonka M., Hlavak V. and Boyle R. (1993), *Image Processing, Analysis and Machine Vision*, Chapman & Hall.
52. Davidson N.C. and Clarke A.R. (1998), Extending the dynamic range of fibre length and fibre aspect ratios by automated image analysis, *J. Microsc-Oxford*, **196**(2), 266-272.
53. Merickel M. (1987), 3D reconstruction: the registration problem, *Computer Vision, Graphics and Image Processing*, **42**, 206-219.
54. Hibbard L.S., Grothe R.A., Araicar-Sulze T.L., Dovey-Hariman B.J. and Pages R.B. (1993), Computed 3D reconstruction of median-eminence capillary modules: image alignment and correlation, *J. Microsc-Oxford*, **171**(1), 39-56.
55. Paluch B. (1993), Analysis of geometric imperfections in unidirectionaily-reinforced composites, *Proc. of European Conf. on Composite Materials, ECCM6*, Bordeaux, pp 305-310.
56. Clarke A.R., Archenhold G. and Davidson N.C. (1995), A novel technique for determining the 3D spatial distribution of glass fibres in polymer composites, *Comp. Sci. Tech.*, **55**, 75-91.

Глава 4

3D конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Любая достаточно развитая технология практически неотличима от колдовства.

А. С. Кларк. Профили будущего

4.1. Принципы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

Конфокальная микроскопия является неразрушающим методом получения двумерных оптических сечений материала, позволяющим изучать пространственную (3D) топологию поверхности или внутреннюю (подповерхностную) структуру полупрозрачных образцов. Конфокальная микроскопия изучает поверхности размером от 5 до 200 мкм с высоким разрешением (±0,2 мкм), а также особенности, находящиеся на глубине до нескольких миллиметров под поверхностью образца с несколько меньшим разрешением. Максимальная глубина определяется предельным рабочим расстоянием объектива, т.е. расстоянием от поверхности объектива до находящегося в фокусе объекта. Эта величина близка к фокусному расстоянию объектива.

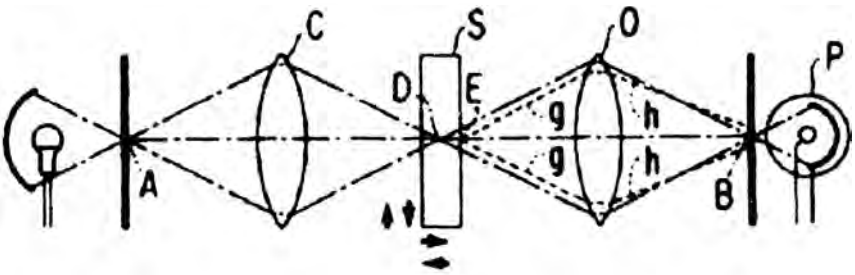
4.1.1. Первые конфокальные микроскопы

В 1957 году Марвин Минский (рис. 4.1a) из Гарвардского университета запатентовал «сканирующий микроскоп с двойной фокусировкой»[1]. Так он основал конфокальную микроскопию, позволяющую сегодня изучать 3D-структуру образцов методом последовательных оптических сечений. Рис. 4.1b демонстрирует схему первого микроскопа Минского с «двойной фокусировкой», в которой свет лампы

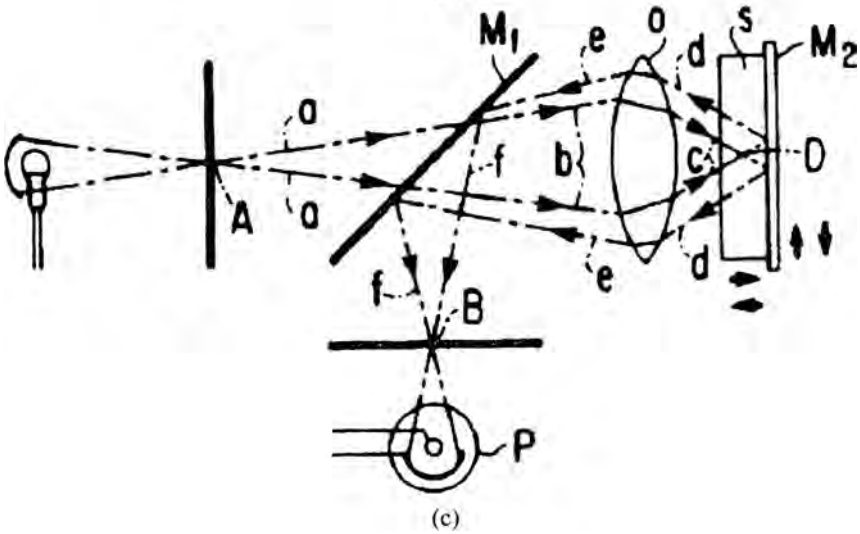
---

[1] Отечественным пользователям лучше знакома аббревиатура КЛСМ или ЛСМ.

(a)



(b)



(c)

Рис. 4.1. (a) – Фотография Марвина Минского; схемы первых конфокальных микроскопов, работающих в режиме проходящего света (b) и в отраженном свете (c). Схемы взяты из оригинального патента

проходит через тонкое отверстие и фокусируется конденсором на образец. Свет, прошедший через образец, фокусируется объективом через второе микроотверстие на детектор. Объектив и конденсор конфокальны, т.е. имеют одну точку фокуса, что и обусловило название «конфокальная микроскопия». Изучение лучевой диаграммы показывает, что свет любой точки, не совпадающей с точкой фокуса обеих линз, не попадает на детектор. Конфокальный микроскоп позволяет получить оптическое изображение одной точки в объеме прозрачного объекта, не несущее информации об окружающих внефокусных областях. Конфокальные изображения называют *оптическими сечениями*. Они позволяют изучить 3D-структуру материала без реального разрезания образца. Эту способность иллюстрирует рис. 4.2, на котором приведены оптические сечения цветочной пыльцы. Получение такой информации при помощи обычного микроскопа потребовало бы микротомирования образца на большое количество тонких срезов.

При использовании объектива с высокой числовой апертурой NA конфокальная юстировка конденсора и объектива становится сложной задачей вследствие уменьшения размера области фокусировки. Эту проблему решает конфокальный микроскоп отраженного света, схема которого представлена на рис. 4.1c. В нем объектив используется и как конденсор, и как объектив, что гарантирует конфокальную юстировку (линза всегда конфокальна самой себе!). Теперь это является классической схемой конфокального микроскопа. Эта конструкция также имеет

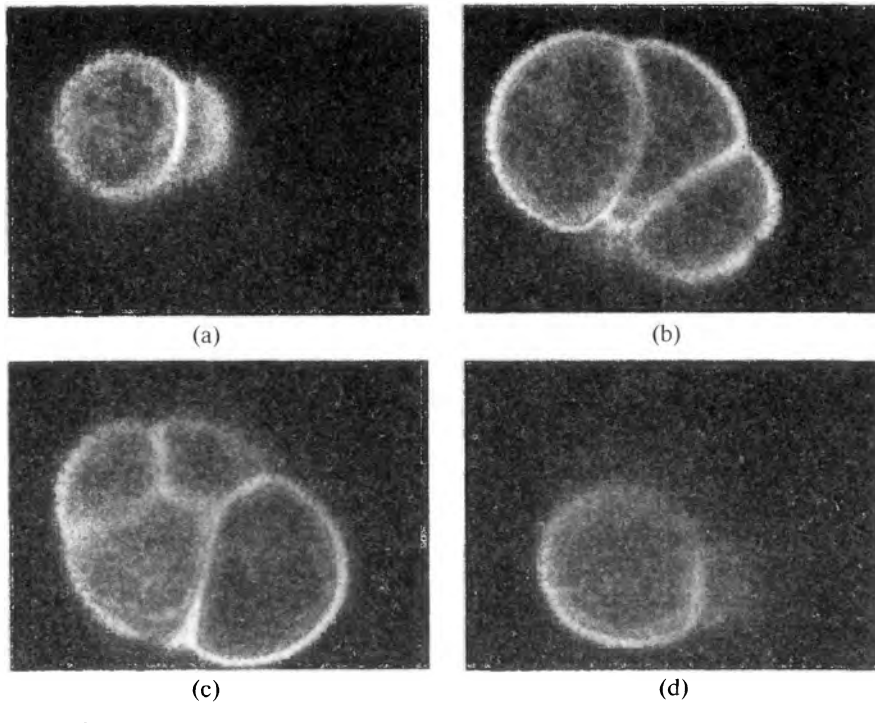


Рис. 4.2. Четыре оптических сечения цветочной пыльцы, сделанные через $\Delta z = 10$ мкм.

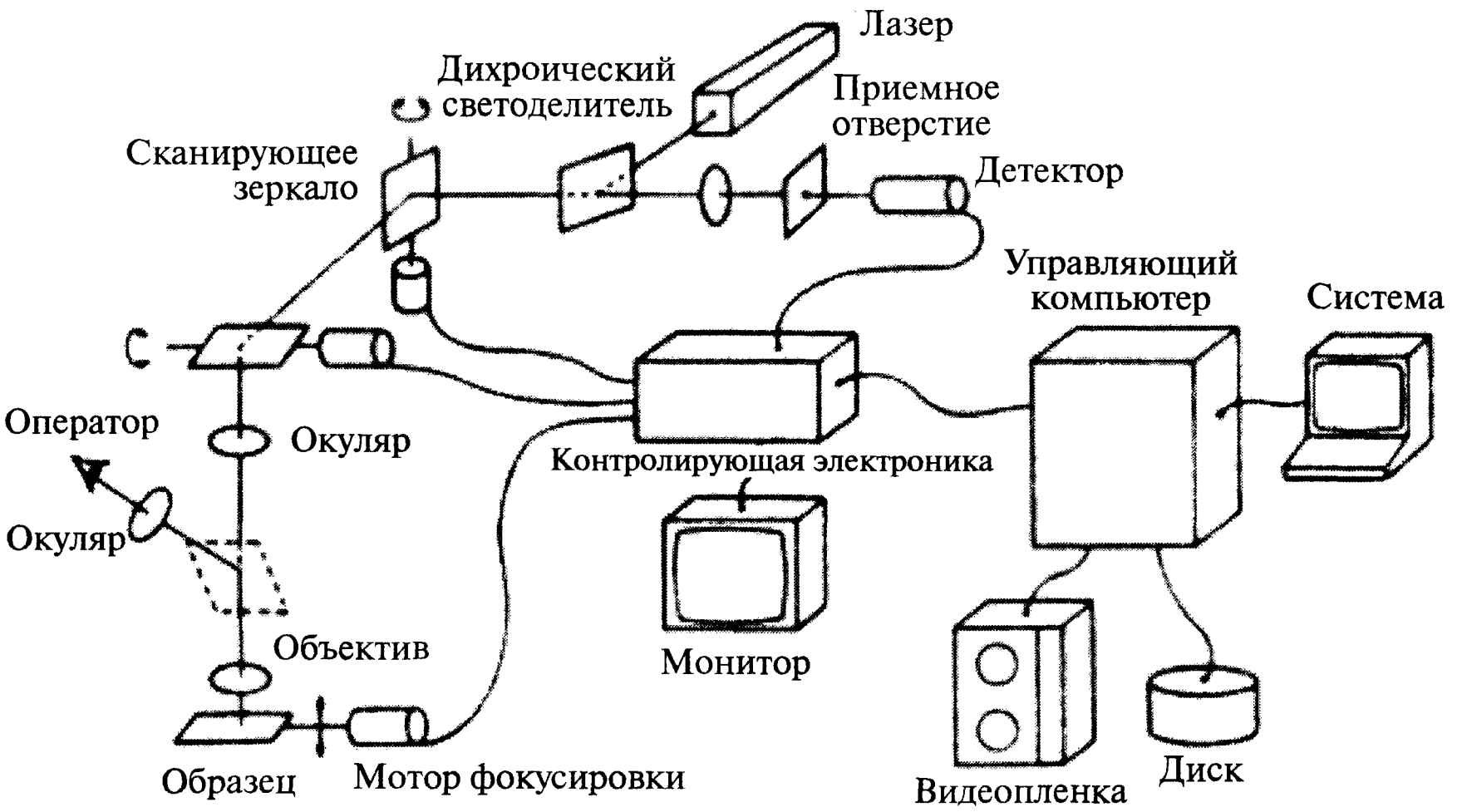


Рис. 4.3. Схема конфокального растрового лазерного микроскопа [4].

два микроотверстия, один перед источником света, а второй перед детектором. Чем меньше отверстие, тем меньше рассеянного света попадает на детектор и тем меньше объем элементарного объема, создающего изображение.

В патенте Минского описан яркий источник белого света, но теперь в конфокальных микроскопах используют лазер. Поэтому их называют конфокальными сканирующими лазерными микроскопами (КСЛМ) или конфокальными лазерными сканирующими микроскопами (КЛСМ). При использовании лазерного источника света осветительное отверстие (отмеченное буквой А на рис. 4.1с) не требуется, что упрощает схему.

Обе схемы на рис. 4.1 обеспечивают конфокальное изображение одной точки образца. Чтобы получить двумерное изображение, нужно найти способ перемещения точки фокуса, т.е. обеспечить сканирование образца. В первой системе Минского сканирование осуществляли физическим перемещением образца, расположенного на предметном столике. Основным преимуществом схемы с неподвижным лучом является то, что луч направлен вдоль оси объектива, что упрощает требования к оптической системе и устраняет потребность в корректировке сферической аберрации. Как отметил в своем патенте Минский, в данной конструкции «не требуются коррекция линз для борьбы с комой, астигматизмом, искривлением и дисторсией поля зрения, а также поперечной хроматической аберрацией». Кроме того, увеличение в этом случае полностью определяется размером сканируемой области, вследствие чего увеличение и размер поля зрения оказываются не связанными. Это можно использовать для увеличения размера поля зрения, которое может достигать сантиметров, что значительно превосходит максимальный размер поля зрения стандартных объективов. Основным недостатком всех сканирующих микроскопов (главы 5 и 6) является большое время построения изображения (обычно десятки секунд).

В самых современных конфокальных микроскопах в качестве источника света используют лазер, создающий сфокусированное пятно света в объеме образца. Изображение получают сканированием пятна света по образцу, как показано

на рис. 4.3. Прошедший через образец свет с помощью той же оптики фокусируют через микроотверстие на детектор. Скорость получения изображения определяется скоростью движения устройства, разворачивающего лазерный луч. В настоящее время разработаны различные сканирующие устройства. Например, дисковый осветитель Нипкова, в котором сканирование осуществляет быстро вращающийся малоапертурный диск [2], колеблющийся волоконный осветитель [3] или зеркало, поворачиваемое гальванометром [4]. Инерция движущихся частей этих устройств значительно ниже, чем у предметного столика, что сильно увеличивает скорость сканирования. В коммерческих микроскопах наиболее широко используют зеркала с гальванометрическим управлением, позволяющие строить от одного до трех кадров в секунду. К сожалению, при этом оказалось утраченным одно из основных преимуществ конфокального микроскопа - пониженные требования к объективам и независимость размера поля зрения от увеличения. Такова цена за быстрое построение изображения!

За последние пятнадцать лет появилось несколько коммерческих конфокальных микроскопов, применяемых в основном для изучения биологических и медицинских объектов. Соответственно, имеется большое количество публикаций на эти темы. Более подробно с применением КЛСМ в биологии можно ознакомиться в монографии под редакцией Поули [5]. Математическое описание принципов формирования изображения в конфокальной системе можно найти в монографии [6]. Некоторые исследователи использовали конфокальный микроскоп для изучения 3D-рельефа поверхности [7]. Голландские исследователи пытались усовершенствовать конструкцию конфокального микроскопа [8], а в ранних публикациях обсуждали его потенциал для изучения композитов [9,10].

Чтобы читатель «не изобретал велосипед», в этой главе будут описаны типичные ошибки оператора при работе на КЛСМ. Основное внимание будет уделено способам обработки цифровой информации и интерпретации изображений, получаемых конфокальными системами. Прежде чем рассматривать примеры использования КЛСМ в материаловедении, в разделе 4.1.2 кратко описаны основы конфокальной микроскопии. Эксплуатационные особенности двух коммерческих конфокальных микроскопов (Biorad MRC500 и Noran Odyssey) обсуждаются в разделе 4.2. В разделах 4.3-4.5 рассматриваются практические проблемы получения, интерпретации и представления трехмерной структуры образца.

4.1.2. Оптика конфокального микроскопа

Обычно для определения пространственной разрешающей способности микроскопа анализируют изображение точечного источника света. Изображение предельно малого источника света, формируемое объективом, не является бесконечно малым вследствие дифракции света на линзе объектива. Изображение точечного источника, формируемое обычной линзой, представляет собой дифракционное пятно Эри, состоящее из яркого центрального ядра и более слабых внешних колец. Два точечных источника одинаковой яркости, расстояние между которыми равно d, видны как две различные точки, если расстояние между центрами кружков Эри превышает следующее значение:

$$r_A = XY = 0,6\frac{\lambda}{NA}, \qquad (4.1)$$

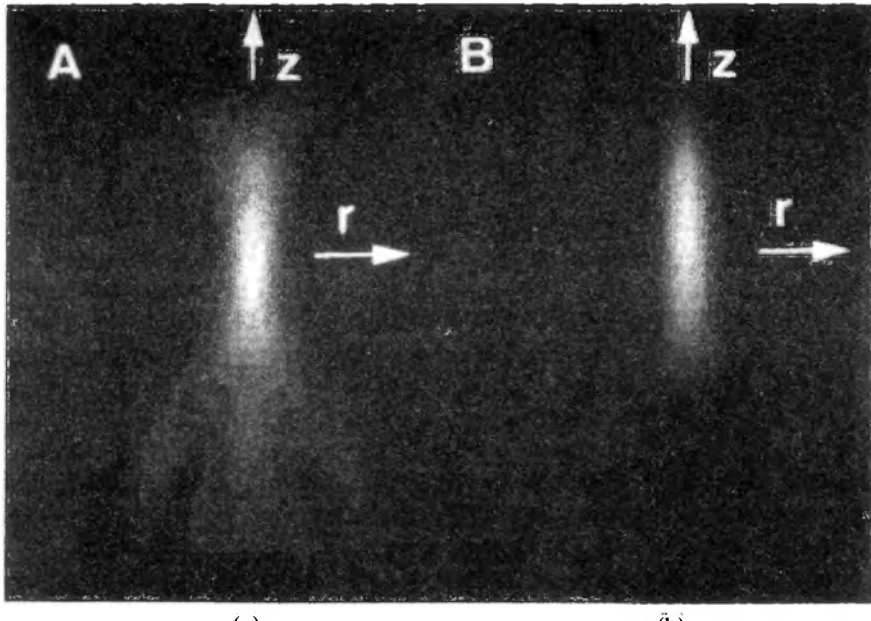
где r_A - радиус первого темного кольца в кружке Эри. Это выражение называют критерием Рэлея (глава 1). Оно определяет разрешающую способность микроскопа в плоскости образца (XY). Отметим, что предел разрешения определяется прежде всего волновой природой света, и поэтому его часто упрощают, считая NA = 1.

Конфокальный метод формирования изображения приводит к небольшому уменьшению размера пятна Эри [6]. Интенсивность пятна Эри для стандартного микроскопа уменьшается по закону n^{-2}, где n - поперечное смещение. В случае конфокального микроскопа интенсивность уменьшается как n^{-4}. Это приводит к увеличению разрешающей способности КЛСМ в полтора раза по сравнению с обычным оптическим микроскопом. Для конфокального микроскопа критерий Рэлея имеет вид:

$$XY_r^c = 0,4\frac{\lambda}{NA}, \qquad (4.2)$$

где XY_r^c - разрешающая способность конфокального микроскопа.

Как правило, небольшое увеличение разрешающей способности не имеет серьезного значения. Чтобы продемонстрировать реальные преимущества конфокального микроскопа, рассмотрим аппаратную функцию (структуру пятна Эри) более подробно и проанализируем разрешающую способность микроскопа в осевом направлении (Z). 3D-распределение интенсивности в пятне Эри было рассчитано в 1956 году Линфутом и Вольфом [11]. Трехмерное пятно Эри, названное трехмерной аппаратной функцией (ТАФ) микроскопа, определяет изображение объекта. ТАФ микроскопа может быть определена экспериментально путем изу-



(a) (b)

Рис. 4.4. Экспериментально определенные трехмерные аппаратные функции (ТАФ) точечного источника обычного (a) и конфокального (b) микроскопов [5].

чении флуоресценции стеклянной сферы очень малого размера. ТАФ обычного и конфокального микроскопов радиально симметричны, и соответствующие распределения интенсивности показаны на рис. 4.4. Для обычного микроскопа ТАФ имеет коническую форму, расширяющуюся и вверх, и вниз от центра, тогда как для конфокального микроскопа она имеет эллиптическую форму и менее вытянута в осевом направлении.

Критерий Рэлея применим и для определения разрешающей способности микроскопа в направлении оптической оси. Для обычного микроскопа два точечных источника, расположенные на некотором расстоянии вдоль оптической оси, можно разрешить, если максимумы их пятен Эри находятся на расстоянии:

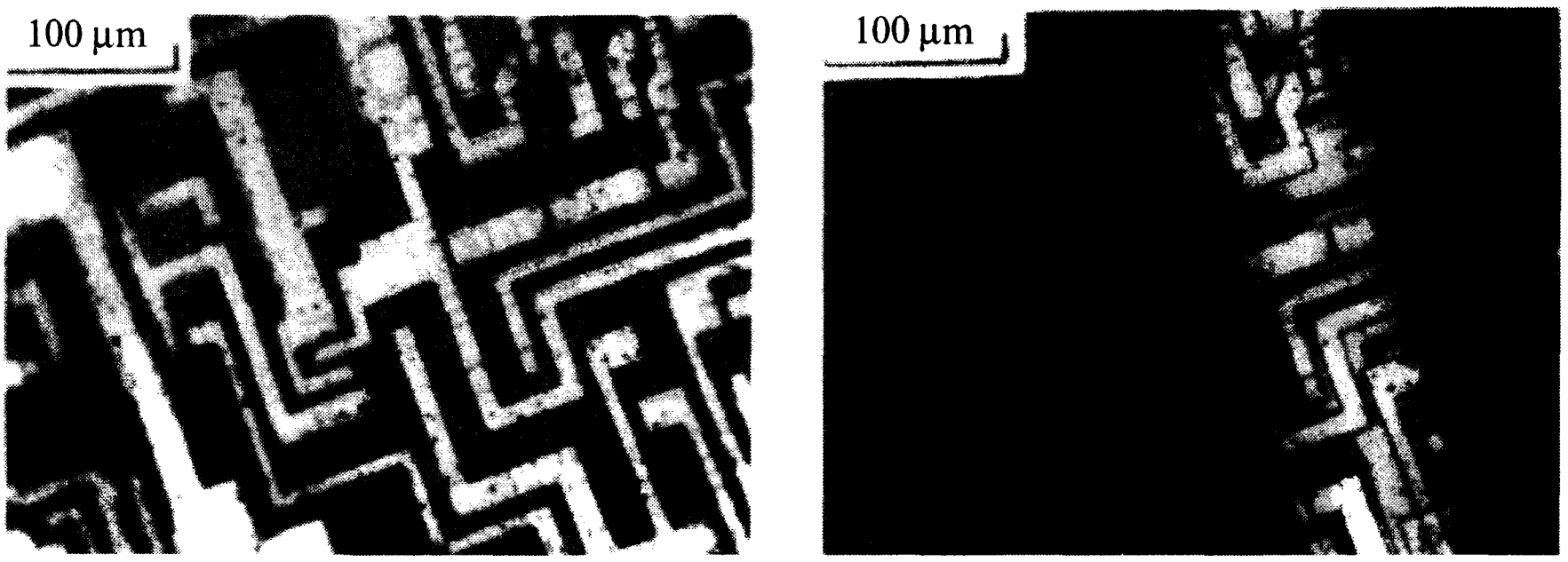
$$Z_r = 2\frac{\lambda}{NA^2}, \tag{4.3}$$

где Z_r - осевая разрешающая способность микроскопа. Для конфокального микроскопа распределение энергии в пятне Эри более узкое, и разрешающая способность в осевом направлении ~1,4 раза выше. Для конфокального микроскопа критерий Рэлея имеет вид:

$$Z_r^c = 1,4\frac{\lambda}{NA^2}, \tag{4.4}$$

где Z_r^c - осевая разрешающая способность конфокального микроскопа.

Хотя конфокальный микроскоп имеет несколько лучшее поперечное и осевое разрешение, это не объясняет гораздо лучшего качества изображения в конфокальном микроскопе. Интенсивность сигнала от точки, находящейся не в фокусе, определяется трехмерной аппаратной функцией. Для обычного микроскопа ТАФ имеют коническую форму, показанную на рис. 4.4. Это означает, что объект, находящийся на несколько микрон выше или ниже плоскости фокуса[1], будет выглядеть



(a) (b)

Рис. 4.5. Изображение микросхемы, расположенной под небольшим углом к плоскости фокуса, в стандартном (a) и конфокальном (b) микроскопах. В конфокальном микроскопе отсутствует свет, отраженный на существенном расстоянии от фокальной плоскости [6].

---

[1] В связи с тем, что речь идет не о теоретической расположении фокальной плоскости относительно главных плоскостей оптической системы, а о реальном расположении объекта в фокусе оптической системы, то рассматривается некая точка, расположенная в плоскости перпендикулярной оптической оси и ее поведение в некой плоскости - плоскости фокуса.

немного крупнее, чем, если бы он был расположен точно в плоскости фокуса, и при этом немного размыт. ТАФ конфокального микроскопа более компактна и, в частности, короче. Это означает, что при смещении объекта из фокальной плоскости интенсивность сигнала уменьшается без размытия изображения до тех пор, пока не обратится в нуль. Рис. 4.5 объясняет причину резкого улучшения качества изображения в конфокальном микроскопе. Рисунок демонстрирует изображение наклонно расположенной микросхемы в стандартном (a) и конфокальном (b) микроскопах.

Для оценки качества настройки нужно проверять осевое разрешение конфокального микроскопа. На практике достичь предельной осевой разрешающей способности, соответствующей критерию Рэлея, очень трудно. Для оценки осевого разрешения требуется контрольный образец, состоящий из нескольких пар флуоресцирующих шариков, расположенных вдоль оптической оси на различном расстоянии друг от друга. Второй метод состоит в измерении интенсивности света, отраженного зеркалом, движущимся вдоль оптической оси через плоскость фокуса. На рис. 4.6 показана интенсивность света, отраженного зеркалом, движущимся через фокальную плоскость. Ширина пика на половине максимальной интенсивности ($\Delta z_{1/2}$) характеризует «толщину» оптического сечения.

4.2. Современные конфокальные микроскопы

Только через несколько десятилетий после изобретения (и после истечения срока оригинального патента!) конфокальная микроскопия начала оказывать реальное воздействие на исследовательскую работу. В конце 1980-х годов интерес к этому методу начал расти, и на рынке появилось несколько конфокальных микроскопов. Все они имеют лазерный источник света, светофильтры и сканирующую оптику. Во всех используется некоторый базовый оптический микроскоп (чтобы использовать уже имеющиеся объектив, корпус и предметный столик).

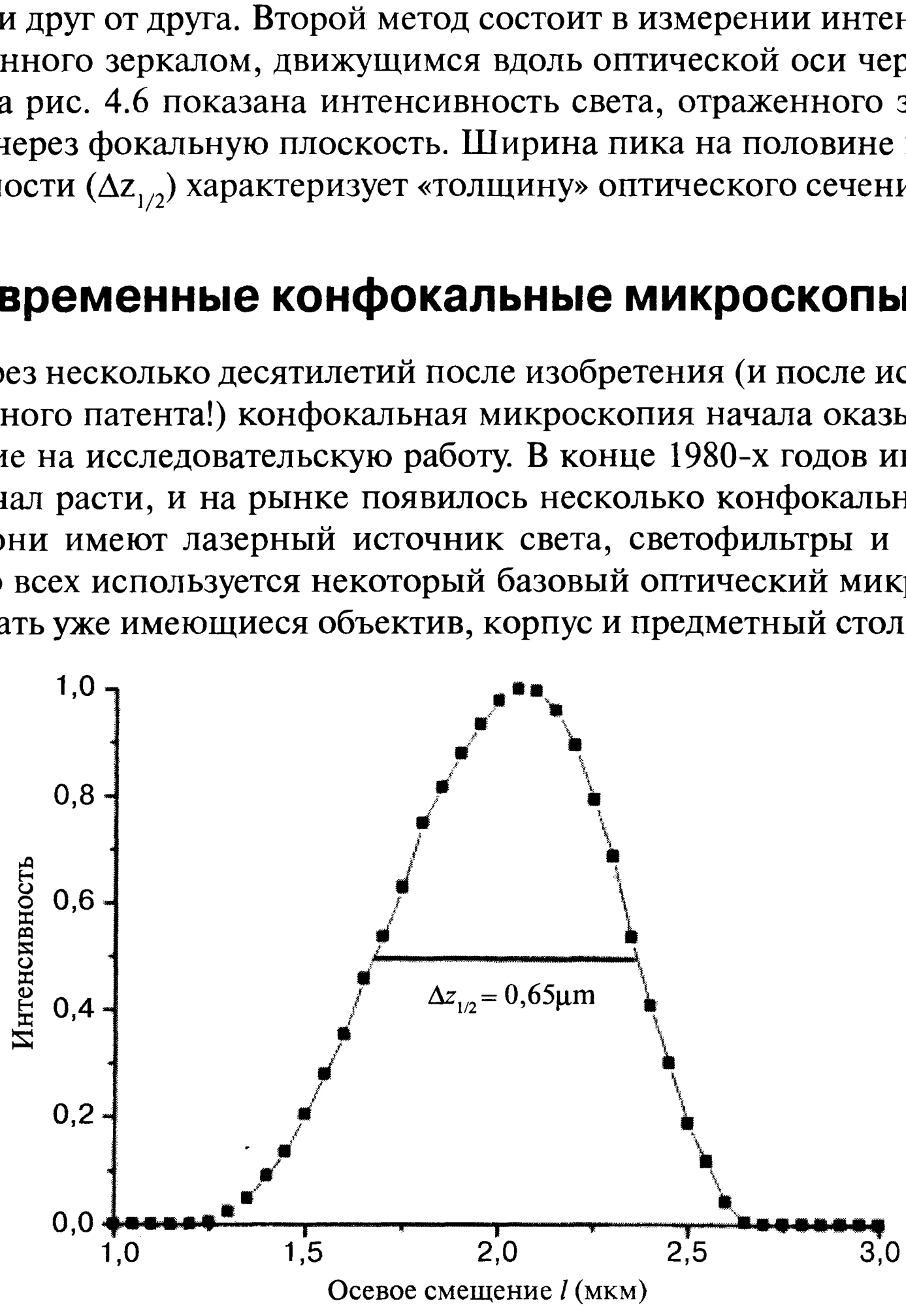


Рис. 4.6. Интенсивность сигнала, отраженного зеркалом, движущимся вдоль оптической оси. Полная ширина пика на половине максимума интенсивности $\Delta z_{1/2}$ равна 0,65 мкм.

До последнего времени большое внимание уделяли практической проверке пользователем качества настройки конфокальной системы. В настоящее время настройка прибора может полностью контролироваться компьютером. Задачей разработчика программного обеспечения является «освобождение микроскописта от необходимости принятия решений». Другими словами, программа на основании оценки качества изображения должна сама настраивать прибор. Как отмечалось в главах 2 и 3, автоматизированная микроскопия имеет ряд преимуществ, и теперь автоматизированные конфокальные микроскопы с успехом применяют для исследования конструкционных материалов. Ниже кратко описаны два серийных конфокальных микроскопа.

4.2.1. Конфокальный микроскоп Biorad MRC 500

На рис. 4.7 показана оптическая схема серийного микроскопа Biorad MRC 500. Изображение в нем строится пиксель за пикселем методом сканирования. Детектором является чувствительный фотоумножитель, расположенный за конфокальной диафрагмой, на которую падает свет, рассеянный малым объемом материала. Сфокусированное лазерное излучение направляется на образец, а сканирование луча осуществляет зеркалом, управляемым гальванометром. Время построения изображения составляет от одной до нескольких секунд.

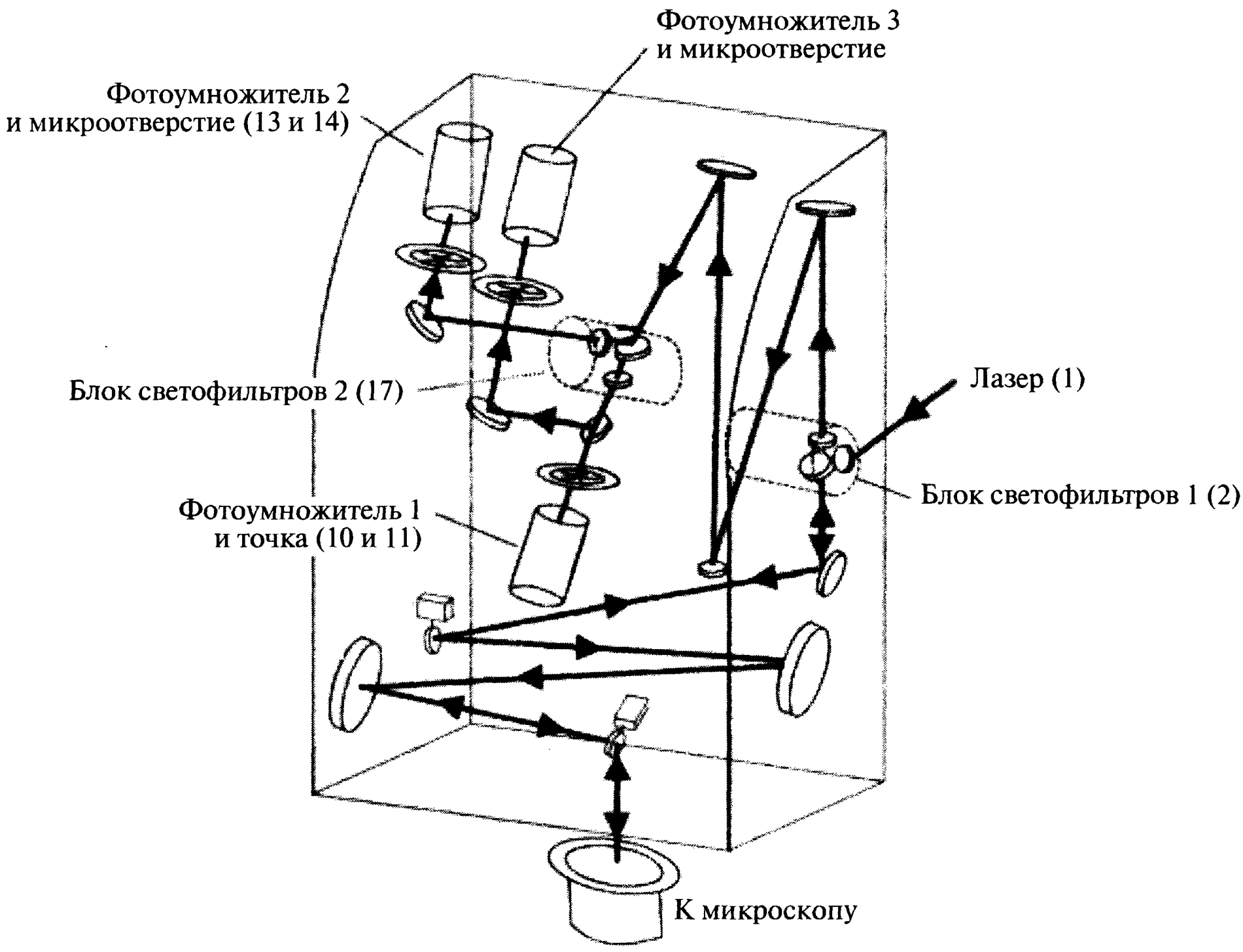


Рис. 4.7. Схема сканирующего оптического конфокального микроскопа Biorad MRC 500.

Как и в других конфокальных микроскопах, для оптимизации качества изображения в системе Biorad MRC 500 нужно вручную установить следующие настройки прибора:

- выбрать размер конфокальной диафрагмы, влияющей на толщину оптического сечения. Уменьшение диаметра отверстия уменьшает толщину оптического сечения;
- выбрать коэффициент усиления электронного сигнала и уровня темнового фона, влияющего на контраст и яркость изображения;
- выбрать нейтральный светофильтр, определяющий мощность падающего света;
- выбрать светофильтры, позволяющие строить изображение в режиме отраженного света, а после этого перейти на люминесцентный режим для повторного сканирования той же области образца. В оптическую систему вводят специальные запирающие светофильтры, которые пропускают или не пропускают лазерный свет. Если светофильтр пропускает лазерное излучение, прибор работает в режиме отраженного света. Если же светофильтр гасит лазерное излучение, изображение строится светом с большей длиной волны и прибор работает во флуоресцентном режиме.

Можно изменять также лазерное освещение. В материаловедении желательно длинноволновое излучение, проникающее в образец глубже, чем коротковолновый свет (интенсивность рэлеевского рассеяния пропорциональна λ^{-4}). К сожалению, лазеры ближнего инфракрасного диапазона дорогие и менее мощные, чем обычный аргоновый лазер. Хотя в режиме отраженного света мощный лазер имеет значительную глубину проникновения, во флуоресцентном режиме работы из-за фотоотбеливания (раздел 4.5.1) он может быть неэффективным.

Можно подумать, что выбор настроек прибора самоочевиден. А именно, апертурную диафрагму нужно уменьшить, коэффициент усиления – увеличить, взять лазер максимальной мощности и посмотреть, в каком режиме получится лучшее изображение. Однако на практике эти параметры связаны, и регулировка одного параметра влияет на выбор других параметров. В результате для решения конкретной задачи приходится использовать итеративную настройку системы.

Основным недостатком этого прибора была его неспособность работать в полуавтоматическом режиме. Перед началом работы нужно было вручную установить настройки, и после этого при других глубинах и при переходе к другой области поверхности изменять их было нельзя. Поэтому стало очевидно, что требуется автоматизированная настройка, заменяющая ручную настройку системы Biorad.

4.2.2. Конфокальный микроскоп «Одиссей» фирмы Норан

На рис. 4.8 показана оптическая схема (a) и связь между различными модульными блоками (b) конфокального микроскопа «Одиссей». Наиболее существенное отличие этого микроскопа от системы Biorad MRC состоит в способе сканирования лазерного луча. «Одиссей» объединяет управляемое гальванометром зеркало для медленного сканирования в вертикальном направлении с акусто-оптическим дефлектором (АОД) быстрого сканирования в горизонтальном направлении.

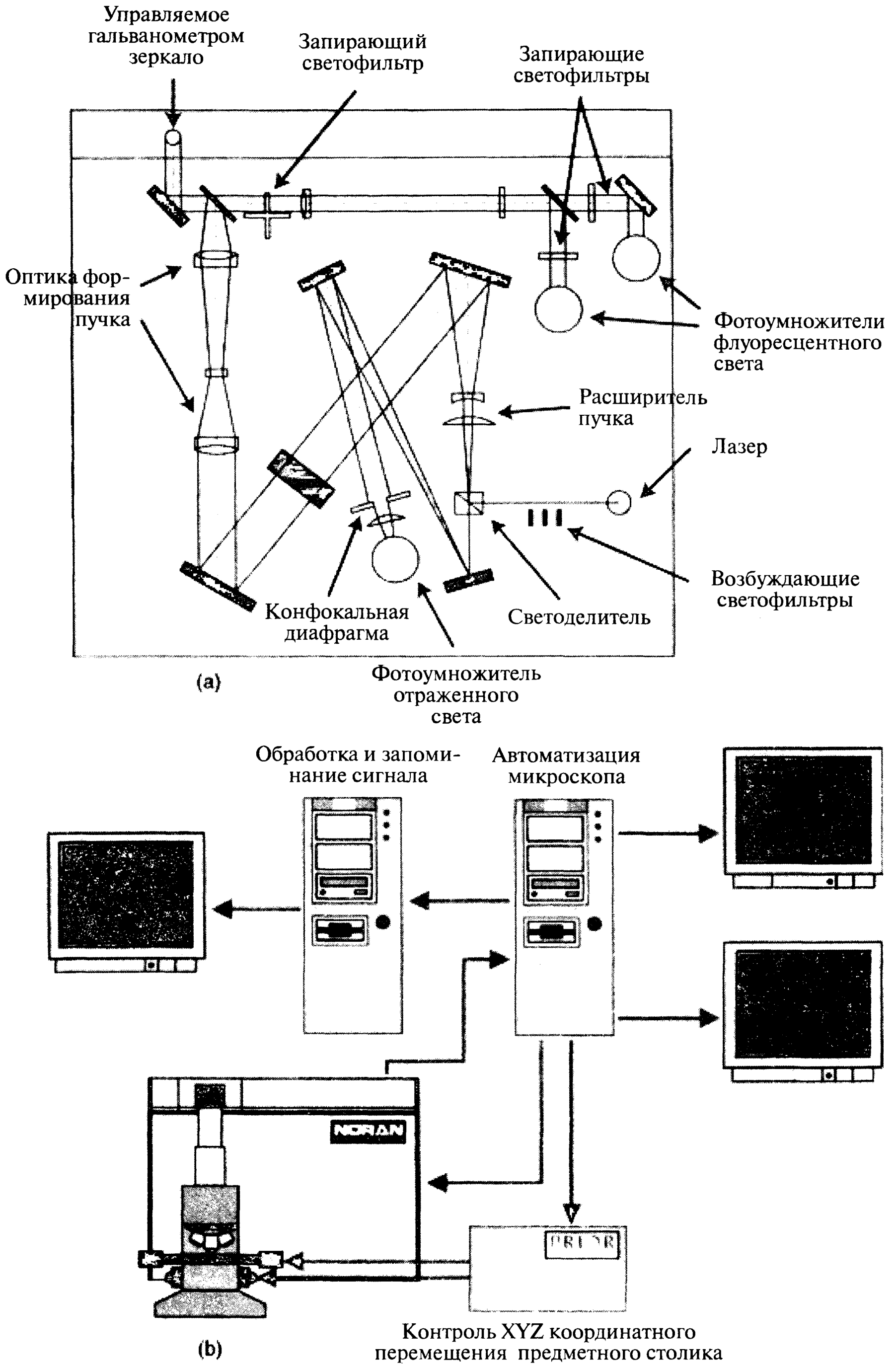


Рис. 4.8. (a) - Оптическая схема КСЛМ «Одиссей». (b) – Конструкция «Одиссея» и система сканирования по трем осям XYZ.

Акусто-оптический дефлектор состоит из стеклянной подложки с последовательно соединенными пьезопреобразователями. Под действием электрического сигнала соответствующей частоты пьезопреобразователь генерирует акустическую волну, формирующую в кристалле дифракционную решетку. Акустическая волна изменяет период оптической дифракционной решетки и, следовательно, угол отражения падающего света. Акусто-оптический дефлектор малоинерционен, что позволяет производить быстрое пилообразное сканирование с почти мгновенным обратным ходом. Эта система сканирования позволяет получать оптическое сечение образца каждые 33 миллисекунды, что соответствует частоте смены кадров кинопленки. Дополнительным преимуществом акусто-оптического дефлектора является возможность варьирования интенсивности дифрагированного пучка изменением подводимой мощности, что позволяет контролировать освещенность образца и быстро прекращать освещение. Кроме того, скорость и амплитуду сканирования можно изменять для получения непрерывной панорамы или для увеличения изображения.

При сканировании отраженный луч проходит в обратном направлении тот же путь, что и падающий пучок. Луч сначала возвращается в начальное направление по вертикали зеркалом, управляемым гальванометром, а затем в горизонтальном направлении акусто-оптическим дефлектором. Наконец, он фокусируется через диафрагму на фотоумножитель. Флуоресцентное излучение негармоническое и состоит из множества волн различной длины. Угол, на который акусто-оптический дефлектор отклоняет свет, зависит от длины волны, и поэтому этим устройством вернуть флуоресцентный свет в первоначальное направление нельзя. Поэтому КЛСМ «Одиссей» для флуоресцентного режима работы имеет дополнительный оптический путь, в котором луч (колеблющийся вдоль одной линии) перед фотоумножителем флуоресцентного света проектируется не на микродиафрагму (точку), а на щель. В этом режиме работы система имеет точечный источник света и щелевой детектор, в результате чего трехмерная аппаратная функция становится радиально несимметричной и несколько уменьшается осевое разрешение микроскопа.

Схема компонентов системы «Одиссей» показана на рис. 4.8b. В отличие от системы Biorad MRC 500, в микроскопе «Одиссей» большинство настроек выполняется главным компьютером. Это позволяет использовать сложные схемы сканирования, в которых решения принимает компьютер на основании анализа изображения. Работа этой системы иллюстрируется примерами, приведенными в конце этой главы.

4.3. Оптические сечения

Конфокальный микроскоп имеет целый ряд преимуществ по сравнению с обычным микроскопом. Однако современные конфокальные микроскопы утратили все эти преимущества, за исключением одного – возможности получения тонких оптических срезов. Получение тонких оптических срезов стало смыслом конфокального микроскопа. В этом разделе рассмотрено получение тонкого оптического сечения и обсуждаются практические проблемы, ограничивающие «толщину» оптического сечения и максимальную глубину, на которой оно может быть получено. Будет рассмотрено влияние следующих параметров системы на качество изображения:

- размера конфокальной диафрагмы;
- числовой апертуры объектива NA;
- показателя преломления;
- поглощения света в образце.

4.3.1. Влияние диафрагмы

Уменьшение интенсивности света по мере увеличения толщины образца влияет на разрешение микроскопа по оптической оси Z. Разрешение зависит как от оптики микроскопа, так и от образца. Рассмотрев идеализированный объект, тонкий плоский отражатель и точечный детектор, можно вывести теоретический предел оптической толщины сечения. Толщину оптического сечения в конфокальном микроскопе обычно характеризуют шириной распределения на полувысоте пика интенсивности $\Delta z_{1/2}$, как показано на рис. 4.6. Если образец и детектор идеальны, этот параметр зависит от NA объектива, длины волны λ и показателя преломления иммерсионной среды n_i [12]:

$$\Delta z_{1/2} = \frac{0{,}43\lambda}{\left\{ n_i - n_i \cos\left[\arcsin\left(\frac{NA}{n_i} \right) \right] \right\}} \qquad (4.5)$$

Рис. 4.9 демонстрирует описываемую уравнением (4.5) зависимость разрешения от числовой апертуры для «воздушного» и масляного иммерсионного объективов при двух различных длинах волн.

В современном конфокальном микроскопе перед детектором обычно имеется регулируемая диафрагма, изменяющая количество света. Размер диафрагмы влияет на толщину получаемого сечения. Чем меньше диафрагма, тем ближе толщина сечения к теоретическому пределу, определяемому уравнением (4.5). Напротив, при очень больших апертурах способность получать тонкое сечение исчезает.

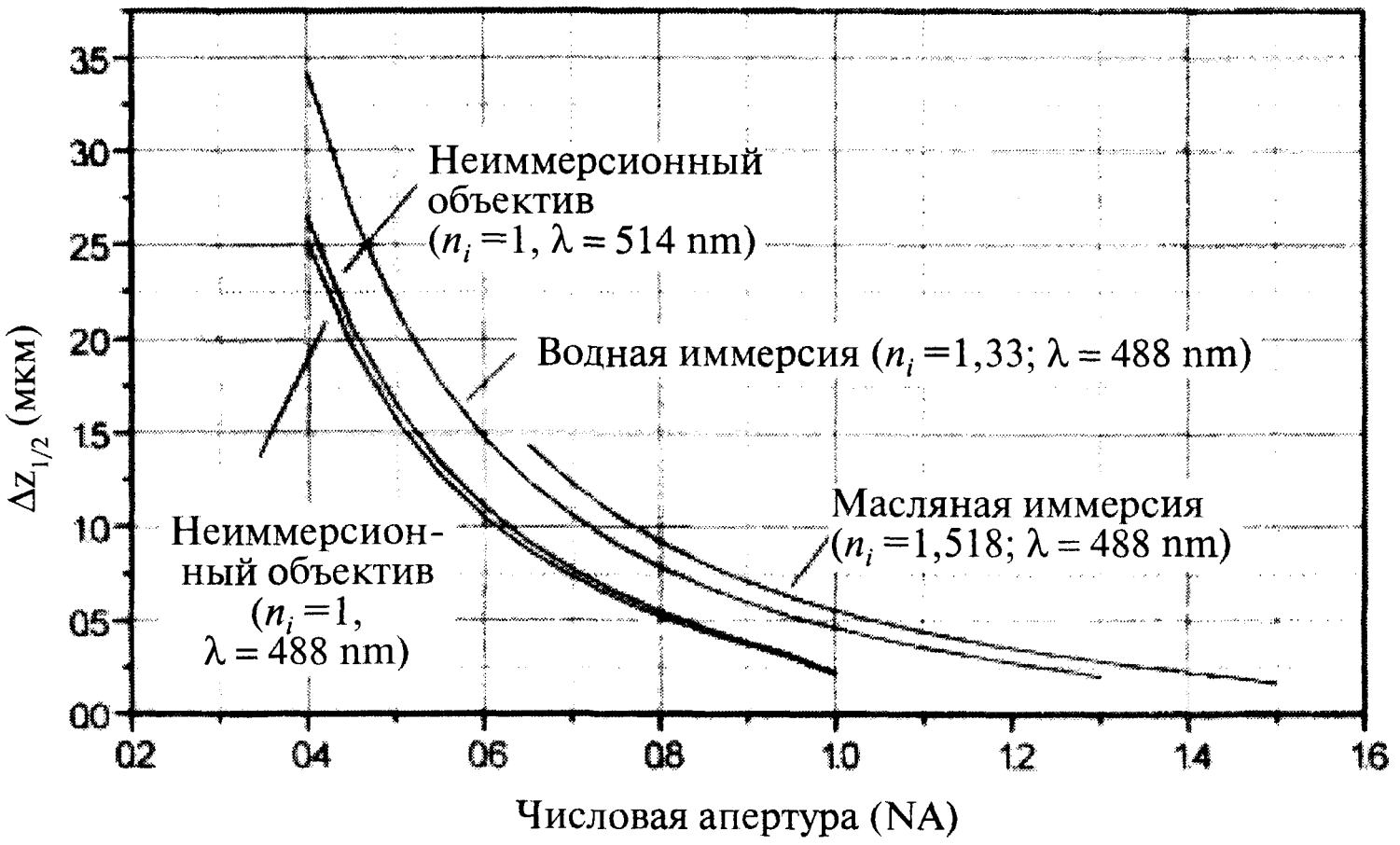


Рис. 4.9. Зависимость осевой разрешающей способности микроскопа $\Delta z_{1/2}$ от числовой апертуры объектива.

Размер апертуры влияет и на количество света, попадающего на детектор, вследствие чего излишне малый размер диафрагмы также нежелателен. Рис. 4.10a демонстрирует интенсивность полученного света (и соответствующие значения $\Delta z_{1/2}$) системы «Одиссей» при различных размерах диафрагмы. Размеры апертурных диафрагм в «Одиссее» несколько отличаются от диафрагм в других конфокальных микроскопах, поскольку оптика, сканирующая световой луч, помещается непосредственно перед детектором света. В «Одиссее» размер ирисовой диафрагмы можно изменять в диапазоне от 1 до 18 мм. В большинстве конфокальных микроскопов размер диафрагмы изменяется в пределах от 5 до 150 мкм. Для сравнения рис. 4.10b демонстрирует интенсивность полученного света во флуоресцентном режиме работы «Одиссея». Отметим небольшую потерю осевой разрешающей способности при замене точки на щель.

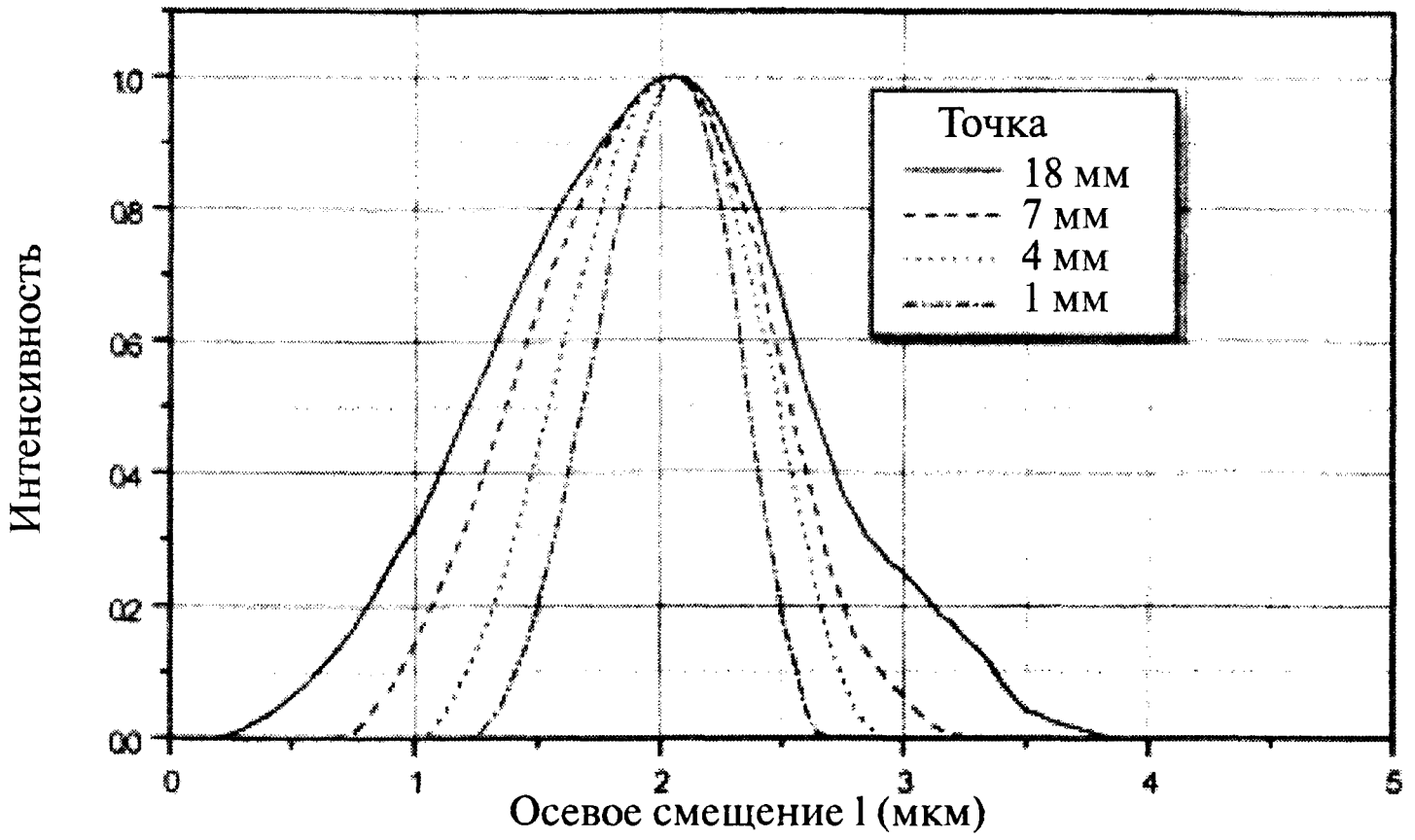


Рис. 4.10. (a) - Осевые характеристики конфокального лазерного сканирующего микроскопа «Одиссей» при различных размерах диафрагмы; (b) - осевые характеристики во флуоресцентном режиме работы.

4.3.2. Показатель преломления и проблема глубины

В оптическом микроскопе обычно получают изображение поверхности или ближайшей области. Если нужно получить изображение внутренней области образца, его приходится разрезать. При правильном выборе объектива и иммерсионной среды (а также покровного стекла), качество изображения должно быть достаточно хорошим. Особенностью конфокального микроскопа является возможность получения оптического сечения на значительной глубине от поверхности образца.

Прохождение падающего и отраженного луча через образец влияет на качество изображения. Если показатели преломления иммерсионной среды и образца близки[1], световой конус будет сходиться, как показано на рис. 4.11а. Если же показатели преломления различаются, появляется сферическая аберрация. Рис. 4.11 поясняет причину сферической аберрации при различных показателях преломления иммерсионной среды и образца в случае значительной глубины оптического сечения. При разных показателях преломления световые лучи, идущие на различном расстоянии от оптической оси, в одну точку не фокусируется, что приводит к потере качества изображения. По возможности показатели преломления образца и объектива должны быть согласованы. На практике, однако, показатель преломления образца изменять нельзя, а выбор объективов очень ограничен.

Если показатели преломления образца и иммерсионной среды различаются, изображение объекта на глубине размыто вдоль оптической оси, а плоскость фокуса сдвинута. Проблему получения точных количественных данных из оптических срезов, имеющих сферическую аберрацию, изучали разные исследователи. Виссер с соавторами для определения сдвига фокальной плоскости использовали лучевую диаграмму [13]. По их расчетам, при перемещении предметного столика в вертикальном направлении на величину Δs перемещение Δz фокальной плоскости равно:

$$\Delta z = \frac{tg\left[\arcsin\left(\frac{NA}{n_i}\right)\right]}{tg\left[\arcsin\left(\frac{NA}{n_s}\right)\right]}\Delta s, \qquad (4.6)$$

где n_i и n_s - показатели преломления иммерсионной среды и образца.

Вывод этого уравнения основан на следующих предположениях:

- для определения положения фокуса рассматриваются только крайние пучки светового конуса, попадающего в объектив;

---

[1] В данном случае автор рассматривает влияние разности показателей преломления иммерсионной жидкости и объекта на появление рассеянного света, снижающего контраст изображения и действующего как эффект сферической аберрации. Равенство показателей преломления фронтального компонента объектива (n_1), иммерсии (n_2) и объекта (n_3) обеспечивает условие наличия дополнительного оптического элемента между объективом и объектом с соответствующим показателем преломления ($n_1=n_2=n_3$) без границы раздела между объективом и предметом, а значит и отсутствие в изображении сферической аберрации.

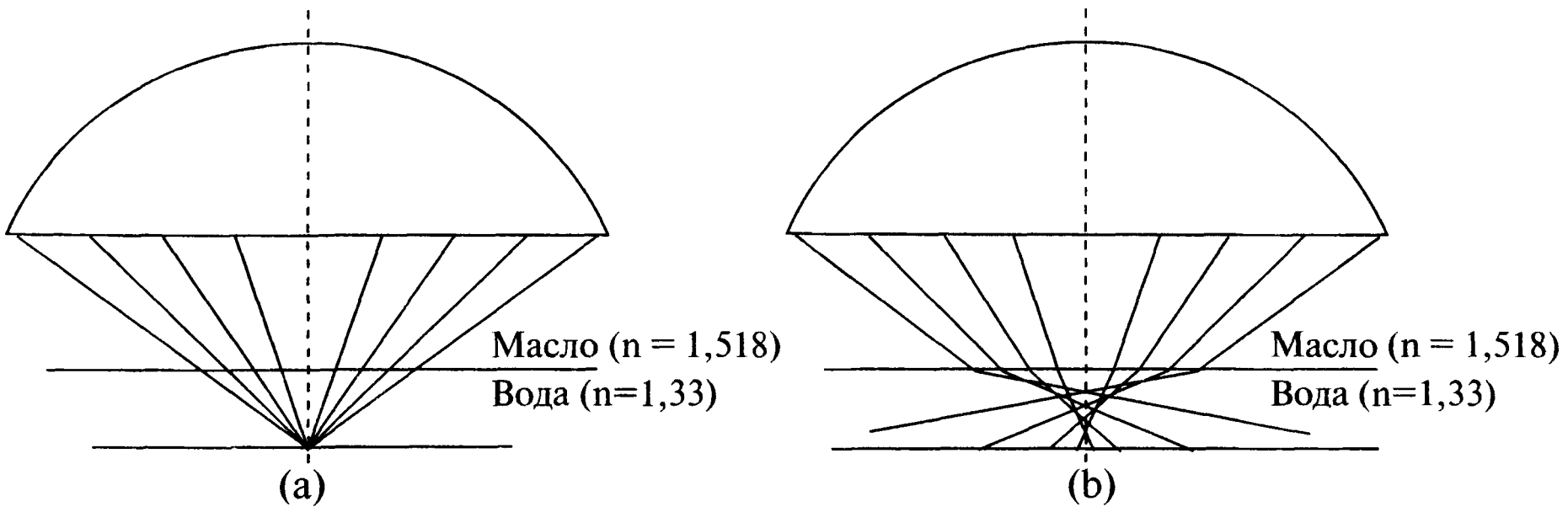


Рис. 4.11. (a) - Формирование изображения иммерсионным объективом без аберрации; (b) - сферическая аберрация, обусловленная несоответствием показателей преломления иммерсионной среды и материала.

- сферической аберрацией оптики микроскопа и границы раздела иммерсионной среды с образцом пренебрегается;
- предполагается, что образец оптически однороден.

Карлссон экспериментально установил, что самое сильное влияние на изображение оказывают параксиальные лучи (т. е. имеющие малый угол с оптической осью) [14]. Этот результат противоречит первому предположению вывода формулы Виссера, и поэтому определяемую по уравнению (4.6) величину Δz следует трактовать как верхний предел разрешающей способности. В работе [15] влияние разницы показателей преломления на сферическую аберрацию учитывали интегрированием по всему диапазону углов падения. На рис. 4.12 приведены результаты вычисления аппаратной функции, учитывающей аберрацию на различной глубине образца. По мере увеличения глубины изучаемых особенностей от поверхности образца:

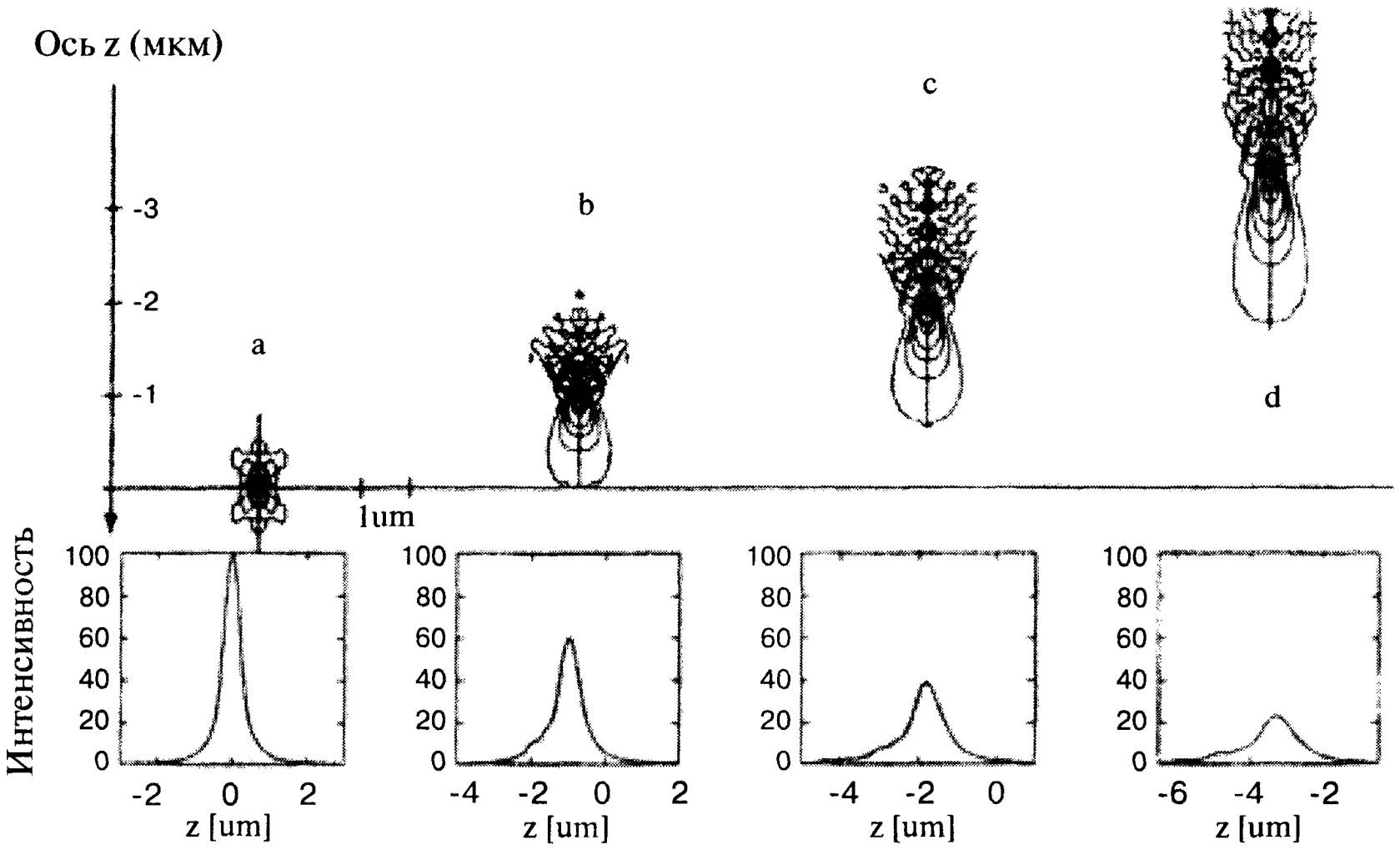


Рис. 4.12. Изменение контуров трехмерной аппаратной функции конфокального микроскопа демонстрирует аберрацию при различной глубине фокусировки иммерсионного объектива микроскопа [15].

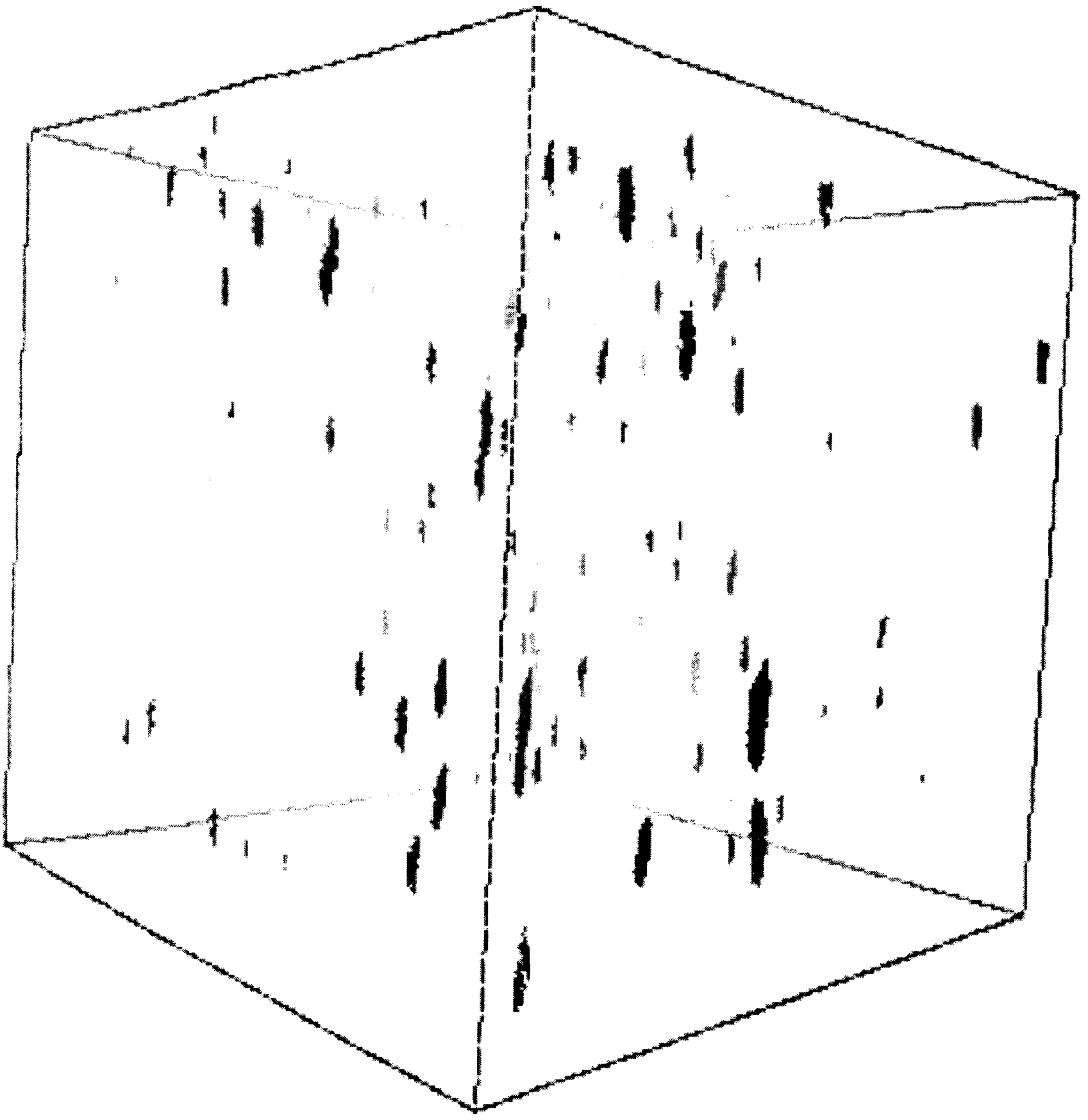


Рис. 4.13. Дисперсные частицы в прозрачном полимере. Видны верхняя и нижняя поверхности пленки. Кажущееся уменьшение количества частиц с глубиной является артефактом, обусловленным уменьшением величины максимальной интенсивности аппаратной функции при увеличении глубины. Показан объем материала размером 100×100×100 мкм

- сильно теряется осевое разрешение и несколько меньше теряется разрешение в поперечном направлении;
- снижается максимум трехмерной аппаратной функции;
- смещается положение пика по оптической оси.

Эти эффекты демонстрирует рис. 4.13, на котором представлено изображение частиц в слое полимера (с показателем преломления 1,6), полученное с помощью неиммерсионного объектива. Уменьшение интенсивности максимума трехмерной аппаратной функции приводит к кажущемуся уменьшению количества частиц при увеличении глубины. Корректировка данных, учитывающая поглощение света материалом (раздел 4.6), позволяет получить более достоверную информацию.

4.3.3. Максимальная глубина проникновения

При использовании конфокального микроскопа наиболее важными параметрами являются разрешающая способность и расстояние от плоскости линзы объектива до поверхности образца, находящегося в фокусе (максимальная глубина оптического проникновения). Уже отмечалось, что для увеличения глубины проникновения объектив должен иметь большую числовую апертуру (NA). Высокие значения NA имеют иммерсионные объективы. К сожалению, такие объективы имеют небольшое максимальное рабочее расстояние (расстояние от линзы объектива до фокальной плоскости), и поэтому приходится искать компромисс между пространственным разрешением и глубиной проникновения.

Как следует из таблицы 4.1, максимальное рабочее расстояние иммерсионных объективов равно приблизительно 200 мкм, тогда как рабочее расстояние воздушных линз достигает нескольких миллиметров. На практике, однако, достичь такой глубины трудно из-за разницы показателей преломления, поглощения света в образце и ошибок программ обработки изображения. Все эти проблемы будут обсуждаться ниже.

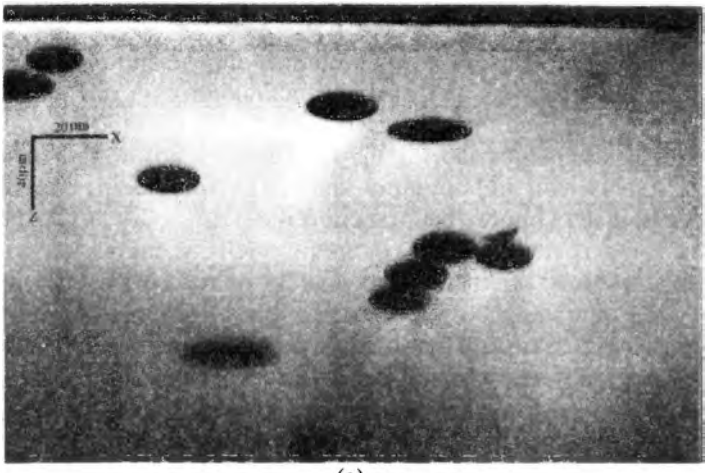
4.3.4. Уменьшение интенсивности света в образце

Идеальный образец, позволяющий достичь максимальной глубины проникновения и максимального разрешения, должен иметь показатель преломления, равный показателю преломления объектива. К сожалению, такой образец должен быть однородным, и его изучение не представляет интереса! Реальные образцы неоднородны и включают особенности, отражающие или поглощающие свет. Это приводит к снижению интенсивности света на большой глубине и появлению тени.

Рис. 4.14 демонстрирует сечения двух композитов в плоскости XZ (по толщине образца), полученные во флуоресцентном режиме работы микроскопа (раздел 4.5.3). В обоих материалах матрица автофлуоресцирует (флуоресцирует без подкрашивания), что обеспечивает контраст волокон и матрицы. При низкой концентрации волокон качество изображения было хорошим даже при полном рабочем расстоянии объектива. При более высокой концентрации волокон интенсивность света сильно уменьшалась вследствие отражения на границе раздела волокно-матрица и появлялись тени. Показатели преломления стеклопластика и масла (n = 1,5) очень близки, и поэтому уменьшение интенсивности света вследствие его отражения на границе волокно-матрица невелико. Рис. 4.15 показывает, что интенсивность сигнала экспоненциально уменьшается с глубиной проникновения.

Таблица. 4.1. Рабочие расстояния типичных объективов

Производитель	Тип объектива	Числовая апертура	Увеличение	Рабочее расстояние
Никон	planapo, масло	1,4	60×	220 мкм
Цейсс	planapo, масло	1,4	100×	100 мкм
Цейсс	achroplan, вода	0,9	63×	145 мкм
Цейсс	eriplan, воздух	0,7	100×	0,95 мм



(a)

(b)

Рис. 4.14. Сравнение максимальной глубины проникновения (a) в углепластике с низкой концентрацией волокон (глубина проникновения соответствует полному рабочему расстоянию объектива 60×, NA=1,4, масляная иммерсия) и (b) в стеклопластике с высокой концентрацией волокон иллюстрирует проблему рассеяния света на глубине более 40 мкм. Для показа области размером 220×50 мкм наложены три XZ кадра. Оба изображения получены во флуоресцентном режиме работы.

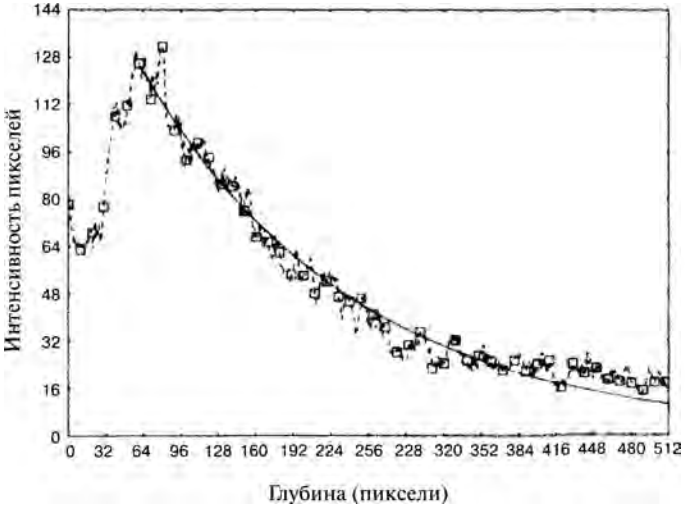


Рис. 4.15. Зависимость интенсивности флуоресценции от глубины демонстрирует экспоненциальное затухание сигнала

4.3.5. Интерпретация данных

Максимальный объем получаемой информации определяется глубиной проникновения. Она зависит от многих факторов, влияющих на оптическую прозрачность материала. Например, максимальная глубина проникновения зависит от концентрации и агломерации частиц, флуоресценции компонентов и т.д. Но еще сильнее объем получаемой информации зависит от программы обработки информации, определяющей скорость работы системы.

Сравнивать эффективность работы различных КЛСМ систем непросто. В конечном счете анализируемый объем образца зависит от того, требуется ли вмешательство оператора или прибор работает автоматически. Например, большей глубины проникновения в образец можно достигнуть, используя интерактивную программу, позволяющую оператору выбрать объекты в плоскости XZ. К сожалению, это отнимает много времени и весьма утомительно. Часто лучше несколько уменьшить глубину проникновения, но успеть обработать большую площадь образца.

Хотя сбор видеоинформации может быть полностью автоматизирован, даже автоматические программы должны иметь операцию остановки работы. Ручное прерывание работы позволяет контролировать качество получаемой видеоинформации, ухудшаемое размытием изображения, тенями и помехами.

Высокую производительность компьютера используют для надежной идентификации объектов, находящихся значительно ниже поверхности. Для повышения качества изображения применяют конволюционные фильтры изображения, а надежность идентификации повышают, ограничивая толщину изучаемого слоя материала [16,17]. В конечном счете приходится находить компромисс между временем обработки сигнала и временем сканирования.

4.4. Проблемы калибровки

Если микроскоп используют для количественных измерений, важна точная калибровка поля зрения. В главе 1 дан краткий обзор исторического развития оптической микроскопии. Постепенно улучшали качество изображения, которое стало плоским, равномерным по интенсивности и менее искаженным. Путь от оптического сигнала в объективе микроскопа до его конечной цифровой формы весьма сложен, и на этом пути также могут возникнуть различные искажения. Кроме того, в конфокальном микроскопе степень линейности связи конечного сигнала с интенсивностью света зависит и от сканирующей оптики. Оба конфокальных микроскопа, описанные в предыдущем разделе, серьезно искажают изображение в связи с неидеальностью сканирующей оптики. Ниже описаны методы исправления этих искажений.

4.4.1. Коррекция неравномерности освещенности

В системе «Одиссей» развертку пучка в направлении Y осуществляет управляемое гальванометром зеркало, а по оси X - акусто-оптический дефлектор АОД. На рис. 4.16 приведено изображение зеркала, демонстрирующее, что оптика создает неравномерное освещение поля, обусловленное главным образом АОД. Во флуоресцентном режиме, когда излучаемый образцом свет проходит различный путь, неравномерность освещенности менее очевидна.

Коррекцию фона можно осуществить при помощи контрольного изображения зеркала, как описано в главе 2. Если при изучении большой площади образца используют один объектив, а изображение получают совмещением множества кадров, контрольное изображение нужно получить только один раз. В конфокальном микроскопе получение контрольного изображения осложнено необходимостью установки зеркала точно перпендикулярно оптической оси. Если зеркало неперпендикулярно к оптической оси микроскопа, его изображение будет похоже на рис. 4.17. Эту проблему можно решить, перемещая зеркало вдоль оптической оси и регистрируя максимальную интенсивность каждого пикселя (раздел 4.5.4). При флуоресцентном режиме работы еще один метод калибровки состоит в изучении толстой пластины. В этом случае изотропия флуоресценции устраняет необходимость автофокусировки [18].

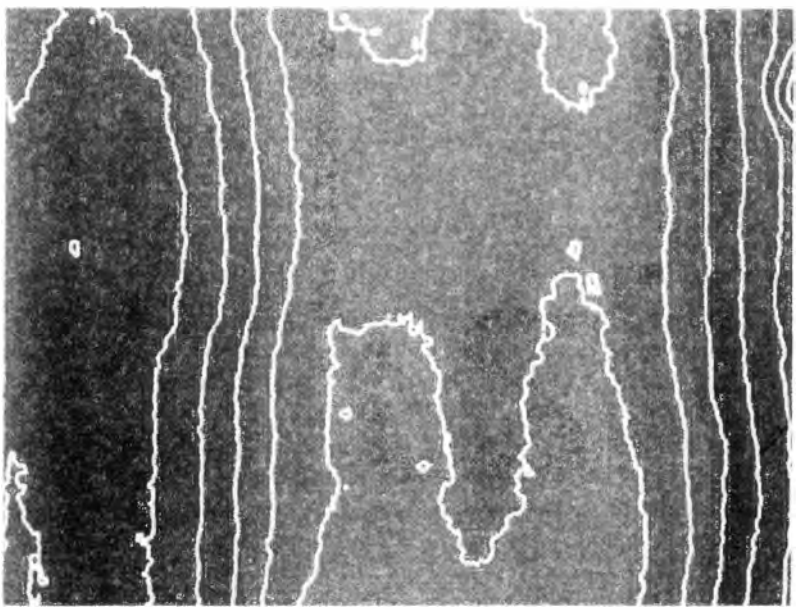


Рис. 4.16. Изображение зеркала в отражающем режиме работы микроскопа демонстрирует неравномерность освещенности поля зрения. Контуры интенсивности соответствуют разнице в 10 единиц

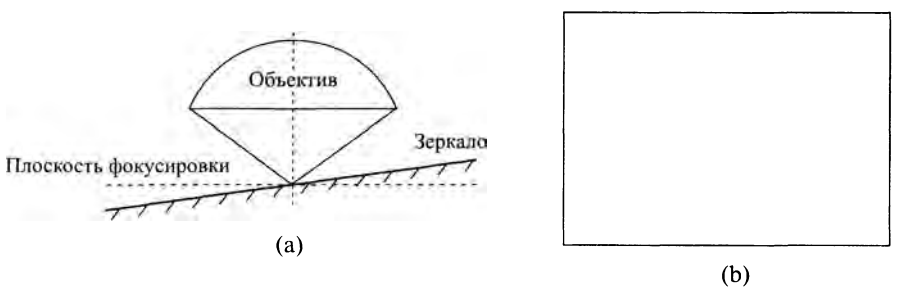


Рис. 4.17. Изображение наклонного зеркала (a) в отражающем режиме работы конфокального микроскопа (b).

В главе 2 описано уравнение, корректирующее интенсивность фона:

$$I_c(x,y) = \frac{I_o(x,y) - B_e(x,y)}{B_r(x,y) - B_e(x,y)} \langle I_o \rangle, \tag{4.7}$$

где $I_o(x, y)$ - начальная интенсивность пикселя, $I_c(x, y)$ - исправленная интенсивность, $B_r(x, y)$ - интенсивность фона, $B_e(x, y)$ – фоновая интенсивность при отсутствии освещения и $< I_o >$ - средняя интенсивность исходного изображения.

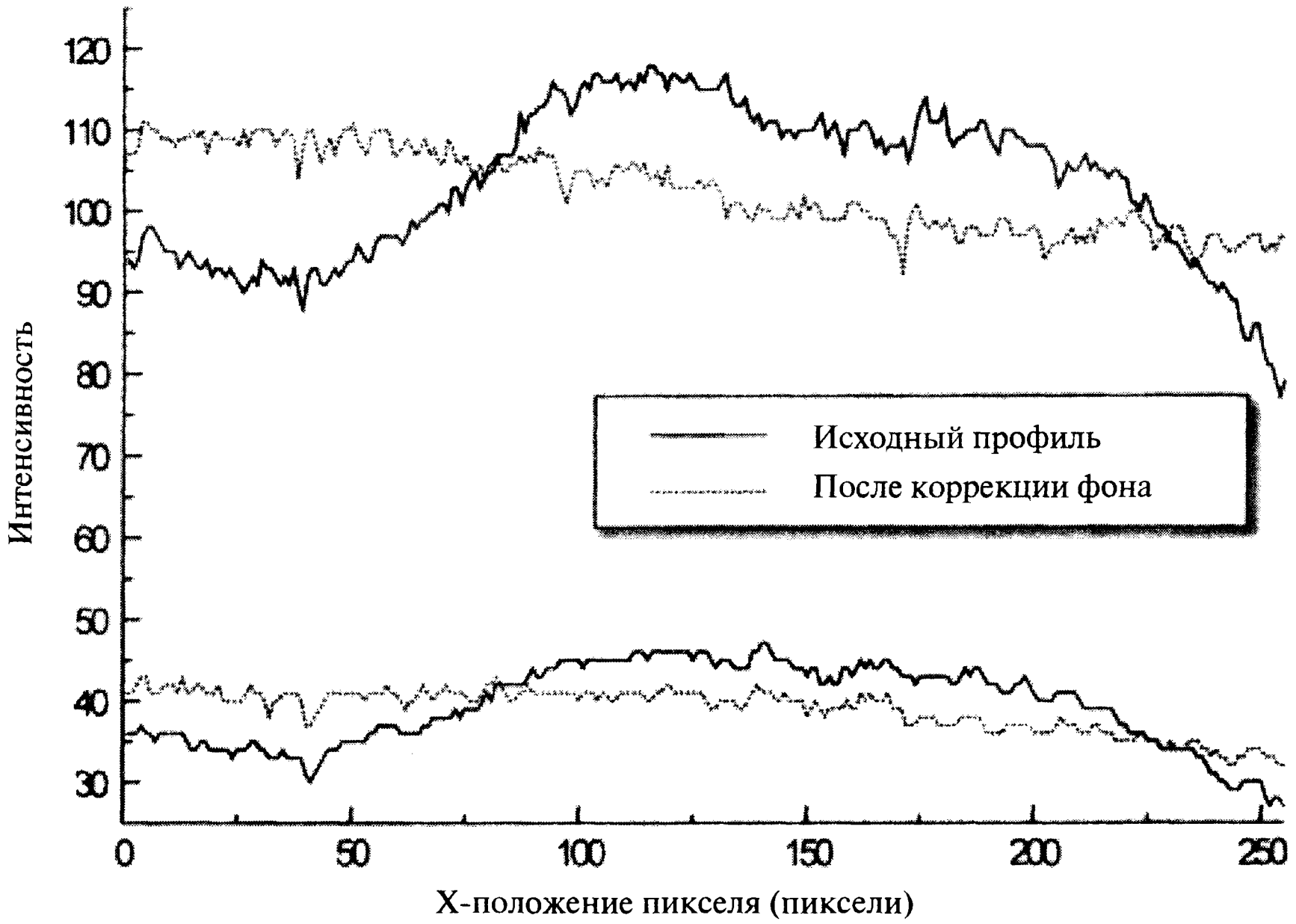


Рис. 4.18. Линейные профили интенсивности сигнала, отраженного зеркалом, при двух настройках коэффициента усиления. Пунктирные линии показывают профили после коррекции фона.

Рис. 4.18 демонстрирует результат коррекции интенсивности фона с помощью уравнения (4.17). На рисунке приведено сравнение профилей исходного и скорректированного сигналов. Обратим внимание, что интенсивность откорректированного изображения непостоянна, как ожидалось бы для отражающего зеркала. Это объясняется тем, что зеркало не строго ортогонально к оптической оси микроскопа. Это подчеркивает важность автофокусировки изображения. Угол наклона зеркала может быть рассчитан путем сравнения изменения интенсивности вдоль линии сканирования с осевой характеристикой (рис. 4.10b). Изменение интенсивности на десять процентов на расстоянии 100 мкм свидетельствует, что зеркало наклонено на угол 0,1° к фокусной плоскости микроскопа.

4.4.2. Геометрическая коррекция

В конфокальных микроскопах, в которых сканирование осуществляют путем передвижения предметного столика, скорость сканирования можно контролировать очень точно. Если же сканирование осуществляют световым пучком, особенно

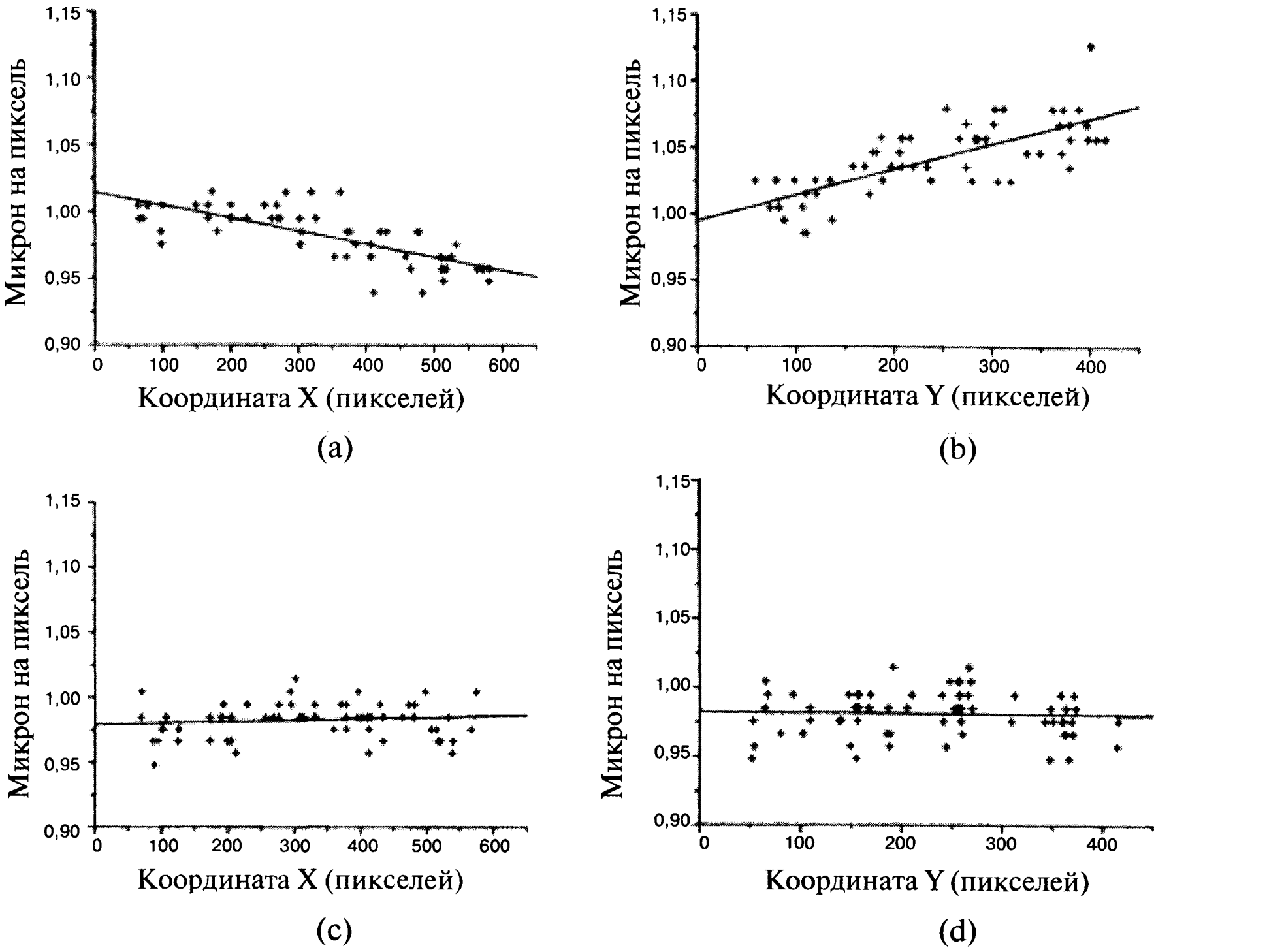


Рис. 4.19. (a) и (b) – Увеличение микроскопа по осям X и Y в пределах поля зрения непостоянно; (c) и (d) - увеличения откорректированного изображения в направлениях X и Y соответственно. Данные получены с помощью «сухого» объектива с увеличением 10x и NA = 0,4

если изображение строится в режиме реального времени, скорость сканирования может быть непостоянной, что приводит к искажениям. Степень искажения зависит от оптических устройств развертки пучка. Зеркало гальванометра, используемое в большинстве конфокальных микроскопов, не должно сильно искажать изображение [19]. Однако при сканировании большой области даже небольшие искажения приводят к несоответствию соседних кадров.

Степень искажения может быть оценена измерением размера особенности известной длины в различных точках поля зрения. Особенно удобно это делать с помощью регулярной квадратной сетки известного размера. Микроскопист может измерить размер квадратов сетки в различных точках поля зрения. Разделив полученные размеры выбранного квадрата (в пикселях) на реальный размер (в микронах), получают увеличение в конкретной точке. На рис. 4.19 показаны измеренные коэффициенты увеличения размеров по осям X и Y системы «Одиссей». Искажение размеров весьма значительно, и в правой части экрана объект кажется на шесть процентов длиннее, чем в левой.

В главе 2 была описана методика коррекции геометрических искажений при гладком преобразовании точки $s(x, y)$ с помощью пары функций $i(x, y)$ и $j(x, y)$:

$$t(x, y) = s(\mathrm{i}(x, y), j(x, y)) \qquad (4.8)$$

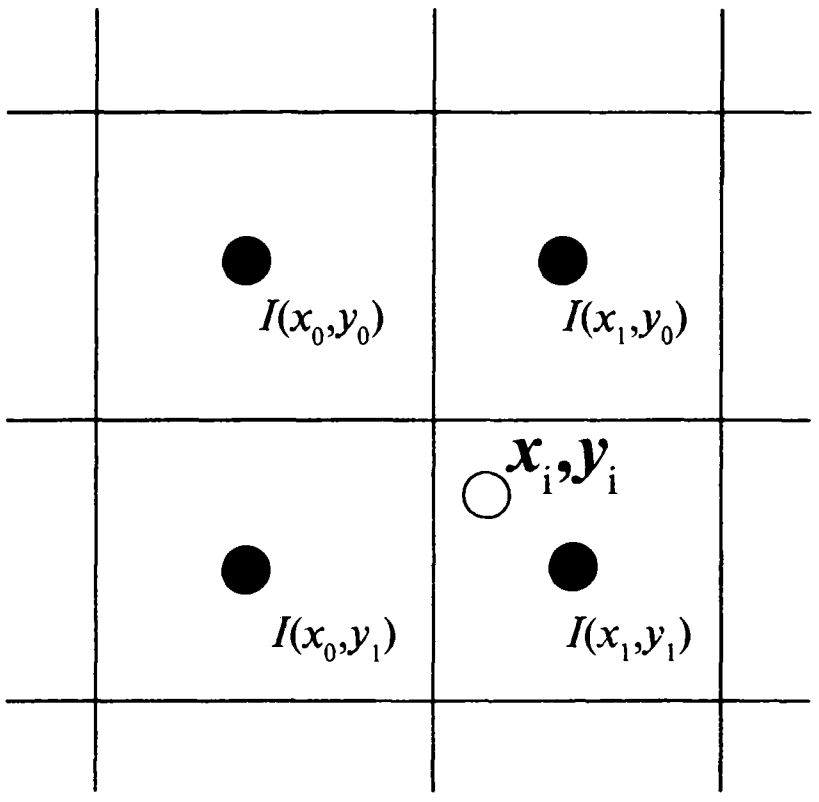
В данном случае искажения оказались практически линейными по осям X и Y. Кроме того, функции $i(x, y)$ и $j(x, y)$ независимы, что позволяет упростить преобразование:

$$t(x, y) = s\,(i(x), j(y)) \tag{4.9}$$

Искажения на рис.4.19 описываются следующими линейными функциями:

$$i(x) = 0{,}95x\,(1{,}015 - 5{,}4\ 10^{-5}x),$$
$$j(\mathrm{y}) = 0{,}96\,y\,(0{,}99 + 8{,}8\ 10^{-5}y) \tag{4.10}$$

Пиксель s исходного изображения после преобразования не обязательно будет иметь целое значение координаты. Например, пиксель с начальными координатами t (150, 240) после преобразования имеет координаты (146,3, 242,7). Преобразованные координаты могут быть округлены до ближайшего целого значения, однако иногда это приводит к неприятному совмещению координат. Лучший метод решения этой проблемы состоит в интерполяции нового значения интенсивности исходя из интенсивности четырех ближайших соседей, как показано на рис. 4.20. Операции построения панорамы крупной области и увеличения малой области («зум»/«zoom»), имеющиеся в современных КЛСМ, осуществляются путем изменения диапазона сканирования управляемых гальванометром зеркал (акусто-оптического дефлектора в системе «Одиссей»). Это почти наверняка изменит степень искажения изображения, и процедуру калибровки в этом случае нужно повторять.



$$J(x_j,y_j) = I(x_0,y_0)(x_1 - x_i)(y_1 - y_i) + I(x_1,y_0)(x_i - x_0)(y_1 - y_i)$$
$$+ I(x_0,y_1)\,(x_1 - x_i)(y_i - y_0) + I(x_1,y_1)(x_i - x_0)(y_i - y_0)$$

Рис. 4.20. Методика определения интенсивности пикселя откорректированного в направлениях X и Y изображения относительно исходного изображения.

4.4.3. Z-калибровка

Калибровка КЛСМ системы по оптической оси Z сложнее, и на разработку методики оценки качества Z-калибровки было потрачено много сил [20]. Как описано в главе 3, линейное перемещение рабочего вала по оси Z нестрого пропорционально количеству импульсов, приходящихся на шаговый двигатель. (Теперь в прода-

же имеются дорогостоящие пьезопреобразователи, имеющие высокую точность перемещения). Для материаловеда эта проблема не столь актуальна, как проблема неверного определения глубины детали, находящейся под поверхностью образца. Этот эффект, подробно обсуждавшийся в разделе 4.3.2, обусловлен разницей показателей преломления материала и иммерсионного масла.

4.5. Способы построения изображения

В главе 2 были описаны методы усиления контраста стандартного микроскопа (например, метод фазового контраста). Конфокальные микроскопы имеют дополнительные способы модификации изображения, связанные с возможностью преобразования сигнала главным компьютером. Самый очевидный метод построения изображения 3D-структуры состоит в регулярном оптическом сечении материала и выводе полученных данных на монитор компьютера. Существуют и более сложные способы демонстрации полученной информации, обусловленные возможностью ее обработки. Например, были разработаны методы коррекции, учитывающие уменьшение интенсивности сигнала при увеличении глубины оптического сечения. Кроме того, можно комбинировать режимы отраженного и флуоресцентного света, что позволяет дополнительно изменять режим формирования изображения.

4.5.1. Работа в отраженном и флуоресцентном свете

Как отмечалось, КЛСМ-системы имеют два основных режима работы. В режиме отраженного света детектор регистрирует свет, длина волны которого совпадает с длиной волны лазерного излучения. Во флуоресцентном режиме детектор регистрирует излучение, длина волны которого выше, чем у возбуждающего лазерного света.

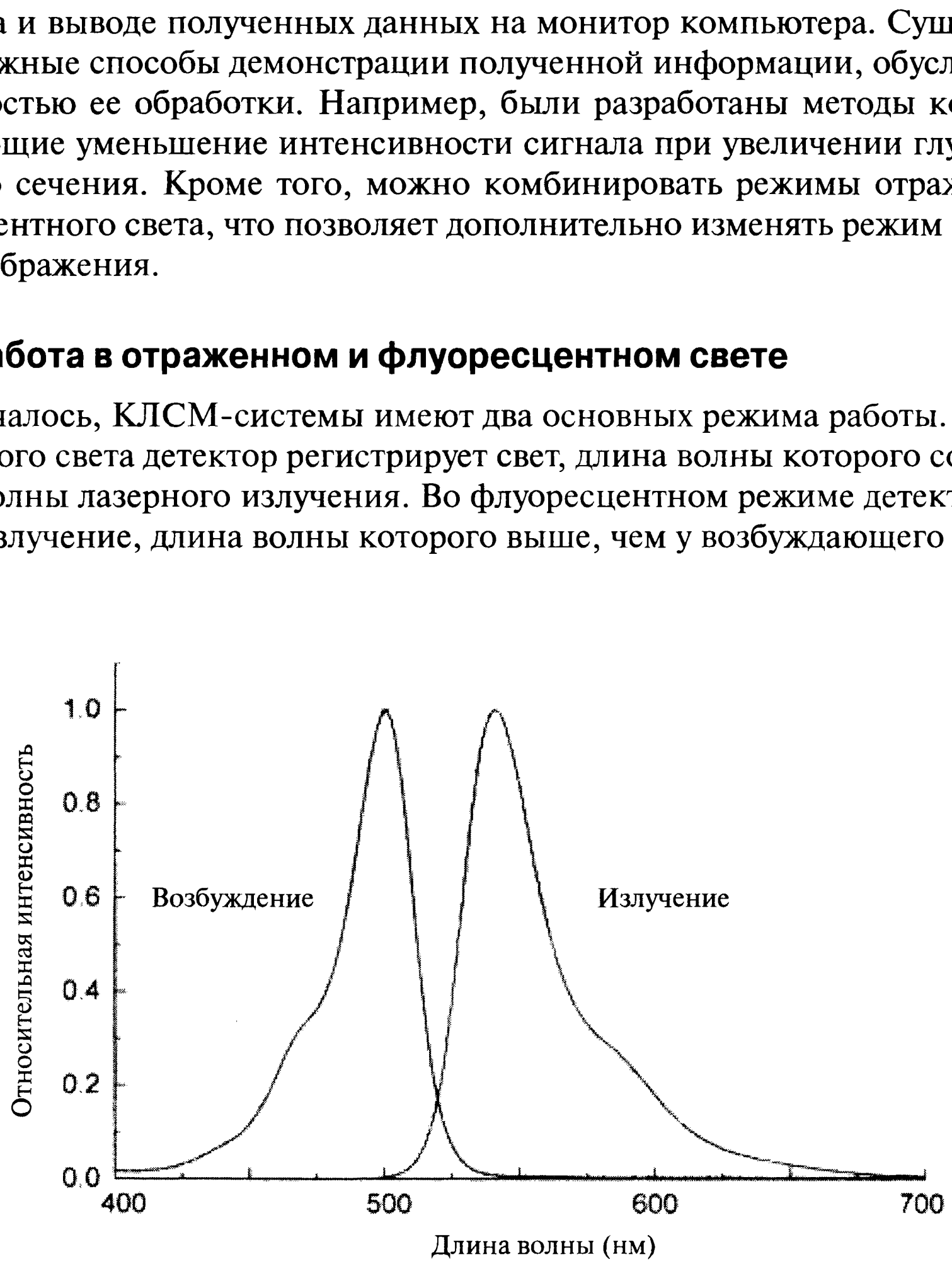
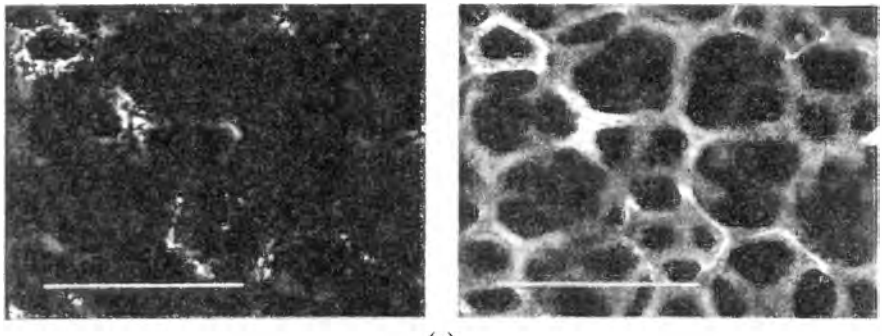
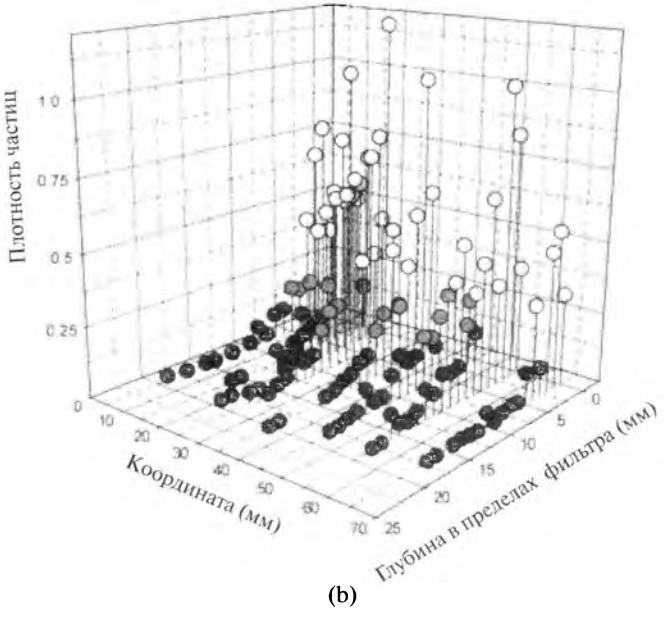


Рис. 4.21. Спектры возбуждения и флуоресценции красителя позволяют выбрать длину волны возбуждения и запирающий светофильтр.

Для увеличения контраста в образец можно ввести флуоресцентный краситель. При изучении биологических объектов широко используют красители типа флуоресцина и родамина, однако в материаловедении они применяются значительно реже. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресцина показаны на рис. 4.21. Из приведенных спектров следует, что для флуоресцентного режима подходит возбуждение длиной волны 488 нм и запирающий светофильтр с порогом 550 нм. Рис. 4.22a демонстрирует два изображения вспененного фильтровального материала, работающего в воздушном потоке. Фильтруемые микрочастицы обработали флуоресцином, чтобы они были хорошо видны во флуоресцентном свете, а структура пены хорошо видна в режиме отраженного света. Комбинирование режимов работы позволило определить глубину проникновения частиц во вспененный фильтр, и результаты представлены на рис. 4.22b.



(a)



(b)

Рис. 4.22. (a) – Изображения вспененного полиуретана в режимах флуоресцентного и отраженного света. Длина масштабной линии равна 1 мм. Положение и количество частиц легко определить во флуоресцентном свете, что позволяет исследовать глубину проникновения микрочастиц в пену (b).

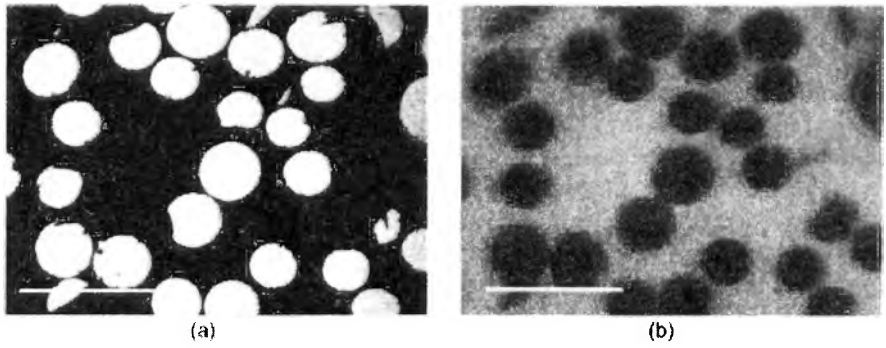


Рис. 4.23. (a) - Поверхность стеклопластика в отраженном (a) и флуоресцентном свете (b). Длина масштабной метки равна 20 мкм. Артефакты, появляющиеся при полировке (щербины и мелкие фрагменты волокон), хорошо видны в отраженном свете. Во флуоресцентном режиме они не наблюдаются.

Некоторые образцы флуоресцируют без красителя, примером чего являются композиты на основе полимерных матриц. Рис. 4.23 демонстрирует поверхность волокнистого композита в режимах отраженного и флуоресцентного света. Полированные торцы волокон хорошо отражают свет, что создает контрастное изображение в режиме отраженного света. Полимерная матрица, в отличие от стекловолокон, автофлуоресцирует, и во флуоресцентном режиме изображение оказывается практически негативным по отношению к изображению, полученному в отраженном свете. Отметим, что флуоресцентный сигнал значительно слабее отраженного. Поэтому для увеличения отношения сигнал/шум необходимо увеличить мощность лазера и суммировать изображения нескольких кадров. Увеличение мощности лазера приводит к необратимым химическим реакциям в полимерных молекулах, и флуоресценция ослабляется. Этот эффект, называемый фотоотбеливанием, является очень важным и не слишком исследованным явлением [21]. Фотоотбеливание проявляется в постепенном уменьшении интенсивности флуоресцентного сигнала со временем.

При сканировании образца мощным лазером облучается весь материал, попадающий в световой конус. В том числе и области по глубине, не попадающие на изображение. Например, если нужно получить шестнадцать последовательных оптических срезов на различной глубине от поверхности, интенсивность шестнадцатого среза из-за фотоотбеливания может быть на 10–40% ниже, чем при первом сканировании! Кроме того, на дозу облучения значительное влияние оказывает размер кадра. Например, в некоторых КЛСМ для ускорения получения XZ сечения (по толщине образца) можно отменить сканирование по оси Y. На рис. 4.24 показано изображение в плоскости XY, на котором темная линия соответствует предыдущей линии сканирования в плоскости XZ. Хотя фотоотбеливание ограничивает отношение сигнал/шум, оно при изучении крупных областей облегчает поиск границы предыдущих кадров сканирования!

Помимо работы в отраженном и фотолюминесцентном свете некоторые КЛСМ-системы могут работать в режиме подсчета фотонов, который используется при очень слабой интенсивности сигнала [22]. Достоинством этого метода является очень высокая чувствительность, а недостатком – медленное построение изображения.

4.5.2. Представление трехмерной структуры

После получения ряда оптических сечений необходимо построить трехмерное изображение структуры. Конфокальный микроскоп обычно получает набор оптических срезов с регулярно возрастающей глубиной Δz от поверхности образца. Для большинства конфокальных микроскопов получение сотни 2D-изображений обычно занимает несколько минут. Это очень быстрый метод получения большого объема видеоинформации. Разработано несколько методов ее представления. Отметим, что эстетика методов демонстрации трехмерных образов (используемых главным образом в биологии) практически не влияла на расширение области применения конфокальной микроскопии.

Чтобы визуализировать трхмерную структуру композита, можно построить плоскость виртуального экрана, как показано на рис. 4.25. Это делают, расширяя векторы виртуальной плоскости и определяя их пересечение с объемом информации. На данном рисунке все векторы параллельны и изображение не имеет перспективы. Если бы эти векторы расходились, полученная проекция за счет перспективы создавала бы ощущение глубины. Изменяя положение и ориентацию виртуальной плоскости, микроскопист может рассматривать данные из любой точки.

Обычно используют два метода проектирования данных на плоскость виртуального экрана:

- *Плоскостной метод.* Трехмерную информацию проектируют на сечение, в результате чего образуется многоугольник, демонстрирующий изменение интенсивности сигнала (рис. 4.34b). Эту поверхность можно преобразовать в оптимизированную поверхностную сеть [23, 24]. Цвет и интенсивность можно определить, исходя из ориентации плоскости относительно источника света и метода затенения. Наконец, каждое сечение можно по очереди спроектировать на виртуальный экран согласно его координате Z.

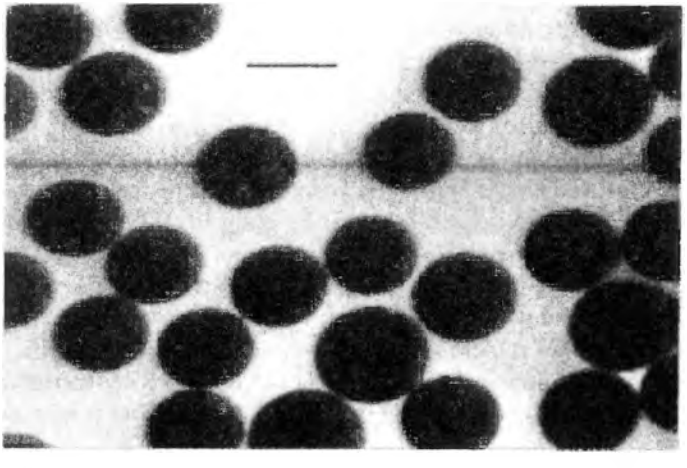


Рис. 4.24. Двумерное изображение армированного пластика, полученное во флуоресцентном свете, демонстрирует эффект фотоотбеливания после трех параллельных сечений в плоскости XZ. Фотоотбеливание привело к проявлению темной горизонтальной полосы. Длина масштабной линии соответствует 20 мкм.

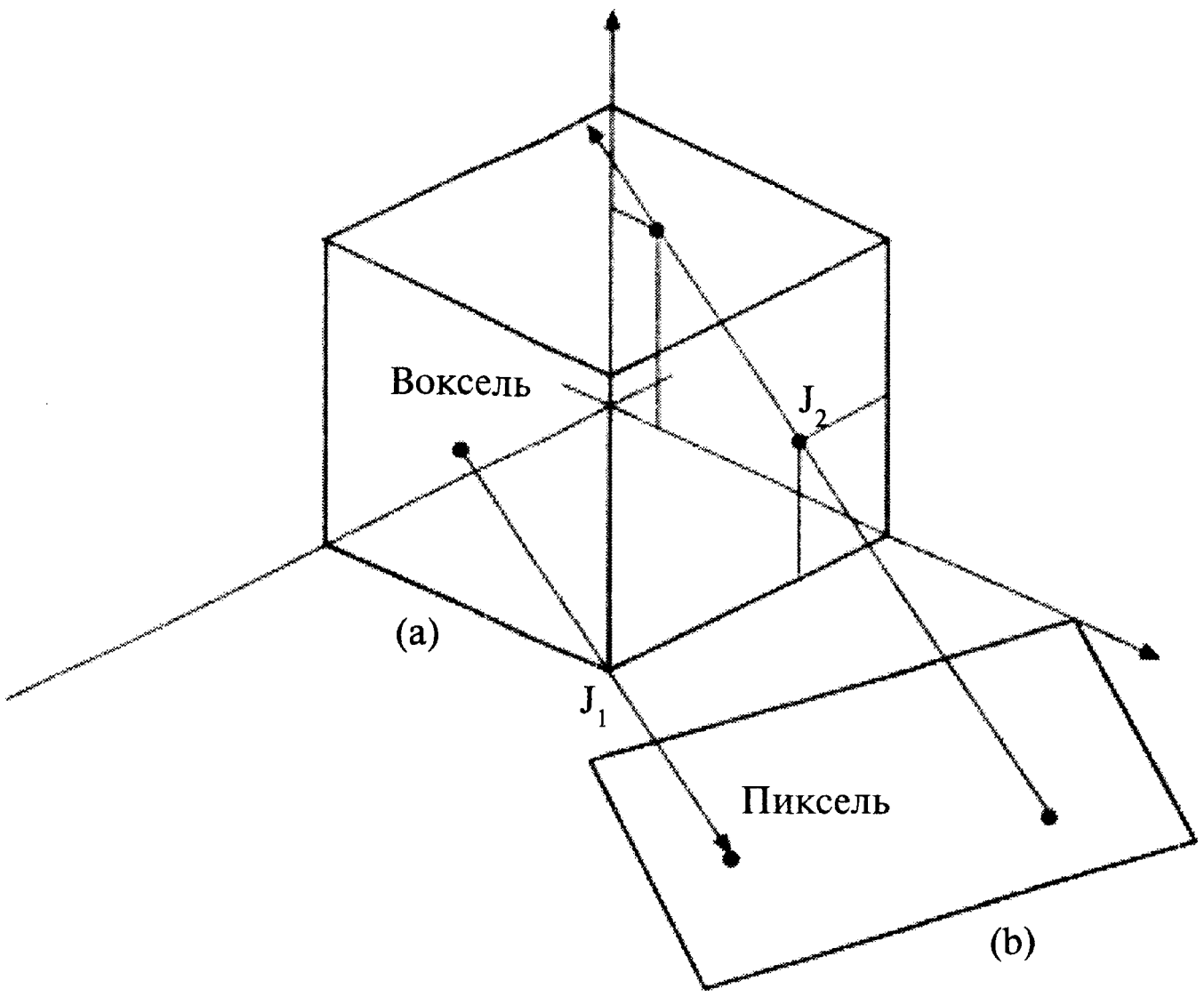


Рис. 4.25. Схема, иллюстрирующая два метода представления трехмерной структуры материала. (a) - Каждый воксель (трехмерный аналог пикселя) рассматривают по очереди и строят вектор, проходящий через воксель перпендикулярно виртуальному экрану. Точка пересечения виртуального экрана дает проекцию вокселя. (b) - Рассматривают каждый пиксель на виртуальном экране и создают нормальный к нему вектор. Две точки, в которых вектор пересекает плоскость 3D-данных, расположены в точках (I_1, I_2). После этого вычисляют уравнение прямой, соединяющей эти точки и определяются все воксели, которые проектируются в данную точку виртуального экрана.

- *Объемное представление.* При плоскостном методе представления лучи направлены на виртуальный экран. В объемном методе представления данных пучки направлены в обратном направлении - от виртуального экрана к набору данных. Каждый пучок на своем пути пересекает множество вокселей (3D-аналог пикселей), а алгоритм определяет интенсивность и цвет каждого пикселя на виртуальном экране. Полученная интенсивность может зависеть от интенсивности вокселей по координате Z (относительно виртуального экрана), и изображение создается за счет изменения интенсивности [26]. Эту методику иллюстрируют рис. 4.26 и 4.27, демонстрирующие объемную структуру волокнистого композита и пенополиуретана соответственно.

Метод представления объема обычно используют для демонстрации структуры биологических объектов [27]. Конструкционные материалы обычно менее прозрачны, и их структуру демонстрируют плоскостным методом. Основным недостатком этих методов является большой объем необходимой памяти. Если используют некоторый количественный метод анализа полученной информации, большая ее часть оказывается избыточной. Для анализа нескольких областей или для получения панорамы крупной области более удобны другие методы.

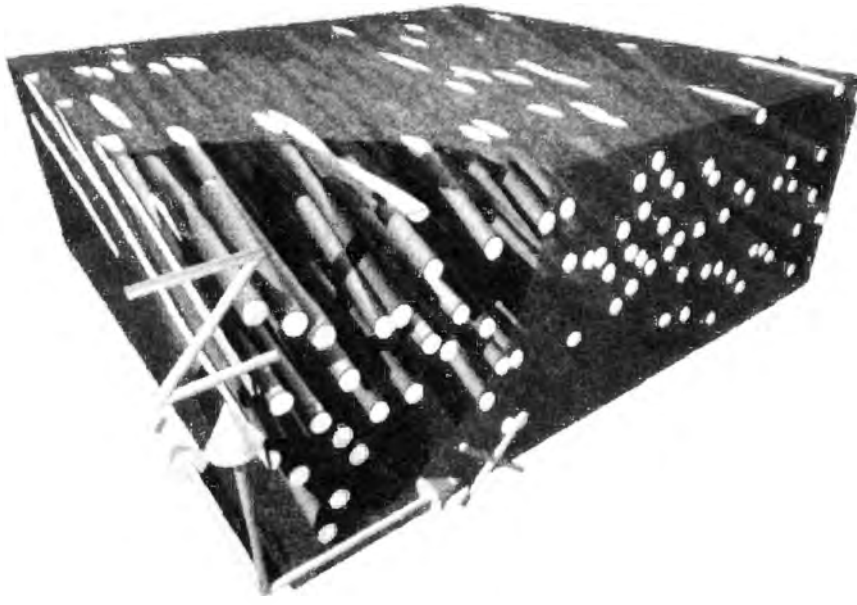


Рис. 4.26. Трехмерная структура стеклопластика. Изображаемый объем равен 1,5×2,0×0,5 мм.

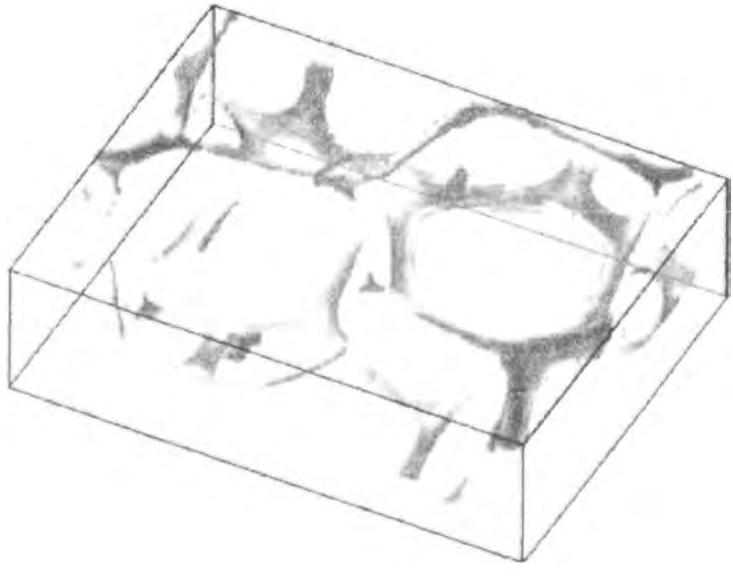


Рис. 4.27. Трехмерная структура пенополиуретана, полученная в режиме отраженного света. Изображаемый объем равен 2,5×1,5×1 мм.

4.5.3. Методы получения тонких оптических сечений

Оптическое изображение можно получить двумя способами, иллюстрируемыми рис. 4.28 и 4.29. Выбор наиболее подходящего способа зависит от особенностей образца и поставленной задачи. Если изучаемые объекты более или менее параллельны плоскости предметного столика микроскопа, как волокна в однонаправленном композите (раздел 4.7), то оптическое сечение лучше делать в плоскости XZ при нескольких различных значениях координаты Y. Рис. 4.29 иллюстрирует метод получения тонких сечений в плоскости XZ. Образец разрезают так, чтобы волокна были параллельны поверхности образца. Этот метод позволяет изучать слабо изогнутые волокна в однонаправленных композитах. Если интересующие особенности параллельны оптической оси микроскопа, лучше получить несколько XY кадров при различных значениях Z, как показано на рис. 4.28.

4.5.4. Исследование поверхности

По мере движения объекта через фокальную плоскость интенсивность отраженного света проходит через максимум. Этот эффект иллюстрирует рисунок 4.6, демонстрирующий изменение интенсивности отраженного сигнала от координаты Z при прохождении зеркала через фокальную плоскость. Для неровных объектов со сложной топологией поверхности максимумы интенсивности в различных точках образца наблюдаются при различных значениях координаты Z в зависимости от высоты поверхности. Координата Z в максимуме определяет уровень высоты соответствующей точки. На практике получают несколько изображений в плоскости XY при регулярном возрастании глубины в направлении Z. При регистрации последовательности изображений для каждого пикселя регистрируют координату Z, при которой интенсивность достигает максимума. На рис. 4.30 показано изображение, демонстрирующее высоту кремниевой микросхемы в различных точках. Время сбора информации составляло 20 секунд.

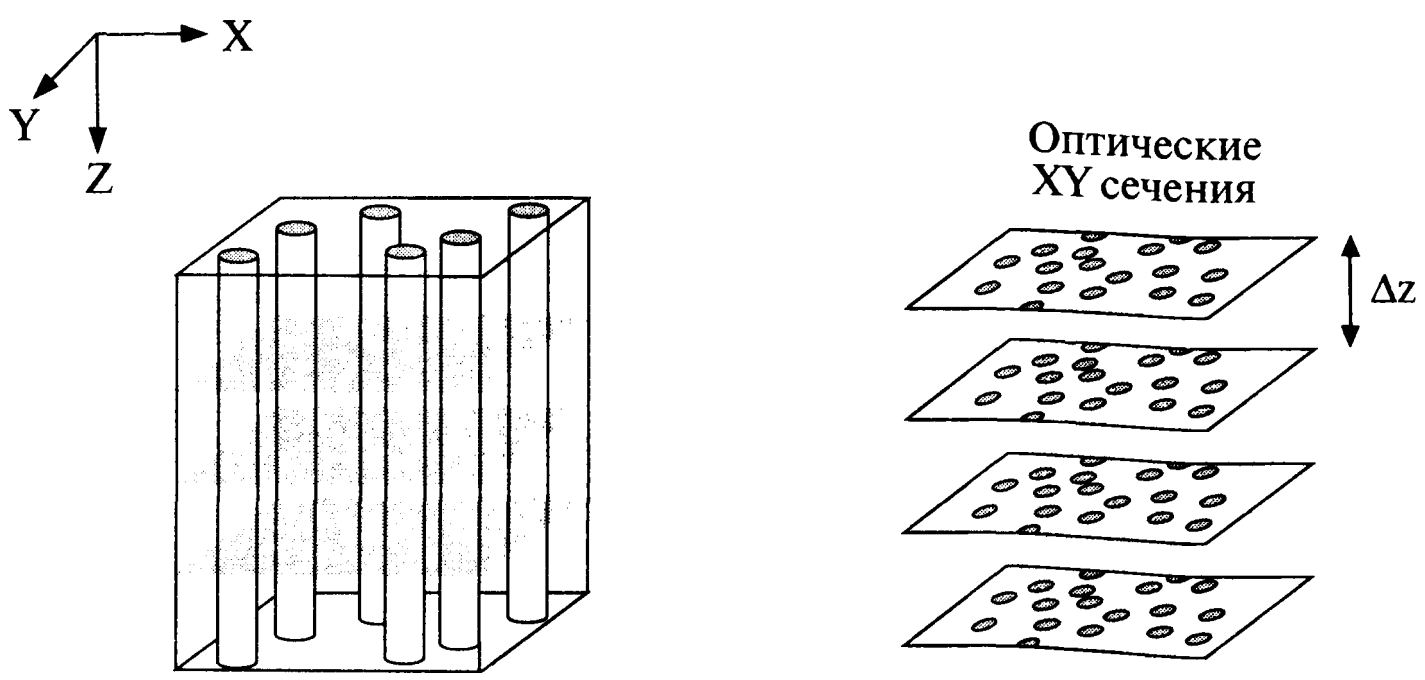


Рис. 4.28. Изучение трехмерной структуры композита при помощи конфокального микроскопа. Получают последовательность оптических сечений в плоскости XY, расположенных на расстоянии Δz друг от друга. Сопоставляя координаты центров волокон в различных сечениях, можно определить их ориентацию и распределение по длине

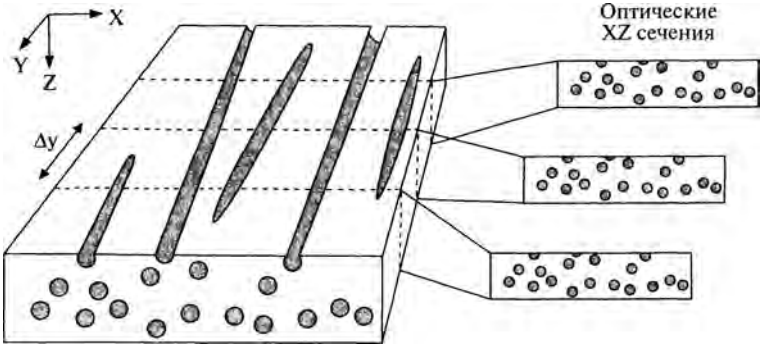


Рис. 4.29. Альтернативный метод изучения структуры материала состоит в получении ряда оптических сечений в плоскости XZ, расположенных на расстоянии Δy. Если образец разрезан так, чтобы волокна были параллельны плоскости сечения, то их сечение в плоскости XZ будет почти круглым. Сопоставляя изображения в различных XZ сечениях, можно определить изогнутость волокон.

Точность измерения высоты некоторой точки зависит от характеристик микроскопа (раздел 4.3). Прежде всего она зависит от числовой апертуры объектива NA. Как отмечалось в разделе 4.1.2, осевая разрешающая способность микроскопа может быть определена исходя из критерия Рэлея путем измерения размера дифракционных колец, формируемых двумя точечными объектами. Согласно этому критерию, предел разрешения соответствует осевому расстоянию между двумя точечными источниками, когда они начинают различаться. Для конфокального микроскопа с масляным иммерсионным объективом разрешающая способность

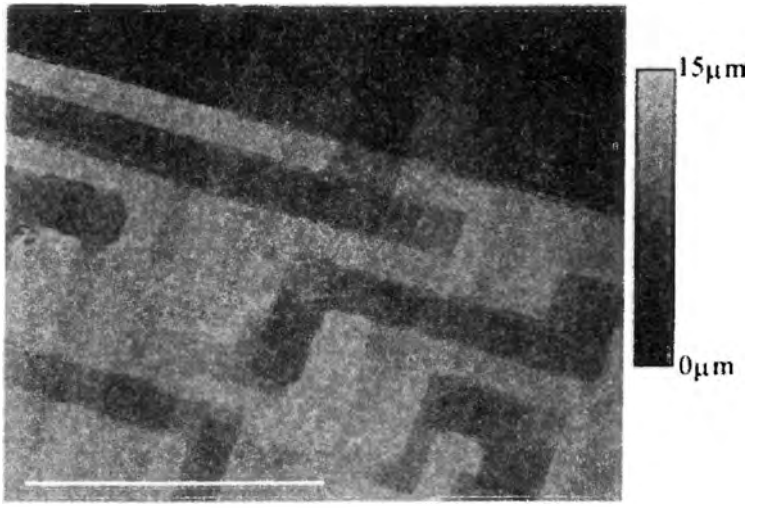


Рис. 4.30. Карта высоты поверхности кремниевой микросхемы. Длина масштабной линии равна 50 мкм. Прямоугольник справа описывает высоту точки уровнем интенсивности серого цвета. Области, в которых не удалось определить высоту поверхности, даны белым цветом.

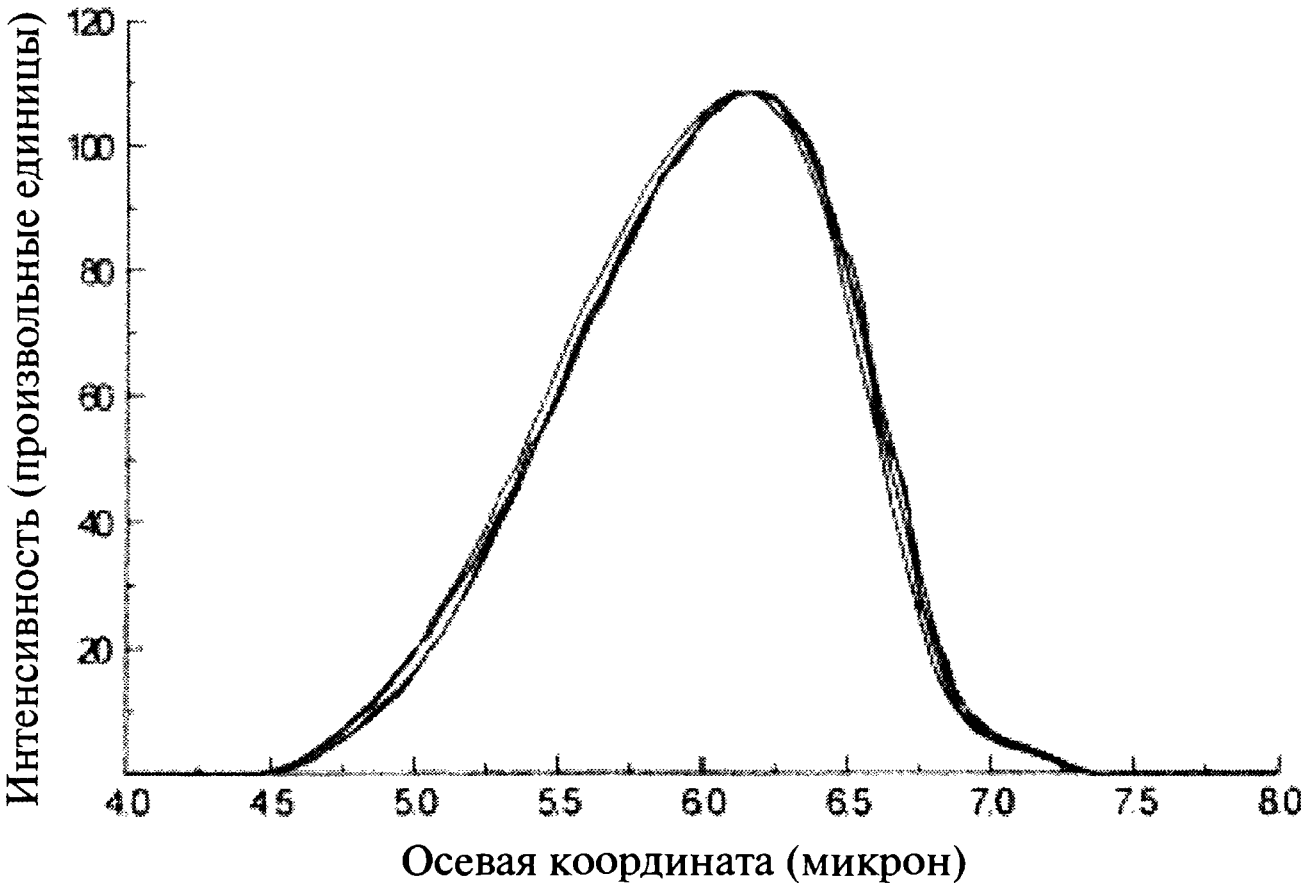


Рис. 4.31. Воспроизводимость перемещения образца по координате Z иллюстрируется измерением интенсивности сигнала при повторных движениях зеркала по оси Z.

в осевом направлении может достигать 0,5 мкм. Однако точность определения положения поверхности в осевом направлении зависит от точности, с которой может быть определена осевая координата центра кружка Эри. Согласно работе [28], а эта величина может быть меньше 0,1 мкм. На практике она ограничивается точностью механического перемещения образца по оси Z. В микроскопе «Одиссей» с этой целью используют шаговый двигатель, осуществляющий фокусировку микроскопа. Его наименьший шаг равен 0,05 мкм. Рис. 4.31 демонстрирует точность и воспроизводимость фокусировки. Интенсивность отраженного зеркалом сигнала была измерена четыре раза, и после каждого прохода шаговый двигатель возвращался в начальную точку. Положение максимума воспроизводится с точностью ±0,05 мкм.

Отражение света на границе раздела двух фаз зависит от разности их показателей преломления. Если показатели преломления близки, граница раздела

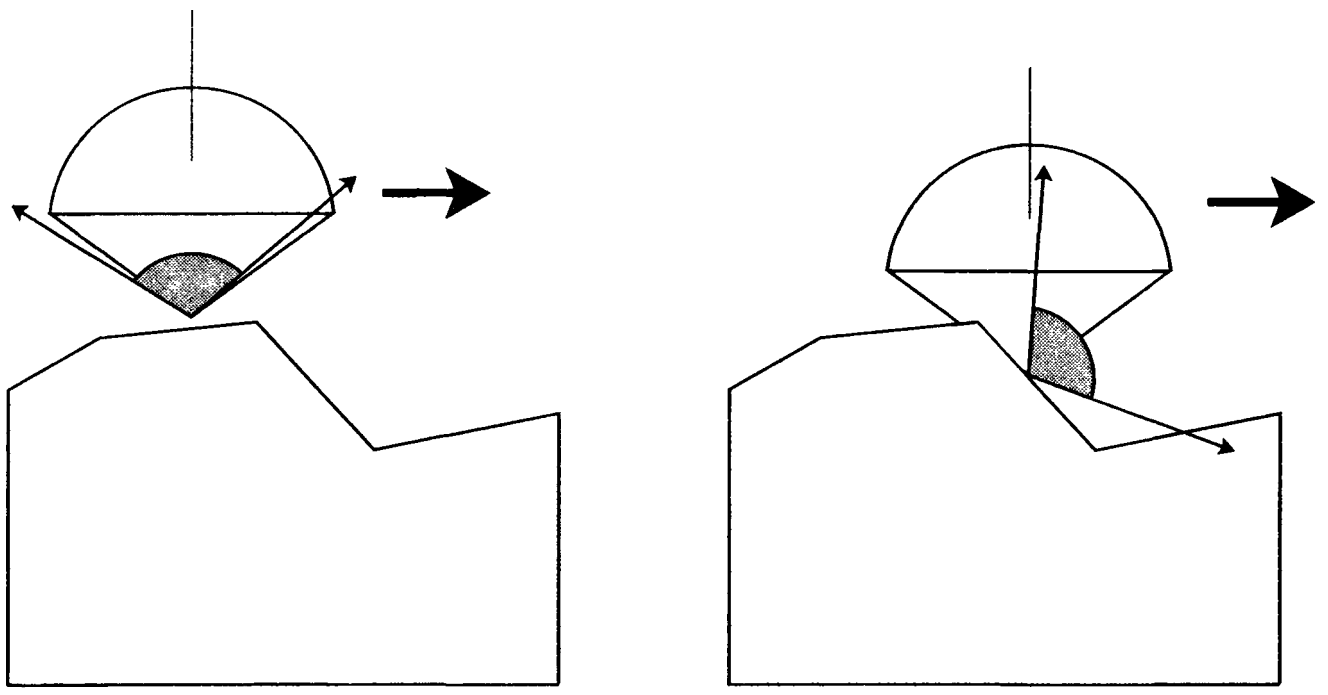


Рис. 4.32. Фокусировка микроскопа при сложной топологии поверхности. При увеличении угла наклона поверхности уменьшается количество света, отражаемого в объектив.

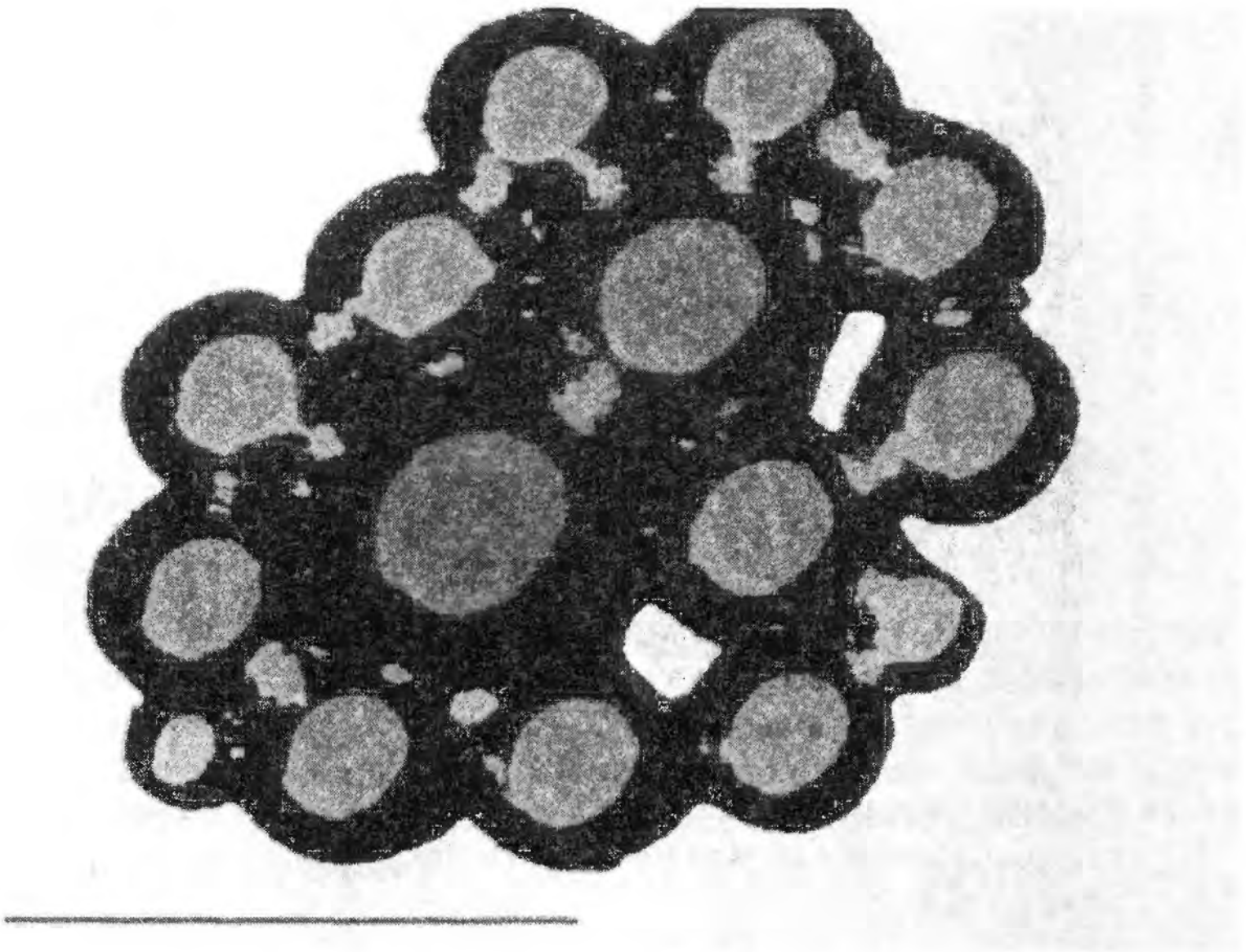


Рис. 4.33. Латексные шарики, покрытые слоем металла. Изображение получено в режиме отраженного света. Длина масштабной линии равна 20 мкм.

отражает очень слабо. В этом случае для увеличения контраста нужно или увеличивать коэффициент усиления, что усиливает шум, или обработать образец так, чтобы возросло отражение. С этой целью на поверхность образца часто напыляют слой металла, создающего отражающую поверхность.

Интенсивность отраженного света зависит от угла наклона поверхности, что может вызвать проблемы при анализе образцов с грубой топологией поверхности [29]. Если угол наклона мал, почти весь отраженный свет попадает в объектив. При большем угле наклона в объектив отражается меньше света (рис. 4.32). Для образцов с сильной шероховатостью поверхности коэффициент отражения может изменяться столь сильно, что приходится изменять коэффициент усиления сигнала. Имеется верхний предел наклона поверхности ϕ_{max}, выше которого в объектив свет вообще не попадает. Этот угол равен углу светового конуса объектива $\phi_{max} = \alpha$. Поэтому для анализа образцов с шероховатой поверхностью оптимальны объективы с большой числовой апертурой NA. Однако и в этом случае при большом угле наклона поверхности ($\phi_{max} > \alpha$) свет в объектив не попадает. Этот эффект демонстрирует рис. 4.33, на котором показаны стеклянные сферы небольшого диаметра. На изображении имеются области черного цвета, из которых отраженный свет в объектив не попадает. В этих «дырках» можно искусственно усреднить интенсивность соседних пикселей, но этот метод крайне нежелателен. Рис. 4.34a демонстрирует конфокальное изображение поверхности тонкой пленки. Чтобы увеличить интенсивность отраженного света, на пленку напылили тонкий слой алюминия. Рис. 4.34b демонстрирует плоскостное 3D-представление этой пленки методом, описанным в разделе 4.5.2.

4.5.5. Автофокусировка микроскопа

В стандартном микроскопе изображение образца со сложной топологией поверхности имеет области, находящиеся в фокусе, и области, которые не в фокусе. В конфокальном микроскопе области, находящиеся не в фокусе, на изображении просто отсутствуют. Однако и в этом случае часто требуется получить изображение поверхности, которая полностью находится в фокусе. Для достижения этой цели можно получить ряд изображений при различных положениях объектива по

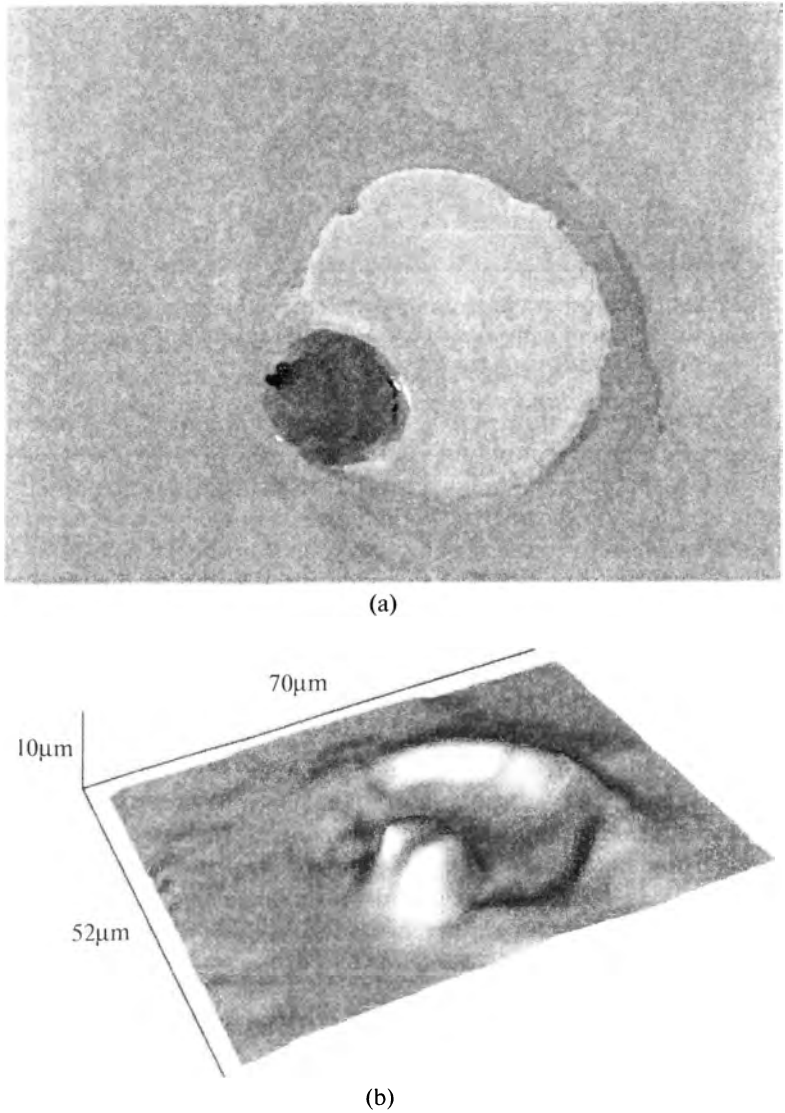


Рис. 4.34. Тонкая полимерная пленка, содержащая малое стеклянное включение. При растяжении шарик отслоился. Изображение профиля поверхности (a) и 3D-реконструкция (b).

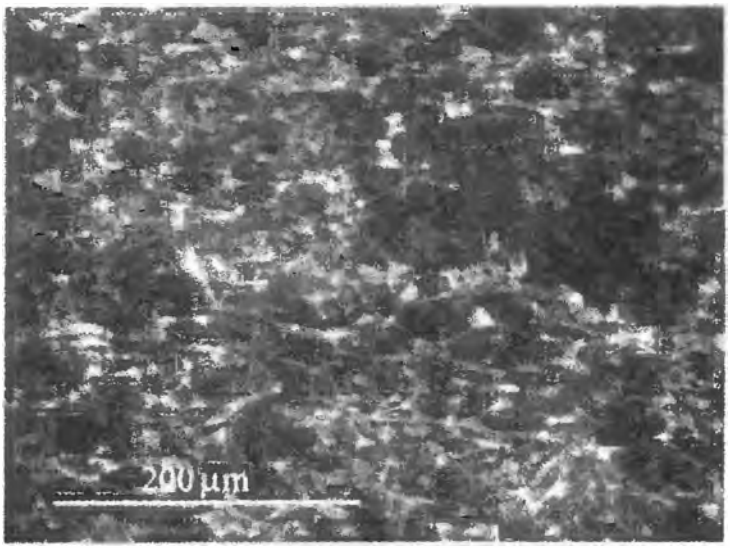


Рис. 4.35. Автофокусированное изображение пенополиуретановой пены, полученное при помощи неиммерсионного объектива с 10х увеличением. Расстояние между сечениями $\Delta Z = 300$ мкм

координате Z, а затем объединить их для получения полностью сфокусированного изображения. Метод объединения зависит от режима работы микроскопа.

В стандартном микроскопе по очереди обрабатывают каждое сечение для определения находящихся в фокусе областей. Сфокусированные области затем объединяют, в результате чего создается автофокусированное изображение. Алгоритм такого преобразования изображения непрост, но имеются промышленные пакеты, которые достаточно хорошо решают эту задачу [31]. Их недостатком является невысокая скорость работы.

В конфокальном микроскопе области, находящиеся не в фокусе, устранены оптикой. Поэтому методика обработки состоит в объединении изображения различных сечений. Это можно делать в режиме реального времени, по мере получения последовательных сечений. Автофокусированное изображение строится нахождением максимальной интенсивности каждого пикселя на всех оптических сечениях. Алгоритм автофокусировки аналогичен программе изучения топологии неровной поверхности, но в этом случае регистрируется интенсивность, а не координата Z. Рис. 4.35 демонстрирует автофокусированное изображение пенополиуретановой пены, полученное с интервалом $\Delta Z = 300$ мкм.

4.6. Анализ тонких пленок, наполненных частицами

4.6.1. Краткое описание

Ниже описан метод измерения количества и объема микрочастиц методом конфокальной микроскопии. Для иллюстрации работы метода исследовали две тонкие полимерные пленки, наполненные антиблокирующими частицами флуоресцирующей окиси кремния.

4.6.2. Полимерные пленки

Полимерные молекулы представляет собой очень длинные цепи, состоящие из повторяющейся последовательности небольших звеньев. Молекулярные цепи могут быть линейными, разветвленными или поперечно-сшитыми. Их длина может достигать 10 мкм. В расплавленном состоянии цепи гибки и под действием внешних сил, приложенных к расплаву, могут ориентироваться. Структура макромолекул сильно влияет на физические (в том числе и оптические) свойства полимера [32].

Полимерные пленки имеют целый комплекс замечательных свойств, например, высокую прочность при растяжении, износостойкость, хорошие электроизоляционные свойства и оптическую прозрачность. Благодаря этому они успешно используются в индустрии и быту. Для примера рассмотрим полимерную ленту, являющуюся основой кассетной магнитной пленки. Высокая прочность позволяет использовать очень тонкую пленку, что обеспечивает большой объем записываемой информации. Восстановление длины полимера после растяжения гарантирует неизменность длины во времени. Наконец, пленка очень дешевая.

Рис. 4.36 иллюстрирует производство двуосноориентированной полимерной пленки. В экструдер насыпают гранулы полимера, где они плавятся, и полимер экструдируется в виде пленки на охлаждаемый барабан. Полученная пленка нагревается и вытягивается в продольном направлении приблизительно в три раза от начальной длины при помощи нескольких валиков, движущихся с различной скоростью. После этого пленка подается на два ряда движущихся зажимов, захватывающих края пленки. Пленка вновь нагревается вместе с этими зажимами и вытягивается в поперечном направлении приблизительно в три раза. В растянутом состоянии пленка кристаллизуется в специальных термошкафах, после чего ее охлаждают, разрезают и наматывают на катушки.

Во время высокоскоростной перемотки пленка контактирует с соседними витками. Площадь контакта соседних слоев достаточно велика благодаря гладкой поверхности пленки, а поверхностный электрический заряд приводит к притя-

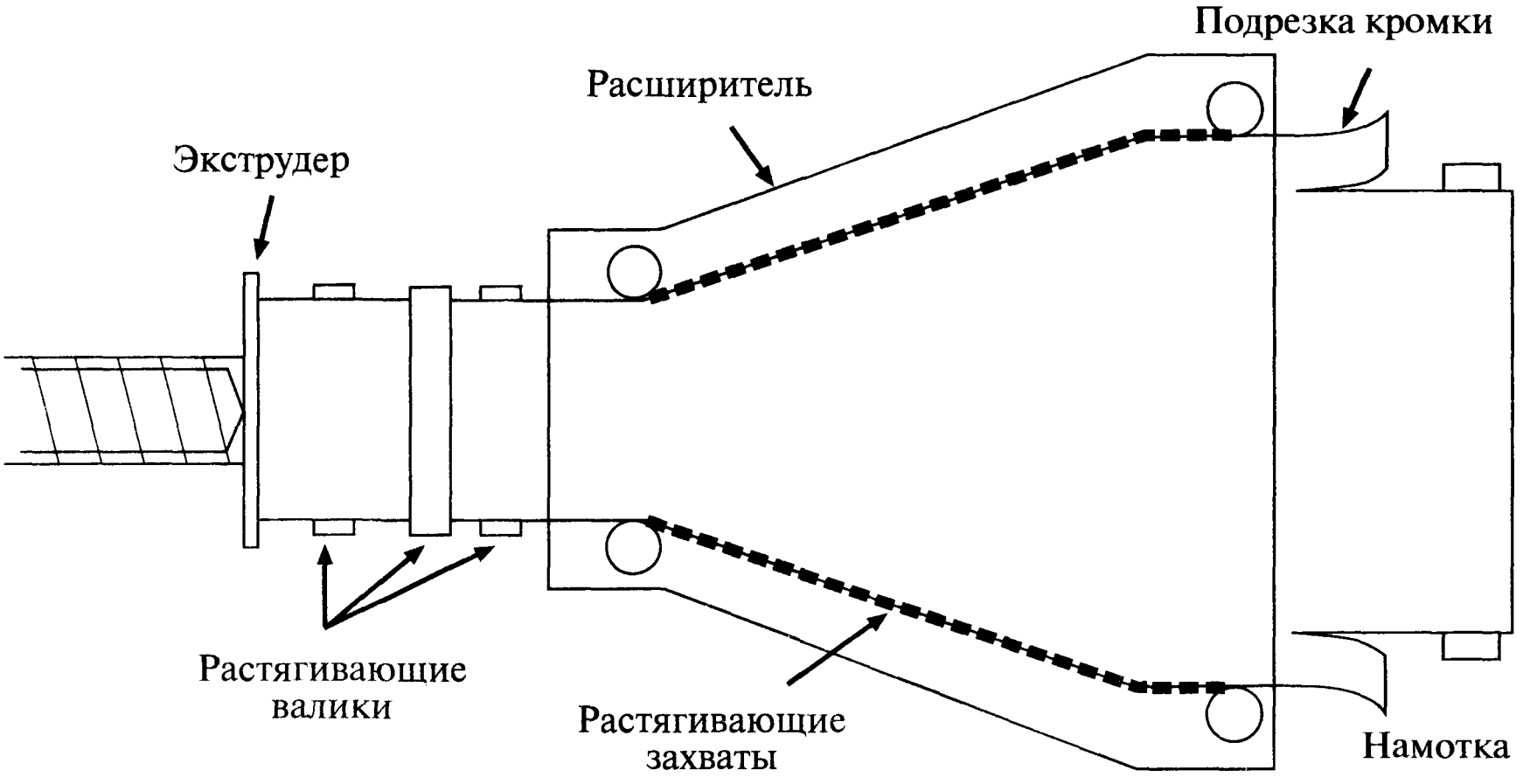


Рис. 4.36. Схема, иллюстрирующая производство двуосноориентированной полимерной пленки методом экструзии.

жению соседних слоев. Для уменьшения силы сцепления при гранулировании полимера в него добавляют мелкие частицы. Чтобы пленка осталась прозрачной, коэффициент преломления частиц должен быть близким к коэффициенту преломления полимера. При вытяжке пленки вблизи жестких частиц она становится шероховатой, что облегчает перемотку [33].

4.6.3. Стереологический анализ частиц

Типичной задачей микроскописта является изучение частиц. Они могут представлять собой клетки, песчинки или, как в данном случае, микрочастицы окиси кремния. Во всех случаях эту задачу решают сходными стереологическими методами. Такое исследование часто состоит в измерении концентрации и определении распределения микрочастиц по объему.

До появления методов изучения трехмерной структуры количество частиц измеряли на тонких срезах образца. Процедуру подсчета иллюстрирует рис. 4.37, на котором показаны два последовательных среза, находящихся на расстоянии h. Для идентификации частиц в первом сечении, называемом контрольным, используется рамка подсчета, описанная в разделе 2.9. Концентрацию частиц можно оценить, исходя из количества объектов, попавших в контрольное сечение, но отсутствующих на сечении сравнения. Эту процедуру повторяют на множестве случайно выбранных срезов, пока не будут с требуемой точностью получены статистически достоверные данные. Ручной подсчет количества частиц трудоемок, но эту процедуру можно выполнять методом автоматизированной обработки изображения. Скорость подсчета значительно увеличивает и тандемный проекционный микроскоп, позволяющий одновременно просматривать пары срезов [34].

Для измерения объема микрочастиц можно использовать метод Кавальери [35]. Для этого на каждом сечении измеряют площадь микрочастиц, а объем вычисляют суммированием площади всех частиц и умножением полученной суммы на толщину среза. Этот метод также очень трудоемкий.

Резюмируя вышесказанное, распределение частиц по размеру и их количество можно определить, сделав несколько последовательных срезов с известным расстоянием между ними. Хотя этот метод дает хорошие результаты, при некоторой

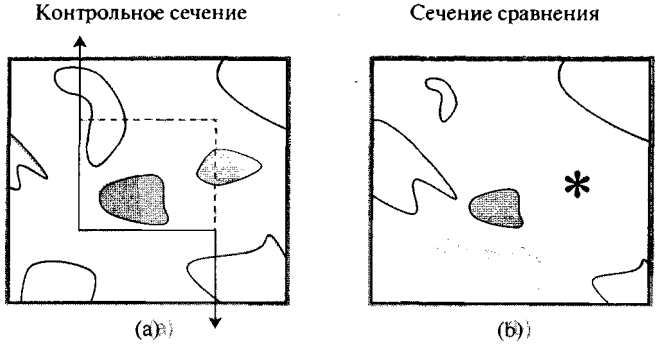


Рис. 4.37. Правила дисекции. (a) - Объект учитывается, если он появляется во внутренней рамке контрольного сечения, но отсутствует на сечении сравнения (b). В данном случае учитывать нужно лишь один из двух заштрихованных объектов.

форме частиц появляются ошибки. Примерами могут служить случаи, когда размер частиц меньше толщины среза или частицы имеют вогнутую форму. Первую проблему можно решить, уменьшив расстояние между сечениями. Однако возможности микротома для получения тонких срезов и время анализа большого количества срезов налагают строгие ограничения на этот метод. В последнее время для этого успешно применяют конфокальную микроскопию, позволяющую получать тонкие оптические сечения образца.

4.6.4. Анализ частиц методом конфокальной микроскопии

И дисекция, и метод Кавальери требуют получения множества тонких срезов высокого качества. Идеальным инструментом для таких измерений является конфокальный микроскоп, позволяющий делать непрерывные оптические сечения на различной глубине от поверхности образца. Чтобы использовать это преимущество, была предложена новая методика подготовки образца, позволяющая значительно увеличить скорость работы и названная «оптической дисекцией». Рис. 4.38 иллюстрирует метод оптической дисекции, использующей 3D-рамку подсчета, названную «блоком подсчета». Трехмерный блок подсчета имеет три поверхности приема и пять поверхностей запрета, что совершенно аналогично правилам подсчета для плоского случая. В процессе работы микроскопист перемещает образец и вручную считает объекты, строго выполняя правила подсчета [36].

Компьютер радикально ускоряет изучение трехмерной структуры материала, и поэтому теперь он является составной частью большинства КЛСМ. В отличие от метода дисекции, предполагающего выпуклую форму объектов, конфокальная микроскопия позволяет точно определить количество частиц, не делая каких-либо предположений об их форме. В работе [37] этим методом изучали распределение пор в оптически прозрачном оксиде алюминия.

Конфокальная микроскопия устраняет потребность в инструментальных средствах стереологического подсчета, но она имеет и некоторые недостатки. Например, изображение зависит от оптического пути света, как описано в разделе

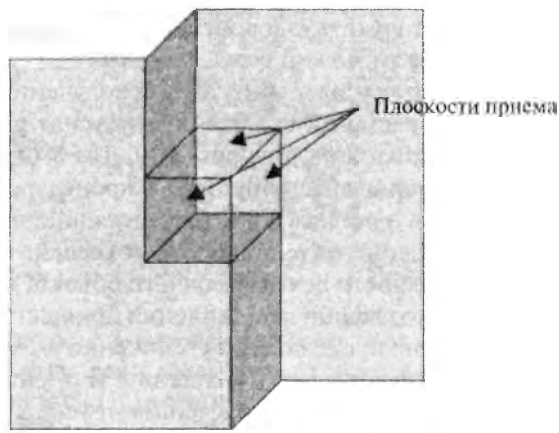


Рис. 4.38. 3D-блок подсчета, аналогичный рамке подсчета, используемой для анализа 2D-изображений.

4.3.4. Дополнительное ухудшение качества изображения могут вызвать неоднородность флуоресценции и внутренние отражающие плоскости.

Коррекция поглощения света в конфокальной микроскопии обсуждалась выше. Лильеборг с соавторами описали метод коррекции, в котором коэффициент затухания рассчитывали из гистограмм распределения интенсивности, полученных из оптических сечений [38]. После этого программа компенсировала уменьшение интенсивности в каждом сечении. В работе [39] описан метод коррекции, в котором вычисляли интенсивность каждого вокселя. В этом случае учитывается не только уменьшение интенсивности, но и неоднородность флуоресценции образца, что еще важнее.

Рис. 4.39 иллюстрирует проблему неоднородной флуоресценции образца. На рисунке показаны два изображения пленки полиэтилена низкой плотности, содержащей флуоресцирующие частицы окиси кремния при высоком и низком значениях коэффициента усиления сигнала. При низком коэффициенте усиления (a) видны лишь наиболее крупные частицы, а при высоком (b) видны и мелкие частицы. Изображение крупных частиц при высоком коэффициенте усиления сильно размыто вдоль оптической оси. Если использовать низкий коэффициент усиления, количество микрочастиц будет недооценено, а если коэффициент усиления слишком высок, оно завышается. Отметим, что эта проблема не решается методами Лильеборга [38] и Маргаданта [39].

4.6.5. Методы измерения объема

При ручном регулировании микроскопа выбор коэффициента усиления зависит от оператора. Коэффициент усиления устанавливают, исходя из гистограммы распределения интенсивности особенностей. При оптимальном коэффициенте усиления объекты имеют «здоровую» гистограмму распределения интенсивности. Это означает, что интенсивность большинства пикселей выше уровня фона, с одной стороны, а количество пикселей в режиме насыщения (имеющих максимально возможную интенсивность) мало – с другой. Иными словами, большинство пикселей должно соответствовать диапазону динамического изменения интенсивности. Рис. 4.39 свидетельствует, что в некоторых случаях регулировка коэффициента усиления не позволяет получить «здоровую» гистограмму интенсивности для всех особенностей. Такой объем можно визуализировать путем изучения образца при различных коэффициентах усиления и синтеза полученных данных.

При регулярном возрастании коэффициента усиления было получено шесть изображений области, показанной на рис. 4.39. Для выделения объектов использовали единственный порог интенсивности и процедуру объединения вокселей, аналогичную описанной в разделе 2.8.6. Определяли центр и объем каждого объекта, а также распределение интенсивности вокселей. Рис. 4.40 демонстрирует распределение интенсивности вокселей одного объекта при трех коэффициентах усиления. Увеличение коэффициента усиления приводит к кажущемуся увеличению размера объекта. Оно проявляется в увеличении количества вокселей, интенсивность которых превышает порог насыщения. Изучение гистограмм показывает, что для этого объекта оптимален коэффициент усиления 20-25%.

Автоматизированная программа анализа образов отбирает и объединяет объекты, анализируя информацию, полученную при нескольких уровнях коэффи-

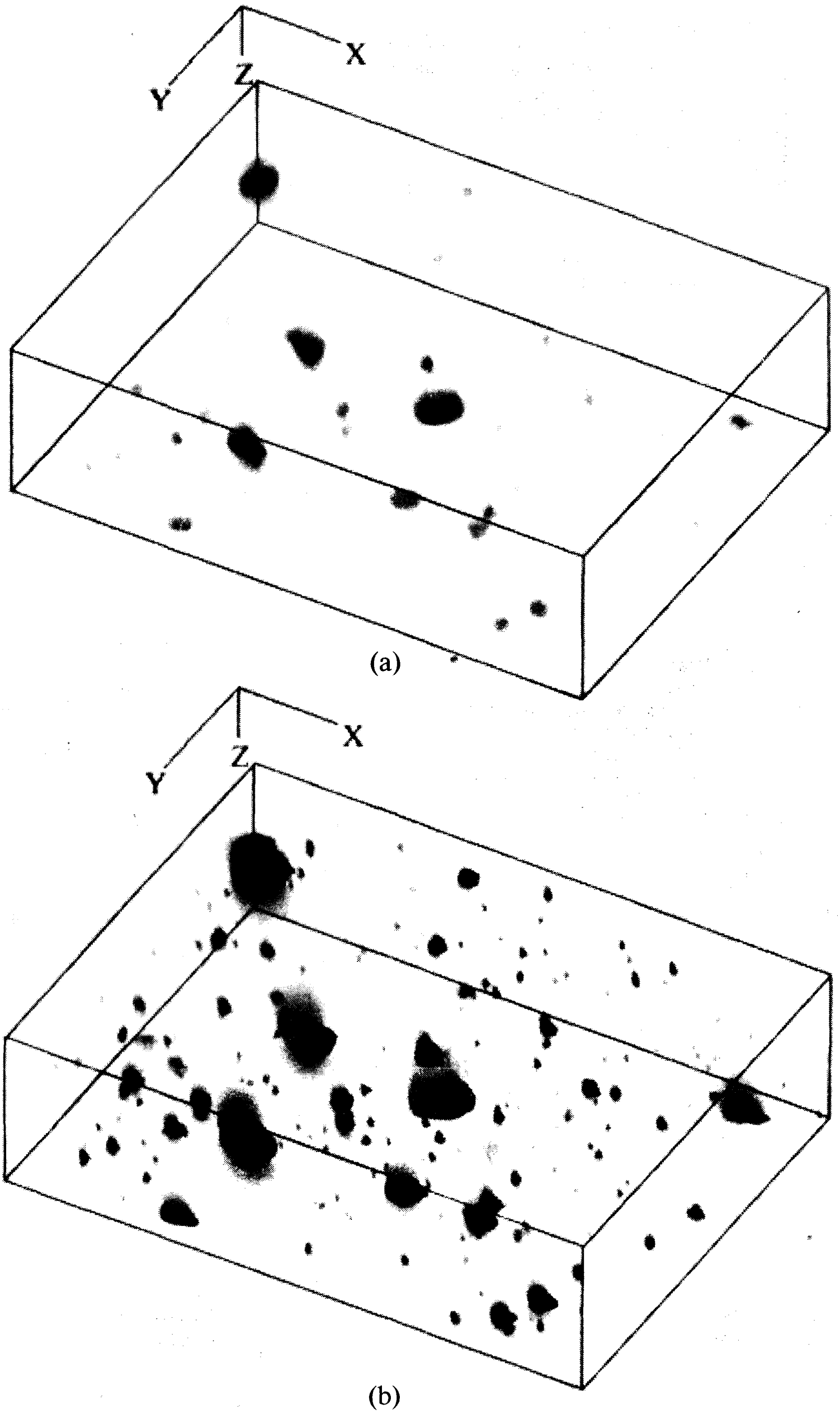


Рис. 4.39. Два изображения флуоресцентных частиц в полимерной матрице. (a) - При низком коэффициенте усиления сигнала мелкие частицы не видны. При большем усилении (b) мелкие частицы видны, а крупные размыты.

Рис. 4.40. Распределение интенсивности вокселей при различных коэффициентах усиления сигнала.

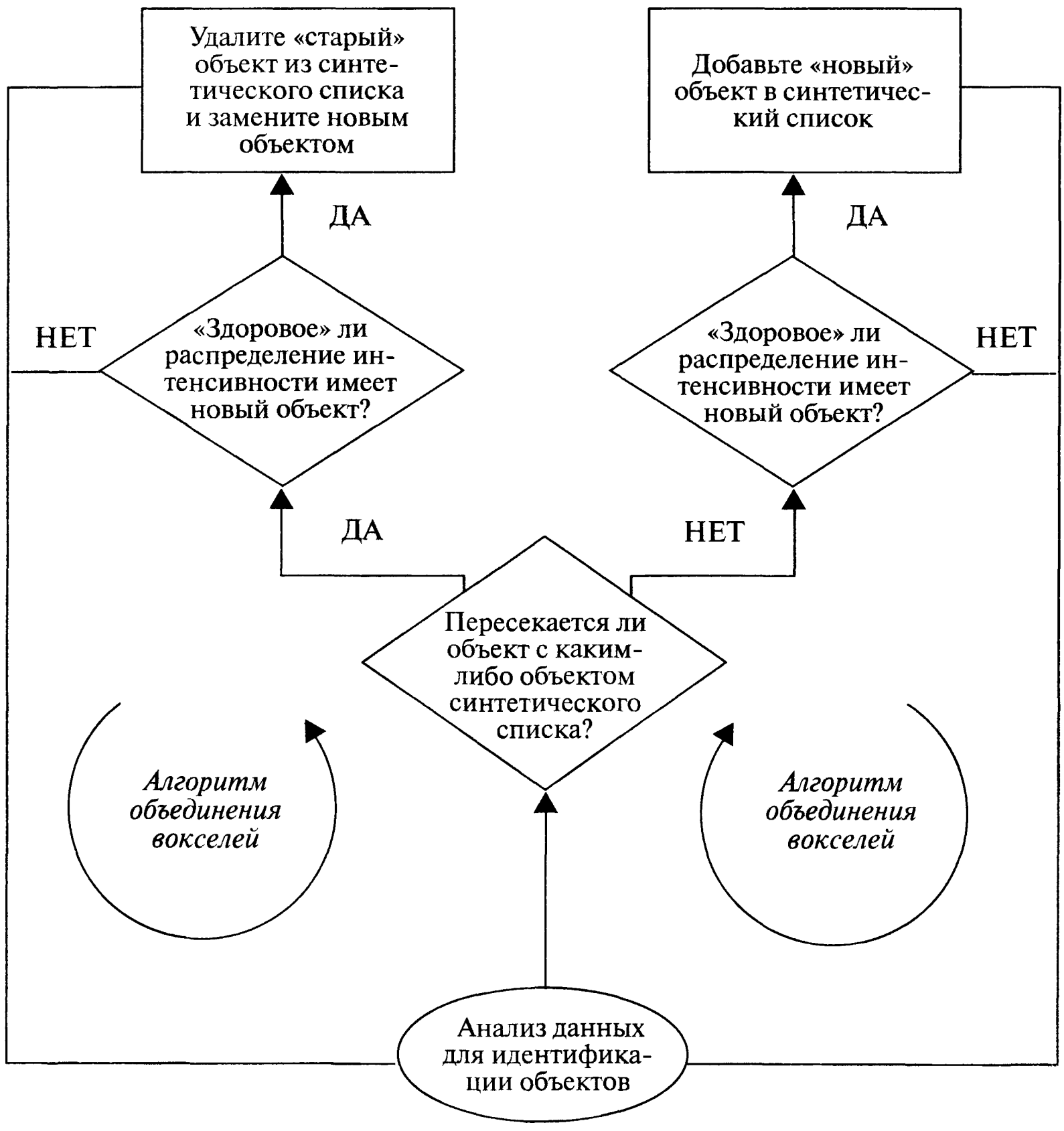


Рис. 4.41. Схема алгоритма анализа образов, используемая для идентификации объектов из набора трехмерных данных.

циента усиления. Программа по очереди рассматривает каждый объект и решает, следует ли его поместить в «синтетический» список объектов. Алгоритм программы показан на рис. 4.41. Его основой является процедура роста области вокселей. Когда программа находит новый объект, набор правил позволяет определить, нужно ли его добавить в синтетический список объектов. Объекты добавляются или удаляются из синтетического списка алгоритмом «роста области», описанным в разделе 2.8.6.

Алгоритм основан на оценке гистограммы распределения интенсивности каждого объекта. Он определяет, нужно ли объект помещать в синтетический список и следует ли его идентифицировать с уже найденным объектом. Алгоритм сравнивает среднюю интенсивность вокселей каждого объекта с пределом насыщения. Рис. 4.42 демонстрирует «синтетический» объем, полученный суммированием шести изображений, построенных при различных коэффициентах усиления. Рис. 4.42 свидетельствует, что «синтетическое» изображение имеет как крупные, так и мелкие объекты. Размывание крупных объектов не наблюдается, а предела насыщения интенсивности достигает лишь небольшое количество пикселей.

На изображениях, полученных при единственном пороге интенсивности, вокруг крупной частицы часто наблюдаются кластеры небольших частиц. «Сопутствующие» объекты обычно обусловлены шумом. Рис. 4.43 иллюстрирует, как на изображении появляются мелкие артефакты. Нерегулярное окружение крупного объекта (b) обусловлено шумом. Внимательное изучение изображения после введения порога интенсивности (b) показывает, что вблизи границы крупного объекта имеются воксели, не контактирующие с ним. Если применить процедуру слияния вокселей, то «сателлиты» приобретают вид отдельных микрочастиц, хаотически расположенных вокруг большой частицы. Для подавления шума некоторые исследователи используют пространственные фильтры [38]. Рисунки 4.43c и 4.43d показывают тот же объект после применения фильтра усреднения размером 3×3. Хотя усреднение сглаживает форму объектов и уменьшает вероятность появ-

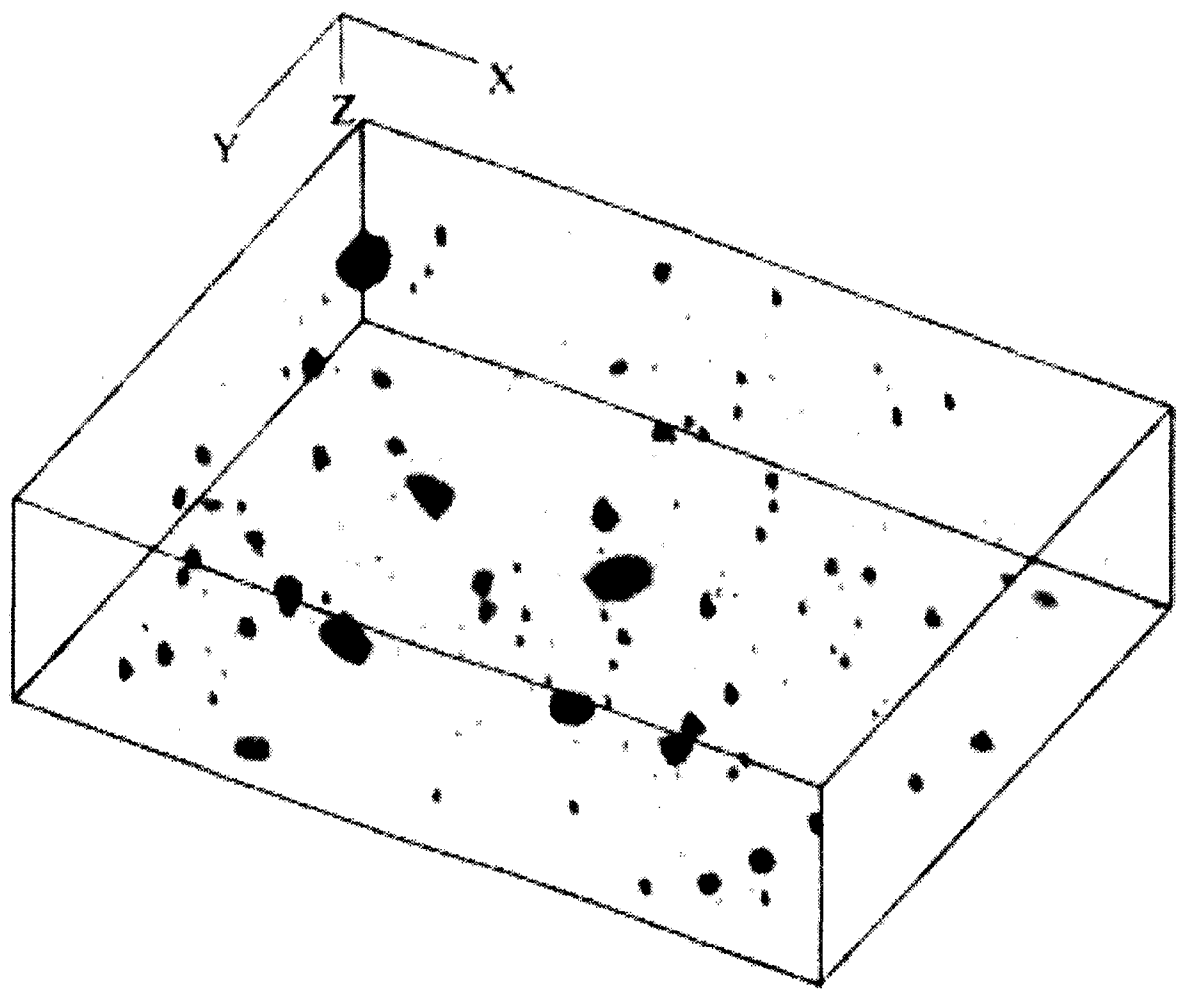


Рис. 4.42. Синтетическое изображение, построенное из шести плоских сечений, полученных при различных коэффициентах усиления.

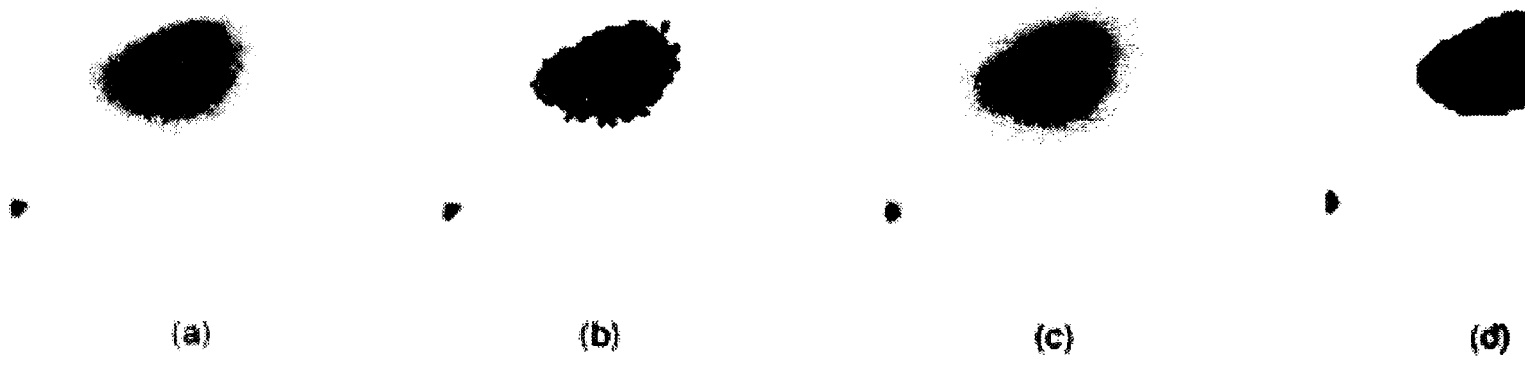


Рис. 4.43. Шум, окружающий крупный объект (a) после введения порога может привести к появлению сателлитов (b). Фильтр размером 3x3, усредняющий интенсивность соседних пикселей (c) устраняет сателлиты (d).

ления сателлитов, применять его нежелательно, потому что оно приводит к потере разрешения и контраста. Предпочтительнее подход, в котором «сателлиты» устраняются путем контроля распределения интенсивности. Сателлиты имеют низкую интенсивность в максимуме, которая обычно лишь немного превышает порог интенсивности, и для фильтрации объектов на «синтетических» изображениях можно использовать значения их максимума интенсивности.

4.6.6. Эксперимент

Ниже будет анализироваться распределение частиц окиси кремния в двух различных образцах ПЭВП, называемых A и B. Частицы окрасили родамином 6G, имеющим пик поглощения на длине 530 нм и излучающим широкий спектр длинноволновой флуоресценции. Образцы размером 2×2 см помещали в масло с показателем преломления 1,5, близким к показателю преломления ПЭВП. Близость показателей преломления уменьшает аберрацию (раздел 4.3.2), но уменьшает отражение света на границе полимера и масла. Чтобы определить концентрацию частиц, нужно знать объем образца, что требует определения положения верхней и нижней поверхностей пленки. Для этого обе поверхности покрыли тонким слоем алюминия, видимого в режиме отражения. Это покрытие не влияло на интенсивность флуоресценции исследуемого материала.

Описанную выше методику изменения коэффициента усиления использовали для получения двадцати оптических сечений, взятых случайно на различной глубине каждого образца. Одно из этих сечений показано на рис. 4.42. Для опре-

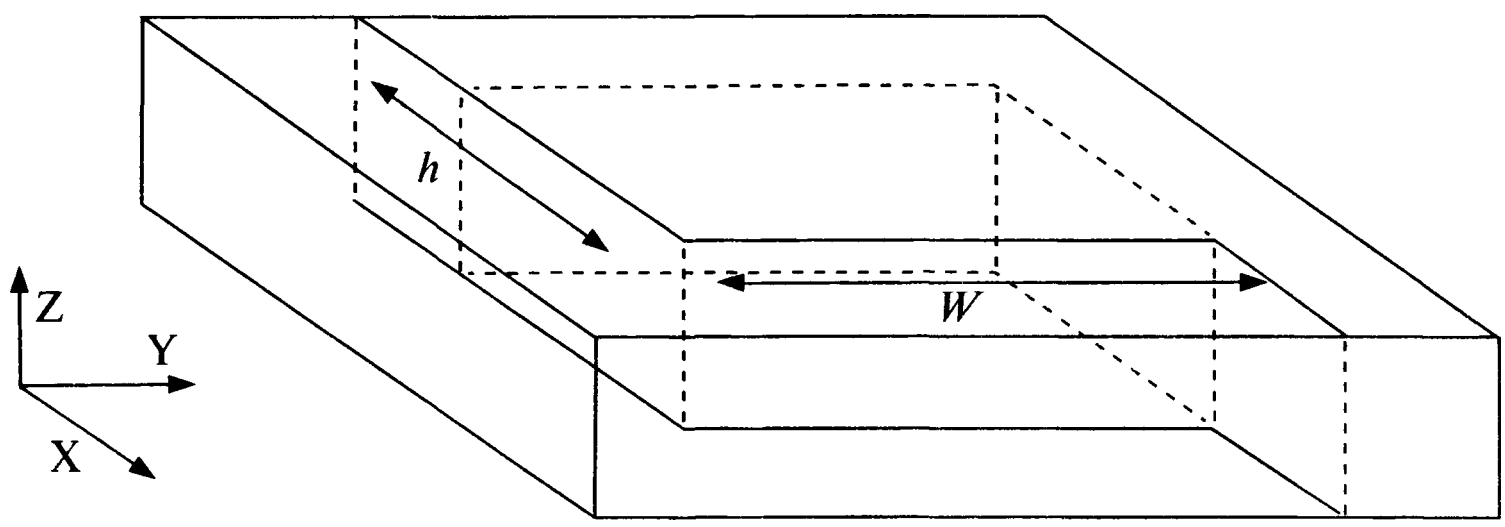


Рис. 4.44. 3D-блок подсчета шириной w и глубиной h, образуемый двумя параллельными плоскостями, расположенными на расстоянии t.

деления верхней и нижней поверхностей образца его сняли также в режиме отраженного света. Чтобы анализировать весь объем пленки, максимальная глубина сечения превышала толщину пленки. Рамка подсчета имела ширину w и глубину h, как показано на рис. 4.44. Этот метод немного проще, чем использование 3D-блока подсчета (рис. 4.38).

4.6.7. Результаты и выводы

Средняя толщина пленки t была равна 41 мкм для образца A и 23 мкм для образца B. Количество микрочастиц n может быть пересчитано в концентрацию N следующим образом:

$$N = n/wht, \tag{4.11}$$

где t - толщина пленки, h и w - размеры блока подсчета. Распределение количества частиц для каждого образца представлено на рис. 4.45. Концентрация частиц окиси кремния в образце B (0,0023 об.%) выше, чем в образце A (0,0011 об.%). Тем не менее, из приведенных данных не очевидно, различны ли распределения частиц по их объему (определяемому размерами). Более ясное сравнение дают нормализованные распределения объема микрочастиц, представленные на рис. 4.46. На этом рисунке представлена доля частиц, объем которых лежит в некоторых границах. Такие распределения называют числовыми. При размере частиц >0,5 мкм эти распределения сравнивать затруднительно. Альтернативный метод демонстрации тех же данных представлен на рис. 4.47. На нем представлено количество частиц, умноженное на их объем, что дает распределение объема частиц. В литературе одинаково часто приводят и распределения количества частиц, и распределения их объема. Отметим, что обязательно нужно указывать вид распределения. Распределения микрочастиц по объему одинаковы для обоих образцов. Возможно, антиблокирующие частицы кремнезема в образцах имеют одинаковое происхождение, а различна лишь их концентрация.

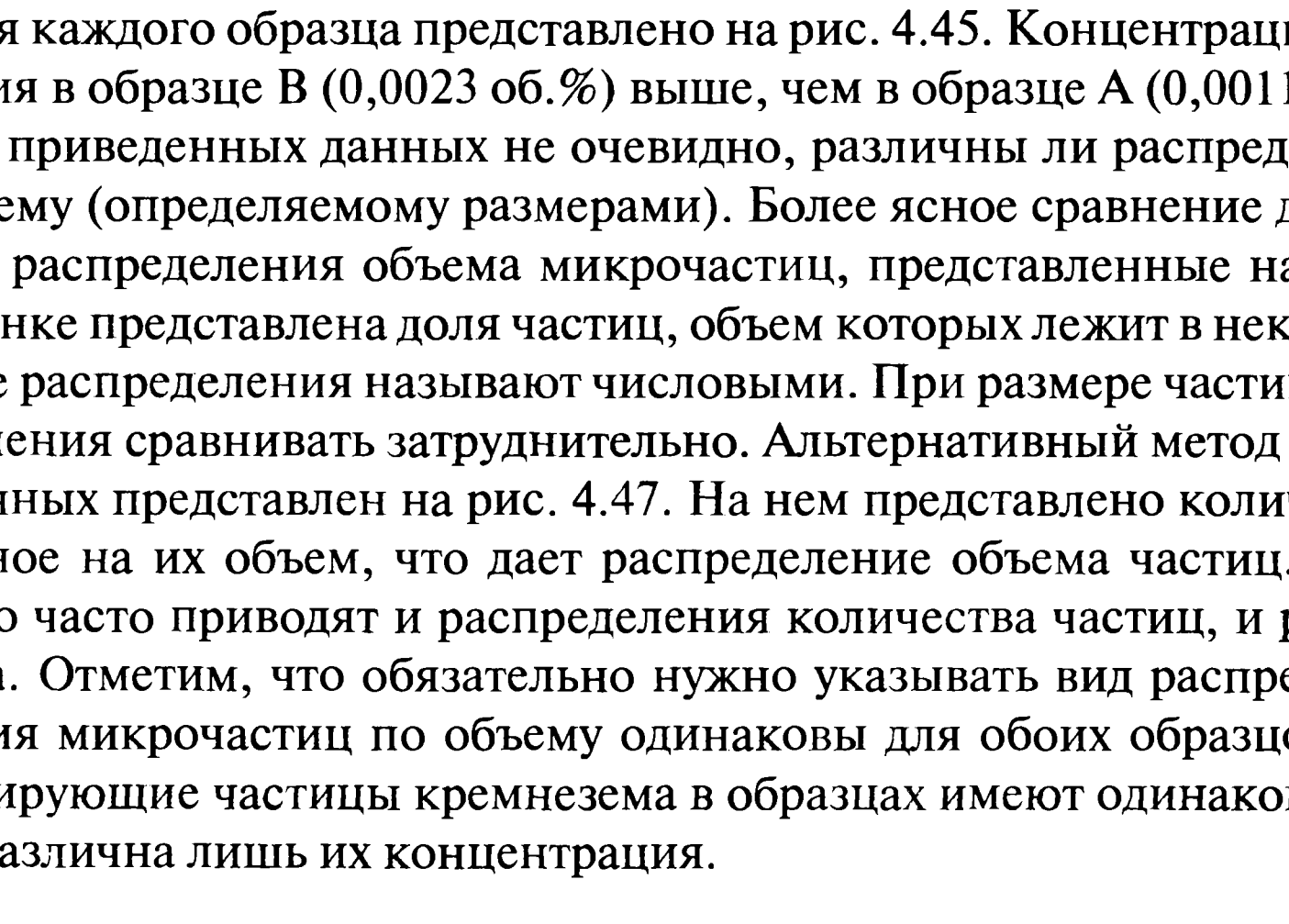


Рис. 4.45. Распределение количества микрочастиц в двух различных образцах.

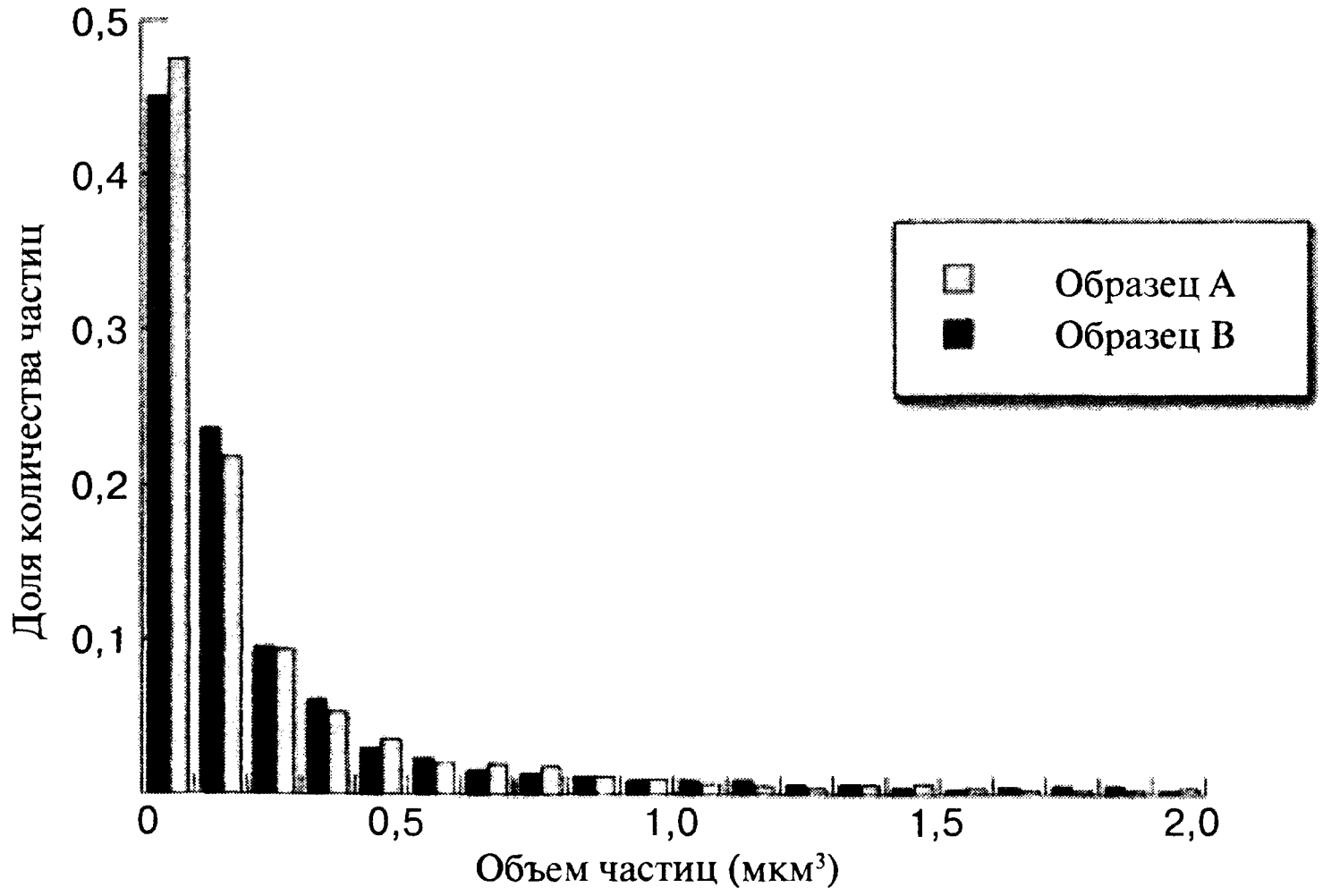


Рис. 4.46. Распределение относительного количества микрочастиц.

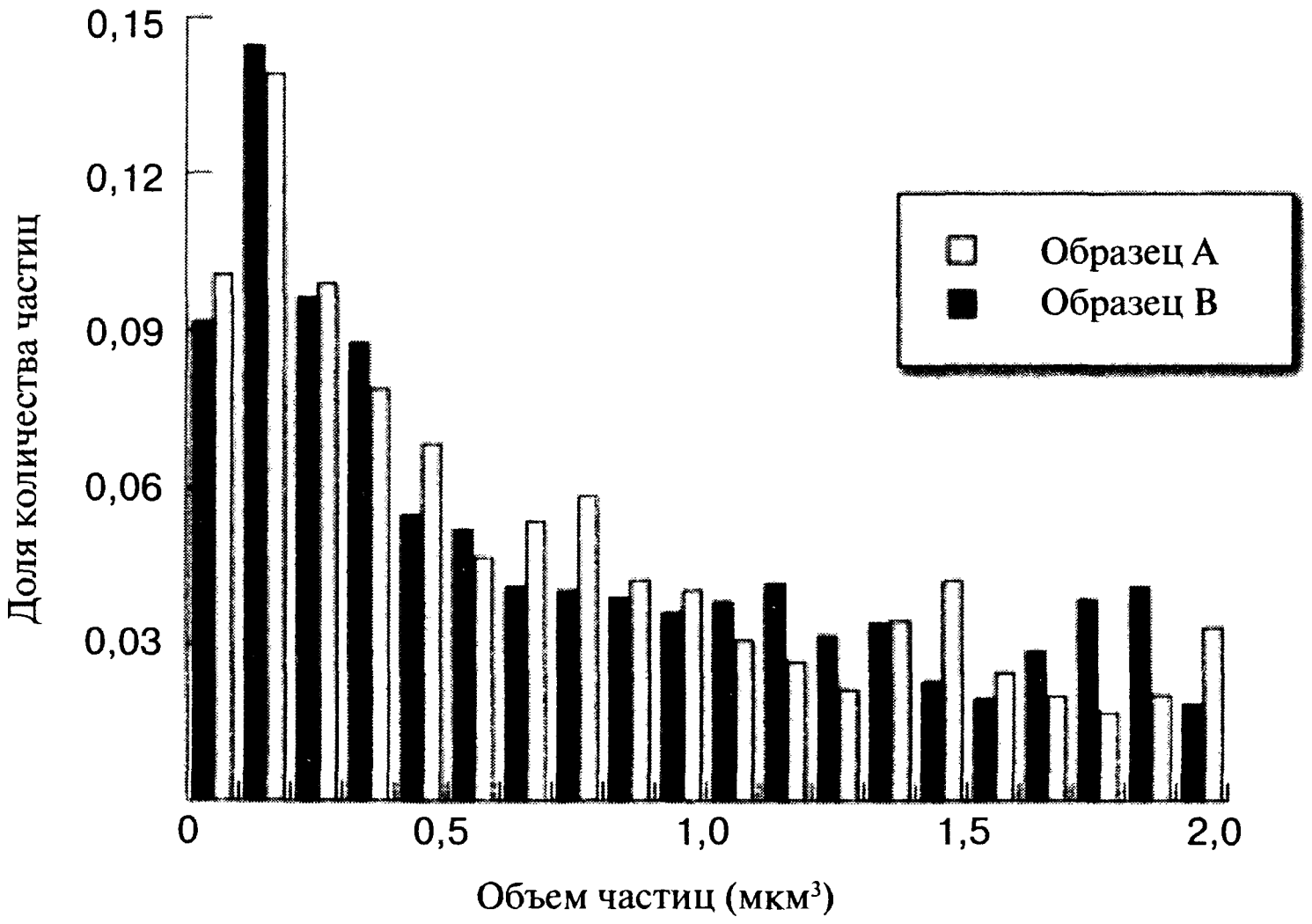


Рис. 4.47. Распределение относительной доли объема частиц.

4.7. Исследование волнистости волокон

4.7.1. Краткое описание

В данном разделе описан метод прямого измерения волнистости волокон методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Особенностью методики является сглаживание высокочастотного инструментального шума. Оно позволило определить локальную кривизну и степень кручения волокон в композите.

4.7.2. Введение

Механические характеристики материала определяют его реакцию на действие внешних сил. Если они известны, то можно предсказать, как материал будет работать в определенном изделии. Знание физических характеристик позволяет инженеру правильно выбрать материал для определенного изделия. Механические силы приводят к его деформации. Например, при ударе по мячу теннисная ракетка деформируется, но затем восстанавливает первоначальную форму. Деформация ракетки в этом случае является упругой. Если же материал нагрузить чрезмерно сильно, он разрушится. При наличии механических нагрузок нужно обязательно учитывать существование предела прочности материала, особенно в критических конструкциях типа мостов.

Упругое поведение большинства материалов вполне предсказуемо. Например, под действием определенной растягивающей силы пружина реагирует совершенно одинаково. Это обусловлено тем, что при малых упругих деформациях связи между атомами растянуты, но не разрушены, и структура материала не изменяется. Прочность материала определить значительно труднее, а точно предсказать точку катастрофического разрушения, как правило, вообще нельзя. Разрушение состоит в распространении трещины. Оно имеет статистическую природу, и поэтому точно предсказать его невозможно. Прочность материала всегда определяется самой слабой частью, и поэтому обычно разрушение инициируется дефектами.

Прочность однонаправленного композита при сжатии максимальна в направлении укладки волокон. Если волокна имеют небольшую разориентацию с осью детали, то под действием сжимающей силы угол разориентации начинает увеличи-

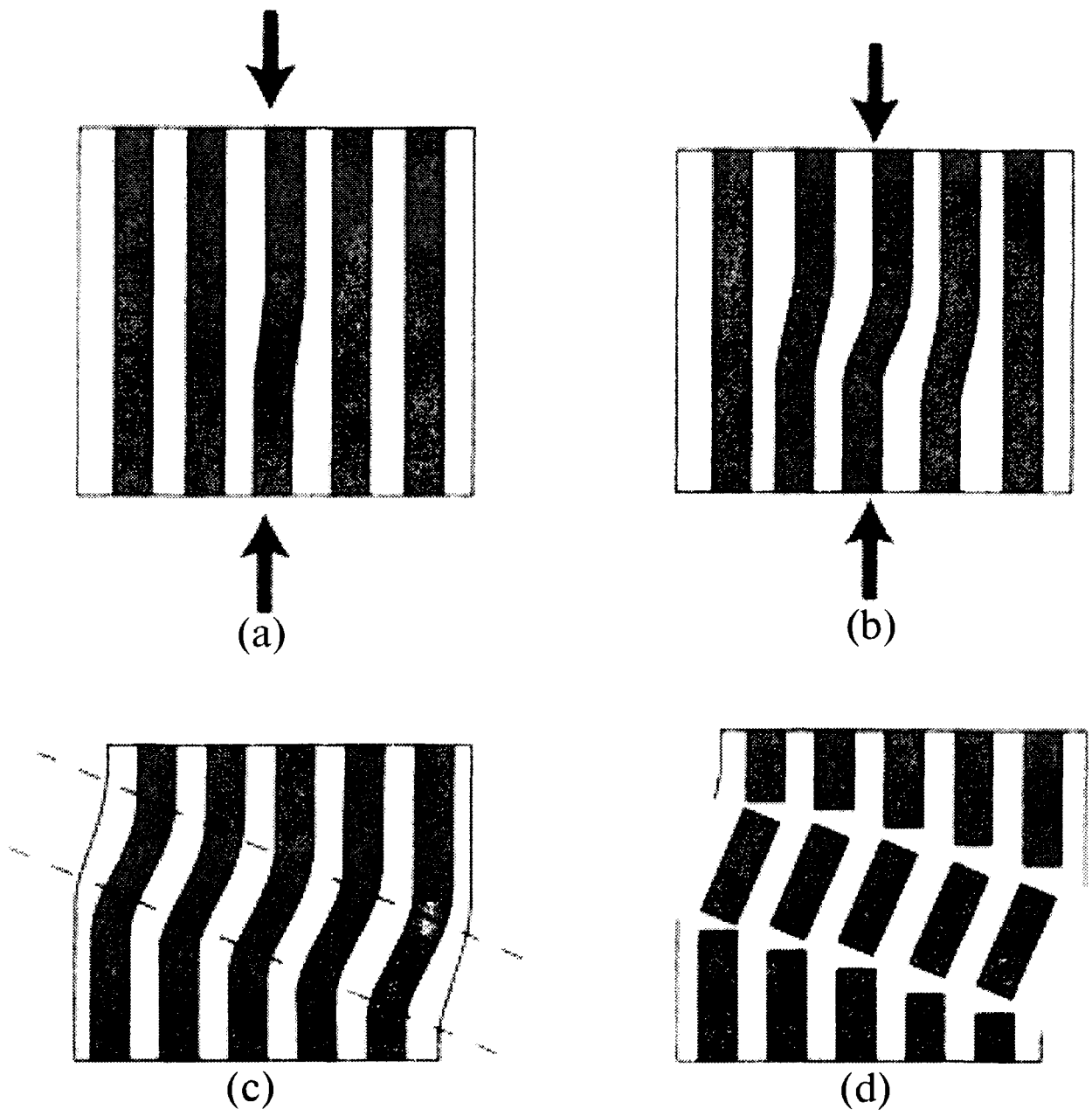


Рис. 4.48. (a) - Сжатие однонаправленного композита с одиночным изогнутым волокном. Под нагрузкой (b) и (c) формируется кинк, в котором волокна ориентированы под некоторым углом к оси сжатия. (d) - В конечном счете происходит разрушение.

ваться. Это продолжается до тех пор, пока не сформируется так называемый кинк (z-образный изгиб волокон), схематически показанный на рис. 4.48. Поскольку в кинке волокна разрушены, увеличивается нагрузка на матрицу, и происходит катастрофическое разрушению композита, иллюстрируемое рис. 4.49. Считается, что изгиб волокон является основной причиной разрушения композита при сжатии*. Было предложено несколько моделей, позволяющих оценить прочность композита исходя из степени разориентации волокон. Хотя они несколько различаются в деталях, общим в них является обратная пропорциональность между прочностью и углом разориентации волокон. Согласно Аргону прочность композита при сжатии σ_c пропорциональна пределу текучести матрицы при сдвиге τ_{ym} и обратно пропорциональна углу разориентации волокон $\Delta\phi$ [40]:

$$\sigma_c = \frac{\tau_{ym}}{\Delta\phi}, \qquad (4.12)$$

где угол $\Delta\phi$ измеряется в радианах. Эксперименты [41] и моделирование [42] подтвердили, что разориентация волокон даже на один градус приводит к значительному снижению прочности при сжатии.

Однонаправленные композиты часто получают ручной укладкой тонких лент (препрегов), содержащих непрерывные волокна и недоотвержденную эпоксидную смолу в объеме между ними. После укладки препрегов смолу отверждают путем нагревания. При неточной укладке слоев появляются области, в которых волокна разориентированы относительно оси композита. Кроме того, могут иметься области с повышенным содержанием смолы, что приводит к деформации и изгибу соседних волокон. Определение угла разориентации и степени волнистости во-

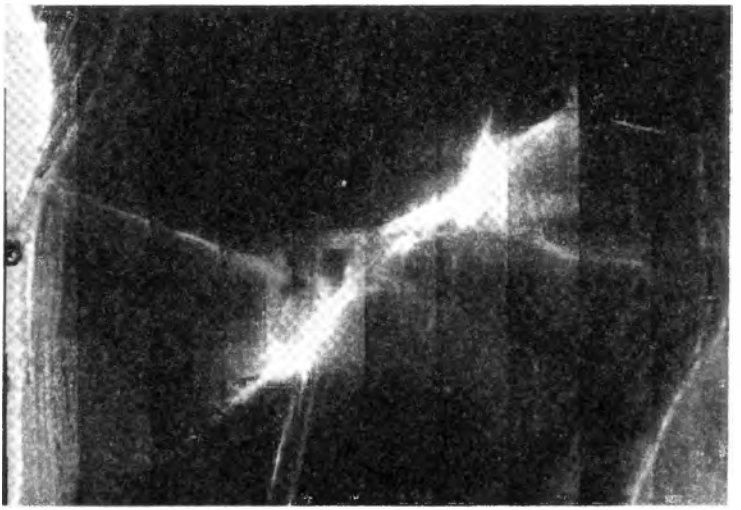


Рис. 4.49. Разрушение волокнистого композита при сжатии. Панорама большой области построена суммированием 100 кадров, полученных во флуоресцентном режиме работы.

* На самом деле, основным механизмом разрушения волокнистых композитов является продольное растрескивание композитов, описываемое формулой (4.12). – *Прим. редактора перевода.*

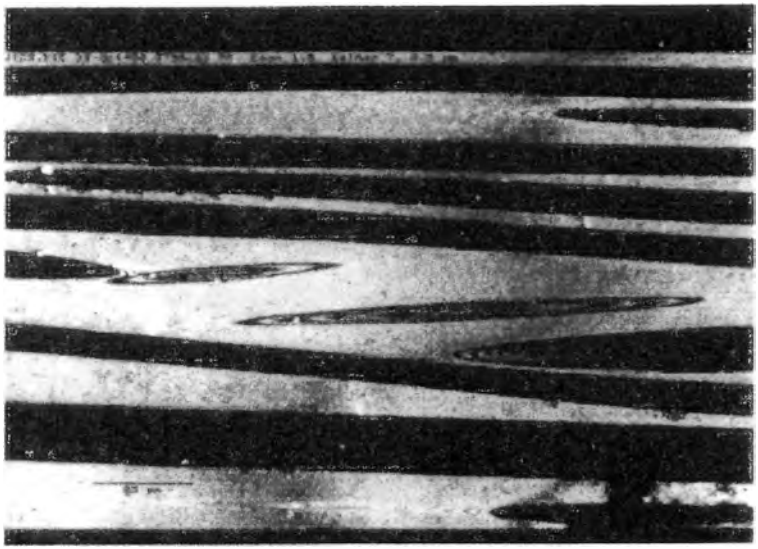


Рис. 4.50. Поверхность однонаправленного стеклопластика. Размер изучаемой области равен 200×150 мкм. Большинство волокон лежит в плоскости сечения, но некоторые из них ориентированы под небольшим углом. Интерференционные полосы обусловлены сложением пучков, отраженных поверхностью и стекловолокнами, находящимися ниже ее. Островки овальной формы в центре кадра обусловлены двумя искривленными волокнами, пересекающими сечение. Рисунок демонстрирует искривление волокон.

локон важно для предсказания поведения композита при сжатии. К сожалению, измерение малых углов разориентации волокон является непростой задачей. Для измерения волнистости волокон было предложено несколько разрушающих и неразрушающих методов, но для изделий сложной формы все они большого успеха не имели. Некоторые из этих методов использовали лишь для количественной оценки разориентации волокон в модельных образцах с искусственно созданной волнистостью [43]. В модельных образцах волнистость волокон имела большую амплитуду и была коллективной. Наиболее эффективные методы измерения разориентации и волнистости волокон рассмотрены ниже.

Методика определения ориентации волокон путем изучения полированной поверхности описана в предыдущей главе. Ее можно использовать и для определения степени разориентации волокон в однонаправленном композите. Однако она применима лишь для волокон идеально цилиндрической формы. Точность измерения угла ориентации улучшается, если образец разрезать под углом к направлению укладки волокон, в результате чего сечения волокон приобретают вид эллипсов [44]. Однако сомнительно, может ли точность этой методики превысить доли градуса [45].

Волнистость волокон становится очевидной, если посмотреть на полированную поверхность, параллельную направлению укладки волокон (рис. 4.50). Угол разориентации можно оценить из микрофотографий. На этом основан метод создания карт волнистости волокон [46,47]. Однако изгиб волокон может быть и

не плоским, и поэтому нужно использовать более сложные методы определения волнистости волокон [48]. Физическое получение последовательности тонких сечений является чрезвычайно трудоемкой задачей, поскольку получение одного сечения требует не менее дня. Поэтому вряд ли кто-то решится часто выполнять эту операцию. Ниже описан метод получения тонких оптических сечений при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

4.7.3. Изучение однонаправленных композитов методом конфокальной микроскопии

Основным недостатком метода физического удаления тонких слоев композита является его трудоемкость. Кроме того, трудно добиться точного равенства расстояний между последующими сечениями. Эти проблемы решает конфокальная микроскопия, позволяющая получать тонкие оптические сечения очень быстро и практически на одинаковом расстоянии друг от друга. Рис. 4.51 демонстрирует результаты пяти последовательных сечений композита во флуоресцентном свете. Сечения получены с интервалом 10 мкм. Смещение центров волокон на последующих изображениях определяется практически прямо, что позволяет измерить ориентацию волокон.

Рис. 4.52 демонстрирует два сечения однонаправленного композита в плоскости XZ. Поверхность образца ясно видна в отраженном свете, однако структура под поверхностью видна плохо. Это связано с тем, что в оптический конус объектива

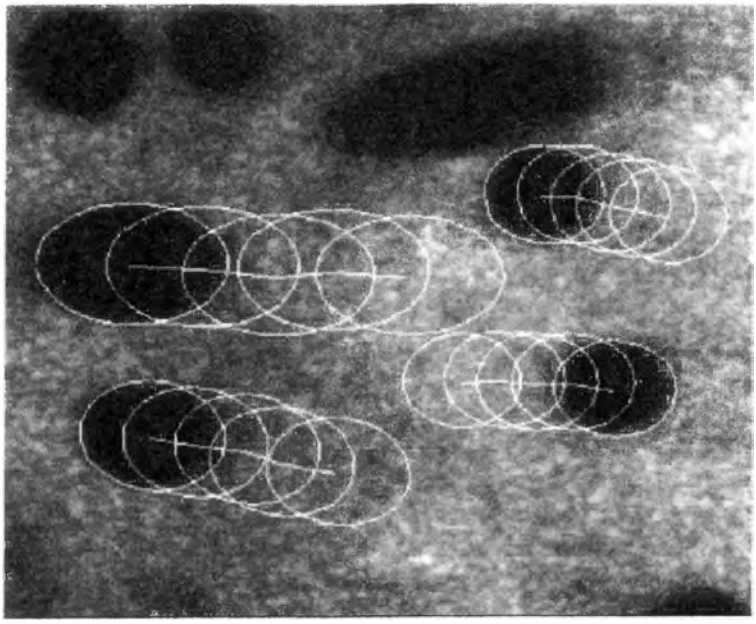


Рис. 4.51. Получив ряд изображений на различной глубине Z, можно измерить сдвиг центров волокна. Из степени эллиптичности и величины сдвига центра волокна можно определить его ориентацию. Отметим, что волокна с большей степенью эллиптичности смещаются сильнее.

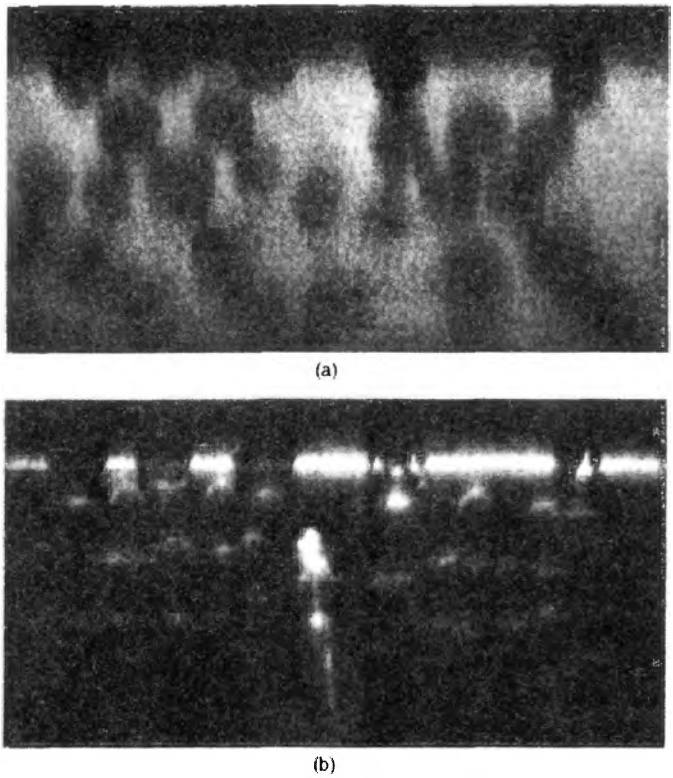


Рис. 4.52. Оптические XZ-сечения стеклопластика во флуоресцентном (a) и отражающем (b) режимах работы микроскопа. Размер поля зрения 100×50 мкм.

попадает лишь часть лазерного излучения, отраженного на границе волокно-матрица. Поэтому на изображении наблюдаются лишь верх и низ периметра волокон. Во флуоресцентном режиме свет излучается во всех направлениях, и ориентация границы волокно-матрица не влияет на изображение. Однако для этого образец должен автофлуоресцировать, что, к счастью, характерно для большинства полимерных матриц. Поэтому для изучения структуры композитов наиболее удобен флуоресцентный режим работы микроскопа.

Качество изображения зависит от образца. На него влияет множество параметров, но самыми важными являются объемная доля волокон и пор, а также степень флуоресценции матрицы. При увеличении глубины качество изображения ухудшается, появляются помехи и снижается контраст. Это вызвано прежде всего отражением света на границе раздела волокно-матрица, приводящим к затенению глубоко расположенных деталей, особенно при высоких степенях наполнения. Кроме того, ухудшение качества обусловлено поглощением и рассеянием света матрицей. Для образцов с высоким содержанием волокон, превышающим 40 об.%, оптические изображения на глубине $Z > 40$ мкм столь искажены, что практически не несут полезной информации. Однако в образцах с низкой степенью армирования ($V_f < 10\%$) изображение хорошего качества может быть получено вплоть до максимального рабочего расстояния объектива ~200 мкм, как показано на рис. 4.14.

Показатель преломления большинства полимерных матриц равен приблизительно 1,5 (таблица 4.2). Следовательно, для получения оптического сечения наиболее подходят иммерсионные объективы. Все изображения в этом разделе были получены при помощи объектива с масляной иммерсией PlanApo 60x, NA=1,4.

4.7.4. Изучение формы волокон

Волнистость волокон сильно влияет на характеристики высокопрочных однонаправленных композитов. Эти материалы обычно имеют высокую объемную долю волокон. Поэтому максимальная оптическая глубина обычно не превышает 40 мкм, образец должен быть разрезан так, чтобы волокна были параллельны поверхности. Рис. 4.53 поясняет схему анализа. Волокна параллельны оси Y. В плоскости XZ они имеют практически круглую форму, и, если расстояние между последующими сечениями не слишком велико, индивидуальные волокна могут быть прослежены и на следующем сечении.

Таблица 4.2. Показатели преломления полимерных матриц

Полимерная матрица	Показатель преломления
ПТФЭ (тефлон)	1,35
ПВДФ	1,42
Полиоксиэтилен	1,48
ПММА	1,49
ПП	1,49
ПВХ	1,54-1,55
ПЭЭК	1,67

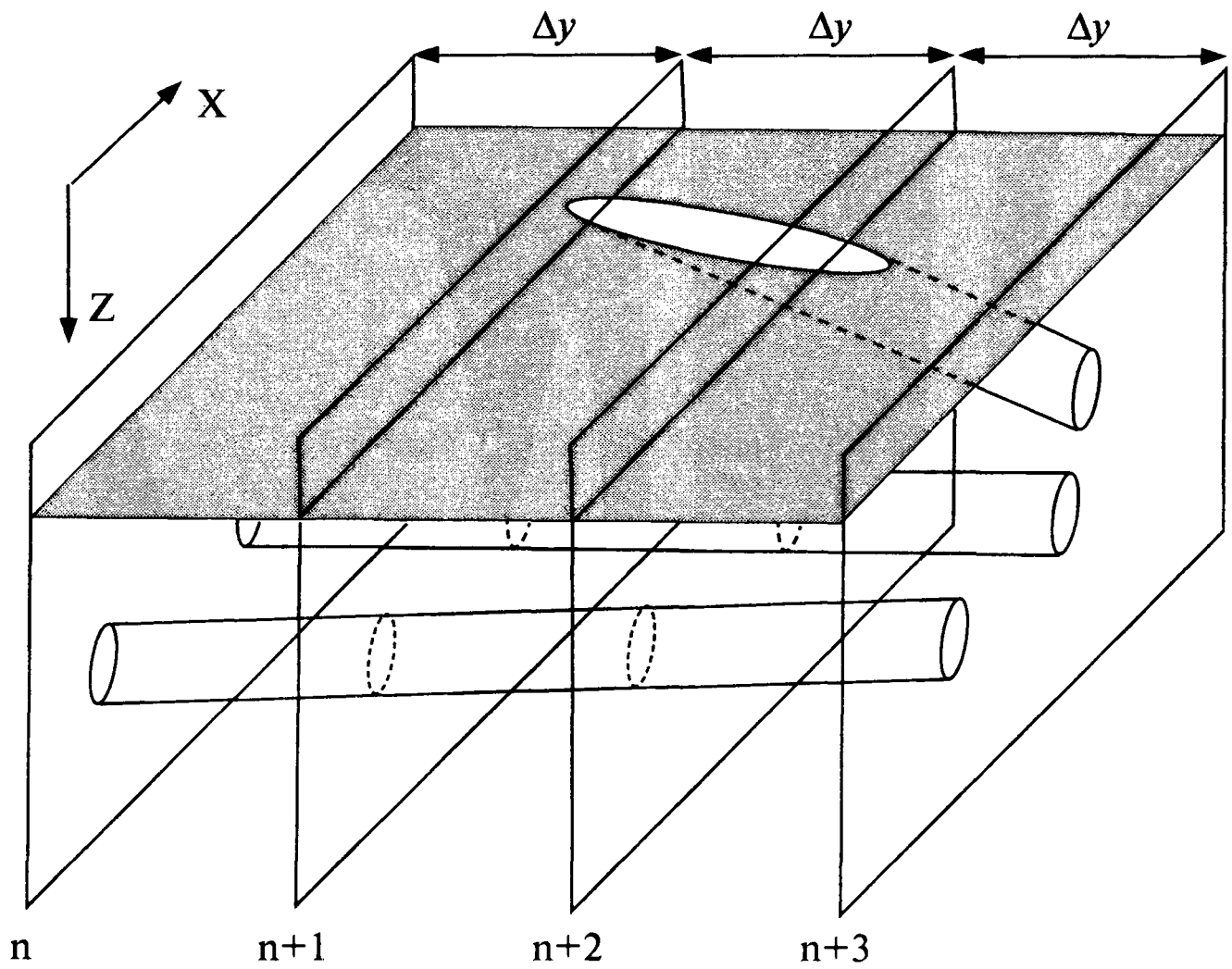


Рис. 4.53. Метод получения тонких оптических сечений для изучения волнитости волокон.

Рис. 4.54. Оптическое сечение композита в плоскости XZ при наличии шума. Изображение получено введением порога интенсивности. Поверхность образца находится в верхней части рисунка, а вследствие затенения волокна кажутся смешанными с соседями. Размер области равен 100×50 мкм.

В первых работах волнистость волокон изучали путем физического сечения композита, следя за изменением положения их центров на последовательных плоскостях, количество которых достигало ста [49]. Это исследование дало первые корректно измеренные значения волнистости волокон. Во флуоресцентном режиме работы микроскопа автоматизированное определение положения центра волокон на оптических XZ сечениях затруднено шумом и поглощением света. Стандартный метод выделения объектов введением единственного порога интенсивности не позволяет идентифицировать волокна даже после учета уменьшения интенсивности, что иллюстрирует рис. 4.54. Если координаты волокна известны на предыдущем XZ-сечении, это облегчает определение его положения на следующем сечении.

Описываемый ниже метод определения положения волокон основан на итерационном анализе изображения, дающем наиболее вероятное положение волокна. Относительная вероятность нахождения волокна радиусом r в точке (x, y) может быть определена исходя из градиента интенсивности G на периметре круга:

$$G = \frac{I_{in}}{I_{out}}, \tag{4.13}$$

где I_{in}- средняя интенсивность ближайших к периметру внутренних пикселей круга и I_{out} - средняя интенсивность ближайших к периметру внешних пикселей:

$$I_{in} = \frac{\sum_{x,y} i_{x,y}}{n} \quad \forall x, y : \left(r - \Delta < \sqrt{(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2} < r\right),$$
$$I_{out} = \frac{\sum_{x,y} i_{x,y}}{n} \quad \forall x, y : \left(r < \sqrt{(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2} < r + \Delta\right), \tag{4.14}$$

где $i_{x,y}$ - интенсивность пикселя с координатами (x, y). Центр волокна имеет координаты (x_c, y_c), а понятие «близкие» определяется расстоянием Δ от периметра,

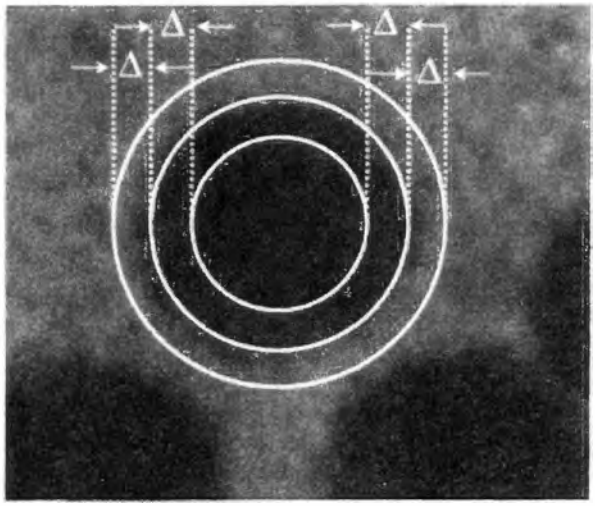


Рис. 4.55. Градиент интенсивности сигнала G вычисляют из значений интенсивности в кольце радиусом r и толщиной Δ.

как показано на рис. 4.55. Градиент интенсивности G(x, y, r) может быть рассчитан в области возможных значений радиуса волокон. Максимум этой функции дает наиболее вероятные координаты волокна. Недостатком этого метода является очень большой объем вычислений. Предпочтительнее итерационная процедура поиска максимума градиента интенсивности. В этом случае необходимо выбрать «подходящую» исходную точку x_1, y_1, r_1. Градиент рассчитывается в этой и множестве соседних точек, то есть $G(x_1+\delta, y, r)$, $G(x_1-\delta, y, r)$,..., $G(x_1, y, r-\delta)$. Если градиент в одной из соседних точек выше, чем в исходной, она становится исходной позицией на следующей итерации. Итерационный поиск заканчивается, когда найден пиксель максимального градиента.

Для ускорения сходимости итерационного процесса величину возмущения δ можно изменять. Рис. 4.56 демонстрирует смещение положения волокна, центр которого был найден после пятнадцати итераций с линейным изменением величины δ от 5 до 1 пикселя. Конечная точка поиска зависит от исходного положения центра волокна. Следовательно, очень важен правильный выбор исходной точки. Положение волокна нужно отслеживать на последовательности оптических сечений, и естественной исходной точкой центра волокна является его положение на предыдущем сечении. Это позволяет определить координаты центра волокна и вычислить его пространственную форму. Если центр волокона при переходе к следующему сечению сдвигается не более чем на половину радиуса, волокно может быть прослежено во всем изучаемом объеме.

4.7.5. Анализ многослойных композитов

Композит, состоящий из тридцати двух собранных вручную слоев, был залит эпоксидной смолой и отполирован, как описано в разделе 3.1.1. После этого его поместили на предметный столик и ориентировали, как показано на рис. 4.57. Поверхность образца сканировали в режиме отраженного света, чтобы калибровать движение

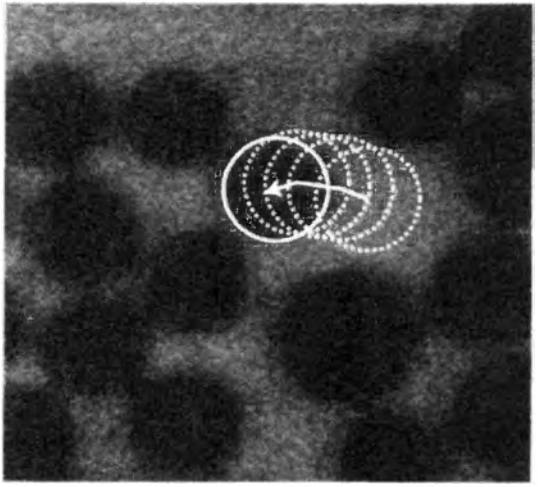


Рис. 4.56. Итерационная процедура определения центра волокна, постепенно перемещающая его положение в точку максимума градиента интенсивности.

предметного столика, как описано в разделе 3.2.3. При калибровке получали изображения образца в плоскостях XY и XZ. «Панорамные» XZ сечения типа показанного на рис. 4.58 можно получить объединением нескольких кадров, а большой объем образца можно изучить, объединяя такие сечения. На рис. 4.59 показана структура объема образца размером 440×5000×50 мкм, полученная в результате объединения двухсот XZ панорам, расположенных на расстоянии $\Delta y = 25$ мкм.

Форму волокна определяли с помощью процедуры, описанной в предыдущем разделе. В качестве первой итерации подпрограмма использует положение центра волокна на предыдущем оптическом сечении. Для определения координат волокон на первом сечении разработали интерактивный метод, состоящий в показе очередного изображения на экране и устранении очевидных ошибок. Этим ме-

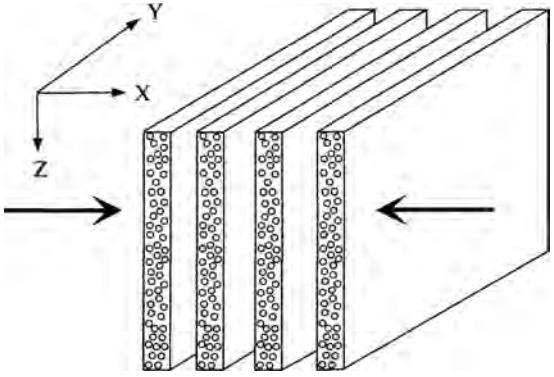


Рис. 4.57. Чтобы получить композит, складывают несколько слоев волокон и неотвержденной матрицы и помещают в пресс. После этого материал нагревают для отверждения матрицы. Оси указывают ориентацию образца под микроскопом.

Рис. 4.58. «Панорама» XZ-сечения стеклопластика во флуоресцентном свете. Размер поля зрения в плоскости XZ равен 280×50 мкм.

тодом в течение двух часов определяли положение центров приблизительно 9 000 волокон.

Рис. 4.59 демонстрирует трехмерную структуру композита. На рисунке показаны линии центров 472 волокон. Чтобы разориентация и волнистость волокон были более очевидны, изображение сжато в направлении Y. Несмотря на небольшую глубину изученного объема (50 мкм), на большом протяжении удалось проследить значительное количество волокон. Распределение длины волокон приведено на рис. 4.60.

На рис. 4.59 можно определить границы слоев композита. Видно, что соседние слои ориентированы в различном направлении, что проявляется в разной ориентации групп соседних (10–50) волокон. Заметна и разориентация соседних волокон в этих группах. Следовательно, разориентация волокон возникает уже на стадии производства слоя. При укладке слоев появляется дополнительная коррелированная разориентация большого количества волокон.

Однонаправленные слои на основе непрерывных волокон обычно представляют собой ленты или плоские листы толщиной приблизительно 100 мкм. Толщина

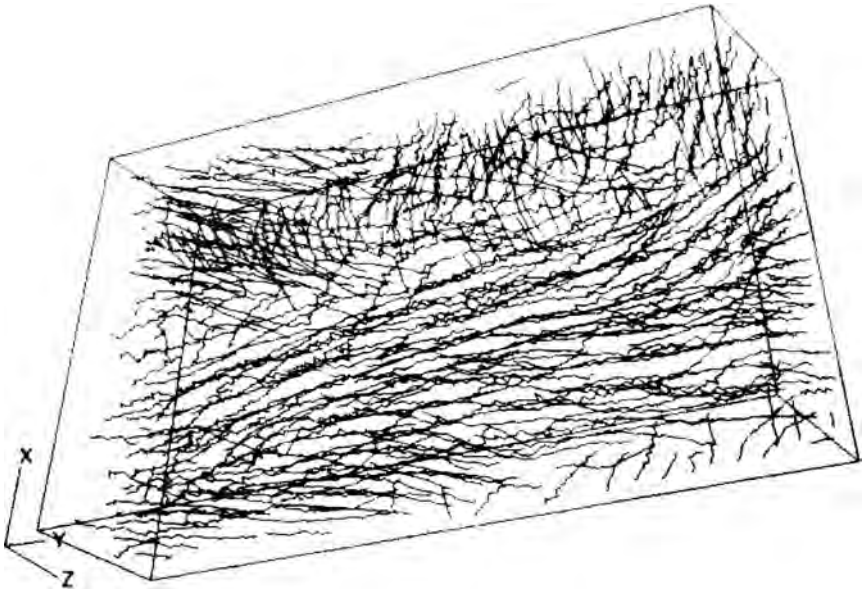


Рис. 4.59. Размеры изучаемого объема материала равны 440x5000x50 мкм. Показаны центры 472 волокон. Изображение сжато в направлении Y, чтобы подчеркнуть волнистость и разориентацию волокон.

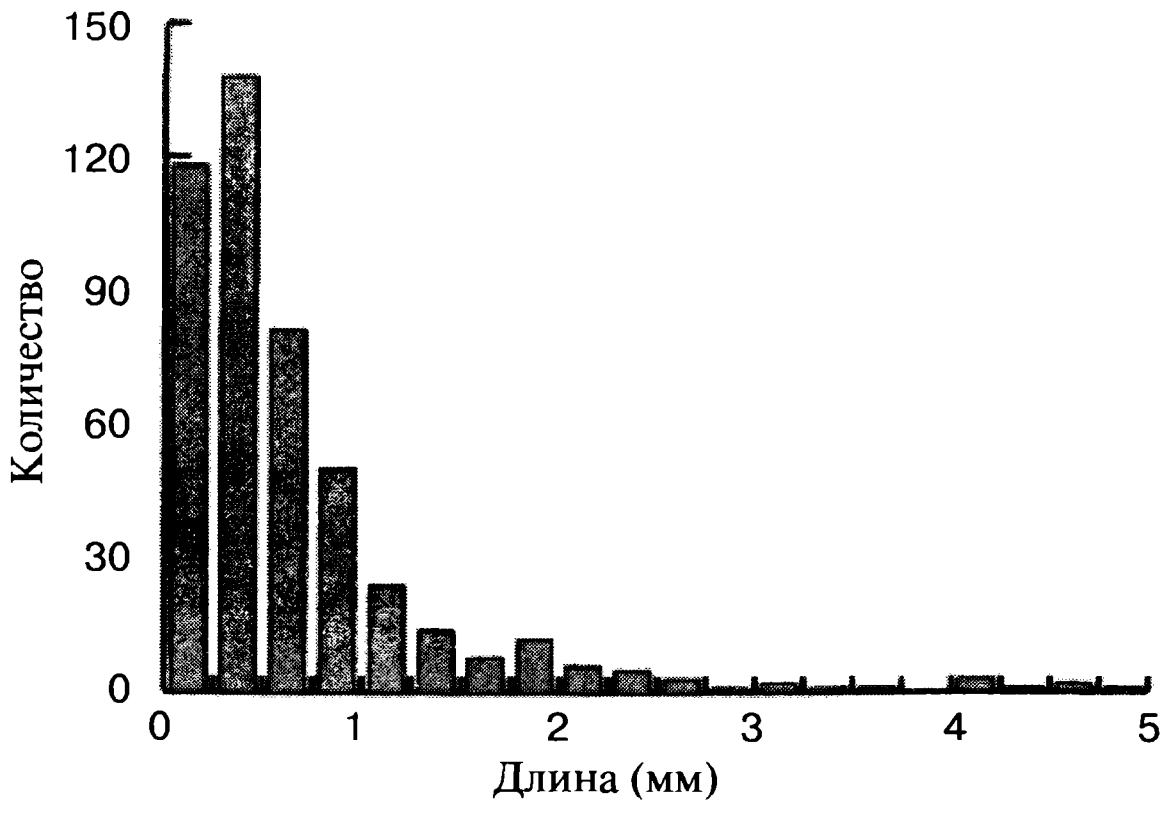


Рис. 4.60. Распределение длины волокон, соответствующих рис. 4.59.

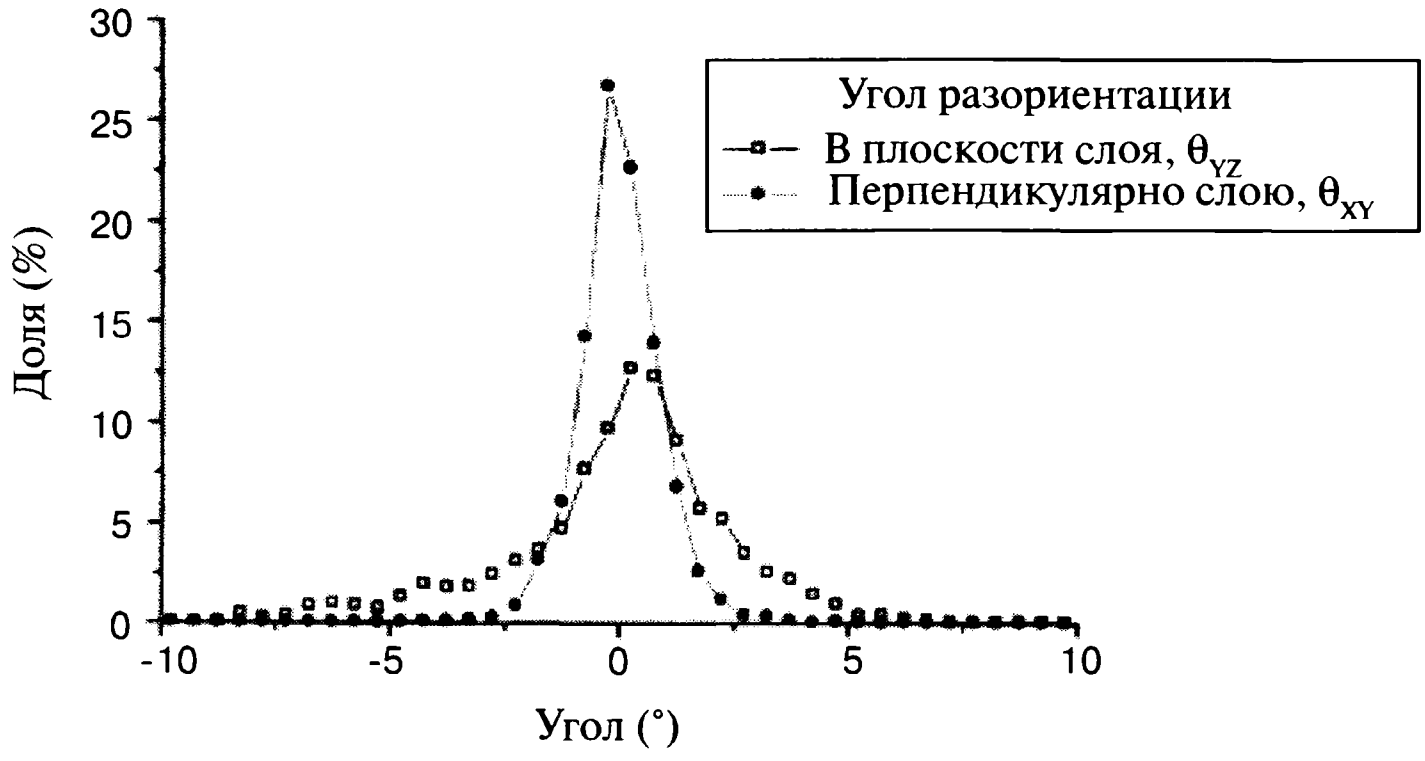


Рис. 4.61. Распределение угла разориентации волокон в плоскости слоя и перпендикулярно плоскости слоя.

слоя ограничивает разориентацию волокон в перпендикулярном направлении, и поэтому более вероятна разориентация в плоскости слоя. Это подтверждает рис. 4.61, демонстрирующий распределение углов ориентации волокон слоя в плоскостях YZ и XY. Разориентация волокон в направлении, перпендикулярном плоскости слоя, невелика. Это демонстрируется узким распределением со среднеквадратичным отклонением 1°. Напротив, разориентация волокон в плоскости слоя втрое выше, и среднеквадратичное отклонение равно 3°. Прочность композита при сжатии чрезвычайно чувствительна к разориентации волокон относительно оси нагружения (уравнение 4.12). И хотя величина разориентации волокон в этом образце кажется малой, она приводит к значительному снижению прочности при сжатии.

4.7.6. Изучение волнистости волокон

При описании волнистости волокон предполагают, что их форма в некоторой плоскости описывается синусоидальной волной [47, 50]. Это позволяет определить угол разориентации волокон. Имеется несколько причин появления волнистости волокон, одна из которых состоит в сморщивании отдельных слоев волокон.

Амплитуду и длину синусоиды можно оценить, рассматривая образец в обычном оптическом микроскопе. Однако форма волокон на рис. 4.59 не является ни плоской, ни синусоидальной. Первое исследование формы нескольких волокон методом конфокальной микроскопии было проведено в работе [51]. Оказалось, что форма индивидуальных волокон не описывается простой синусоидой. Для более полной характеризации волнистости волокон необходимо более подробное описание положения центров волокон.

На первый взгляд можно подумать, что кривизну волокна можно определить, просто взяв три или четыре соседних положения его центра (рис. 4.59) и аппроксимировав эти точки дугой. Однако этот метод приводит к большой ошибке измерения кривизны. Для уменьшения погрешности определения центров волокон полученные значения координат нужно сгладить. Это можно осуществить, описывая координаты центра волокна полиномами высоких степеней, что фактически соответствует описанию волокна непрерывной пространственной кривой. Такое описание формы волокон имеет несколько преимуществ. Во-первых, степень сглаживания можно контролировать, изменяя степень полинома. Во-вторых, описание формы волокна непрерывной математической функцией позволяет вычислить кривизну, кручение и ориентацию волокна в любой точке по его длине.

Форма волокна может быть описана радиус-вектором **r**:

$$\mathbf{r}(s) = f_x(s)\,\mathbf{i} + f_y(s)\,\mathbf{j} + f_z(s)\,\mathbf{k}, \qquad 4.15)$$

где $f_x(s)$, $f_y(s)$ и $f_z(s)$ - полиномиальные функции от длины s; **i**, **j** и **k** - векторы единичной длины, определяющие систему координат. Радиус кривизны $\rho(s)$ и кривизну $\kappa(s)$ можно вычислить по формуле [52]:

$$\rho(s) = \frac{1}{\kappa(s)} = \frac{|\mathbf{r}'|^3}{|[\mathbf{r}'x\mathbf{r}'']|}, \qquad (4.16)$$

Такое описание позволяет охарактеризовать волнистость волокон. Аналогично, кручение пространственной кривой может быть описано формулой:

$$\tau(s) = \frac{|[\mathbf{r}'x\mathbf{r}'']\mathbf{r}'''|}{[\mathbf{r}'x\mathbf{r}'']^2}, \qquad (4.17)$$

где **r**(s) - радиус-вектор точки волокна, $\mathbf{r}' = d\mathbf{r}/ds$ - производная по длине дуги s и $\mathbf{r}''$ - вторая производная $d^2\mathbf{r}/ds^2$.

Форму волокна описывали полиномами различной степени, коэффициенты которых определяли методом наименьших квадратов [53]. Кривизна аппроксимирующей кривой зависит от степени полинома, как показано рис. 4.62. Координаты центра волокна можно спроектировать на плоскость XY, в которой их можно описать полиномами второй, четвертой и восьмой степени. Рис.4.62 показывает, что полином второй степени приводит к недооценке кривизны. Полином четвертой степени хорошо аппроксимирует данные, а полином восьмой степени излишне чувствителен к экспериментальному шуму. Это проявляется в виде ряда максимумов полученного радиуса кривизны на рис. 4.62b. Следовательно, нужно оптимизировать степень полинома.

Из-за недостатка сопоставимых данных невозможно определить, при какой степени полинома удается наиболее адекватно описать кривизну волокон. В таких случаях принимают субъективное решение, интуитивно определяющее «хорошее»

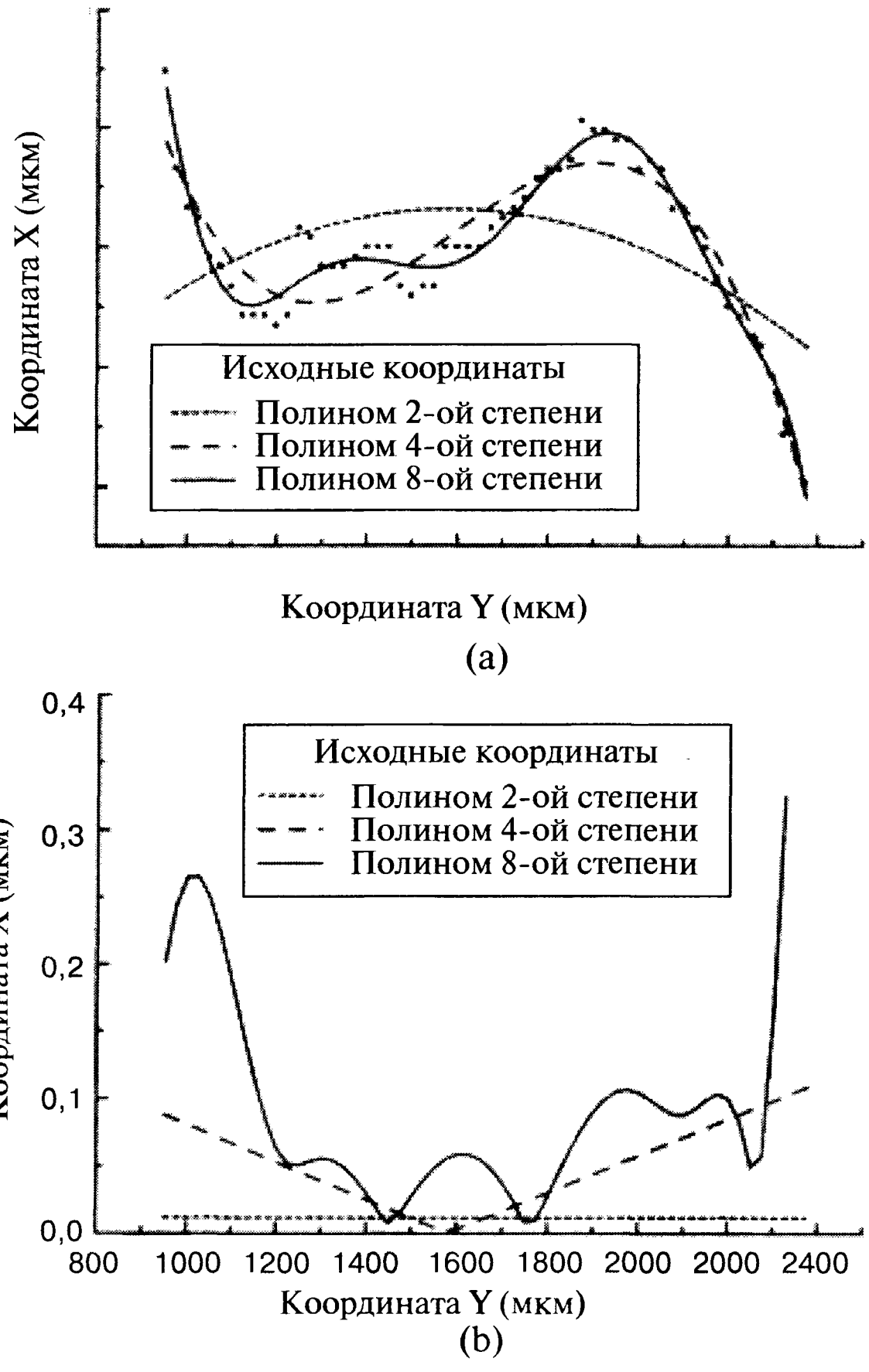


Рис. 4.62. Аппроксимация формы волокна полиномами различной степени. (a) - Если степень полинома выбрана адекватно, высокочастотный инструментальный шум сглажен; (b) - если полином имеет слишком высокую степень, кривизна волокон вблизи их кончиков определяется слишком неточно.

соответствие. Это неплохой метод, если данные используют для визуальной демонстрации [54]. Если же хотят получить количественную информацию, она может оказаться невоспроизводимой. Для проверки можно использовать результаты анализа контрольных образцов, армированных волокнами известной кривизны, что позволяет выбрать адекватный аппроксимирующий полином.

Для исследования влияния случайных экспериментальных ошибок на качество описания формы волокон при помощи полиномов решили использовать «функцию шума». Распределение ошибки измерений получали следующим способом:

(a) получали изображение в плоскости XZ;

(b) вручную определяли положение центров волокон;

(c) используя случайные начальные точки, запускали автоматизированную программу поиска координат центров волокон;

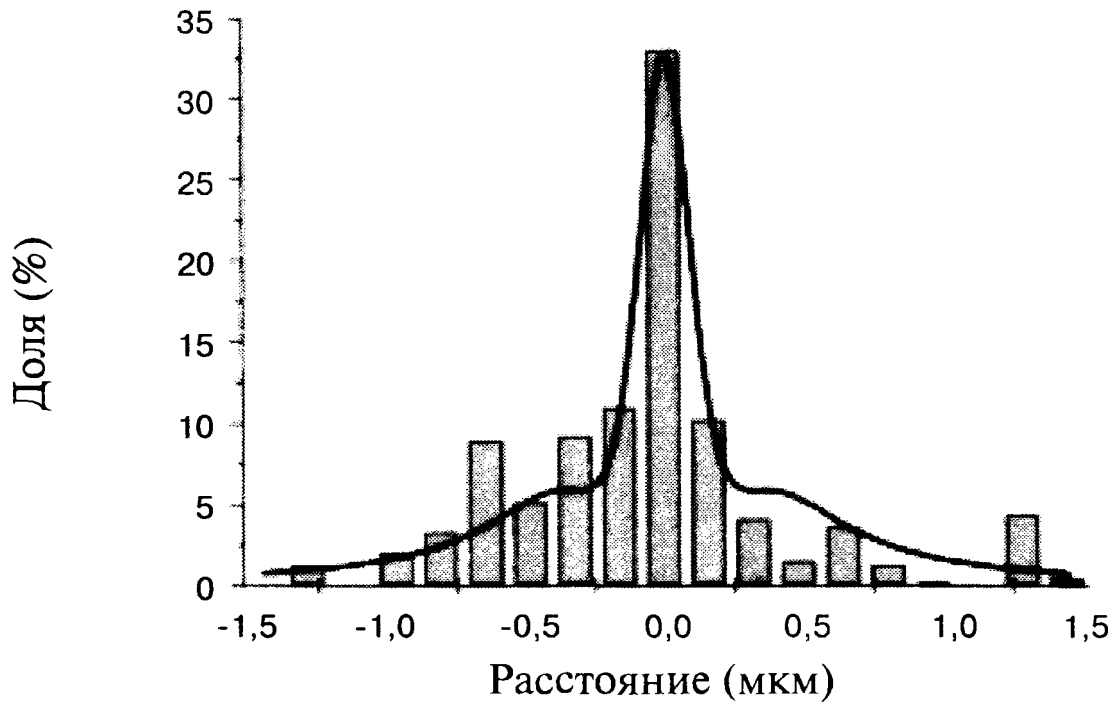


Рис. 4.63. Распределение ошибок определения координат методом автоматического поиска центра волокон. Ошибку характеризовали разностью координат центров волокна, определенных вручную микроскопистом и программой.

(d) строили распределение ошибки определения координаты δX (или δZ), как показано на рис. 4.63.

Сплошная кривая демонстрирует распределение ошибок, имитирующее инструментальный шум.

Координаты волокна можно описать непрерывной функцией (уравнение 4.15). Для проверки работы методики волокна моделировали спиралями известной формы, на которые накладывали шум, распределение которого показано на рис. 4.63. Таким образом, моделировали сигнал конфокального микроскопа. Рис.4.64 демонстрирует относительную ошибку определения радиуса кривизны в зависимости от степени аппроксимирующего полинома, а также от значения радиуса кривизны волокна. При увеличении ρ, что соответствует более выпрямленному волокну, возрастание степени полинома приводит к увеличению высоко-

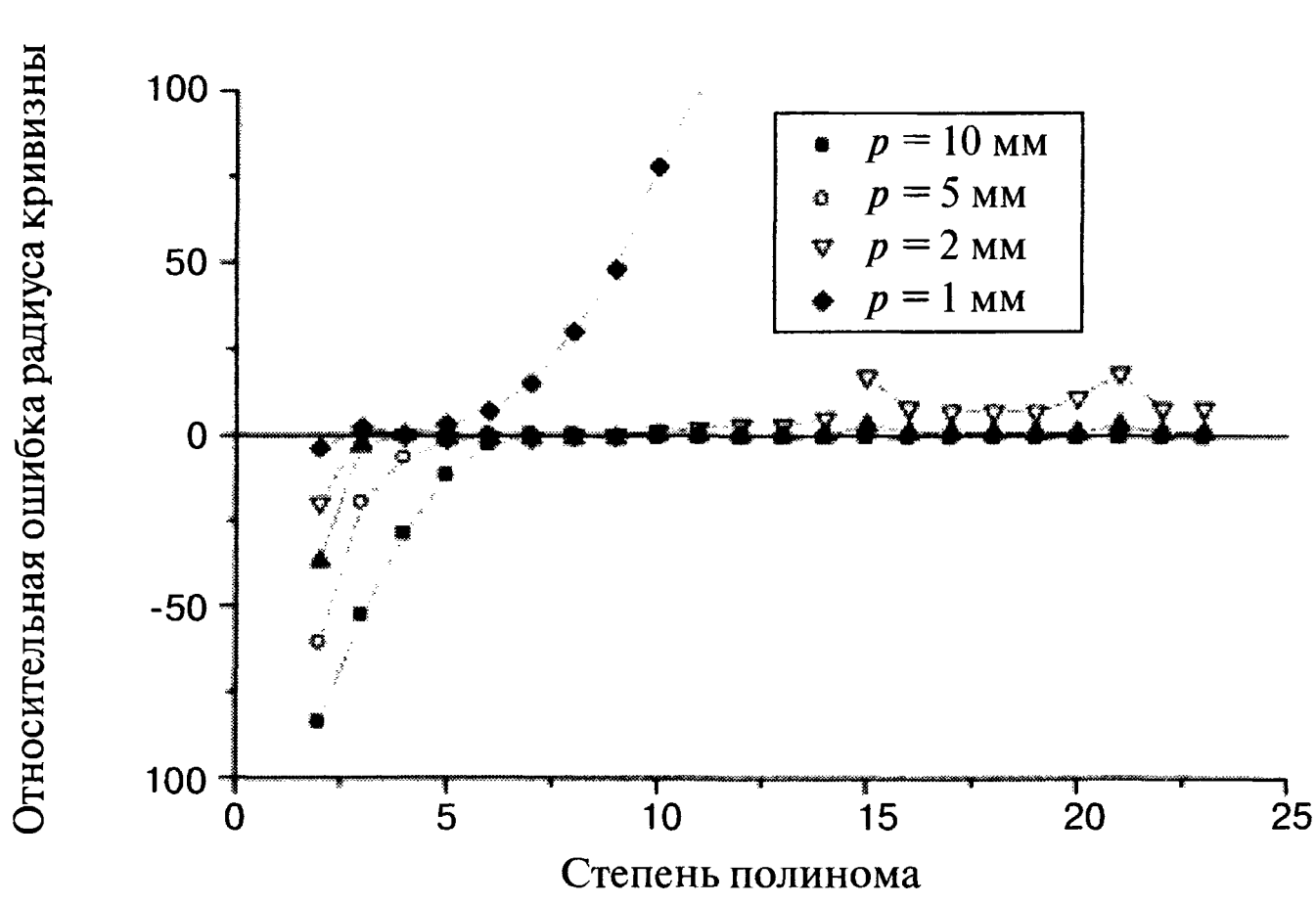


Рис. 4.64. Зависимость относительной ошибки среднего радиуса кривизны от степени аппроксимирующего полинома для волокон длиной 2 мм.

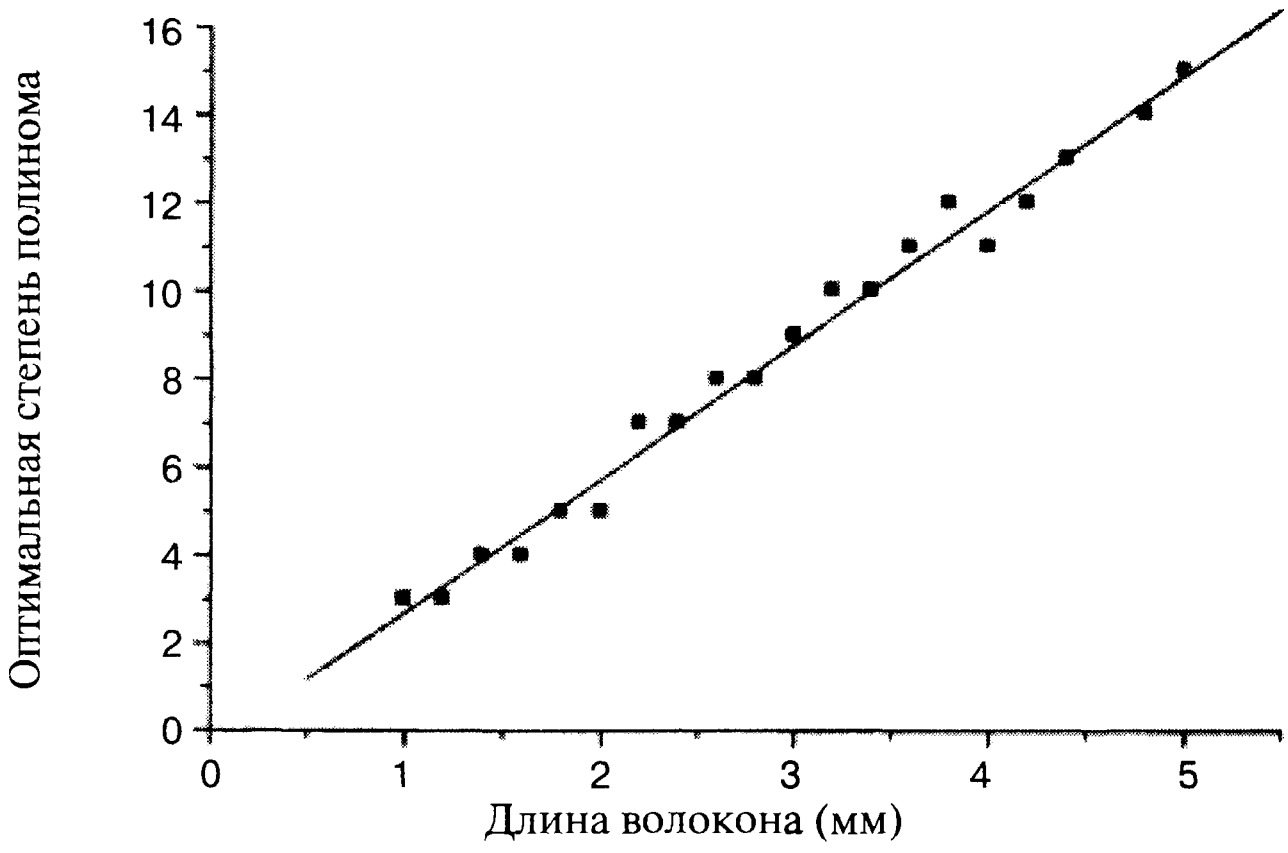


Рис. 4.65. Оптимальная степень аппроксимирующего полинома для волокон спиральной формы в зависимости от длины волокна.

частотного пространственного шума и относительному увеличению ошибки ρ. Из приведенных данных следует, что для сегментов волокон длиной 2 мм оптимален полином шестой степени (если радиус кривизны волокон лежит в пределах $0{,}5 < \rho < 100$ мм).

Результаты компьютерного моделирования волокон спиральной формы приведены на рис. 4.65. На рисунке приведена зависимость от длины волокон оптимальной степени аппроксимирующего полинома, определяющего радиус кривизны ρ с погрешностью $|\delta\rho| < 20\%$ для спиралей в диапазоне $0{,}5 < \rho < 100$ мм. Для коротких волокон длиной менее 1 мм не существует полинома, удовлетворительно аппроксимирующего все спирали. Поэтому измерение кривизны волокон длиной меньше 1 мм можно считать ненадежным.

На рис. 4.66 показаны результаты полиномиальной аппроксимации формы волокон, показанных на рис. 4.59. Устранялись волокна, длина которых на исходном

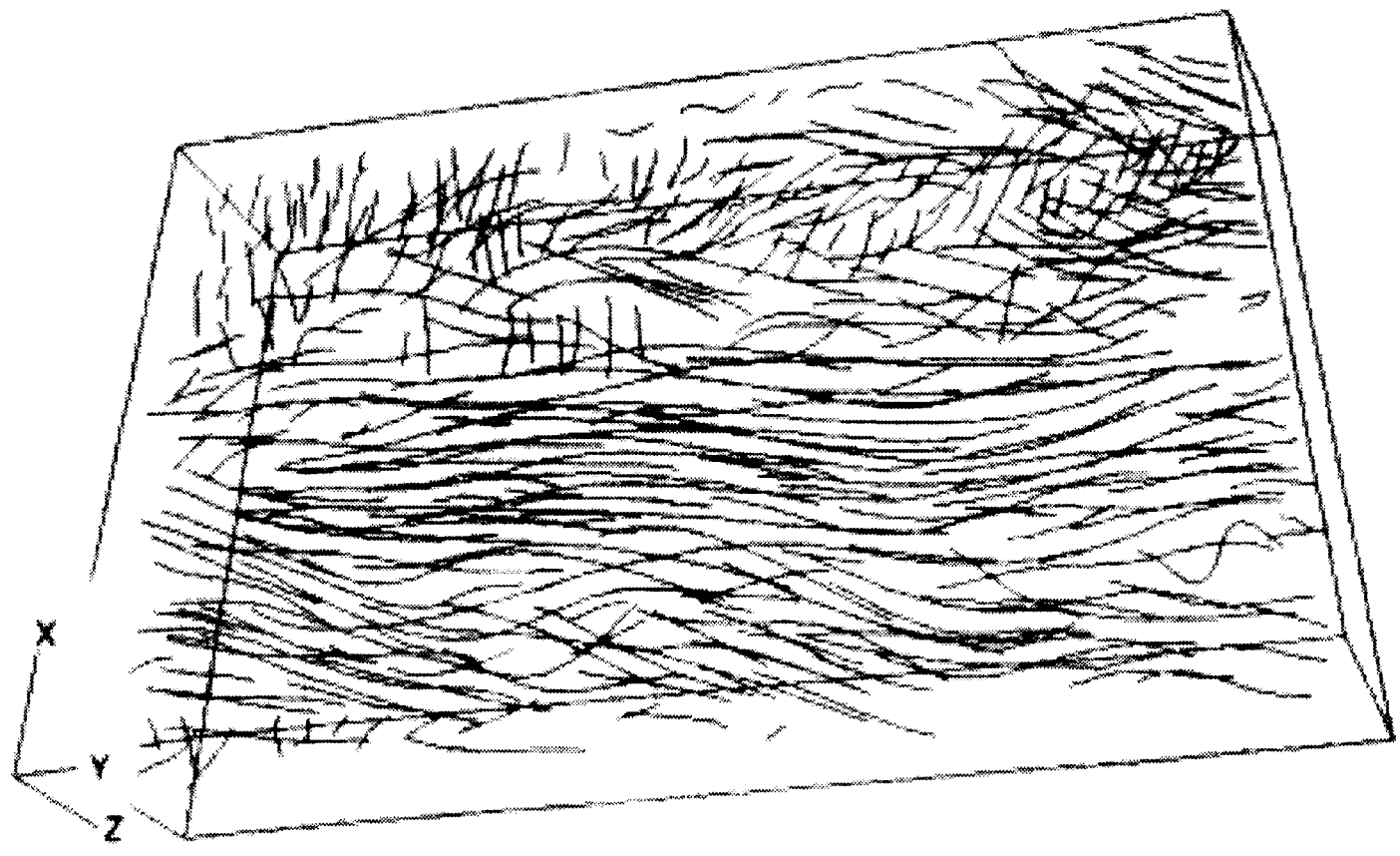


Рис. 4.66. Сглаживание формы волокон полиномами дает более реалистичное трехмерное изображение, чем исходный рис. 4.59.

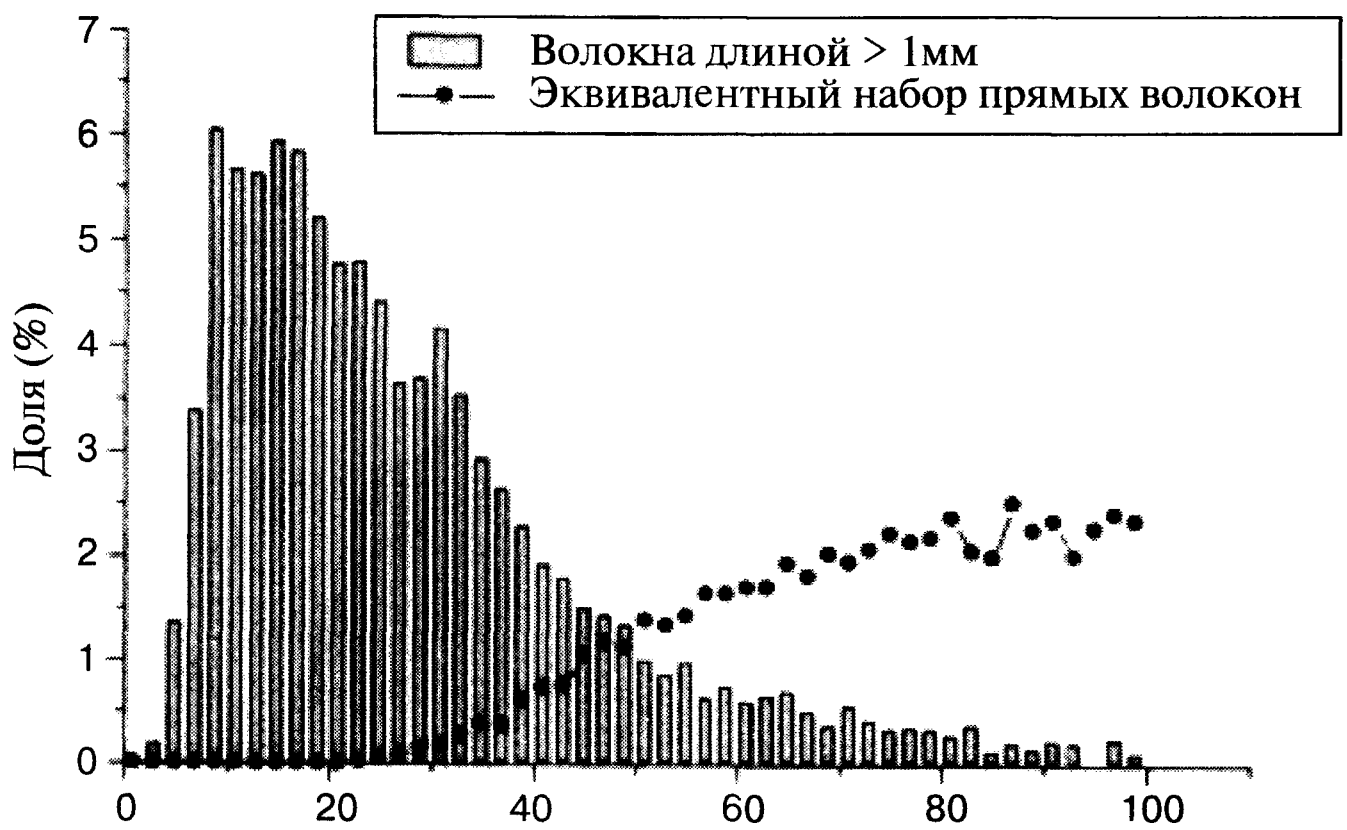


Рис. 4.67. Распределение радиуса кривизны волокон в стеклопластике. Для сравнения приведено аналогичное распределение для прямых волокон, в которых кривизна обусловлена инструментальным шумом микроскопа.

рисунке 4.59 была меньше 1 мм. Влияние процедуры сглаживания формы вполне очевидно. Распределение кривизны волокон представлено на рис. 4.67. Радиус кривизны $\rho(s)$ вычисляли по уравнению (4.16) через каждые 50 мкм вдоль волокна. Для сравнения моделировали эквивалентный набор прямых волокон (такое же количество отрезков прямых волокон той же длины), и на рисунке представлено полученное распределение кривизны. Эти данные свидетельствуют, что значения радиуса кривизны, полученные на основе полиномиальной аппроксимации, обусловлены подлинной кривизной волокон, а не инструментальным шумом.

Внимательный читатель мог заметить, что мы не рассматривали влияние ограниченности размеров изучаемого объема. Рис. 4.68 иллюстрирует появление ошибки измерения длины волокон, обусловленной конечностью объема. Для достоверного измерения кривизны длина волокон должна превышать 1 мм. Если амплитуда волны велика, длина будет занижена. Следовательно, получаемое распределение длины волокон является лишь приближением реального распределения.

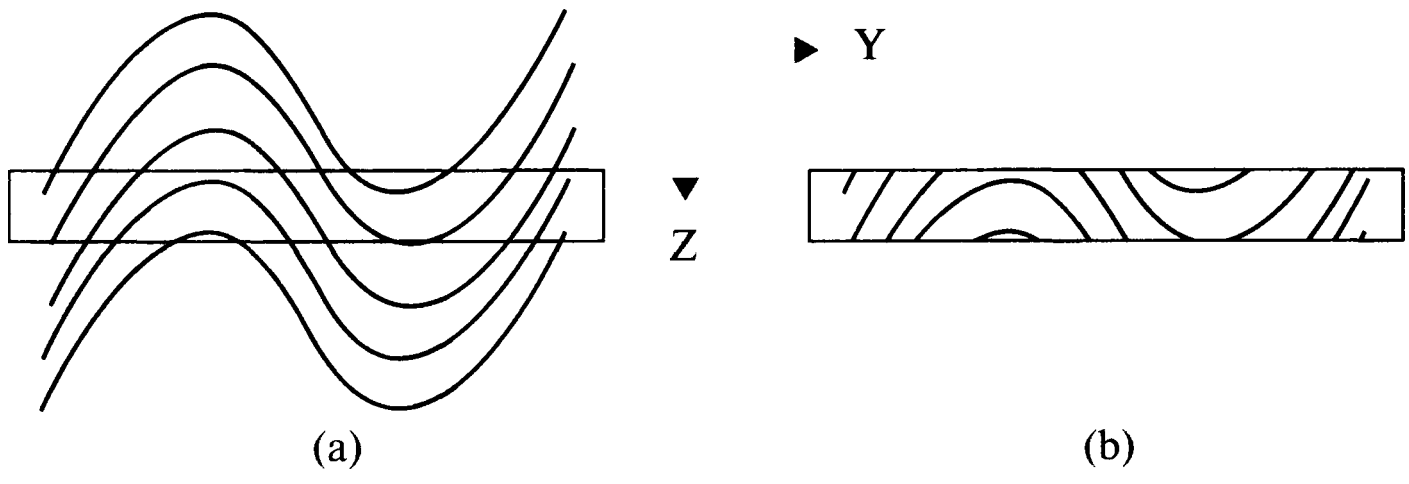


Рис. 4.68. (a) – Изогнутые волокна, выходящие за пределы толщины изучаемого объема; (b) - полученные сегменты волокон. Этот эффект приводит к ошибке измерения кривизны.

4.7.7. Заключение

В этой части книги было продемонстрировано, как полуавтоматическая обработка изображений может увеличить скорость получения информации. Контраст оптического сечения образца в плоскости XZ при флуоресцентном режиме работы микроскопа достаточен для точного определения координат волокон. Полностью автоматические программы анализа изображений оказались не очень надежными. Поэтому была разработана полуавтоматическая программа, определяющая положение волокна исходя из его координат на предыдущем оптическом сечении. Информацию, которую при ручной обработке получали за несколько дней, в полуавтоматическом режиме получают за два часа.

Было замечено, что результаты измерения кривизны волокон чувствительны к инструментальному шуму, и поэтому для определения кривизны форму волокон аппроксимировали полиномами. Для определения оптимальной степени полинома изучали влияние шума на волокна спиральной формы. Разработанная методика позволила определить распределение радиусов кривизны волокон. Используемую схему проверяли при помощи контрольного компьютерного моделирования. Если изменить любой из используемых параметров (например, расстояние между плоскостями оптических XZ сечений), контрольное компьютерное моделирование нужно повторять. Имитируемые наборы данных позволяют оценить точность измерения и необходимый объем образца для получения результатов с заданной точностью.

4.8. Перспектива развития конфокальной микроскопии

Возможности конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в материаловедении кажутся беспредельными. В последние шесть лет авторы настоящей книги широко использовали автоматизированную конфокальную систему для изучения ориентации и пространственного распределения волокон в волокнистых композитах. Ее использовали в следующих целях:

- для изучения степени изотропии распределения волокон в композите;
- для изучения ориентации волокон и, следовательно, для изучения процесса течения расплава в местах сложной геометрии [56];
- для количественного определения кривизны волокон и введения новых способов характеризации структуры волокон. Например, для определения расстояния между соседними волокнами, определения трехмерных кластеров и углового распределения центров волокон [57];
- для выяснения погрешности измерения ориентации волокон [58,59].

В процессе работы конструкция конфокального микроскопа изменялась. Например, для увеличения глубины проникновения использовали оптическую когерентную томографию (глава 5). Чтобы снизить эффект фотоотбеливания, была предложена система линз, позволяющая увеличить амплитуду сигнала [60], а также метод двухфотонного возбуждения [61].

Как отмечалось в главе 2, существуют миниатюрные конфокальные системы. За несколько прошлых лет для европейского Космического центра в Норд-

вийке была разработана облегченная конструкция микроскопа для космических зондовых аппаратов [62]. Однако еще более любопытна конфокальная система наноуровневого размера, схематически показанная на рис. 1.71 [63]. Заинтересованный читатель может ознакомиться со всеми направлениями развития конфокальных микроскопов в книге Поули [5]. Будущее конфокальной микроскопии действительно выглядит очень ярким!

4.9. Литература

1. Minsky M. (1957), Microscopy Apparatus, US Patent 3013467.
2. Egger M.D. and Petran M. (1967), New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells, Science, **157**, 305-307.
3 Ellis G.W. (1979), A fiber-optic phase-randomizer for microscope illumination by laser [Abstract ME1610], *Journal of Cellular Biology*, **83**, 303a.
4. Åslund N., Carlsson K., Liljeborg A. and Majlof L. (1983), PHOTBOS, a microscope scanner designed for micro-fluorometric applications, using laser induced fluorescence, *Proceedings of the Third Scandinavian Conference on Image Analysis*, Studentliterature, Lund.
5. Pawley J.B. (1995), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd edn, New York and London, Plenum Press.
6. Wilson T. (1993), *Confocal Microscopy*, London, Academic Press.
7. Gee M. (1994), «Parallel Confocal Microscopy», National Physical Laboratory, Teddington, Annual Report.
8. Brakenhoff GJ., van der Voort H., Baarslag M.W., Oud J.L., Zwart R. and van Driel R. (1988), Visualisation and analysis techniques for 3D information acquired by confocal microscopy, Scanning Microscopy, **2**(4), 1831-1838.
9. Knoester A. and Brakenhoff G.J. (1990), Applications of confocal microscopy in industrial solid materials: some examples and a first evaluation, *J. Microsc-Oxford*, **157**(1), 105-113.
10. Thomason J. L. and Knoester A. (1990), Application of confocal scanning optical microscopy to the study of fibre reinforced composites, *J. Mat. Sci. Letters*, **9**, 258-262.
11. Linfoot E.H. and Wolf E. (1953), Diffraction images in systems with an annular aperture, *Proceedings of the Physics Society*, **66**(B), 145-149.
12. Sheppard C.J.R. and Wilson T. (1981), Effects of high angles of convergence in V(Z) in the scanning-acoustic microscope, *Appl. Phys. Lett*, **38**, 858-859.
13. Visser T.D., Oud J.L. and Brakenhoff G.J. (1992), Refractive index and axial distance measurements in 3D microscopy, *Optik*, **90**, 17-19.
14. Carlsson K. (1991), The influence of specimen refractive index, detector signal integration, and non-uniform scan speed on the imaging properties in confocal microscopy, *J. Microsc-Oxford*, **163**(2), 167-178.
15. Hell S., Reiner G., Cremer C. and Stelzer E.H.K. (1993), Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index, *J. Microsc-Oxford*, **169**(3), 391-405.
16. Visser T.D., Groen F.C.A. and Brakenhoff G.J. (1991), Absorption and scattering correction in fluorescence confocal microscopy, *J. Microsc-Oxford*, **163**(2), 189-200.

17. Kriete A (1992), Undesirable phenomena in 3D image cytometry. In *Visualisation in biomedical microscopies - 3D imaging and computer applications*, VCH Publishers, Chapter 9, pp. 214-218.
18. Entwistle A. and Noble M. (1994), Optimizing the performance of confocal point scanning laser microscopes over the full field of view, *J. Microsc-Oxford*, **175**(3), 238-251.
19. Sandison D.R., Williams R.M., Wells K.S., Stridder J. and Webb W.W. (1995), Quantitative fluorescence confocal laser scanning microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy* Ed. Pawley, J.B., Plenum Press.
20. Cogswell C.J. and Larkin K.G. (1995), The specimen illumination path and its effect on image quality, Chapter 8, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. Pawley J.B., Plenum Press.
21. Tsien R.Y. and Waggoner A. (1995), Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry, Chapter 16 in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. Pawley J.B., Plenum Press.
22. Art, J. (1995), Photon detectors for confocal microscopy, Chapter 12 in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. Pawley, J.B., Plenum Press.
23. Lucas L., Gillard D. and Remion Y. (1997), A new unsupervised cube-based algorithm for iso-surface generation, *Comput. Networks ISDN*, **29**(14), 1737-1744.
24. Chan S.L. and Purisima E.O. (1998), A new tetrahedral tessellation scheme for iso-surface generation, *Computers and Graphics*, **22**, 83-90.
25. Gouraud H. (1971), Continuous shading of curved surfaces, *IEEE T. Comput*, **20**, 623-629.
26. White N.S. (1995), Visualization systems for multidimensional CLSM images, Chapter 14 in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. Pawley J.B., Plenum Press.
27. Lucas L., Gilbert N., Ploton D. and Bonnet N. (1996), Visualization of volume data in confocal microscopy: comparison and improvements of volume rendering, *Microsc-Oxford*, **181**, 238-252.
28. Hamilton D.K. and Wilson T. (1982), Surface profile measurement using the confocal microscope, *J. Appl. Phys.*, **53**, 5320-5322.
29. Cheng P.C. and Kriete A. (1995), Image contrast in confocal light microscopy, Chapter 17 in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. Pawley J.B., Plenum Press.
30. Boyde A. and Jones S.J. (1995), Mapping and measuring surfaces using reflection confocal microscopy, Chapter 15 in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Ed. Pawley J.B., Plenum Press.
31. www.syncroscopy.com
32. Osswald T.A. and Meges G. (1995), *Materials Science of Polymers for Engineers*, Hanser Publishers.
33. Coupland K. and Maltby A. (1997), Modification of the surface properties of polyethylene plastomer films by the use of additives, *J. Plast. Film Sheet*, **13**(2), 142-149.
34. Howard C.V. and Reed M.G. (1998), *Unbiased Stereology*, Appendix A, BIOS Scientific Publishers.
35. Cavalieri B. (1666), *Geometria degli Indivisibili*, Unione Tipografico-Editirice, Torino.
36. Howard C.V., Reid S., Baddeley A. and Boyde A. (1985), Unbiased estimation of

particle density in the tandem scanning reflected light microscope, *J. Microsc-Oxford*, **138**, 203-212.
37. Karlsson L.M. and Liljeborg A. (1994), Second-order stereology for pores in translucent alumina studied by confocal scanning laser microscopy, *J. Microsc-Oxford*, **175**(3), 186-194.
38. Liljeborg A., Czader M. and Porwit A. (1995), A method to compensate for light attenuation with depth in three-dimensional DNA cytometry using a confocal scanning laser microscope, *J. Microsc-Oxford*, **177**(2), 108-114.
39. Margadant F., Leemann T. and Niederer P. (1996), A precise light attenuation correction for confocal scanning microscopy with O(n4/3) computing time and O(n) memory requirements for n voxels, *J. Microsc-Oxford*, **182**(2), 121-132.
40. Argon A.S. (1972), *Fracture of Composites, Vol. 1*, Academic Press.
41. Creighton CJ. and Clyne T.W. (2000), The compressive strength of highly-aligned carbon-fibre/epoxy composites produced by pultrusion, *Comp. Sci. Tech.*, **60**, 525-533.
42. Wisnom M.R. (1994), The effect of fibre waviness on the relationship between compressive and flexural strengths of unidirectional composites, *Journal of Composite Materials*, **28**(1), 66-76.
43. Mrse A.M. and Piggott M.R. (1993), Compressive properties of unidirectional carbon fibre laminates: П. The effects of unintentional and intentional fibre misalignments, *Comp. Sci. Tech.*, **46**, 219-227.
44. Yurgartis S.W. (1987), Measurement of small angle fiber misalignments in continuous fiber composites, *Comp. Sci. Tech.*, **30**(4), 279-293.
45. Clarke A.R., Davidson N.C. and Archenhold G. (1997), Mesostructural characterisation of aligned fibre composites, Chapter 7 in *Flow-induced Alignment in Composite Materials*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
46. Joyce P.J., Kugler D. and Moon T.J. (1997), A technique for characterizing process-induced fiber waviness in unidirectional composite laminates - using optical microscopy, *J. Compos. Mater.*, **31**(17), 1694-1734.
47. Highsmith A.L., Davis J.J. and Helms K.L.E. (1992), The influence of fiber waviness on the compressive behaviour of unidirectional continuous fiber composites, *Composite Materials: Testing and Design (Tenth Volume)*, ASTM STP 1120. American Society for Testing Materials, Philadelphia, pp. 20-36.
48. Paluch B. (1996), Analysis of geometric imperfections in unidirectional reinforced composites, *J. Compos. Mater.*, **30**(4), 454-485.
49. Clarke A.R., Archenhold G. and Davidson N.C. (1998), 3D Confocal microscopy of glass fibre reinforced composites, Chapter 3 in *Microstructural Characterisation of Fibre-reinforced Composites*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
50. Hsiao H.M. and Daniel I.M. (1996), Elastic properties of composites with fibre waviness, *Comp. Sci. Tech.*, **56**, 581-593.
51. Clarke A.R., Archenhold G., Davidson N.C, Slaughter W.S. and Fleck N.A. (1995), Determining the power spectral density of the waviness of unidirectional glass fibres in polymer composites, *Appl. Comp. Mater.*, **2**, 233-243.
52. Nutbourne A.W. and Martin R.R. (1998), *Differential Geometry Applied to Curve and Surface Design*, Ellis Horwood Limited.
53. Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T. and Flannery B.P. (1996), *Numerical Recipes in C, «The Art of Scientific Computing»*, Cambridge University Press.

54. Shelden E. and Knecht D.A. (1997), Reconstruction and display of curvilinear objects from optical section data using 3D curve fitting algorithms, *J. Microsc-Oxford*, **191**(1), 97-107.
55. Mattfeldt T., Clarke A.R. and Archenhold G. (1994), Estimation of the directional distribution of spatial fibre processes using stereology and confocal scanning laser microscopy, *J. Microsc-Oxford*, **173**(2), 87-101.
56. Clarke A.R., Eberhardt C.N. and Davidson N.C. (1999), 3D characterisation of glass fibres in composites by confocal microscopy, *Proceedings of the 12th Int. Conf. on Composite Materials fICCM12)*, Paris, p. 471 (extended abstracts), paper 167.
57. Clarke A.R. and Eberhardt C.N. (1999), The representation of reinforcing fibres in composites as 3D space curves, *Comp. Sci. Tech.*, **59**, 1227-1237.
58. Eberhardt C.N. and Clarke A.R. (2001), Fibre orientation measurements in short glass fibre composites. Part 1: automated, high-angular resolution measurement by confocal microscopy, *Comp. Sci. Tech.*, **61**, 1389-1400.
59. Eberhardt C.N., Clarke A.R., Vincent M., Giroud T. and Fluoret S. (2001), Fibre orientation measurements in short glass fibre composites. Part II: a quantitative error estimate of the 2D image analysis technique, *Comp. Sci. Tech.*, **61**, 1961-1974.
60. Reichelt S. and Amos W.B. (2001), SELS: A new method for laser scanning microscopy of live cells, *Microscopy & Analysis*, November, 9-11.
61. Diaspro A., Corosu M., Ramoino P. and Robello M. (2000), A two photon excitation microscope based on a compact confocal scanning head, *Microscopy & Analysis*, July, 21-24.
62. Schiller P. (1994), Confocal laser scanning microscope, *European Space Agency Bulletin*, Summer, 8-9.
63. Zandonella C (2001), Sick cells can't escape the eagle eye of the micro-microscope, *New Scientist*, **172** (2320), 24.

Часть III

Дополнительные микроскопические методы

Глава 5

Дополнительные оптические и электромагнитные методы исследования

При рассмотрении природы света... используйте корпускулярную теорию в понедельник, среду и пятницу, а волновую теорию во вторник, четверг и субботу.

... приписывается сэру Уильяму Генри Брэггу (1928)

5.1. Введение

В этой главе будут обсуждаться некоторые методы оптической микроскопии отраженного света и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.

Уравнения Максвелла имеют общий характер и применимы к различным типам электромагнитного излучения. Их различие состоит в длине электромагнитной волны. Развитие новых технологических процессов начинает оправдывать надежды, связываемые с машинами и приборами нанометрового масштаба, и одна из главных причин развития неоптической микроскопии состоит в необходимости улучшении пространственного разрешения вплоть до нанометровой области. Многие авторы анализировали возможность преодоления дифракционного предела разрешения оптической микроскопии [1,2,3] за счет изменения методов анализа информации. Например, классический критерий Рэлея будет преодолен, если на компьютере построить кривую, соответствующую распределению интенсивности двух близко расположенных точечных источников. Критерий Рэлея является лишь качественным эмпирическим правилом, а функциональная аппроксимация кривой использует количественные методы. Однако истинный способ достижения более высокого разрешения состоит в использовании излучения с более короткой длиной волны (например, рентгеновского) или применении ска-

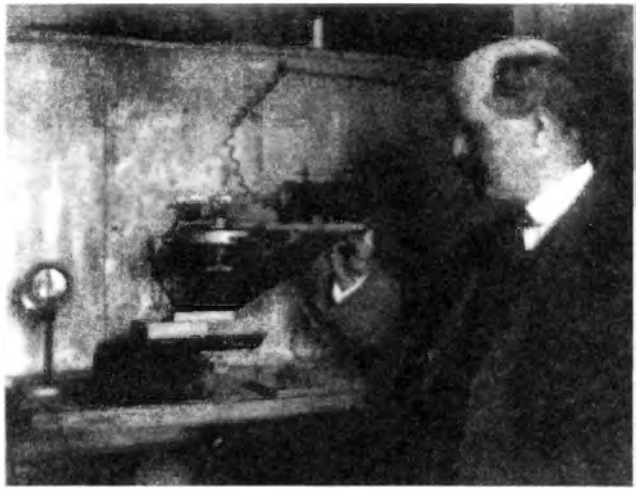


Рис. 5.1. На фотографии 1915 года сэр Уильям Генри Брэгг изображен вместе со своей рентгеновской установкой для изучения кристаллографической структуры кристаллов.

нирующего атомно-силового микроскопа. Использование высокоэнергетичного неоптического излучения также позволяет улучшить разрешение микроскопа.

Сэр Уильям Генри Брэгг, профессор физики в университете Лидса в 1909–1915 гг. [4], вместе со своим сыном сэром Уильямом Лоренсом Брэггом предпринял исследования в области рентгеновской кристаллографии. Уравнение Брэгга $n\lambda = 2d \sin \theta$, связавшее длину волны рентгеновского излучения λ с углом отражения θ, является краеугольным камнем рентгеновской кристаллографии. Брэгги поняли, что рентгеновские лучи можно использовать для исследования атомной структуры материалов. Первый рентгеновский спектрометр, построенный ими в 1915 г. (рис. 5.1), можно считать неким трехмерным микроскопом. Промышленно построенный рентгеновской аппарат Брэгга изображен на рис. 5.2. Новейший настольный рентгеновский микротомограф, применяемый для исследования структуры материалов, будет описан ниже.

Прежде чем анализировать возможности рентгеновских систем, рассмотрим рамановскую и сканирующую атомно-силовую микроскопию. Интерес к оптической микроскопии не ослабевает до сих пор, и регулярно появляются новые типы микроскопов, которые затем постепенно совершенствуются. В настоящее время основной тенденцией является развитие многофункциональной микроскопии, в которой на одной базовой основе используются множество дополнительных приспособлений (модулей), делающих микроскоп более универсальным.

Включение растровых силовых микроскопов в настоящую главу может показаться нелогичным, поскольку они не относятся к электромагнитным методам исследования. Причины здесь две. Во-первых, это позволяет рассмотреть принципы, лежащие в основе оптических методов, близких к силовым. Во-вторых, в некоторых атомно-силовых микроскопах для определения положения кончика иглы консоли используют лазерное освещение, и дифракция света определяет разрешение прибора.

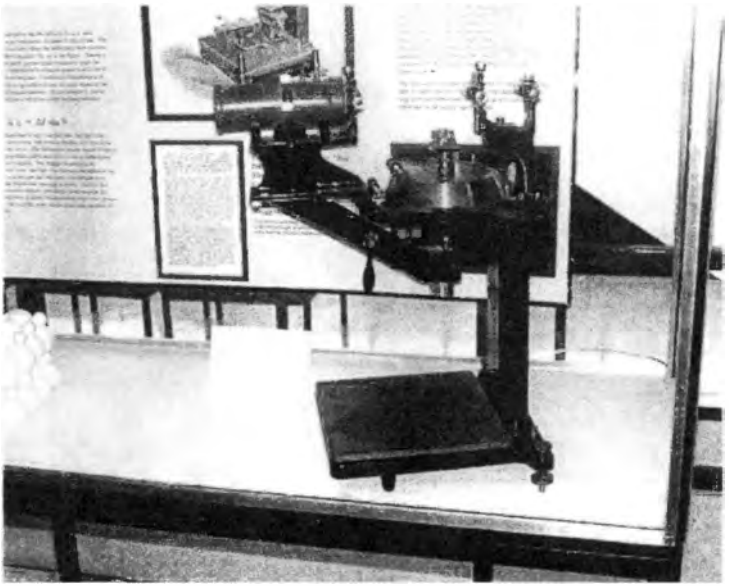


Рис. 5.2. Промышленно производимый спектроскоп (PYE, Кембридж), в течение многих лет использовавшийся для кристаллографических исследований.

5.2. Рамановская микроскопия*

Эффект комбинационного рассеяния обнаружен в 1928 г. Мандельштамом, С.В. Раманом и К.С. Кришнаном [5], хотя пятью годами ранее он был предсказан Смекалом [6]. Если монохроматическое излучение интенсивностью I падает на оптически прозрачную жидкость, небольшая доля излучения (10^{-8}) рассеивается. Помимо основной линии падающего света, в спектре рассеянного света наблюдается пара новых линий, частота которых немного выше и ниже частоты падающего излучения. Появление дополнительных линий комбинационного рассеяния ИК-излучения обусловлено взаимодействием света с колеблющимися молекулами (рис. 5.3). Самый простой способ объяснить появление этих линий состоит в рассмотрении поляризации материала P, которая зависит от коэффициента поляризуемости α материала и интенсивности электрического поля E световой волны частотой ν_0 [7] :

$$P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \qquad (5.1)$$

---

*Этот эффект имеет различное название в западной и отечественной литературе. На западе его называют эффектом Рамана, а в отечественной литературе – эффектом комбинационного рассеяния или эффектом Мандельштама-Бриллюэна. Первое название (комбинационное рассеяние) в России более принято. Тем не менее, термин *рамановская микроскопия* получил распространение и в России, поэтому в настоящей книге используются термины *комбинационное рассеяние* и *рамановская спектроскопия*. – *Прим. редактора перевода.*

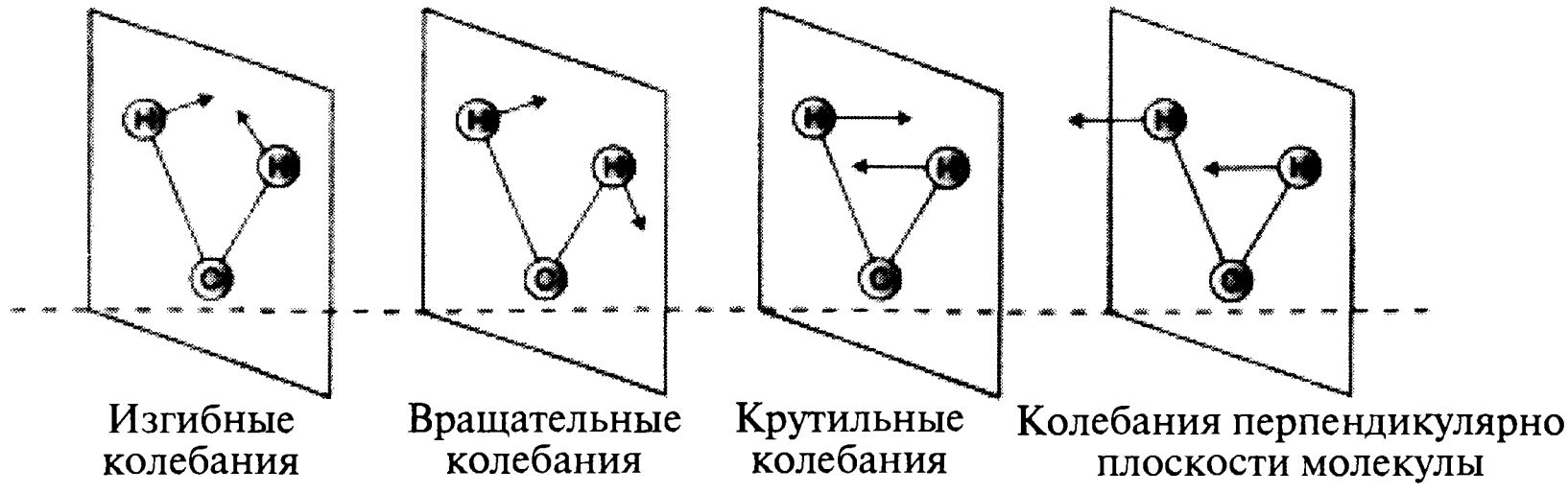


Рис. 5.3. Инфракрасная и рамановская микроскопия дают информацию о колебаниях молекул. Схематически изображены четыре типа колебаний молекулы CH2, приводящих к появлению рамановских инфракрасных линий: изгибные, вращательные, крутильные колебания, а также колебания, перпендикулярные плоскости вращения.

Заряды в материале колеблются с частотой v_m около положения равновесия:

$$q = q_0 \cos(2\pi v_m t), \tag{5.2}$$

Обычно амплитуда электрического поля E_0 постоянна в пределах периода колебаний (что превосходно выполняется для видимого света).

Колебания изменяют поляризуемость материала, которую можно описать рядом Тейлора:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right) q + O(q^2) \tag{5.3}$$

где $O(q^2)$ обозначает величину «порядка q^2». Поскольку величина q^2 намного меньше q, ею и последующими слагаемыми этого ряда можно пренебречь. Объединяя эти уравнения, в первом приближении получаем:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi v_0) + \frac{1}{2} q_0 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 E_0 [\cos\{2\pi(v_0 - v_m)t\} + \cos\{2\pi(v_0 + v_m)t\}] \tag{5.4}$$

Первое слагаемое соответствует рэлеевскому рассеянию, а второе описывает комбинационное рассеяние. Вероятность комбинационного рассеяния зависит от величины производной $\delta\alpha/\delta q$. Если при колебательном переходе поляризуемость не меняется, $\delta\alpha/\delta q = 0$ и переход не является активным. В трехмерном пространстве величина $\delta\alpha/\delta q$ определяется тензором поляризуемости. Колебания комбинационно-активны, если во время колебаний изменяется хотя бы одна компонента тензора поляризуемости. Поэтому комбинационно-рассеянный свет имеет частоты, равные $v_0 - v_m$, и $v_0 + v_m$. Частота первой линии меньше частоты падающего света, и такие линии называют стоксовскими, а частота второй — выше, и такие линии называют антистоксовскими.

Интенсивности антистоксовских линий комбинационного рассеяния значительно ниже интенсивности стоксовских линий, что иллюстрирует рис. 5.4. Спектры комбинационного рассеяния принято описывать волновыми числами, причем волновое число возбуждающего света принимается за начало системы координат. Линии комбинационного рассеяния характеризуют параметром $1/\lambda = 1/\lambda_1 - 1/\lambda_2$, причем длины волн λ_1 и λ_2 принято выражать в сантиметрах. Стоксовские линии имеют более низкую частоту, чем возбуждающее излучение, а антистоксовские линии расположены симметрично и имеют более высокую частоту.

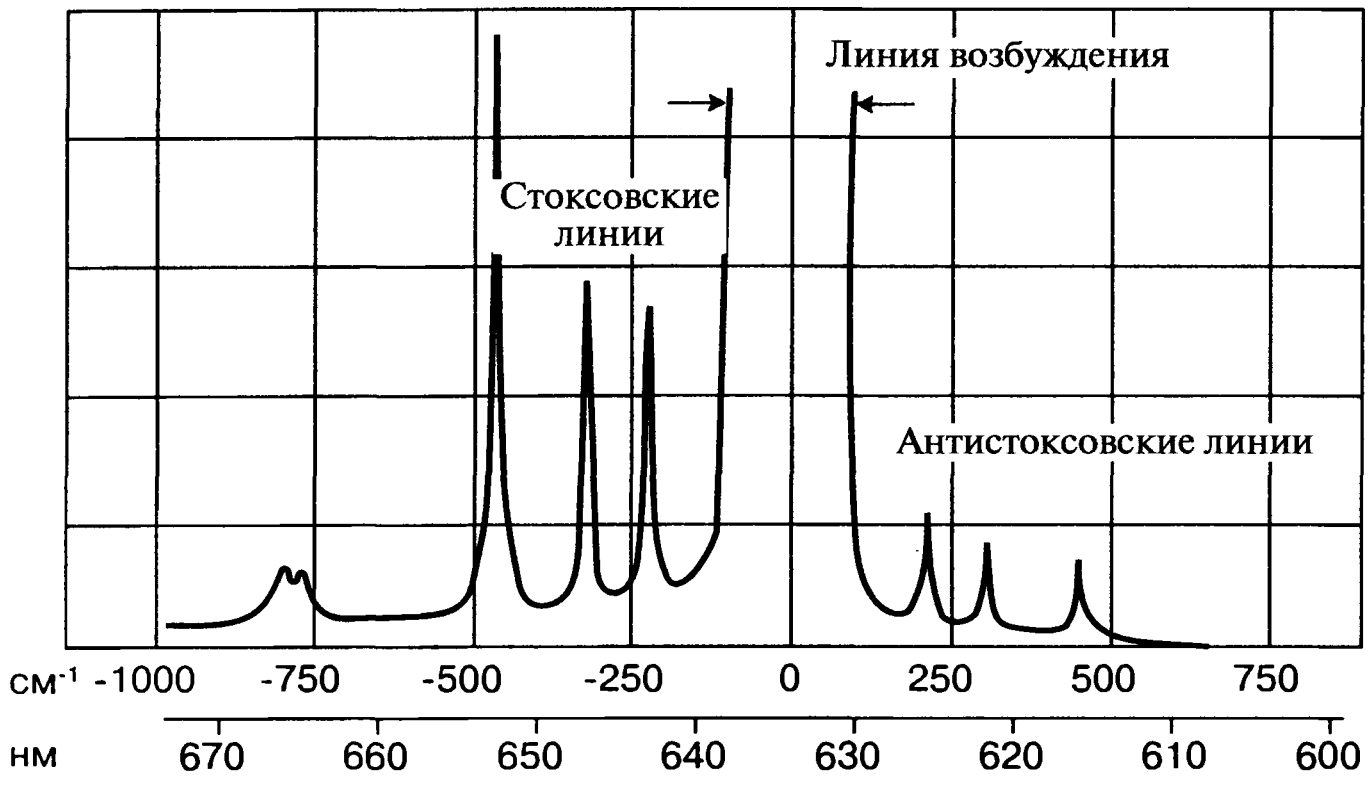


Рис. 5.4 Типичный спектр комбинационного рассеяния жидкого четыреххлористого углерода, на котором видны как стоксовские, так и антистоксовские линии, располагающиеся симметрично относительно линии 632,8 нм возбуждающего He-Ne лазера. Интенсивность линий дана в произвольном масштабе, но примечательна слабость линий комбинационного рассеяния по сравнению с интенсивностью линии рэлеевского рассеяния. Типичная интенсивность линии комбинационного рассеяния равна 10^{-8} интенсивности линии падающего излучения.

Для антистоксовского рассеяния фотон должен получить дополнительную энергию (за счет тепловой энергии рассеивающих молекул). Поэтому антистоксовские линии полностью изчезают при абсолютном нуле (-273°C), когда невозможно получить какую-либо тепловую энергию.

Рамановская спектроскопия подверглась революционным изменениям в начале 1960-х годов после появления лазеров, что позволило получать спектры комбинационного рассеяния на образцах малого объема. Последующее усовершенствование оптических фильтров и появление более чувствительных световых датчиков (вроде ПЗС-камер) позволило существенно расширить область применения эффекта комбинационного рассеяния в микроскопии.

Хотя комбинационное рассеяние легче описывать классическими представлениями, существует и альтернативное квантово-механическое описание. В этом случае говорят о «переходах между колебательными уровнями, возникающих из-за взаимодействия с полем излучения и описываемых гамильтонианом возмущения» [8].

5.2.1. Раманскоп

Члены Группы исследований в области молекулярной физики и контрольно-измерительных приборов университета Лидса участвовали в разработке раманскопа фирмой Renishaw начиная с 1994 года [9]. На рис. 5.5 приведена фотография прибора, позволяющего получать изображение образца с помощью комбинационно-рассеянного света с пространственным разрешением 1 мкм и спектральным разрешением 1 $см^{-1}$. Оптическая схема раманскопа показана на рис. 5.6. Его конструкция подробно обсуждается в работе [10], но основные его черты описаны ниже.

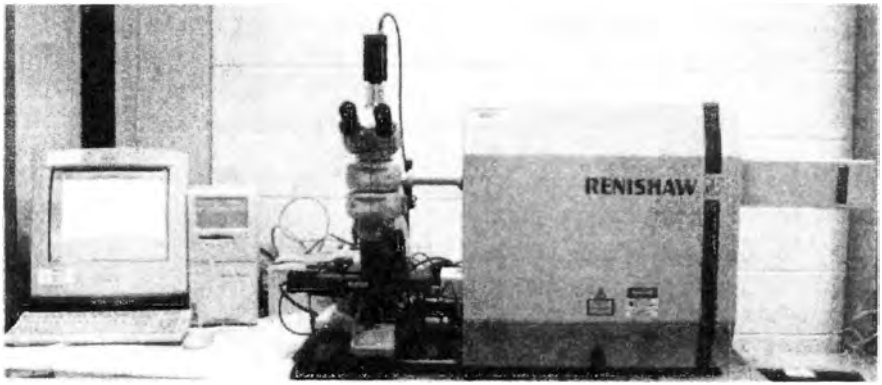


Рис. 5.5. Фотография раманскопа фирмы Renishaw, подключенного к стандартному оптическому микроскопу.

Интенсивность лазерного освещения выбирают с помощью нейтрального светофильтра, расположенного на вращающемся диске. Диаметр лазерного луча увеличивают с помощью двух линз, после чего он проходит через пространственный фильтр, отражается от зеркал M_1 и M_2 и направляется на голографический фильтр NF_1. Небольшой угол наклона этого фильтра (10°) гарантирует, что поляризация отраженного лазерного луча и идущего от образца комбинационно-рассеянного света изменяется не очень сильно. Этот фильтр отражает 98% лазерного света. Напротив, комбинационно-рассеянный свет проходит через него и через второй такой же фильтр NF_2 практически полностью. Фильтр NF_2 еще больше подавляет рэлеевский рассеянный свет. Если длина волны комбинационного рассеяния превышает 100 $см^{-1}$, доля прошедшего света превышает 90%. Узкая щель, помещенная в конфокальную точку, действует как пространственный фильтр, обеспечивающий работу системы в конфокальном режиме. Комбинационно-рассеянный свет затем проходит через дисперсионный элемент, состоящий из дифракционной решетки и отражающей призмы. Наконец, расположенная в оптической схеме микроскопа линза L_2 создает изображение, а ПЗС-матрица регистрирует его интенсивность. Для увеличения чувствительности ПЗС-матрицу иногда охлаждают за счет эффекта Пелетье. На рис. 5.7a приведена типичная спектральная кривая, иллюстрирующая спектральное разрешение системы. На рис. 5.7b приведена аналогичная кривая для того же материала, подвергнутого действию высокого давления в наковальне Бриджмена [10]. Исследуемая линия резонансного комбинационного рассеяния соответствует изгибным колебаниям большой амплитуды вокруг тройной связи поли(бис(паратолуол сульфонат) 2,4-гексадиен-1,6-диола). При давлении 50 кбар полоса комбинационного рассеяния сдвигается по частоте и распадается на два пика. На рис. 5.7b показана зависимость от давления относительного сдвига и расстояния между этими пиками. Эти данные показывают, как давление фундаментально перестраивает структуру материала. В настоящее время изучаются возможности различных применений раманскопа, которые обсуждаются ниже.

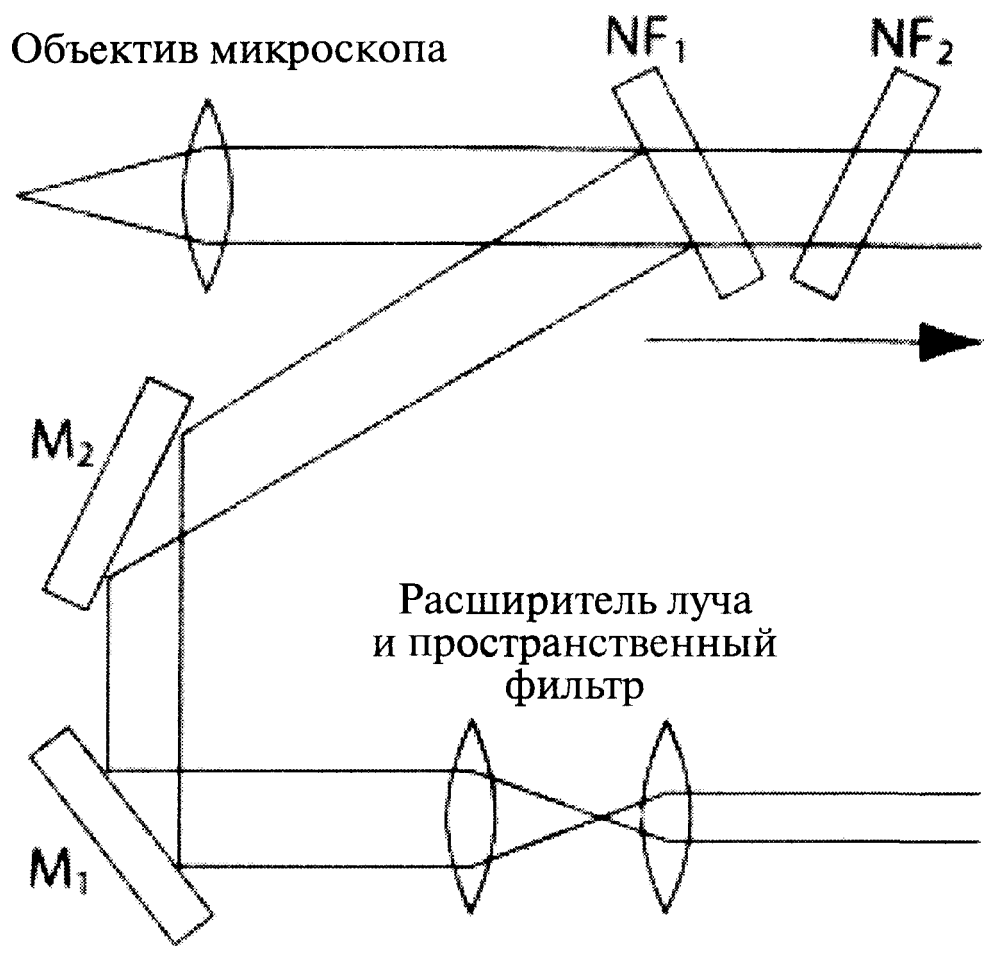


Рис. 5.6. Оптическая схема раманскопа, демонстрирующая ввод лазерного луча в микроскоп и гашение упруго рассеянного света. Элементы NF_1 и NF_2 являются краевыми фильтрами, гасящими свет лазера. Для лазерного луча фильтр NF_1 действует как зеркало, аналогичное M_1 и M_2.

5.2.2. Дополнительные методы, связанные с эффектом комбинационного рассеяния

Если возбуждающее излучение находится в полосе поглощения молекулы в видимом или ультрафиолетовом диапазоне, оно может быть рассеяно посредством двух различных процессов – резонансной флуоресценции или резонансного комбинационного рассеяния. Оба процесса дают гораздо более интенсивное рассеивание, причем пики интенсивности резонансного комбинационного рассеяния могут быть в 100–1000 раз выше, чем нерезонансные пики. Эффект резонансного комбинационного рассеяния был предсказан Плачеком в 1934 г., который предложил поляризационную теорию этого явления. Резкое увеличение интенсивности комбинационного рассеяния может быть получено простым поворотом поляризатора, в результате чего он будет пропускать компоненту комбинационно-рассеянного света, ориентированную перпендикулярно направлению поляризации возбуждающего лазерного света.

Резонансное комбинационное рассеяние определяется когерентными колебаниями молекул, возбуждаемыми электрическим полем лазерного луча. Впервые этот эффект наблюдали в 1962 году в жидком нитробензоле Вудбери и Инг, исследовавшие возможность его использования в качестве электрооптического затвора [11].

Интересный метод, основанный на эффекте резонансного комбинационного рассеяния, носит название «спектроскопии антистоксовского когерентного комбинационного рассеяния» (CARS). В этом методе используют два лазера, один из которых имеет фиксированную, а другой – изменяемую частоту генерации. Оба луча вводят в образец под небольшим взаимным углом (примерно 2°). Когда разница частоты между лазерами совпадает с частотой колебаний молекул, стимулируется резонансное излучение (как стоксовское, так и антистоксовское). Изменяя

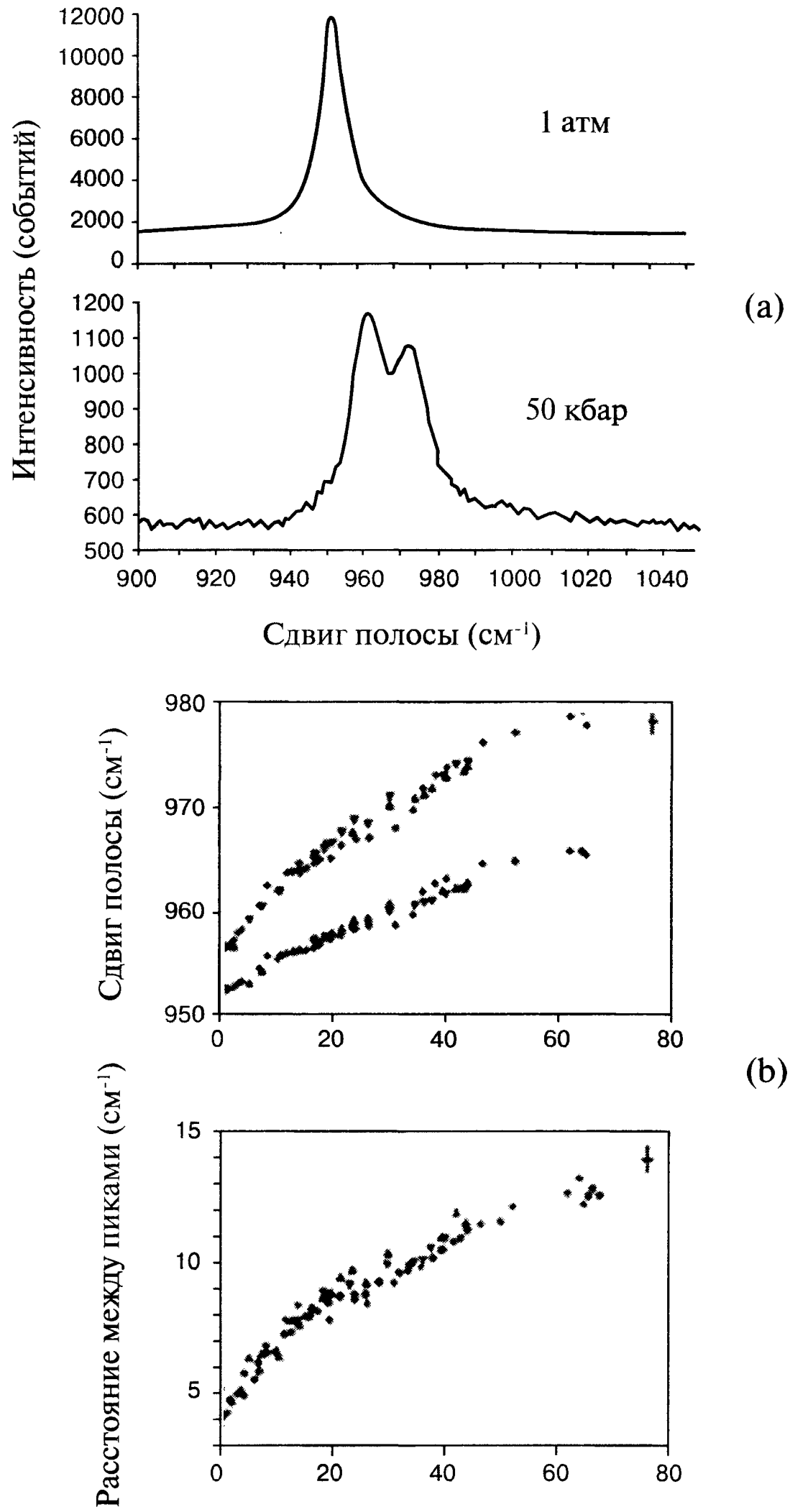


Рис. 5.7. Спектры, иллюстрирующие спектральное разрешение раманскопа. (a) - Спектр резонансного комбинационного рассеяния полисопряженного поли(бис(паратолуол сульфонат) 2,4-гексадиен-1,6-диола) в комнатных условиях и при гидростатическом давлении 50 кбар. (b) - Средняя длина волны и расстояние между пиками полосы 952 $см^{-1}$ в зависимости от приложенного давления.

частоту настраиваемого лазера, получают спектр резонансного комбинационного рассеяния. Преимущество метода антистоксовского когерентного комбинационного рассеяния состоит в высокой интенсивности рассеяния и в отсутствии флуоресцентных помех (частота которых ниже частоты возбуждающего излучения).

Описание других методов, основанных на эффекте комбинационного рассеяния, например, использующих Фурье-преобразование спектров, можно найти в

книге [11]. Кроме того, в следующем разделе обсуждается комбинированный конфокальный и сканирующий рамановский микроскоп ближнего поля с лазерным возбуждением ультрафиолетовым светом. Еще одним любопытным методом, развивавшимся в последние 20 лет, является рамановская спектроскопия поверхности (SERS) [13]. Этот метод основан на том, что интенсивность комбинационного рассеяния некоторых молекул, адсорбированных на специально подготовленную металлическую поверхность, в $10^5 - 10^6$ раз выше ожидаемой. Это открытие заставило пересмотреть теории электрохимии, переноса заряда и химической адсорбции, а также стимулировало развитие науки о поверхности.

Рамановскую спектроскопию используют для определения молекулярной структуры и химического анализа. Она позволяет установить частоты вращательных и колебательных мод молекул. Анализ этих частот позволяет определить геометрию молекул или, по крайней мере, выявить их симметрию. Даже если невозможно точно установить структуру, информация о характерных частотах атомных групп позволяет сделать выводы о расположении атомов в молекуле. Спектры ИК и комбинационного рассеяния дают взаимодополняющие данные о структуре молекул, в том числе и сложных биологических молекул. Спектры комбинационного рассеяния дают также информацию о динамике решетки и электронной структуре твердых тел.

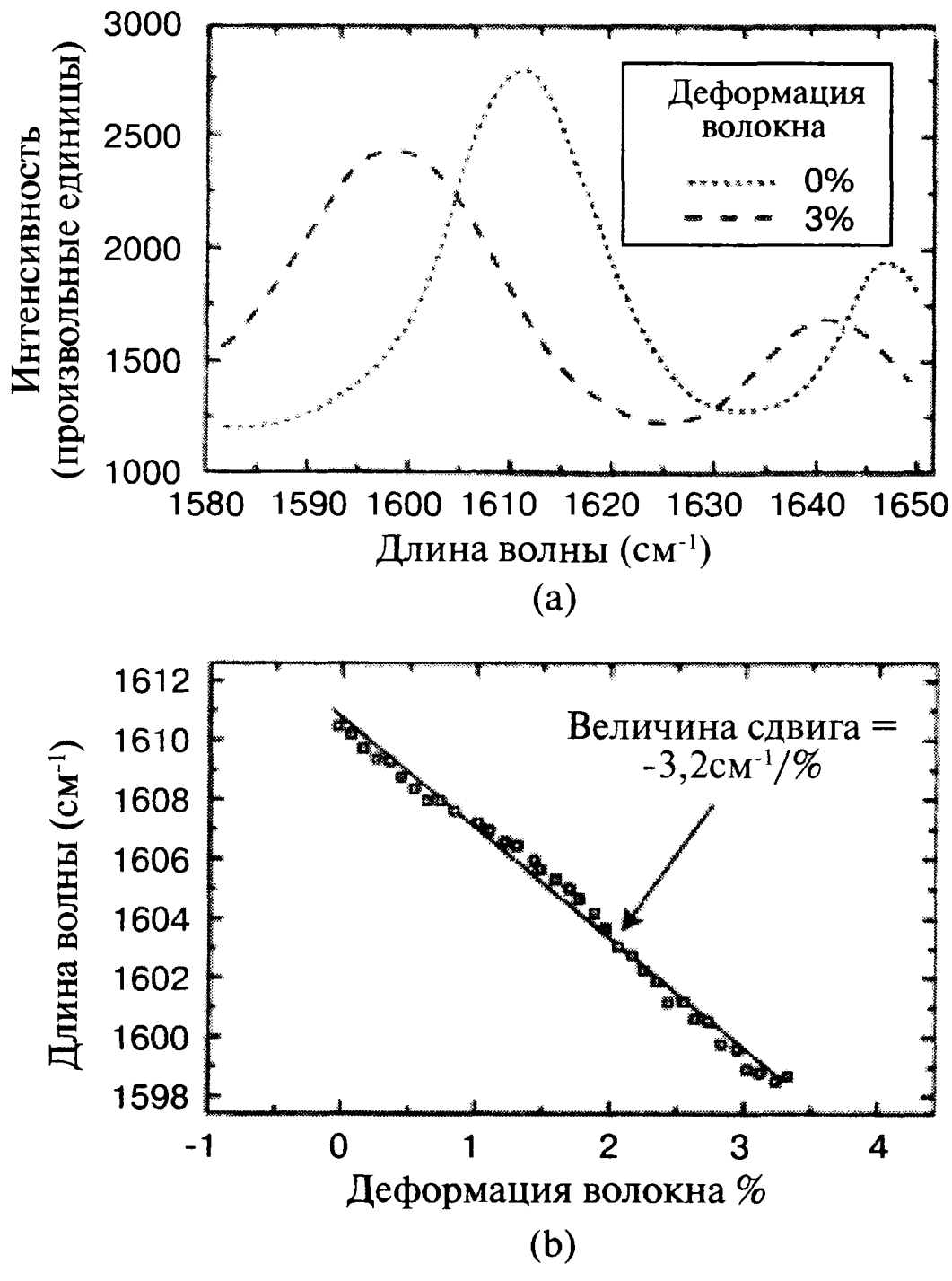


Рис. 5.8. Эффект комбинационного рассеяния был использован [16] для определения деформации волокна. (a) - Линия комбинационного рассеяния сдвигается с 1666 $см^{-1}$ до 1600 $см^{-1}$ при деформации 3%. (b) –Линия комбинационного рассеяния при увеличении деформации сдвигается линейно.

При использовании чувствительных датчиков и высококачественных фильтров можно получить спектры комбинационного рассеяния очень малого объема образца. Поэтому их получают для определения наличия химических веществ в малых пробах при судебно-медицинской экспертизе [14] и при исследовании полупроводников [15]. Возможность измерения локальных механических напряжений открыла новые пути исследования композитов. Юнг опубликовал работы [16,17], посвященные применению рамановской спектроскопии для изучения композитов, армированных арамидными и углеродными волокнами. Рис. 5.8a демонстрирует типичное изменение спектра комбинационного рассеяния волокна под действием нагрузки, а рис. 5.8b демонстрирует линейную зависимость положения пика от деформации. Исследуя сдвиг полос комбинационного рассеяния в волокнах, можно исследовать взаимосвязь структуры и деформации [18].

5.3. Растровая атомно-силовая микроскопия и микроскопия ближнего поля

В начале 1980-х годов появился новый метод, позволивший получать потрясающие изображения отдельных атомов. Многие вопросы современного материаловедения требуют количественного определения некоторых характеристик материалов. В полимерной науке требуется измерение величины адгезии, деформации, силы трения, теплопроводности, коэффициента теплового расширения, температуры плавления, температуры плавления отдельных компонентов в смесях полимеров и т.д.. В науке о полупроводниках требуется измерение размеров особенностей наноразмера, электрической емкости, проводимости и потенциала. Биологи иногда хотят измерить силу сцепления между биомолекулой и ее рецептором на поверхности клетки или между антигенами и антителами, или же наблюдать флуоресценцию отдельной молекулы. За изобретением сканирующего атомного микроскопа, конструкция которого впервые была описана Биннигом с соавторами в 1982 году, последовало появление в 1986 году сканирующего силового микроскопа (SFM) и атомно-силового микроскопа (AFM). Эти разработки подготовили почву для дальнейшего развития данного направления, причем все эти устройства позволяют получать трехмерное изображение поверхности с нанометровым пространственым разрешением.

Принцип работы этих устройств очень прост. В сущности, он напоминает метод действия профилометра. В нем по поверхности образца перемещается игла, а ее поперечное движение принимается соответствующим устройством. Вместо иглы в атомно-силовом микроскопе используется консоль, движением которой управляют пьезоэлектрические преобразователи. Действие сканирующего силового микроскопа состоит в отображении характеристик поверхности через анализ ее взаимодействия с микроконсолью. Арсенал используемых микроконсолей постоянно расширяется, и каждая консоль определяет тип соответствующего микроскопа. Например, магнитный силовой микроскоп (MFM), электростатический силовой микроскоп (EFM), сканирующий тепловой микроскоп (SThM), импульсный силовой микроскоп (PFM), силовой модуляционный микроскоп (FMM) и сканирующий емкостный микроскоп (SCM).

Рис. 5.9. Типичная зависимость силы взаимодействия от расстояния между кончиком консоли и поверхностью образца. Выделены участки кривой, относящиеся к различным режимам работы силового микроскопа.

Различные режимы сканирования силового микроскопа можно классифицировать в зависимости от природы регистрируемых сил и от расстояния от кончика иглы до поверхности образца, как показано на рис. 5.9. Имеется три возможных режима работы этих устройств: контактный, прерывисто-контактный и бесконтактый. Измерение трения, податливости, адгезии и тепловых характеристик требует контакта с образцом, и поэтому в таком случае прибегают к контактному режиму. Однако контактного режима по возможности следует избегать вследствие риска повреждения кончика консоли или поверхности образца.

Рис. 5.10 иллюстрирует метод работы силового микроскопа. Типичное расстояние от кончика консоли до поверхности составляет 50–200 нм. Поэтому важную роль играют системы предотвращения колебаний и точной настройки положения кончика иглы. Пьезоэлектрические элементы осуществляют сканирование в плоскости XY путем перемещения иглы или образца. Важное значение имеют также датчики вертикального положения кончика консоли, а при бесконтактном режиме работы и система обратной связи, удерживающая консоль на фиксированном расстоянии от поверхности. Система сканирования в плоскости XY и система обратной связи являются основой построения трехмерного изображения поверхности.

При контактном режиме работы силового микроскопа контролируется сила отталкивания между образцом и кончиком иглы консоли. Для жестких материалов сила отталкивания определяется топографией образца. Бесконтактный и прерывисто-контактный режимы работы позволяют предотвратить механическое взаимодействие иглы и образца [21,22], а методы силовой модуляции позволяют изучать механические характеристики образца и строить форму поверхности при нулевой силе соприкосновения. Следовательно, имеется возможность построения трехмерного изображения топографии поверхности почти любого материала. Благодаря специальным силовым методам можно изучать даже жидкие фазы и мелкие капли на поверхности образца [23].

Во всех промышленно производимых силовых микроскопах для перемещения кончика консоли используют пьезоэлектрические элементы. Пьезоэлектрики уд-

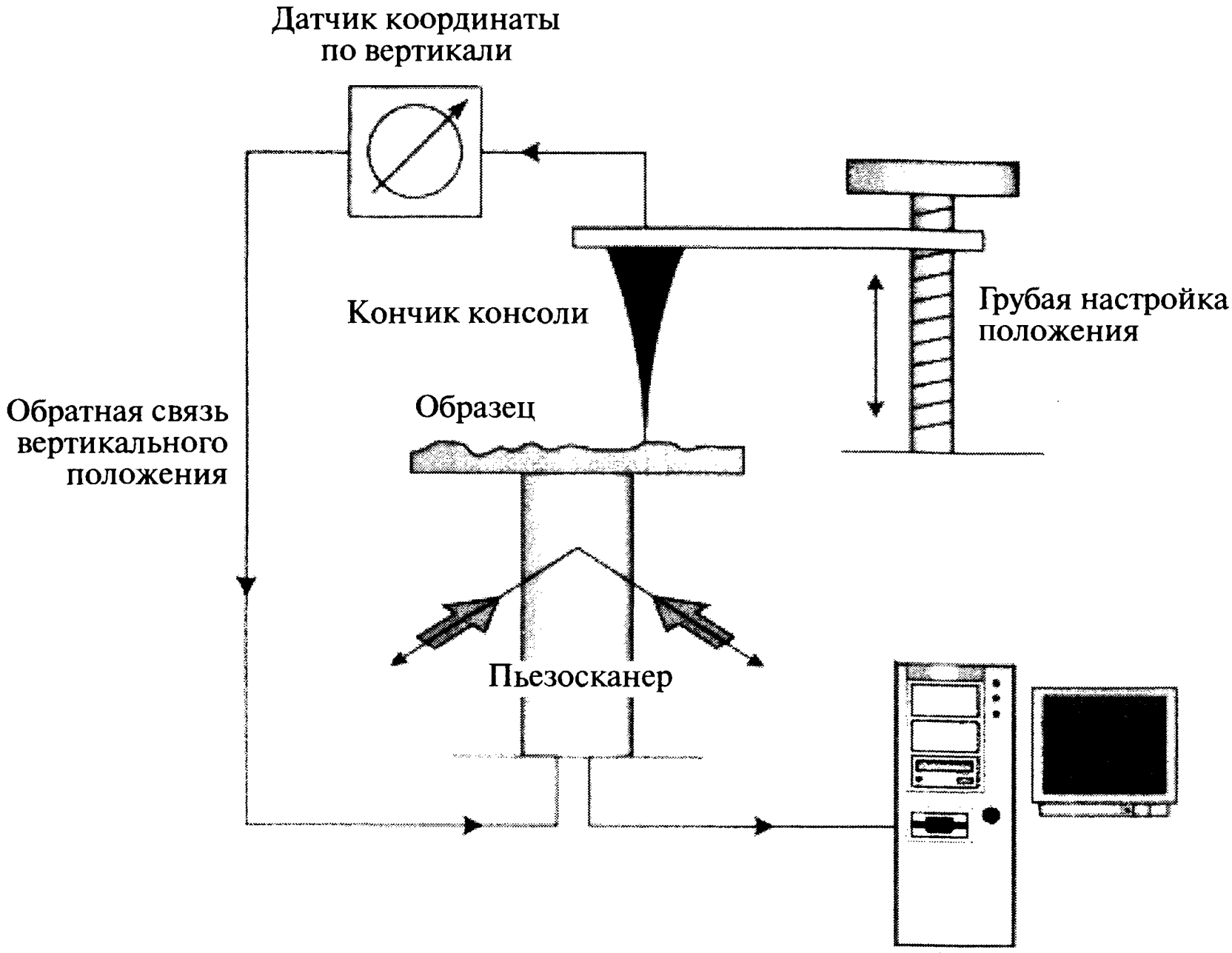


Рис. 5.10. Режимы работы силового микроскопа. Имеются различные способы определения местоположения кончика консоли. Сканирование образца осуществляют перемещением предметного столика в направлениях X, Y и Z при помощи пьезоэлектрических устройств.

линяются (или сокращаются) при приложении электрического поля. Хотя они обеспечивают точное перемещение образца (величина перемещения имеет порядок нанометр/вольт), их характеристики являются нелинейными. В частности, они ползут, имеют гистерезис и остаточную деформацию. Некоторые нелинейные эффекты можно скорректировать, а другие – нет. Поэтому точный контроль движения кончика консоли требует активной системы датчиков координат и системы управления с обратной связью [24]. Пространственные измерения при помощи силового микроскопа требуют точного сканирования. Любая ошибка сканирования приводит к погрешности измерения, и поэтому система интерактивной коррекции сканирования имеет жизненно важное значение. В некоторых системах коррекция сканирования основана на применении оптических или емкостных датчиков координат.

В сканирующей тепловой микроскопии используется нагретая консоль и измеряется электрический ток, требуемый для поддержания постоянной температуры консоли при сканировании поверхности образца. Вариация теплопроводности вызывает изменение тока нагрева. При микротепловом анализе используют аналогичную нагретую консоль, с помощью которой получают калориметрическую информацию об объеме образца порядка нескольких кубических микрон. Информацию в этом случае несет количество тепла, необходимое для повышения температуры изучаемого объема образца. Данный метод позволяет измерять температуры фазового перехода и определять материал по его тепловым характеристикам.

Отметим, что в вакууме при лазерном контроле положения консоли проблемы вызывает электрический сигнал, появляющийся при ее перемещении. При работе в режиме слабого контакта можно количественно измерять слабое взаимодействие на коротких расстояниях. Для этих систем требуются особые податливые консоли для высокочастотной низкоамплитудной модуляции наконечника. Чтобы усилить контраст изображения, система регистрации сигнала должна быть чувствительной к фазовому сдвигу.

5.3.1. Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ)

Фотография сканирующего туннельного микроскопа представлена на рис. 5.11. Если острый металлический наконечник (иглу) консоли поместить достаточно близко к образцу и создать между ними небольшую разность потенциалов (величиной примерно 10 милливольт), из металла начинают туннелироваться электроны. Квантовая механика приводит к следующей зависимости величины туннельного тока I от расстояния s между концом иглы консоли и образцом:

$$I = k \exp(-As\sqrt{\varsigma}), \tag{5.5}$$

где постоянная $A = 10{,}25$ эВ$^{-1}$ нм$^{-1}$, ς - средняя высота барьера между двумя электродами, а константа k зависит от плотности материала иглы консоли.

Ток электронов определяется туннельным эффектом, и его интенсивность пропорциональна вероятности туннелирования. При сканировании образца неровность поверхности приводит к изменению расстояния между иглой и поверхностью. Ввиду экспоненциальной зависимости туннельного тока от расстояния s можно измерить разницу расстояния порядка 0,01 нм. Как следствие, с помощью этого метода можно построить топографическую карту поверхности образца.

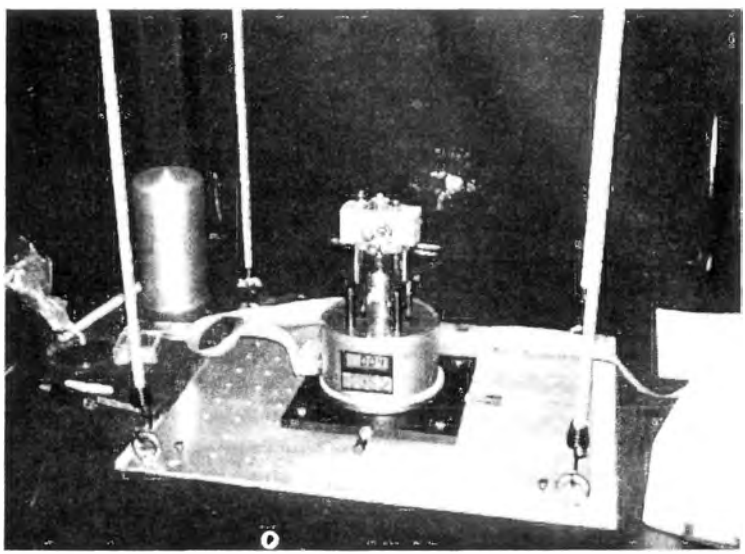


Рис. 5.11. Фотография сканирующего туннельного микроскопа (СТМ), демонстрирующая систему подвески, уменьшающей амплитуду механических колебаний.

При проведении опытов возникают технические трудности, которые впервые были преодолены Биннигом [19]. Поскольку типичное расстояние между концом иглы консоли и поверхностью может составлять несколько нанометров, а амплитуда колебаний стола, на котором расположен микроскоп, может превышать микроны, колебания аппарата должны быть сведены к минимуму. Поэтому конструкция микроскопа должна предотвращать внешнее механическое воздействие на консоль и образец. Второй проблемой является острота иглы, необходимая для достижения высокого пространственного разрешения. Иглу получают электрохимической полировкой металлической проволоки. Несмотря на это, на атомном уровне она остается шероховатой, и электроны туннелируются в одной из областей на конце иглы, где ее толщина составляет лишь несколько атомов. Третья проблема заключается в контроле положения иглы. Она была решена путем разработки пьезокерамических датчиков координат. При подаче электрического напряжения пьезоэлектрик расширяется или сокращается, перемещая иглу консоли. Силовой микроскоп состоит из ряда устройств, позволяющих перемещать образец, от грубого перемещения с помощью рук и шагового электродвигателя до точной настройки с помощью пьезоэлектриков. Туннельные микроскопы могут работать в вакууме, на воздухе, в жидком гелии, масле, воде и даже в растворах электролитов.

5.3.2. Атомно-силовой микроскоп (АСМ)

Конструкция первого атомно-силового микроскопа (АСМ) показана на рис. 5.12. Свет от лазерного диода отражается от кончика консоли и регистрируется фотодиодной матрицей. Сигнал от массива фотодиодов может быть обработан с целью получения информации об изгибающей, нормальной, боковой и скручивающей силах, действующих на конец иглы консоли при сканировании поверхности. Атомно-силовой микроскоп следит за синусоидальным оптическим сигналом, амплитуда которого соответствует степени затухания, определяемой расстоянием

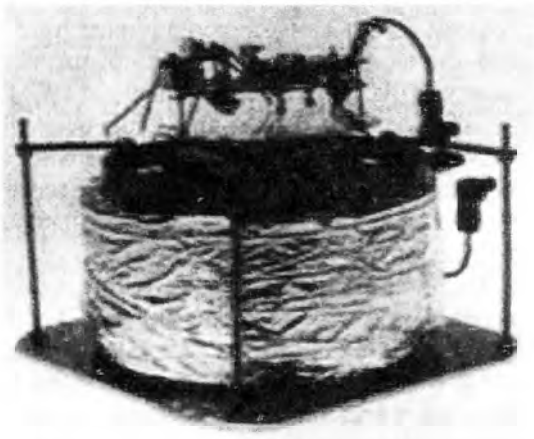


Рис. 5.12. Фотография первого атомно-силового микроскопа (АСМ), построенного Биннигом и Рорером.

до поверхности образца. В большинстве приборов эта амплитуда постоянна, что обеспечивает система обратной связи, поддерживающая расстояние между концом иглы консоли и образцом. Обратную связь можно использовать для измерения этого расстояния и регистрации топографических особенностей.

В главе 1 обсуждался дифракционный предел пространственного разрешения [25]. В 1928 году Синг [26] предложил идею, лежащую в основе сканирующей оптической микроскопии ближнего поля (СМБП). Рассмотрим освещаемое сзади крошечное отверстие, действующее как источник света, размер которого меньше длины волны и помещенное на расстоянии менее длины волны от прозрачного образца. Это называют режимом ближнего поля. В этом случае отпадает необходимость в оптических линзах, свойства которых ограничены дифракцией. Рассеянный свет дает информацию об очень малом объеме образца, величина которого определяется размером конца иглы.

Используя в качестве источника света сужающееся коническое оптическое волокно, размером меньше длины волны, и помещая его на расстоянии ближнего поля, можно преодолеть дифракционный предел разрешения. Первые такие устройства были построены Полем с соавторами в середине 1980-х годов [27]. Интенсивность света в режиме ближнего поля недостаточна для создания хорошей обратной связи, и поэтому для ее создания используют лазерным свет, отраженный концом иглы консоли.

Область сканирования в промышленно выпускаемых оптических микроскопах ближнего поля обычно имеет размер 200×200 мкм, а наилучшее разрешение они достигают при высоте неровности до 10–15 мкм. Отметим, что недавно был описан микроскоп под названием «Milliscope», имеющий широкий диапазон сканирования, типичный для оптического микроскопа [28]. Он позволяет сканировать области размером 1×1 мм при поперечном разрешении порядка 10 нм, что соответствует динамическому диапазону 10 [5].

5.3.3. Сканирующая микроскопия ближнего поля

В сканирующих микроскопах ближнего поля поверхность образца сканируют с помощью консоли с тонким оптическим наконечником (рис. 5.13). Его отверстие столь мало, и располагается оно столь близко к поверхности, что дифракция не влияет на разрешение СМБП. Наконечник консоли в СМБП изготовлен из оптического волокна, конец которого имеет диаметр в несколько нанометров. В СМБП расстояние между наконечником консоли и поверхностью поддерживают путем контроля сил, возникающих между ними. Для этого на консоль направляют лазерный луч. В некоторых системах наконечник консоли колеблется параллельно поверхности образца.

В литературе описаны безапертурные сканирующие микроскопы ближнего поля [29-33] и рамановский микроскоп ближнего поля [34]. Применение оптического микроскопа ближнего поля описано в [35-37]. На рис. 5.14 схематически изображен рамановский оптический микроскоп ближнего поля, сделанный в университете Лидса [38, 39]. Для освещения образца используют коническое сужающееся оптическое волокно, покрытое слоем алюминия толщиной 100 нм. Конец конуса представляет собой отверстие диаметром 100–200 нм (менее $\lambda/2$). Отверстие удерживается в ближнем поле благодаря системе обратной связи, контролиру-

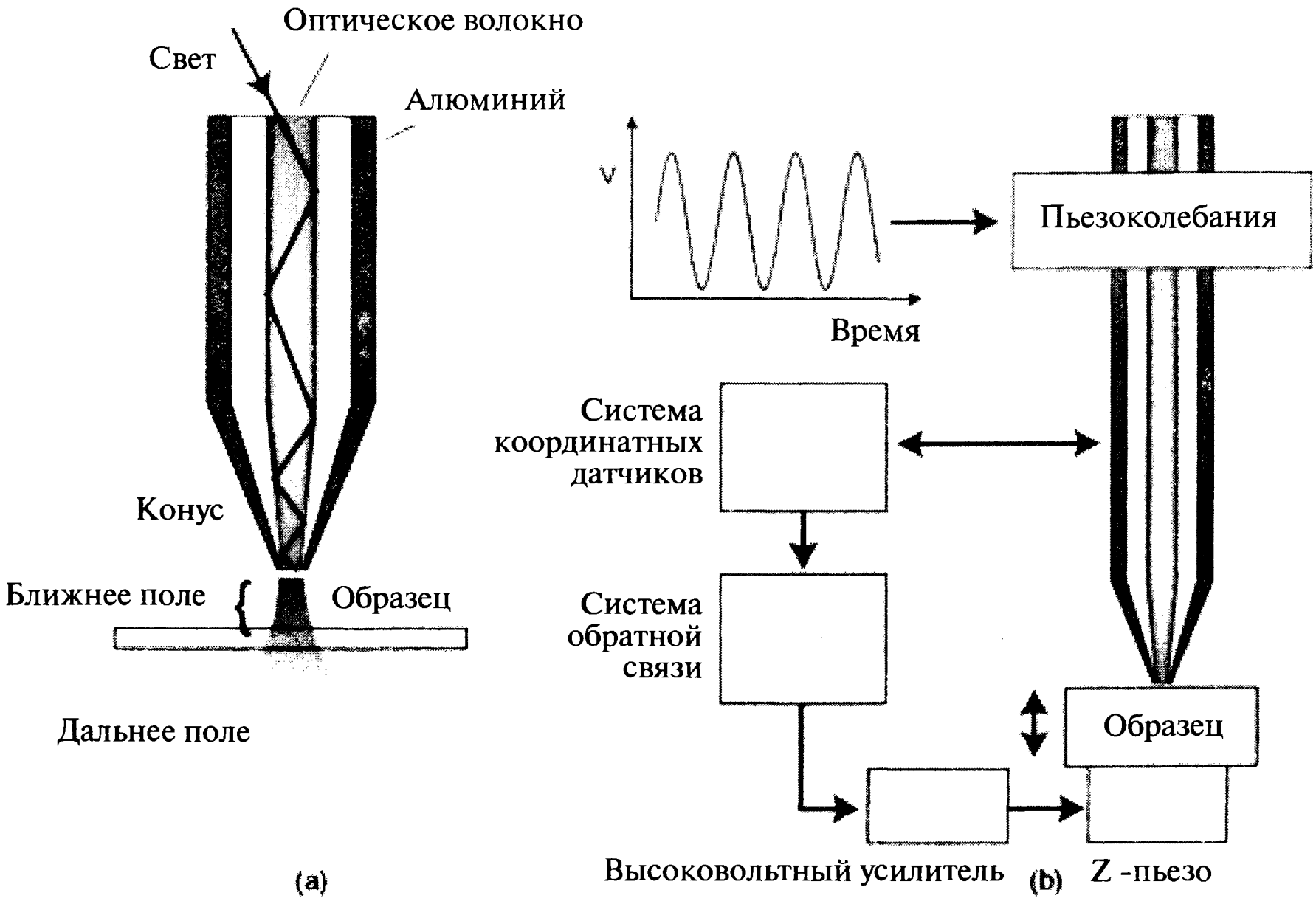


Рис. 5.13. Принципиальная схема микроскопии ближнего поля. (a) – Свет идет вниз по сужающемуся оптическому волокну, покрытому слоем алюминия. В ближнем поле свет проходит через образец или отражается им в оптическое волокно. (b) – Для возбуждения колебаний волокна и получения информации о топологии поверхности может использоваться пьезоэлектрический элемент и система датчиков координат.

ющей сдвиговые силы. Амплитуда колебаний конца иглы консоли контролируется с помощью системы оптических датчиков. Когда конец иглы приближается к образцу на 30 нм, амплитуда колебаний уменьшается из-за взаимодействия с образцом. Данный эффект используют для создания обратной связи, не позволяющей уменьшить расстояние между концом иглы и образцом менее чем на 10–20 нм. При построчном сканировании образца игла консоли отслеживает контур поверхности, что позволяет получать его топографическое изображение. Сканирование образца производят при помощи пьезоэлектрического устройства. Рассеянный свет из области иглы консоли и поверхности образца попадает в объектив микроскопа. В случае проходящего света это объектив проходящего света (ОПС на рис. 5.14), а в режиме отраженного света он рассеивается под углом 60° к оси и попадает в объектив рассеянного света (ОРС на рис. 5.14). Полученный свет с помощью системы линз передается на раманскоп фирмы Renishaw. СМБП, строящий изображение при помощи сигнала комбинационно-рассеянного света, позволяют измерить напряжение в кремниевых интегральных схемах [40-42]. Другие применения описаны в [43]. Рамановская система, работающая в ультрафиолетовом диапазоне, разрабатывается в университете Лидса [44].

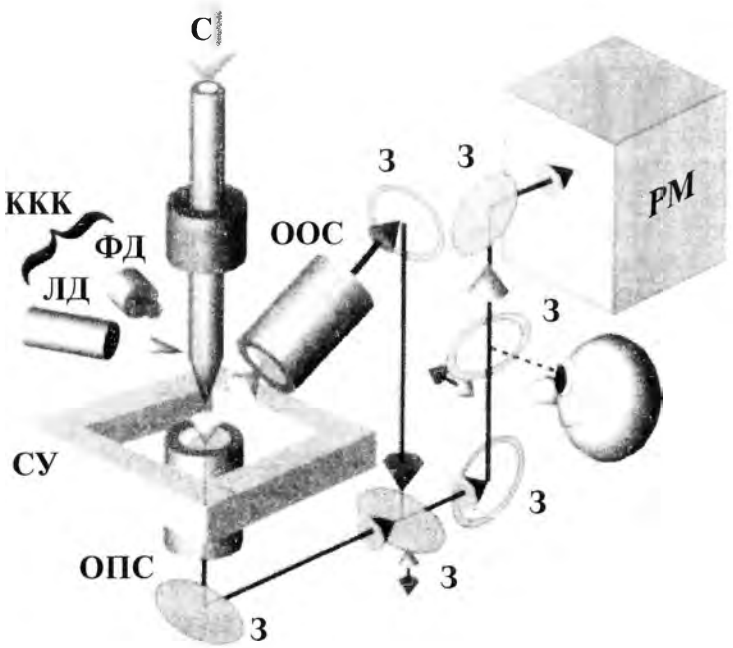


Рис. 5.14. В университете Лидса группа профессора Бэтчелдера разрабатывает сканирующий оптический микроскоп ближнего поля, использующий рамановское рассеяние ультрафиолетового диапазона. Колебания кончика консоли (ККК) регистрируются с помощью лазерного диода (ЛД) и фотодиода (ФД). Пьезоэлектрическое сканирующее устройство (СУ) перемещает образец под консолью, а возбуждающий УФ-свет (С) частично проходит через объектив проходящего света (ОПС) и частично отражается в объектив отраженного света (ООС). Зеркала (З) можно перемещать, так что оператор имеет возможность наблюдать через оптику за концом иглы консоли и поверхностью образца. Свет выводится в рамановский микроскоп (РМ), анализирующий его интенсивность и спектральные характеристики.

5.4. Дополнительные оптические и электромагнитные методы

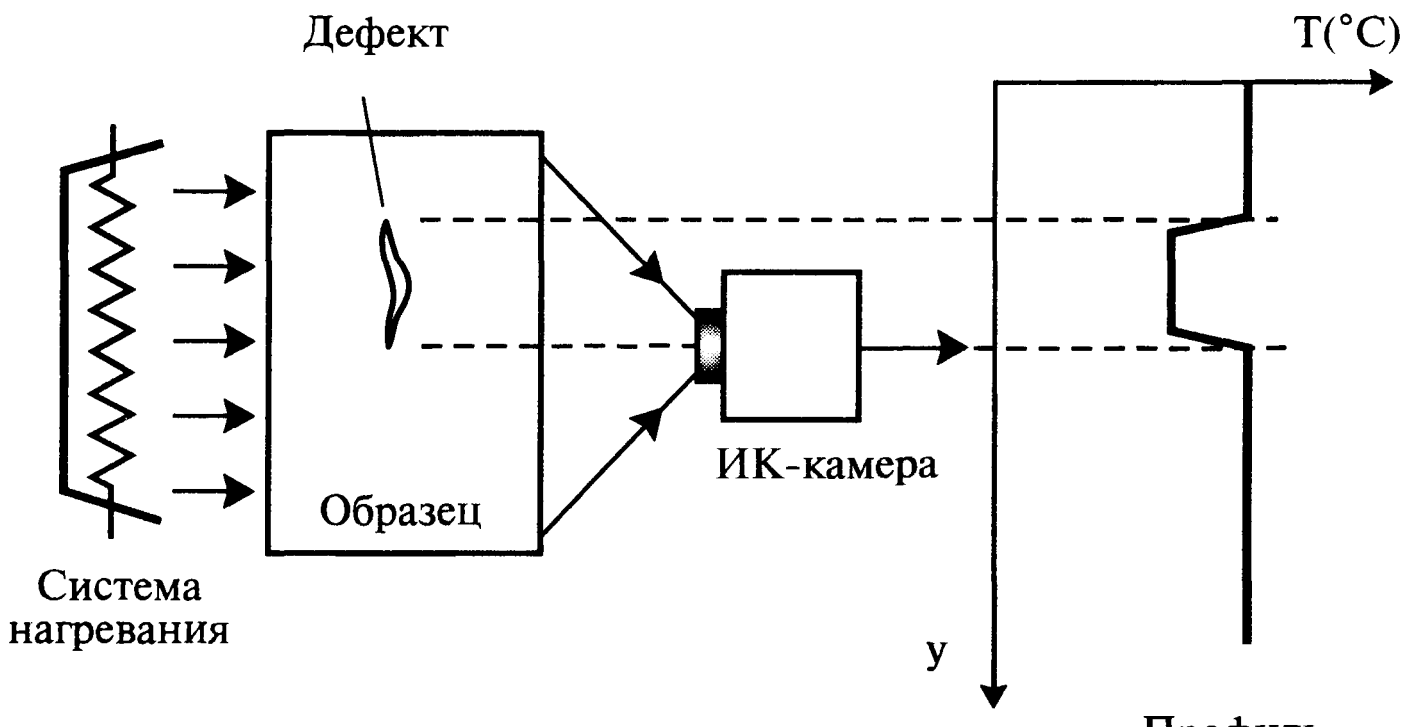
5.4.1. Термография и метод Фурье-анализа инфракрасного света (FTIR)

Строго говоря, данные методы не относятся к оптической микроскопии, но мы все же рассмотрим применение инфракрасного (ИК) излучения для обнаружения дефектов в деталях. Метод использования ИК-излучения, схема которого изображена на рис. 5.15, называется термографией.

Этот метод неразрушающего контроля позволяет быстро обнаружить дефекты в довольно крупных изделиях. Принцип его работы основан на испускании нагретым телом электромагнитного излучения в широком диапазоне волн. Энергия P, излучаемая единицей поверхности, определяется законом Стефана-Больцмана:

$$P = \varepsilon \sigma T^4, \tag{5.6}$$

где ε - излучательная способность поверхности, σ - постоянная Стефана-Больцмана ($5{,}67 \times 10^{-8}$ Вт м$^{-2}$ K^{-4}) и T - температура в градусах Кельвина. В ИК-термографии основным параметром является излучательная способность материала. Эта характеристика поверхности может изменяться в пределах от 0 до 1. Композиционные материалы, обладающие высокой излучательной способностью, испытывать очень легко. Материалы с низкой излучательной способностью для увеличения интенсивности сигнала нужно покрывать пленкой с высокой излучательной способностью. Для повышения чувствительности датчик (например, из антимонида индия) можно охлаждать при помощи жидкого азота или термоэлектрического охладителя Пелетье. Образец можно нагревать как со стороны, противоположной датчику (рис. 5.15a), так и с передней стороны (рис. 5.15b).



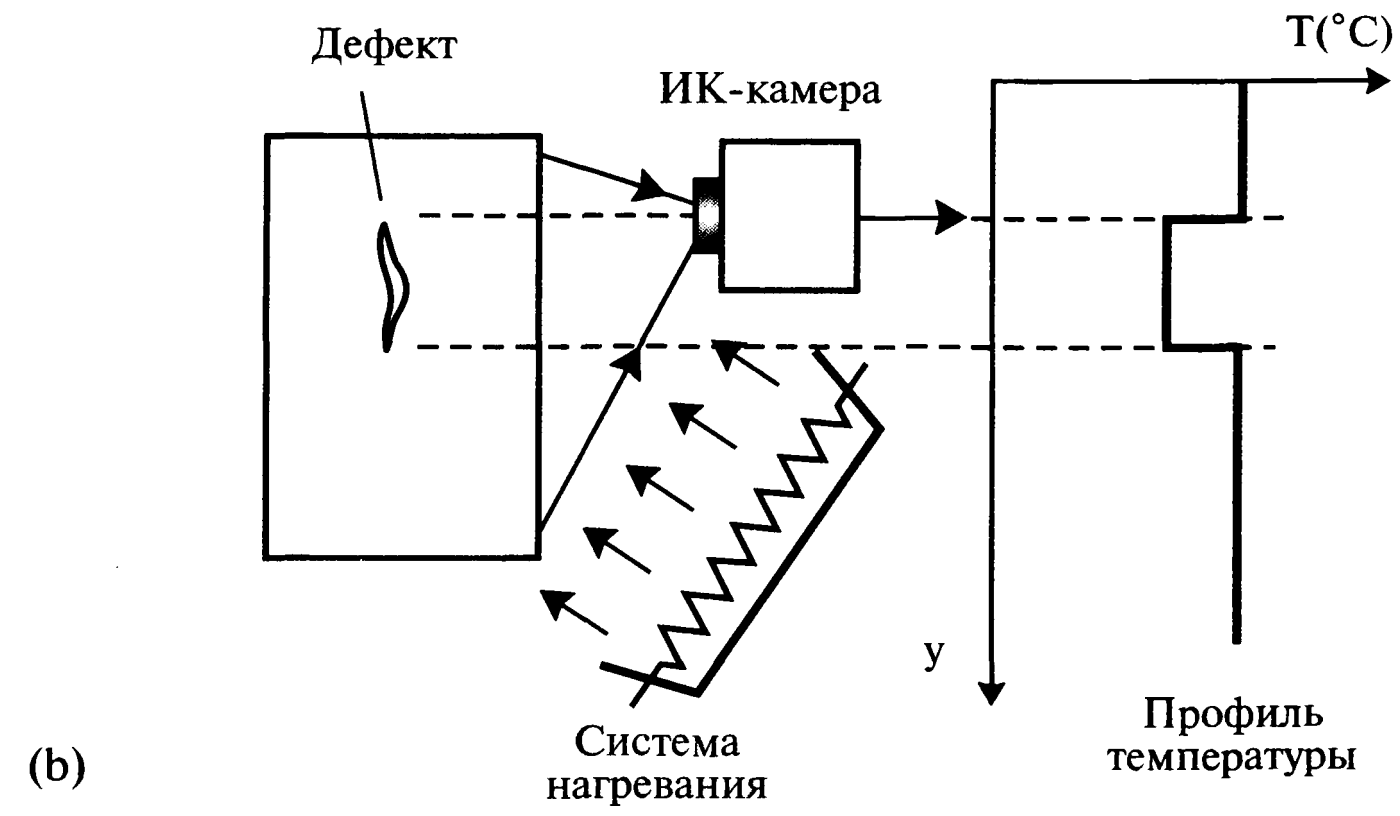


Рис. 5.15. Метод термографии для обнаружения дефектов в крупногабаритных образцах. Имеется две разновидности этого метода. В первом (a) регистрируется ИК-излучение, прошедшее через образец, а во втором (b) - излучение, отраженное от него.

Разновидностью данного метода является ИК-вибротермография, при которой в образце с помощью пьезоэлектрического вибратора возбуждаются высокочастотные механические колебания. Внутреннее трение вызывает выделение тепла, причем поврежденные участки излучают больше энергии, чем остальная часть образца, и эта разница указывает положение дефекта.

В настоящее время наиболее важным методом ИК-спектроскопии (не использующим эффект комбинационного рассеяния) является Фурье-анализ ИК-излучения (FTIR) [45]. ИК-излучение обнаружил в 1800 году в солнечных лучах астроном Вильям Гершель [46-49]. Существует два метода изучения спектральных характеристик ИК излучения. В первом излучение разлагается в непрерывный спектр (традиционно для этого используют дифракционные решетки), а второй является интерферометрическим. Основные различия этих спектральных приборов иллюстрирует рис. 5.16. Теперь вместо дифракционных решеток часто применяют оптические узкополосные перестраиваемые светофильтры (жидкокристаллические или акустооптические), которые позволяют регистрировать ИК-спектры намного быстрее, чем дифракционные решетки. Однако еще быстрее растет популярность ИК-спектроскопии на основе Фурье-анализа (FTIR-спектроскопия).

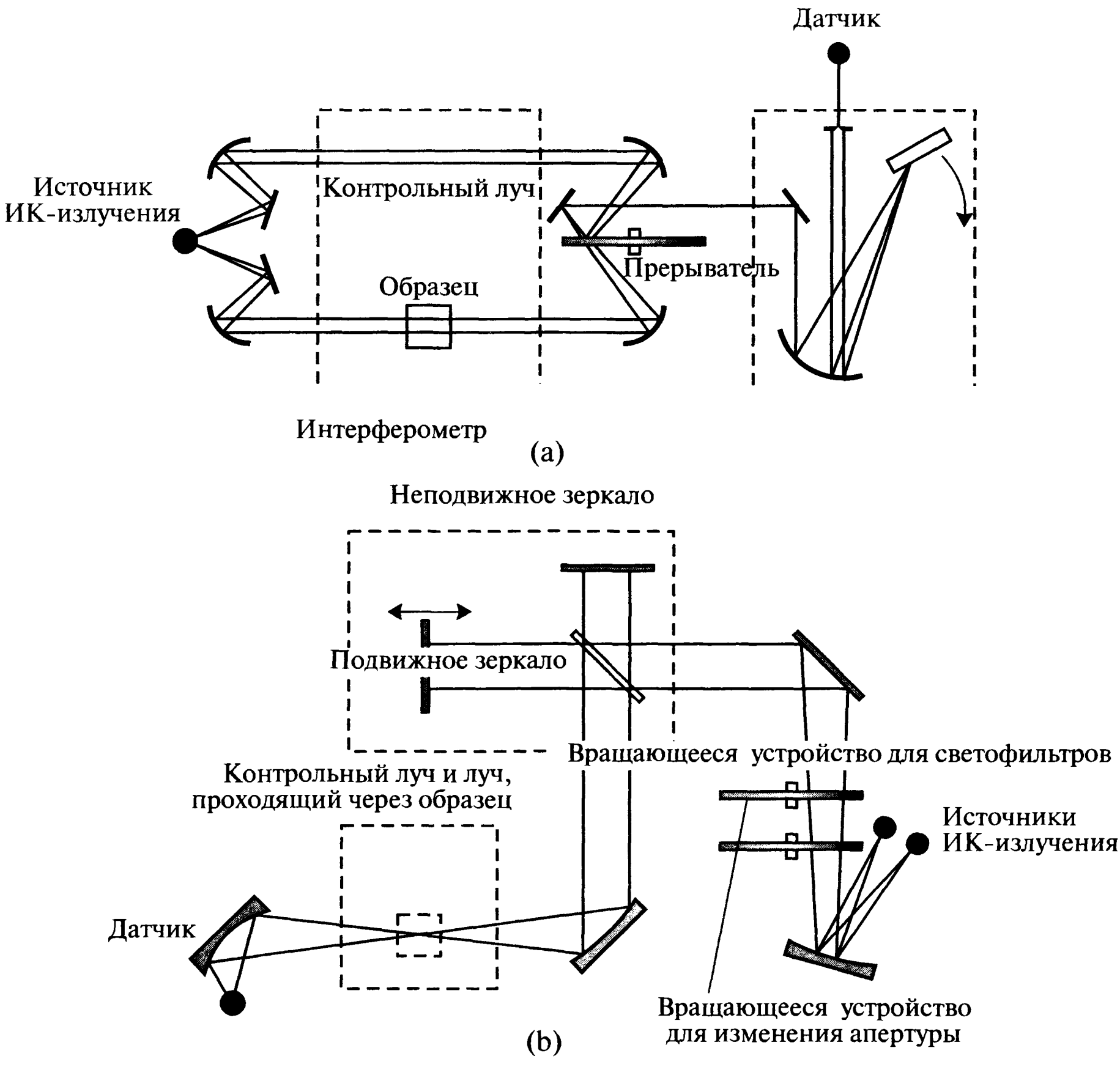


Рис. 5.16. Спектрометрические системы, основанные на Фурье-анализе ИК-излучения (FTIR). Дисперсионная (а) и интерферометрическая (b) системы.

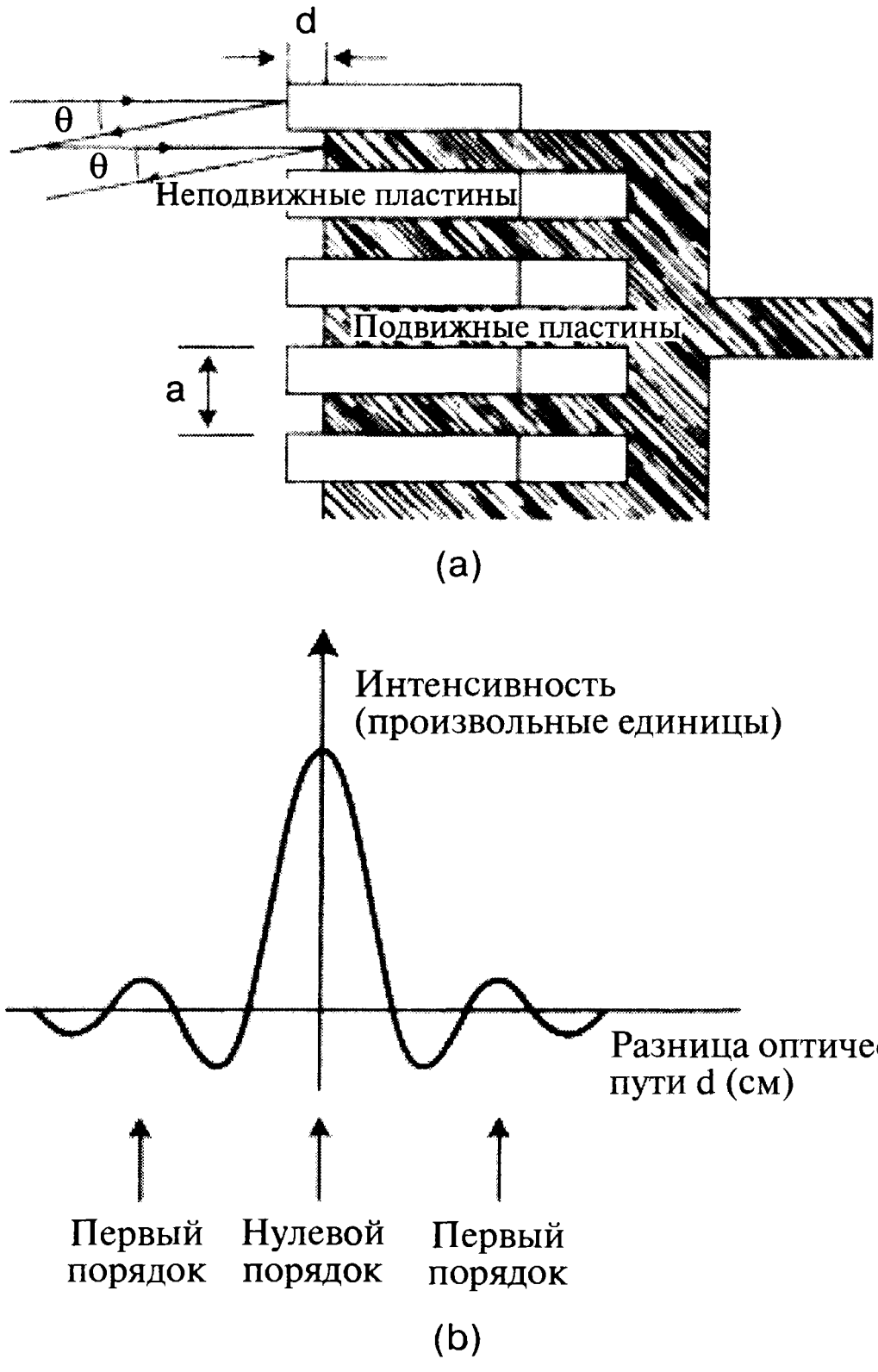


Рис. 5.17. (a) - Расположение неподвижных и подвижных пластин в интерферометре с пластинчатой решеткой, который запускался на аэростате с целью обнаружения ИК-излучения, исходящего из центра Галактики. (b) - Типичная интерферограмма, полученная путем изменения координаты d подвижных пластин. Спектр падающего излучения можно определить путем Фурье-преобразования интерферограммы.

Компьютеры произвели настоящую революцию в ИК-спектрометрии, резко сократив время оцифровки и Фурье-преобразования спектров. Интерферометр состоит из трех главных частей: светоделителя, неподвижного зеркала и перемещающегося зеркала. ИК-луч делится на два пучка (рис. 5.16). Длина оптического пути первого луча варьируется, а длина второго (контрольного) постоянна, и эти лучи интерферируют. На рис. 5.17a изображен еще один пример системы, использующей Фурье-преобразование ИК-сигнала. Этот прибор в 1980-х годах размещали на воздушных шарах, запускаемых с целью обнаружения инфракрасного излучения, исходящего из центра Галактики. В этом интерферометре использовали пластинчатую решетку [50], а интерферограмму получали шаговым перемещением подвижных пластин, как показано на рис. 5.17b. Данные передавали на наземный компьютер и подвергали Фурье-преобразованию.

По сравнению с дисперсионной техникой, ИК-Фурье-интерферометры имеют ряд преимуществ. Прежде всего, они намного быстрее и более чувствительны, поскольку работают одновременно на всем ИК-спектре [51]. Кроме того, они ха-

рактеризуется лучшим отношением сигнал/шум [52]. Внутренний лазер калибрует информацию о помехах и обеспечивает очень высокую точность определения длины волны [53]. Конструкция прибора исключает любое постороннее ИК-излучение, что снижает уровень шума в системе.

Новейшие разработки в области ИК-Фурье-спектроскопии связаны с появлением новых датчиков, позволяющих строить изображение. В недалеком прошлом промышленно производились только точечные датчики (например, ртутно-кадмиево-теллуровые). Поэтому изображения строили медленным механическим сканированием образца под ИК-лучом. Теперь разработаны матричные детекторы, которые располагают в фокальной плоскости, что позволяет сократить время съема данных в сотни раз. Спектральную информацию, на получение которой раньше уходили часы или даже дни, теперь получают за считанные минуты. При использовании матричного детектора пространственное разрешение задается размером пикселей датчика, а не дифракционным пределом, определяемым размером отверстия.

5.4.2. Флуоресцентная микроскопия (FLIM)

Обычный флуоресцентный микроскоп имеет множество недостатков. Например, точность измерения интенсивности зависит от колебаний интенсивности возбуждающего луча, неоднородности образца, поглощения и рассеяния света, фоновой флуоресценции и т.д. Эти проблемы могут быть решены измерением относительной интенсивности сигнала [54]. Недостатком этого метода является ограниченный выбор подходящих датчиков флуоресцентного излучения и низкого отношения сигнал/шум. С другой стороны, определение скорости изменения относительной интенсивности позволяет определить время затухания флуоресценции, которое можно использовать для детекции флуоресцентных молекул и для контроля за местными флуктуациями окружающей молекул, влияющих на скорость затухания.

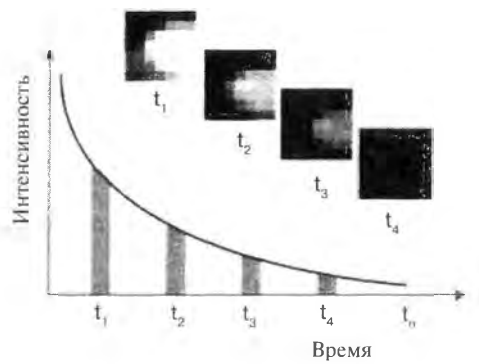


Рис. 5.18. Принцип работы микроскопа флуоресцентного света, строящего затухающее изображение (FLIM). После импульсного лазерного возбуждения через промежутки времени t_1, t_2, t_3 и t_4 строится несколько изображений. Затем определяют время затухания флуоресцентного сигнала, анализируя зависимость интенсивности каждого пикселя от времени и вычисляя показатель экспоненты.

Время флуоресценции может быть получено частотным или временным методами обработки сигнала. Если образец возбудить с помощью синусоидально модулированного источника (обычно с частотой от десятков МГц до ГГц), а интенсивность флуоресценции измерять фазовым датчиком, продолжительность флуоресценции можно установить исходя из сдвига фаз по отношению к возбуждающему свету или из глубины модуляций сигнала. Если образец возбуждают коротким лазерным импульсом, фиксируют изменение флуоресцентного сигнала во времени, как схематически показано на рис. 5.18. Затем на основании данных каждого пикселя определяется показатель затухающей экспоненты, аппроксимирующей уменьшение интенсивности сигнала. На рис. 5.19 изображена схема FLIM системы [55]. Датчик этой системы называется GOI (производится фирмой Kentech Instruments, Дидкот, Великобритания). Он представляет собой переключаемый усилитель изображения с встроенной микроканальной платой. Коул с соавторами добились продолжительности импульса всего лишь 90 пикосекунд. При столь высоком временном разрешении для получения высококачественного флуоресцентного изображения, пригодного для дальнейшего анализа, необходимо усреднить сигнал нескольких (10–30) снимков, соответствующих каждому промежутку времени. Данную систему применяли для исследования биологичес-

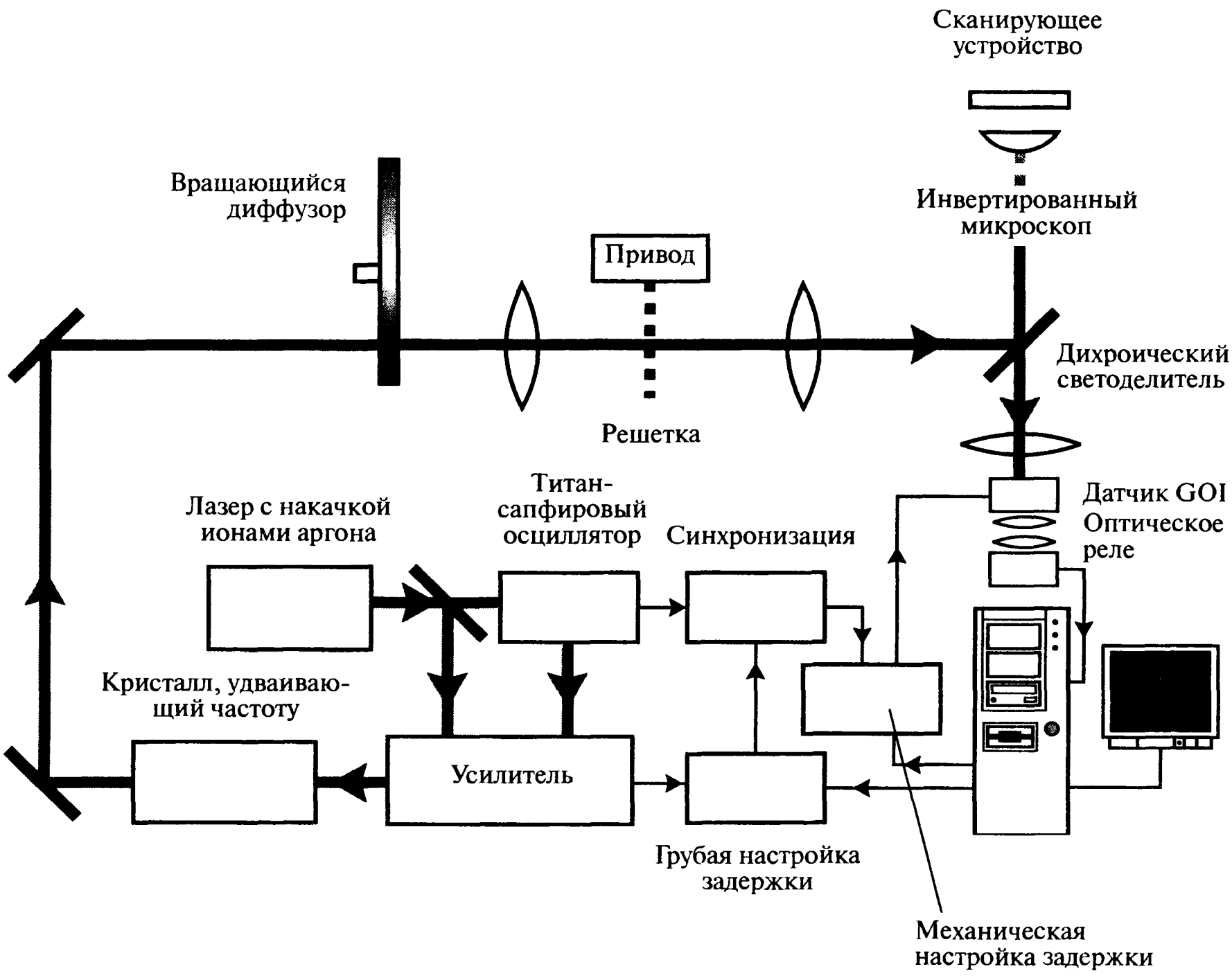


Рис. 5.19. Система Коула FLIM-микроскопа флуоресцентного света. Инвертированный эпифлуоресцентный микроскоп объединен со сверхбыстрым лазерным источником с длиной волны 415 нм. Лазер генерирует импульсы мощностью 1 мкДж длительностью 10 пс с частотой повторения до 25 кГц. Флуоресцентный сигнал усиливается блоком УИ и записывается ПЗС-матрицей.

ких образцов, а недавно была разработана недорогая портативная система, использующая лазерную диодную накачку. Коул с соавторами также описали метод освещения, позволяющий получать трехмерное оптическое сечение образца. Этот метод применялся и во флуоресцентной микроскопии [56]. Интересны также и две недавние работы [57,58] .

5.4.3. Программируемый матричный микроскоп (ПММ) с двойным оптическим путем

Существует новый тип конфокального микроскопа, сообщение о котором появилось совсем недавно [59]. Программируемый матричный микроскоп (ПММ) включает пространственный модулятор света (ПМС), помещенный в плоскость первичного изображения широкопольного микроскопа для определения интенсивности света. ПММ может делать оптическое сечение образца в режимах отраженного [60] и флуоресцентного света [61]. Он имеет спектроскопическую систему, позволяющую строить изображение во флуоресцентном свете [62].

На рис. 5.20 представлена конструкция нового программируемого матричного микроскопа с двумя оптическими путями, строящего два изображения. Сопряженное изображение I_c образуется светом, отраженным объектом и возвращающимся по оптическому пути освещения, а несопряженное изображение I_{nc} создается светом частей пространственного модулятора света, которые не освещают образец. Основным элементом пространственного модулятора света является

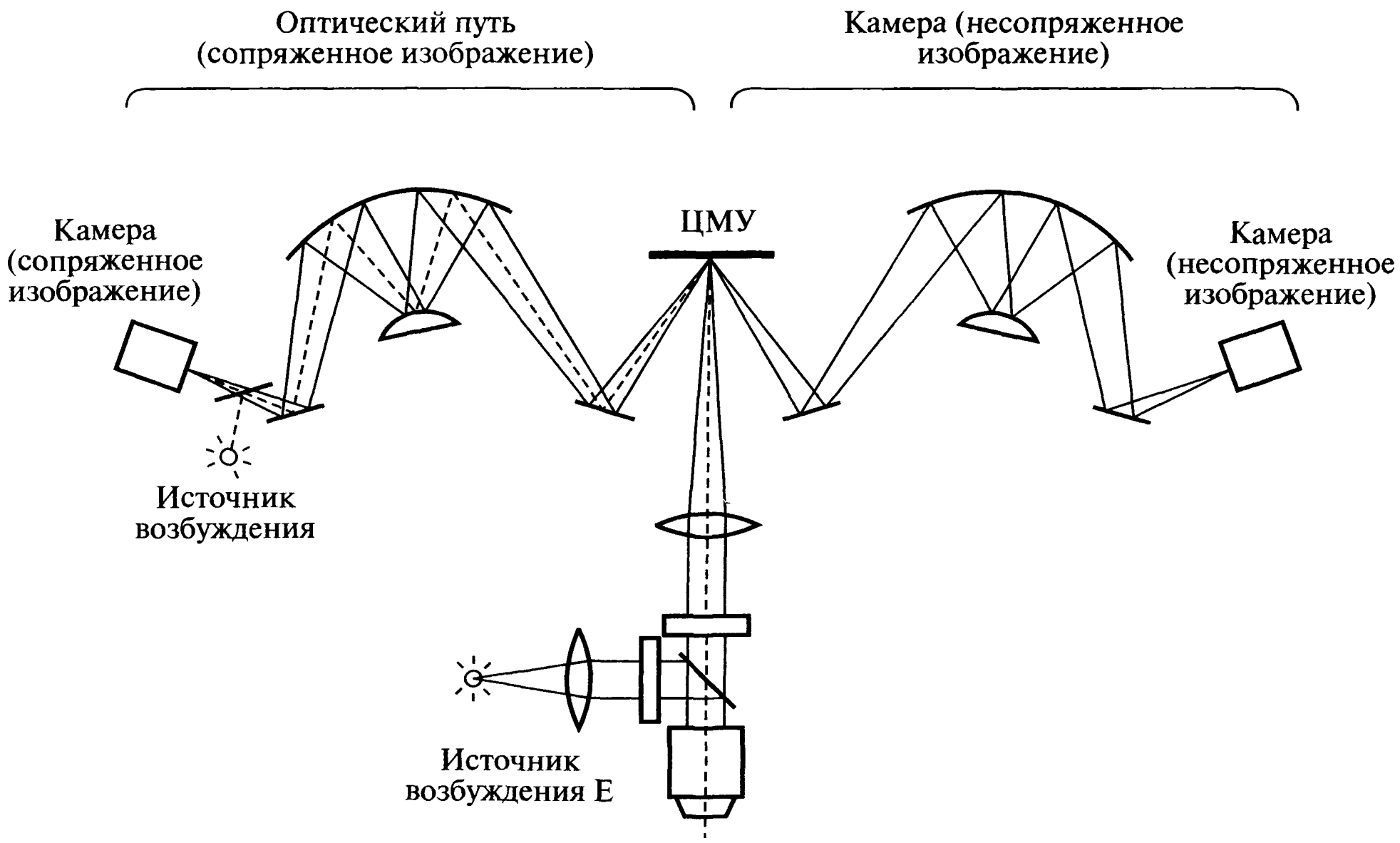


Рис. 5.20. Схема программируемого матричного микроскопа (ПММ) с двумя оптическими световыми путями. Цифровое микрозеркальное устройство (ЦМУ), размещенное в плоскости первичного изображения, направляет свет как на плоскость фокусировки объекта, так и от нее. Источник E используется для эпиосвещения. Фокальные плоскости и цифровая камера перпендикулярны цифровому микрозеркальному устройству.

цифровое микрозеркальное устройство (ЦМУ) фирмы Texas Instruments, представляющее собой решетку из микрозеркал шириной 16 мкм и отстоящих друг от друга на 1 мкм. Наклон каждого микрозеркала решетки контролируется с помощью электроники. В зависимости от наклона микрозеркала могут отражать свет по сопряженному или по несопряженному оптическому пути. Изображение I_c аналогично конфокальному изображению, а I_{nc} – обычному изображению минус I_c. Такая конструкция ПММ обеспечивает более эффективное возбуждение и позволяет полнее использовать излучаемый свет, чем обычный конфокальный лазерный сканирующий микроскоп [63].

5.4.4. Когерентная оптическая томография

Еще одним неразрушающим конфокальным методом изучения структуры является когерентная оптическая томография (КОТ) [64]. В когерентной оптической томографии свет аналогичен звуку в ультразвуковых томографах. Хотя свет проникает на глубину не более нескольких миллиметров от поверхности, он обеспечивает более высокое пространственное разрешение (обычно 5–30 мкм), чем ультразвук. В оптическом микротомографе расстояние до отдельных рассеивающих особенностей определяют с помощью интерферометра и дисперсионного элемента. При поперечном сканировании производится многократное измерение интенсивности отраженного и контрольного сигналов. Изображение поперечно-

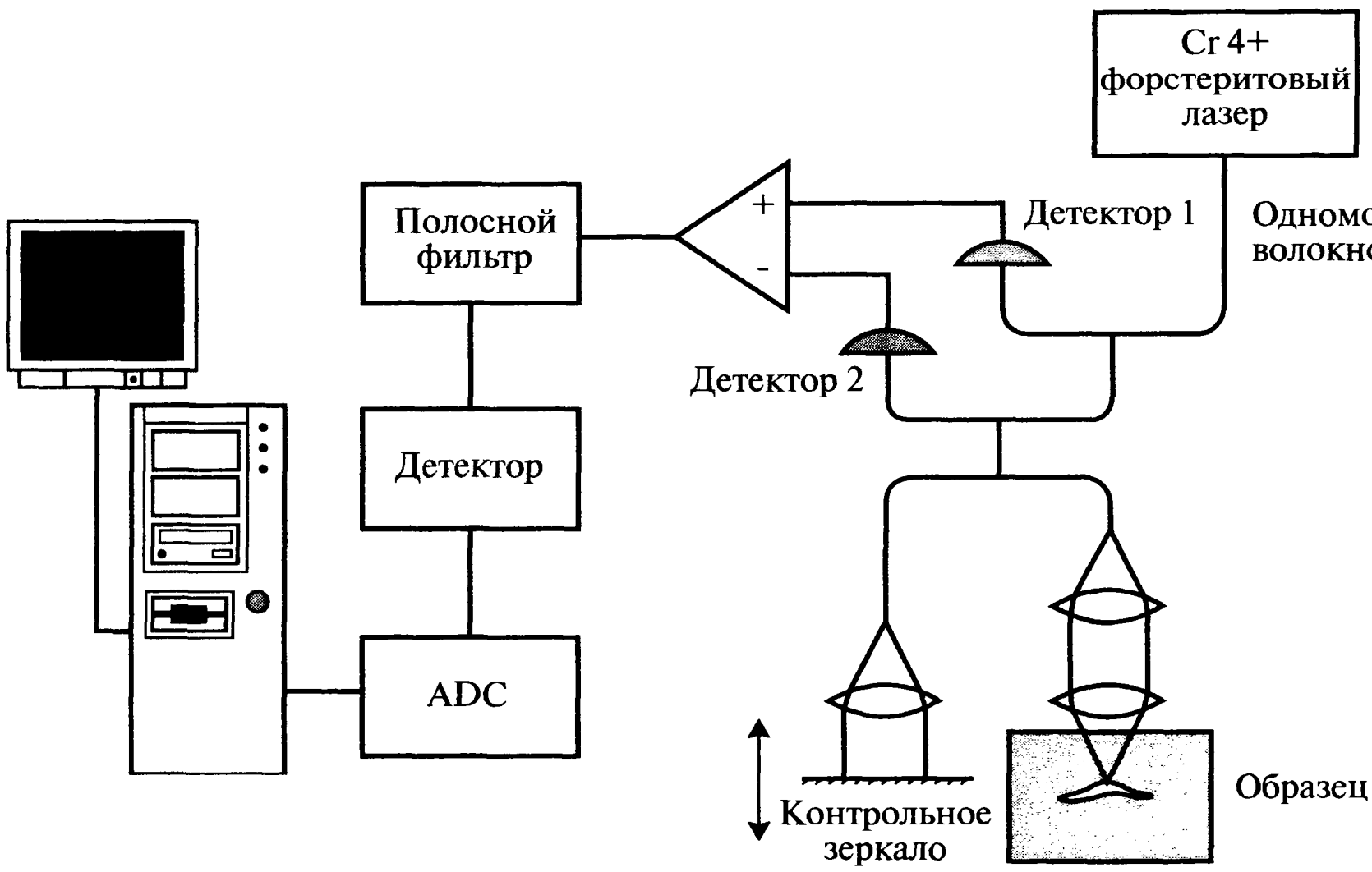


Рис. 5.21. В когерентной оптической томографии (КОТ) широкая спектральная полоса лазерного света (шириной 20-200 нм) через оптическое волокно передается на оптоволоконный светоделитель 50/50. При этом одновременно освещаются образец и движущееся с постоянной скоростью контрольное зеркало. Образец и движущееся зеркало по сути образуют интерферометр Майкельсона. Для освещения используют перекрываемый за 25 фемтосекунд хром-форстеритный твердотельный лазер, а наличие двух датчиков позволяет компенсировать шум лазера.

го сечения строят, комбинируя эти сигналы. Как показано на рис. 5.21, широкополосный лазерный свет через оптическое волокно передается на оптоволоконный светоделитель, освещающий образец и контрольное зеркало, движущееся с постоянной скоростью. По сути оптоволоконный светоделитель, образец и движущееся контрольное зеркало образуют интерферометр Майкельсона. Свет, прошедший два различных оптических пути, вновь объединяется в оптоволоконном светоделителе. Интерференционные полосы образуются, если длина оптического пути контрольной линии соответствует оптическому пути линии, освещающей образец. Осевое разрешение прибора достигает 5 мкм. Поперечное разрешение когерентного оптического томографа определяется размером фокусного пятна, составляющего обычно 10–30 мкм. Как и в конфокальной сканирующей лазерной микроскопии, оптика с более высокой числовой апертурой обеспечивает лучшее поперечное разрешение. Как когерентная оптическая томография, так и ультразвуковой метод страдают ухудшением контраста изображения из-за теней, порождаемых сильно рассеивающими элементами объема, находящимися выше исследуемого объема образца.

Обратимся к рис. 5.21. Два фотодиода используются как двойной сбалансированный датчик, позволяющий компенсировать амплитудный шум лазерного источника света. Интерферометрический сигнал проходит через электронный узкополосный фильтр, настроенный на интерференционную полосу или частоту гетеродина. Отфильтрованный интерференционный сигнал затем демодулирует-

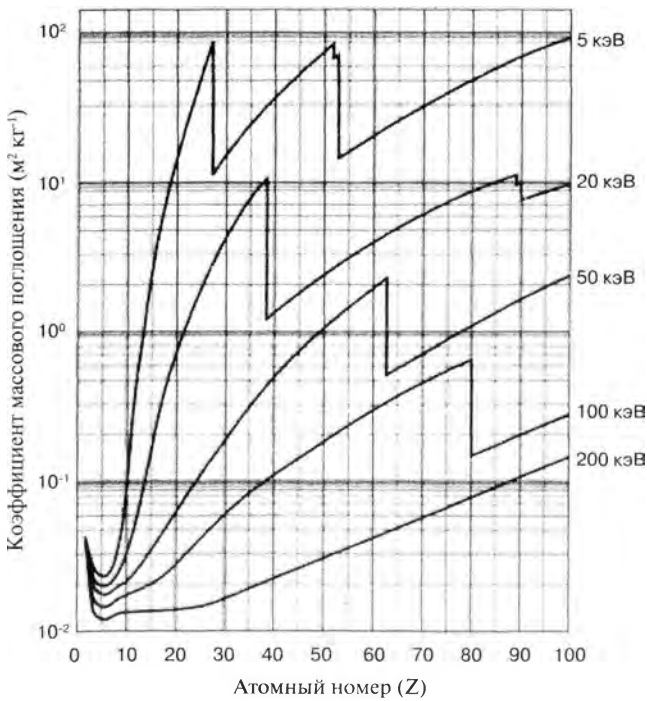


Рис. 5.22. Типичные зависимости коэффициента массового поглощения рентгеновского излучения от атомного номера материала.

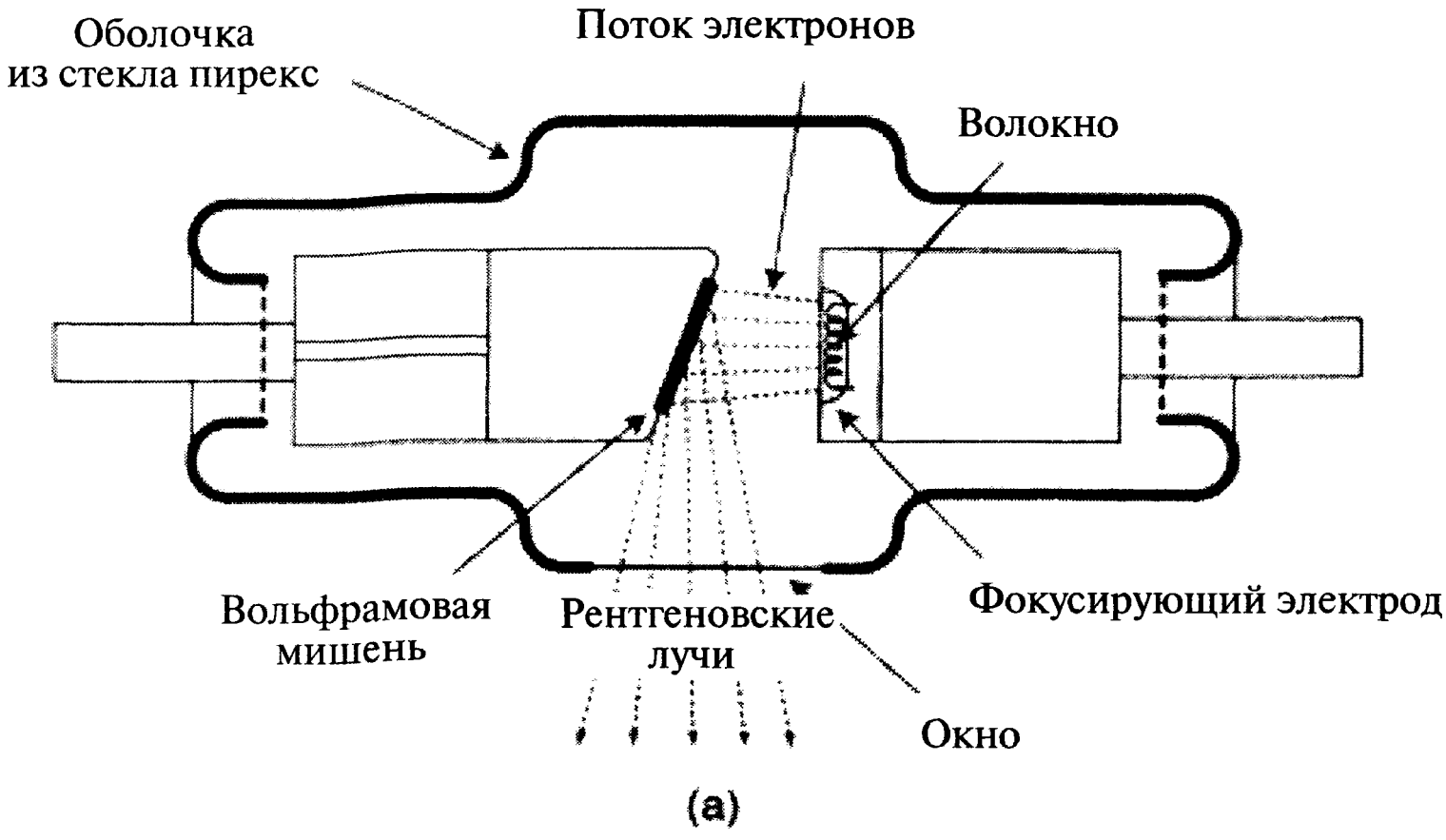


Рис. 5.23. (a) - Рентгеновская трубка, в которой электроны высокой энергии бомбардируют вольфрамовую мишень. Для предотвращения перегрева мишень охлаждают. Рентгеновское излучение выходит наружу через узкое окно из стекла пирекс. (b) - Типичный рентгеновский спектр, имеющий характеристические линии и широкополосное тормозное излучение. Характеристики материала окна определяют левую границу полосы пропускания.

ся, переводится в цифровой вид и сохраняется в памяти компьютера. Высокий динамический диапазон этой системы позволяет обнаруживать отраженные сигналы мощностью в несколько фемтоватт. Контрольное зеркало установлено на движущемся гальванометре, который приводится в действие сигналом треугольной формы. При скорости движения зеркала 260 мм/с частота модуляции интерференционной полосы составляет 400 кГц. Управляемый компьютером двигатель приводит в движение предметный столик, что обеспечивало поперечное сканирование образца. Изображение строят, вычисляя логарифм интенсивности сигнала и выводя его на черно-белый монитор. Типичное время получения изображения составляет одну минуту. Глубина области сканирования равна расстоянию максимального перемещения контрольного зеркала (4,5 мм), деленному на показатель преломления образца n_s, т.е. $4,5/n_s$ мм.

5.5. Рентгеновская микроскопия, томография и микротомография

Возвращаясь к приведенному в главе 1 спектру электромагнитных волн и принимая во внимание критерий Рэлея, становится понятно, что радикального улучшения пространственного разрешения можно добиться путем создания рентгеновского микроскопа (длина волны мягкого рентгеновского излучения равна 2–5 нм). Заметим, что степень прозрачности образца в рентгеновском диапазоне определяется его толщиной, плотностью и атомным номером исследуемого материала. Рис. 5.22 демонстрирует типичные значения коэффициента поглощения рентгеновского излучения. Источники рентгена многочисленны и разнообразны: от массивных ускорителей частиц до небольших портативных источников излучения в настольных микротомографах. Рентгеновское излучение обычно получают, бомбардируя электронами мишень из материала с высоким атомным номером Z. В электронных микроскопах используют различные типы рентгеновских датчиков, которые будут рассмотрены в главе 6. Типичная рентгеновская электронно-лучевая трубка приведена на рис. 5.23.

5.5.1. Микроскопы, использующие мягкое рентгеновское излучение

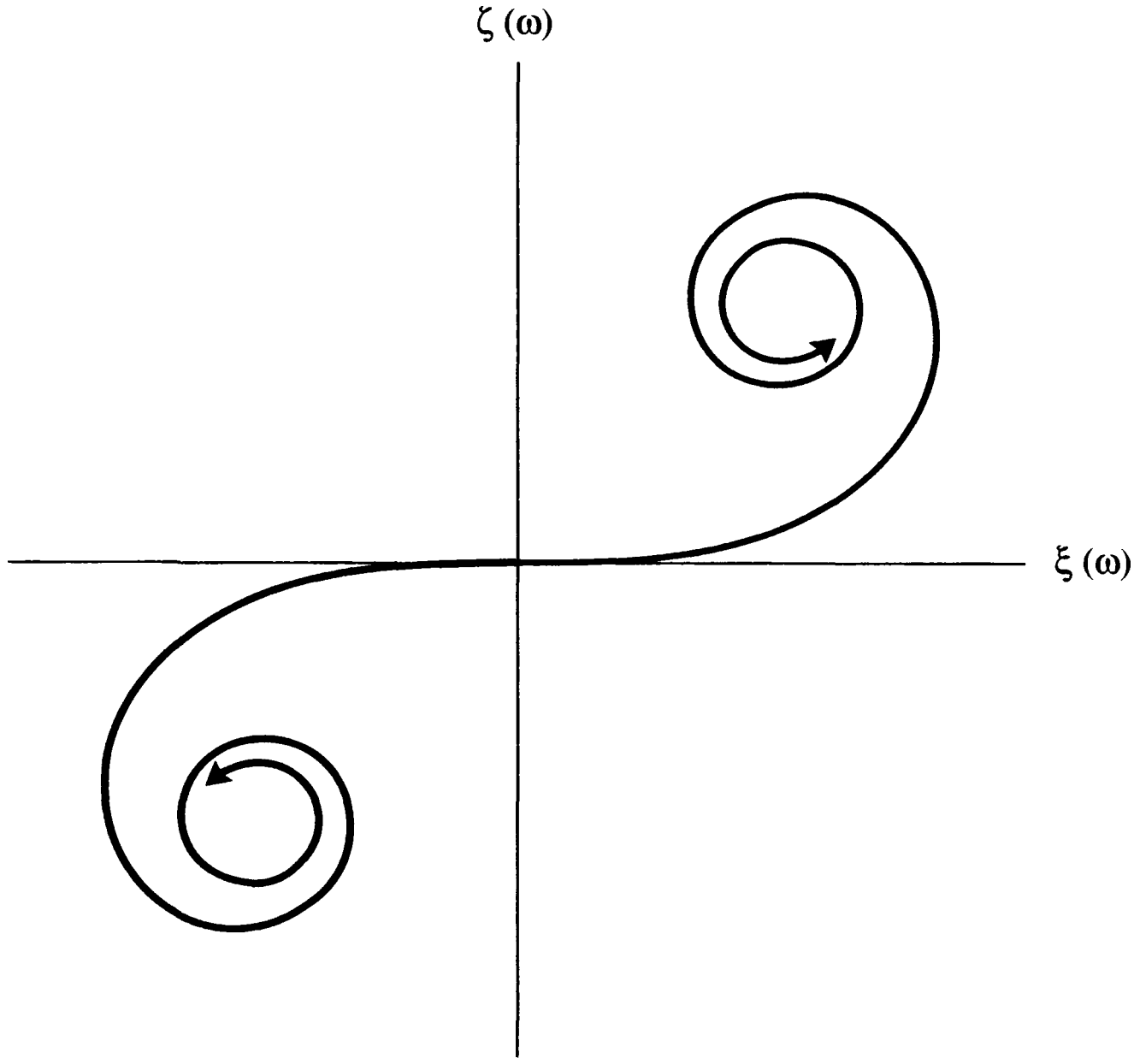
По сравнению с электронами мягкое рентгеновское излучение проникает в образец значительно глубже, до 10 мкм, что в биологии соответствует толщине клетки. Взаимодействуя с веществом, мягкий рентген позволяет получать при атмосферном давлении контрастное изображение биологических объектов, не требуя их искусственного окрашивания. При соответствующем подборе длины волны контраст может определяться как отдельными химическими элементами [65], так и химическими соединениями [66]. Проблемой является высокая проникающая способность рентгеновского излучения, и защита от него является непростой задачей. Единственным источником мягких рентгеновских лучей являются ускорители элементарных частиц типа ускорителя в Национальной лаборатории Лоуренса в Беркли, США [67, 68] или ускорителя в Геттингене, Германия [69]. Элементарные частицы, движущиеся по круговым орбитам, излучают так называемое синхротронное излучение, представляющее собой мягкий рентген. Имеются также сообщения о рентгеновском микроскопе, разработанном Национальной лабораторией в Оук-Ридже в штате Теннесси, США [70]. Этот инструмент позволяет исследовать поликристаллические материалы in situ*, изучая влияние прилагаемых напряжений на отдельные микрокристаллы. Одним из новшеств конструкции данного прибора является зеркало Киркпатрика-Баеза, способное фокусировать рентген на мишень субмикронного размера. В настольных рентгеновских установках для фокусировки рентгена вместо дифракционной или отражающей оптики используют зонные пластинки.

При обсуждении дифракции мы предполагали, что отверстие освещается параллельным пучком света. Если же источник света удален не слишком далеко, а дифракционную картину наблюдают на конечном расстоянии от отверстия, дифракцию следует анализировать при помощи теории Френеля. Интерференцию вторичных волн на прямоугольном отверстии в точке P, расположенной недалеко от отверстия, можно вычислить, суммируя в комплексной плоскости вторичные

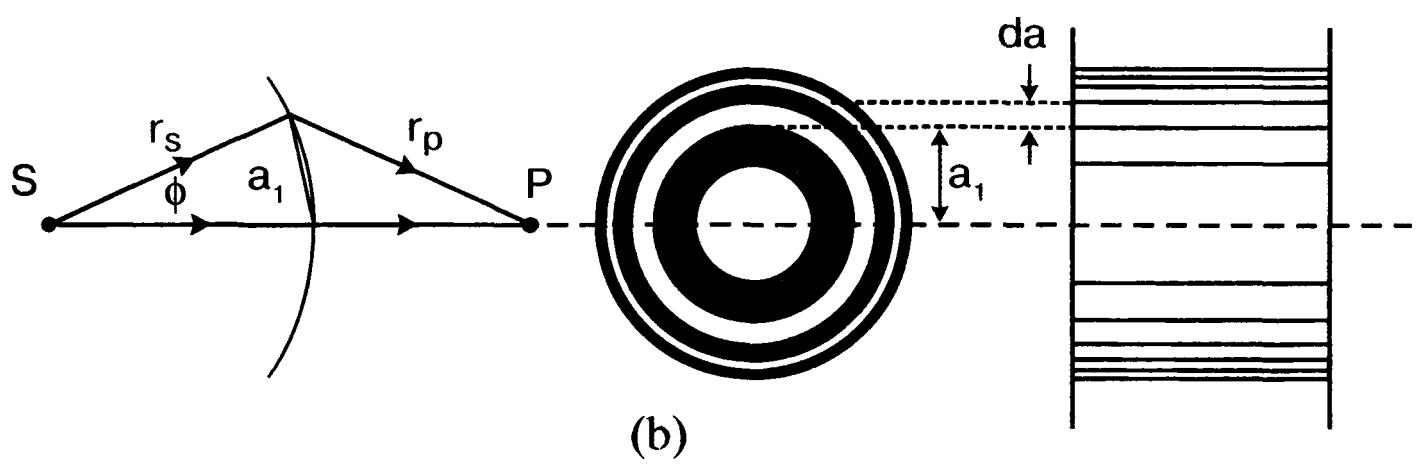
---

* На месте нахождения (лат.). – *Прим. редактора перевода.*

волны. В результате получаем спираль Корню, показанную на рис. 5.24a. Рассмотрим рис. 5.24b и проанализируем влияние различных частей фронта волны на



(a)



(b)

Рис. 5.24. Интенсивность света в точке P вблизи прямоугольного отверстия вычислить сложнее, чем в случае дифракции Фраунгофера, когда экран удален от отверстия. В этом случае необходимо вычислять интеграл Френеля. (a) - Спираль Корню образуется суммированием вторичных волн, излучаемых прямоугольным отверстием. Учитывая их фазу, координаты спирали в комплексной плоскости описываются уравнениями: $\zeta(\omega) = \int_0^{\omega} \sin\left(\frac{\pi\omega'^2}{2}\right) d\omega'$ и $\xi(\omega) = \int_0^{\omega} \cos\left(\frac{\pi\omega'^2}{2}\right) d\omega'$, что позволяет определить интенсивности. (b) - Ширина зон зонной пластинки различна (постоянна их площадь da). Оставляя лишь зоны Френеля одинаковой фазы, можно заставить зонную пластину действовать как линзу с фокусным расстоянием $f = a_1^2/\lambda$, где a_1 - радиус первой зоны Френеля.

интенсивность электромагнитной волны в точке P. Используя вторичные волны Гюйгенса, фаза φ между двумя показанными на рисунке вторичными волнами определяется уравнением:

$$\phi = \frac{2\pi}{\lambda}\left[r_p - (PS - r_s)\right] \approx \frac{\pi PS}{r_s(PS - r_s)\lambda} a^2 \qquad (5.7)$$

Разницу фаз δφ для кольцевого элемента радиусом a и шириной δa получаем дифференцированием следующего выражения:

$$\delta\phi = \frac{2\pi\ PS}{r_s(PS - r_s)\lambda} a\ \delta a \qquad (5.8)$$

Если площадь кольцевых зон одинакова и равна 2πaδa, их вклад в суммарную амплитуду одинаков.

В зонной пластинке блокирован свет всех полупериодов одного знака. Выделены зоны, радиус которых пропорционален квадратному корню натуральных чисел, и каждая вторая зона остается темной (рис. 5.24b). Эту картину подвергают фотоуменьшению, и при прохождении через зонную пластинку световой волны она действует подобно линзе. Эффективное фокусное расстояние f_{zp} зонной пластинки равно:

$$f_{zp} = a_1^2/\lambda, \qquad (5.9)$$

где a_1 - радиус первой зоны Френеля. В микроскопии зонные пластинки широко используют для фокусировки рентгеновского излучения.

Большинство просвечивающих рентгеновских микроскопов рассчитано на синхротронный источник излучения высокой мощности, обеспечивающий краткое время экспозиции. Однако недавно Берглунд с соавторами сообщили о создании компактной настольной системы, использующей мягкое рентгеновское излучение с разрешением менее 100 нм и работающей в диапазоне окна пропускания воды (Δλ = 2,3 - 4,4 нм) [71]. На рис. 5.25 приведена схема установки, в которой используется система капельных мишеней.

Импульсное излучение продолжительностью 100 пикосекунд с частотой 10 Гц, генерируемое Nd-YAG лазером, фокусируется на капли этанола диаметром 15 μm, выбрасываемые из стеклянного капилляра, вибрирующего под воздействием пьезоэлектрического устройства. Производимая лазером плазма действует как источник рентгеновского излучения высокой яркости. Для обеспечения достаточной плотности фотонов в предметной плоскости необходим высокоэффективный оптический конденсор. В данной системе рентгеновские лучи на образец фокусирует многослойное сферическое конденсорное зеркало. На поверхность зеркала напылено двести слоев W/B_4C, расположенных на расстоянии 3,37 нм друг от друга, что обеспечивает интерференционное отражение перпендикулярно направленному пучку. Коэффициент отражения каждого слоя равен 0,5% при длине волны 3,37 нм. Это зеркало создает узкую интерференционную полосу шириной 0,04 нм. Это позволяет снизить ухудшение качества изображения под действием других линий, излучаемых плазмой. Центральная диафрагма, помещенная над источником излучения, не пропускает из плазмы прямые лучи (которые привели бы к перегрузке оптической ПЗС-матрицы) и устраняет излучение нулевого порядка, исходящее от никелевой зонной пластинки. ПЗС-матрица имеет 1024×1024 пиксе-

Рис. 5.25. Аппарат Берглунда состоит из плазменного источника мягкого рентгена, возбуждаемого лазерным облучением капельной мишени, многослойного конденсорного зеркала, образца и зонной пластинки, обеспечивающей получение изображения высокого разрешения на чувствительной к рентгену ПЗС-матрице, освещаемой с тыльной стороны.

лей и представляет собой охлаждаемую тонкую пластинку, освещаемую с тыльной стороны. Степень увеличения системы зависит от расстояния между зонной пластинкой и ПЗС-матрицей. Авторы сообщают, что их прибор разрешает особенности размером менее 60 нанометров. Для получения наилучших результатов образец должен быть тонким (толщиной не более нескольких микрон), поскольку содержащие углерод материалы сильно поглощают излучение длиной волны 3,37 мкм.

5.5.2. Рентгеновская микрорадиография

Появление конфокальных оптических микроскопов позволило изучать объем полупрозрачных материалов (на глубине в десятки микрон). Однако даже в случае прозрачных материалов глубина проникновения ограничена рабочим расстоянием объектива. Естественным средством более глубокого проникновения в материал является рентген. Его эффективность иллюстрируется историей развития методов определения ориентации волокон в композитах. В одной из самых ранних работ, посвященных исследованию ориентации волокон [72], использовалась контактная рентгеновская микрорадиографическая установка, дававшая изображение всех волокон в слое материала толщиной 100 мкм. Типичные размеры исследуемой области составляли 600×600×100 мкм (по осям X, Y и Z соответственно). Направления ориентации волокон в плоскости XY были определены ручным анализом перекрывающихся стеклянных волокон в матрице полипропилена и полиамида-66. В высоконаполненных волокнистых композитах методом контактной микрорадиографии разделить изображения отдельных волокон очень

трудно, а точные характеристики трехмерной структуры получить просто невозможно. Имеются и более поздние исследования в области трехмерной сканирующей рентгеновской томографии [73]. Медицинские сканеры работают с пространственным разрешением порядка 200 мкм, но возможно улучшение разрешения до 10–20 мкм [74]. Сейчас промышленно производятся компактные настольные рентгеновские микротомографы, открывающие перспективу изучения трехмерной структуры различных материалов. Речь об этом пойдет ниже.

5.6. Рентгеновская микротомография волокнистых материалов

5.6.1. Краткое описание

В главах 3 и 4 описан метод изучения структуры объема материала, основанный на получении последовательности сечений (реальных и оптических). Ниже описано получение объемного изображения исходя из ряда рентгенограмм и применения методов компьютерной томографии. Использование рентгена резко увеличивает глубину проникновения по сравнению с видимым светом, что позволяет изучать значительно больший объем образца.

5.6.2. Введение

Рентгеновские лучи были обнаружены в 1895 г. Вильгельмом Рентгеном. Он изучал катодные лучи, излучаемые при пропускании электрического тока через вакуумную лампу. Во время одного из экспериментов он заметил свечение на экране из платиноцианида бария, расположенном на некотором расстоянии от аппарата. Однако он удивился еще больше, когда приблизил руку к экрану и явственно увидел на нем изображение костей кисти своей руки! Природа лучей, вызывающих столь удивительный эффект, оставалась неясной в течение многих лет, и поэтому они получили несколько двусмысленное название «икс-лучи», т.е. «неизвестные лучи». Первые снимки Рентгена, вроде показанного на рис. 5.26, сразу же поразили воображение широкой публики и способствовали присуждению в 1901 году ему Нобелевской премии по физике.

На рис. 5.23 приведена схема типичного лабораторного источника рентгеновских лучей. Из катода вылетают электроны, которые ускоряются электрическим полем до высоких скоростей и ударяются о мишень-анод. Когда мишень (обычно ее делают из вольфрама) бомбардируют электронами высокой энергии, она испускает рентгеновские лучи в широком диапазоне длин волн. При прохождении через вещество рентгеновских лучей они вызывают те же явления, что и свет, например, дифракцию, преломление и флуоресценцию.

Разработка рентгеновских установок затруднена малой длиной волны. Во-первых, рентгеновские волны плохо отражаются, и поэтому их не удается фокусировать зеркалами. Во-вторых, в этом диапазоне длин волн для большинства материалов показатель преломления n очень близок к единице. Как следствие, тонкие линзы для рентгеновских лучей имеют очень большое фокусное расстояние f (которое согласно уравнению (1.51) пропорционально $1/(n - 1)$), что практически исключает использование линз. Для фокусировки рентгеновских лучей используют

Рис. 5.26. Изображение кисти руки г-жи Рентген, полученное 22 декабря 1895 года и традиционно считающееся первым рентгеновским снимком.

зонные пластинки Френеля, состоящие из концентрических колец, как описано в разделе 5.5.1 и работающие благодаря дифракции, а не преломлению. В настоящее время разработаны микроскопы, работающие на этом принципе.

Использование рентгена в медицине показало, что он проникает в материал значительно глубже, чем видимый свет. Это может быть использовано для исследования изделий большого объема. При этом отсутствуют проблемы, свойственные методу последовательных сечений или связанные с недостаточной глубиной проникновения света (глава 3). Однако при отсутствии способа фокусировки рентгеновских лучей требуется альтернативный метод получения четкого изображения образца.

5.6.3. Рентгеновская компьютерная томография

Когда рентгеновские лучи проходят сквозь образец, они поглощаются в соответствии с изменением состава и плотности, что обеспечивает контраст рентгенограммы. Рис. 5.27 иллюстрирует принцип создания рентгенограммы при прохождении пучка параллельных рентгеновских лучей сквозь образец. Одиночная рентгенограмма не позволяет определить, в какой точке образца произошло ослабление лучей. Если при распространении рентген ослабляется постепенно, комбинация большого числа проекций позволяет восстановить структуру объема образца. При томографической съемке образца рентгенограммы фиксируются после каждого поворота на определенный угол. Для восстановления сечения образца профили интенсивности отдельных линий налагают друг на друга.

Рис. 5.28 демонстрирует реконструкцию сечения методом «обратной проекции». Интенсивность одной рентгенограммы проектируется на воссоздаваемое изображение при соответствующей ориентации образца. По мере получения последующих рентгенограмм проекции налагаются друг на друга, и качество реконструируемого изображения улучшается. В приведенном примере образец состоит из двух цилиндрических объектов, расположенных на небольшом расстоянии друг от друга. Структура образца ясно видна на реконструированном поперечном сечении после обратной проекции 16 рентгенограмм. Контур объектов размыт. Размытость контура можно уменьшить по мере получения последующих изображений, но устранить полностью ее невозможно. Существуют различные способы усиления контура, позволяющие ослабить этот эффект [76]. Помимо обратной проекции, были предложены и другие методы, требующие большего объема компьютерных вычислений, но обеспечивающие лучшее качество реконструкции [77].

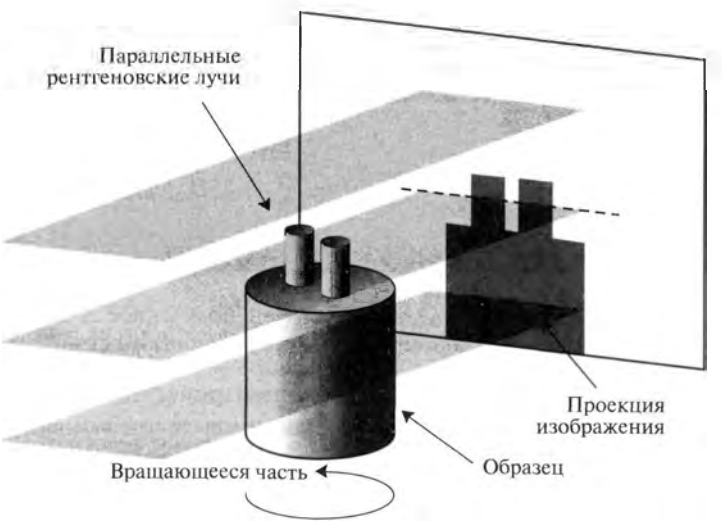


Рис. 5.27. В рентгеновской томографии параллельные лучи проходят через образец и образуют теневую рентгенограмму. Пунктирная линия соответствует тонкому сечению, показанному на рис. 5.28

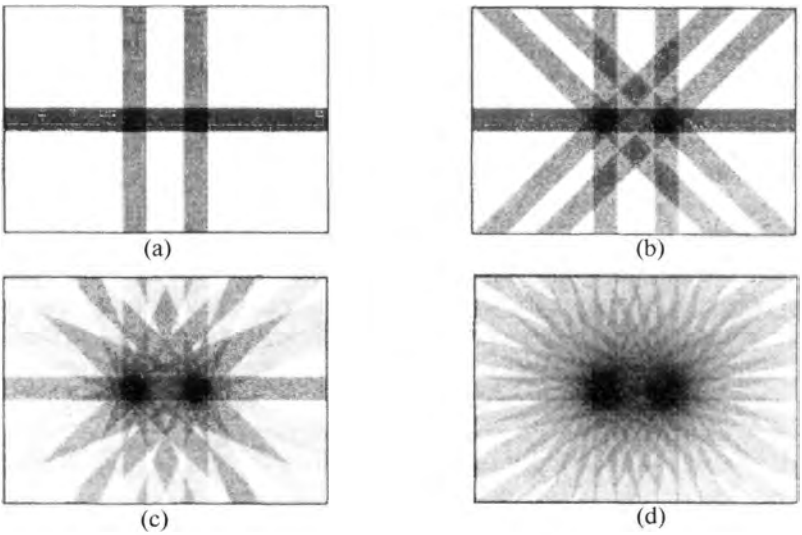


Рис. 5.28. Восстановление поперечного сечения образца методом обратной проекции. Интенсивность последовательных рентгенограмм проецируется на воссоздаваемое изображение. Рисунки (a) - (d) демонстрируют изображения, построенные на основе 2, 4, 8 и 16 проекций соответственно.

Первые компьютерные томографы были разработаны в 1970-х годах. Их широко использовали в медицине. В то время из-за низкой производительности компьютеров реконструкция структуры занимала много часов. В современных сканирующих томографах мощность компьютера уже не является лимитирующим фактором. Это позволяет осуществлять обратную проекцию несравненно большего числа рентгенограмм, что обеспечивает намного более четкое изображение поперечных сечений.

Разрешение современных медицинских томографов равно нескольким миллиметрам, однако недавно появились мощные настольные рентгеновские трубки, что значительно улучшило разрешение. В настоящее время на рынке имеются компьютерные микротомографы высокого разрешения, производители которых гарантируют разрешение до 2 мкм. В настольных микротомографах используются рентгеновские трубки, дающие сфокусированный конус излучения, что позволяет изменять увеличение по мере приближения или удаления образца от источника [78]. Рентгеновское изображение образца фокусируется на материал, который, флуоресцируя в видимой части спектра, позволяет использовать стандартную ПЗС-матрицу.

5.6.4. Качество изображения. Артефакты и разрешение

Способ получения изображения в компьютерной томографии иной, чем в конфокальной микроскопии. Поэтому факторы, определяющие качество воссоздаваемого изображения, также различны. Понимание причин появления артефактов при компьютерной томографии важно для их распознания и устранения. Некоторые артефакты компьютерной томографии освещены выше. Более подробное обсуждение причин появления и методов устранения артефактов можно найти в работе [79].

На рис. 5.29a приведено реконструированное изображение поперечного сечения образца из материала низкой плотности – фетра. Во время построения изображения форма образца слегка изменилась, поскольку он «раздался в объеме», что привело к размытости реконструированного изображения. Стабильность формы при томографической съемке весьма важна. К счастью, для большинства образцов это не является проблемой, поскольку их форма при временах порядка часа вполне стабильна.

На рис. 5.29b показано изображение сечения композиционного полимерного материала. Кольца различной интенсивности концентричны относительно оси вращения образца. Этот артефакт вызван небольшими различиями коэффициента пропорциональности между интенсивностью рентгеновского сигнала и яркостью соседних пикселей ПЗС-камеры, регистрирующей рентгенограмму. Данный

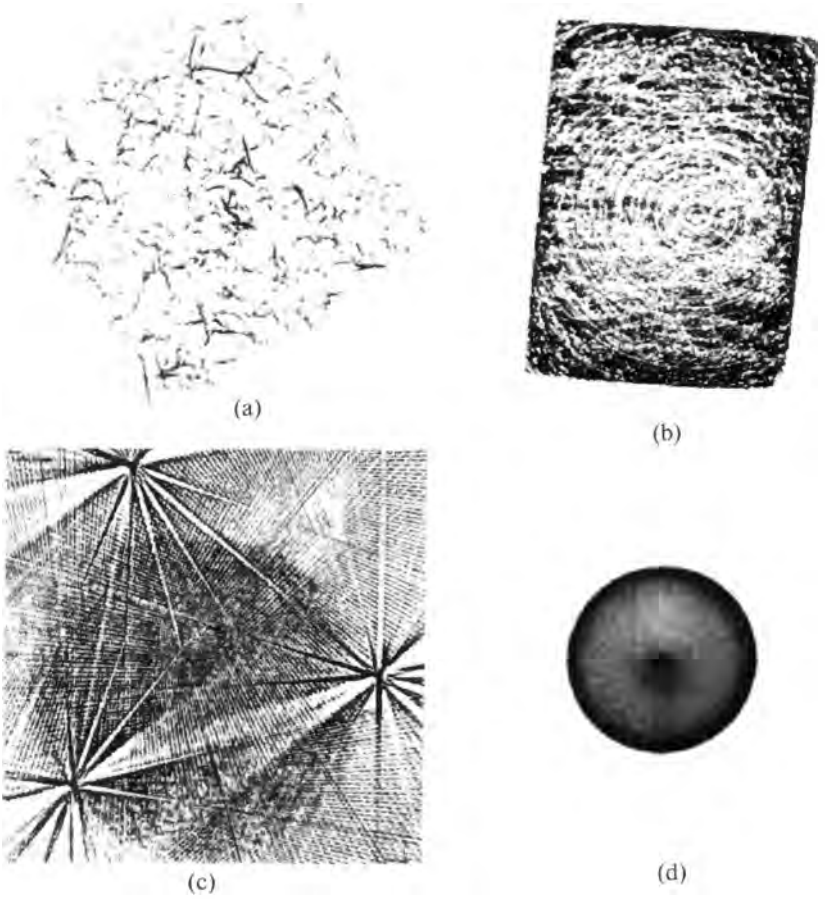


Рис. 5.29. Типичные артефакты, возникающие при компьютерной томографии. (a) - Образец изменил свою форму (увеличил объем) во время съемки, что привело к размыванию изображения. (b) - Кольцевые артефакты вызваны разницей в эффективности регистрации сигнала различными пикселями ПЗС-камеры. (c) - Звездоподобные артефакты могут возникать при наличии особенностей с высокой плотностью. (d) - Потемнение краев объекта.

эффект можно устранить, если после каждой экспозиции образец перемещать на некоторое расстояние. Это позволяет снимать одну и ту же часть образца различными пикселями ПЗС-камеры.

На рис. 5.29c показан тот же образец, что и на рис. 5.29a. Однако в этом случае кусок фетра был сжат между двумя металлическимим пластинами, удерживаемыми вместе тремя стальными иглами. Иглы маскируют изображение менее плотного фетра. Металл с более высоким атомным номером сильно поглощает рентген, лишь небольшая часть которого проходит через иглы. Более того, если иглы приводят к излишне большой плотности рентгенограммы, вся информация об ослаблении рентгена фетром полностью теряется.

На рис. 5.29d изображено поперечное сечение медного цилиндра, края которого выглядят более темными, чем остальное сечение. Рентгеновские трубки, подобные изображенной на рис. 5.23, излучают широкий спектр света. Ослабление рентгеновского излучения зависит от длины волны, и высокоэнергетичная часть излучения поглощается незначительно, в то время как фотоны с меньшей энергией ослабляются гораздо сильнее. Данный эффект можно устранить, поместив на пути рентгена монохроматический фильтр. В этом случае значительно уменьшается интенсивность сигнала, что требует более длительной экспозиции.

В главах 1–4 мы видели, что пространственное разрешение оптического микроскопа определяется дифракционным размером точечного источника света. Разрешение зависит от размера объектива и пути прохождения света через образец (может возникнуть аберрация). Разрешение рентгеновского микротомографа можно определить, построив изображение решетки или объекта, размер которого меньше порога разрешения. Однако качество изображения зависит и от других факторов, например, количества рентгенограмм и алгоритма обратной проекции. По этим причинам пространственное разрешение системы определить не очень просто.

5.6.5. Текстильные и композиционные волокнистые материалы

Волокнистые структуры являются важным компонентом биологических, органических и неорганических материалов, которыми изобилует наша повседневная жизнь. Примером являются текстиль и волокнистые композиты. Характеристики волокон, т.е. их длина, диаметр, ориентация и кривизна определяют макроскопические свойства материала. Для определения модуля упругости, прочности, проницаемости и теплопроводности нужно охарактеризовать микроструктуру волокнистого материала. Ниже будет описано изучение микроструктуры композиционных и текстильных материалов с помощью рентгеновского микротомографа.

Текстиль является волокнистым материалом, который нашел широкое применение как в быту, так и в промышленности. Волокна в текстильном материале могут принимать разную форму. В тканях волокна могут быть весьма упорядоченными, а в нетканых войлокообразных материалах, они, напротив, распределены практически случайно. Стандартный метод определения характеристик текстиля состоит в получении изображения поверхности с помощью светового или электронного микроскопа и его анализа с использованием стандартных методов обработки изображений, например, описанных в [80-82].

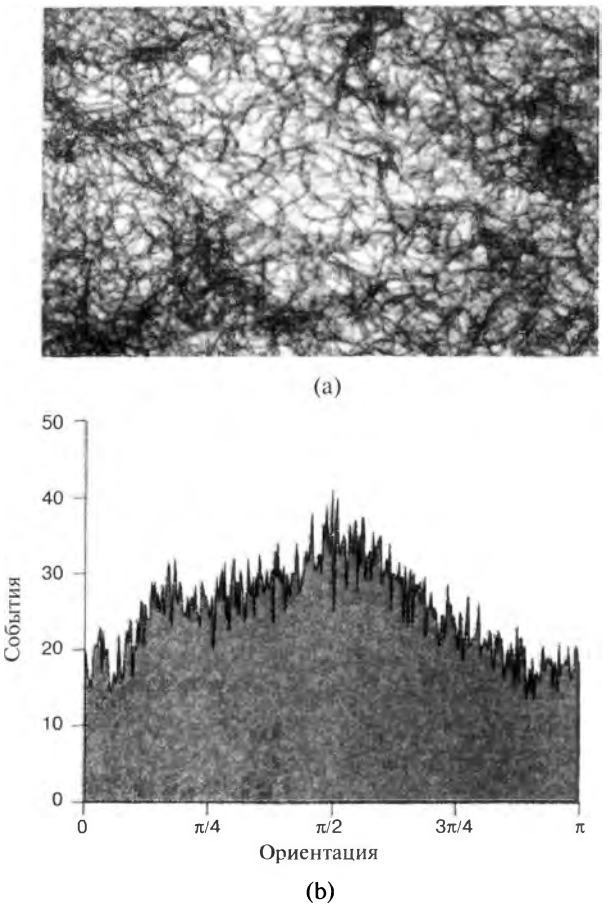


Рис. 5.30. (a) - Снимок нетканого текстильного материала, сделанный с помощью планшетного сканера. (b) - Распределение ориентации сегментов волокон, полученное с помощью преобразования Хоу (глава 2).

На рис 5.30a показано изображение нетканого текстильного материала, полученное с помощью планшетного сканера. После определения краев с использованием лапласовского фильтра это изображение подвергли преобразованию Хоу, и в пространстве параметров этого преобразования были выявлены пики, высота которых превышала определенный уровень (рис. 5.30b). Образец вручную удлинили вдвое в направлении X, что привело к искажению изотропии распределения ориентации волокон.

Исследование микроструктуры волокнистых композиционных материалов довольно подробно обсуждалось в главах 3 и 4. Определение характеристик волокна часто сводится к последовательному удалению тонких слоев материала и изучению поперечных сечений (раздел 3.3). Когда возможно, получают оптические сечения полупрозрачных образцов. В этом случае ограничена глубина изучаемого сечения (раздел 4.5.2). Задача изучения структуры возникает и в случае текстиля или композита. Если материал тонкий, достаточным может оказаться изучение плоской поверхности. Если же материал достаточно толстый или если требуемый параметр

невозможно измерить исходя из одного сечения, единственным выходом становится трудоемкое получение последовательного набора сечений.

5.6.6. Микротомография волокнистых структур

На рис. 5.31 показаны различные образцы, анализируемые с помощью рентгеновского микротомографа модели Skyscan 1072. Для каждого образца приведена рентгенограмма вместе с реконструированным изображением поперечного сечения. Время, затраченное на получение рентгенограмм и построение изображения, составило 2–4 часа.

На рис 5.31a изображена акриловая комплексная нить, состоящая из двух скрученных одиночных нитей. Волокна в каждой нити закручены против часовой стрелки, а вместе они скручены по часовой стрелке. Нити были получены прядением отрезков акриловых волокон длиной несколько сантиметров. Прочность обеспечивалась за счет трения соседних волокон и скрученности двух составляющих нитей. Интерес представляет расположение отдельных волокон в нити. Как

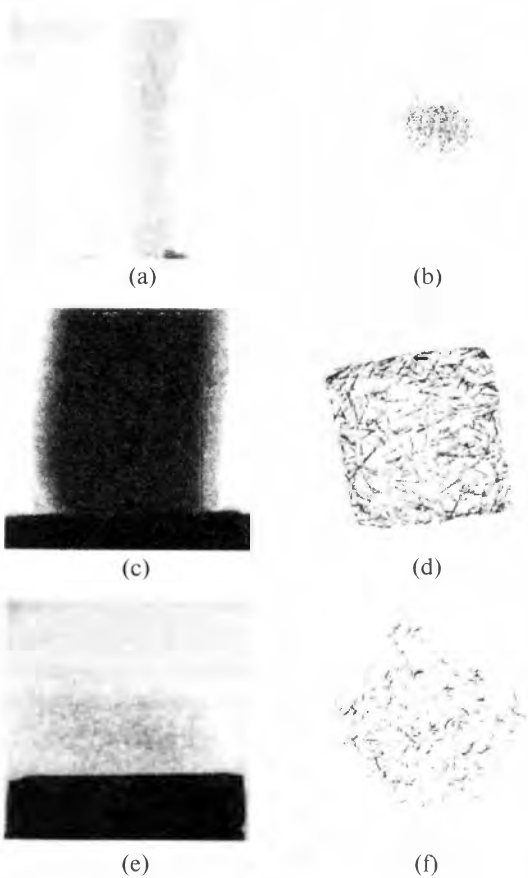


Рис. 5.31. Структура трех различных материалов: (a) и (b) - текстильная нить; (c) и (d) - стеклопластик; (e) и (f) - кусок фетра. Площадь поперечных сечений составляет несколько квадратных миллиметров.

выяснилось, многие волокна имеют винтообразную форму и «мигрируют» от центра к краям [83,84]. На поперечном сечении (рис. 5.31b) ясно видны отдельные волокна, а при анализе последовательных сечений можно наблюдать миграцию волокон.

На рис. 5.31c показан волокнистый композит, содержащий 13 об.% коротких стеклянных волокон диаметром 13 мкм в полипропиленовой матрице. Размер поперечного сечения образца был 2,3×2,3 мм. Его изготовили методом литья под давлением, состоящим в быстром впрыскивании в форму смеси расплава полимера и волокон. Большой интерес представляет влияние технологических условий процесса на длину и ориентацию волокон [85]. Компьютерное моделирование процесса литья позволяет предсказывать трехмерную микроструктуру композита. Исследование подобных структур на реальных образцах обычно ограничивается двухмерными сечениями (глава 3). На рис. 5.31d приведено реконструированное изображение сечения, полученное при помощи рентгеновского микротомографа. На снимке четко видны отдельные волокна. Эти данные позволяют описать пространственное расположение и ориентацию волокон.

Рис. 5.31e демонстрирует структуру нетканого полиариламидного фетра на основе волокон диаметром 42 мкм, который протыкали иглами для увеличения спутанности волокон [86]. Волокна в материале ориентированы преимущественно в плоскости слоя. При ударе в фетр вводится ряд стальных игл, что усиливает связь волокон в поперечном направлении. Для изучения фетра методом световой микроскопии его нужно залить эпоксидной смолой, отвердить ее, разрезать образец и отполировать. Это длительный процесс, который к тому же чреват искажением структуры. На рис. 5.31f приведено поперечное сечение образца, полученное методом рентгеновской микротомографии. Оно демонстрирует применимость данного метода для изучения структуры нетканых материалов.

5.6.7. Автоматизированный анализ формы волокон

Максимальное количество получаемых поперечных сечений образца зависит от количества пикселей ПЗС-матрицы, принимающей изображение. Каждая рентгенограмма в микротомографе Skyscan 1072 имеет 1024×1024 пикселей. Максимальное количество рентгенограмм равно количеству строк (1024), и поэтому максимальный объем информации составляет $1024^3 \times 8$ бит, т.е. один гигабайт. На рис. 5.32 показан пример рентгенограммы. Реально для одного образца получали не 1024, а от 200 до 500 рентгенограмм.

Из-за большого количества рентгенограмм при микротомографии ручная обработка снимков (например, с целью идентификации волокон) малоэффективна. Однако некоторые методы обработки двумерных изображений не поддаются прямому переводу в трехмерную форму. Например, многие операции процедуры определения трехмерной формы особенностей имеют операцию определения связанности определенного участка. На двумерном снимке каждый пиксель имеет 8 соседей, что дает 2^8 различных комбинаций, в то время как на трехмерном изображении каждый пиксель имеет 26 соседей, и число комбинаций возрастает до 2^{26}. Это приводит к колоссальному увеличению продолжительности вычислений. Поэтому необходимо тщательно выбирать алгоритмы обработки изображений, а их действие должно быть оптимизировано.

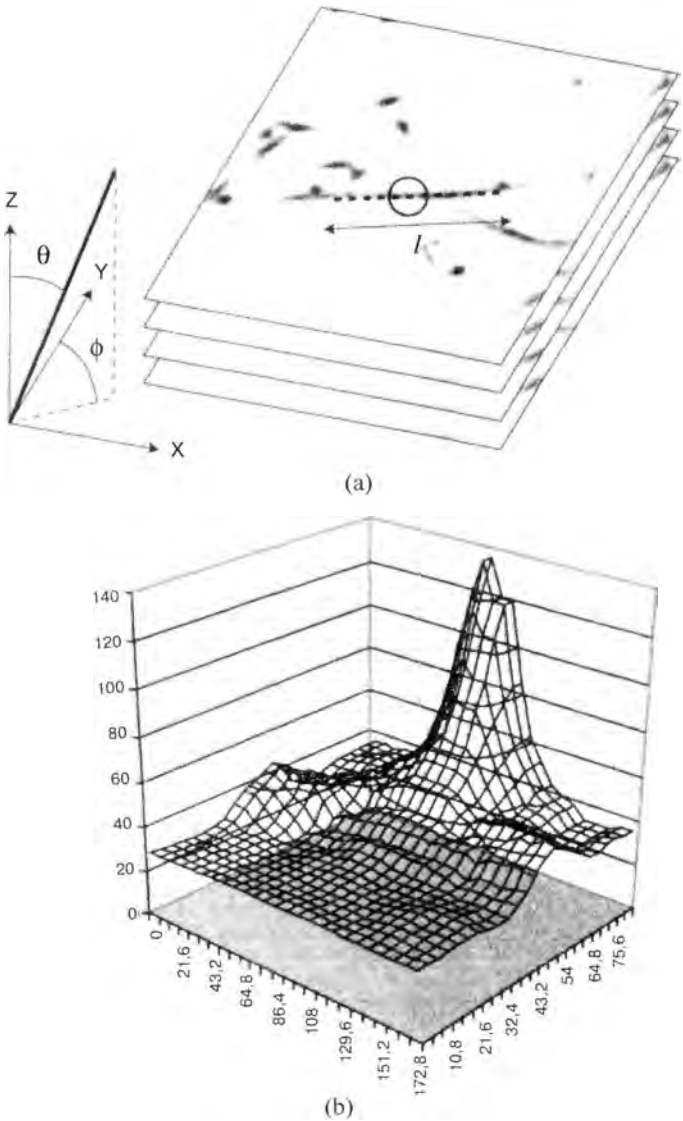


Рис. 5.32. (a) - Параметры, определяющие ориентацию волокна; (b) - интенсивность вокселей при определенной ориентации сегмента волокна позволяет найти наиболее вероятные значения углов (θ, ϕ).

Для обработки массивов трехмерных данных был разработан новый метод определения геометрии волокон. Ниже кратко приводится его алгоритм, а более подробное описание можно найти в работе [87]:

1. Определение локальной ориентации. В каждой точке изображения с координатами (x, y, z) определяют наиболее вероятные углы ориентации (θ, ϕ). Для этого вычисляют среднюю интенсивность вокселей вдоль вектора, характеризуемого углами ориентации (θ, ϕ) (l вокселей в длину) при различных

углах ориентации, как показано на рис. 5.32a. Для определения ориентации волокна в точке (x, y, z) определяют максимум интенсивности, как показано на рис. 5.32b. Ориентация волокон в каждой точке считается возможной, если интенсивность превышает некоторый уровень (рис. 5.33a).

2. Уменьшение количества векторов. Как видно из рис. 5.33a, направление вектора ориентации вдоль длины волокна почти постоянно. Напротив, вектора, лежащие по бокам, изменяют свое направление. Это свойство можно использовать для устранения большинства векторов, не лежащих на волокне, что иллюстрирует рис. 5.33b.

3. Соединение векторов. Последовательно рассматриваются соседние векторы, которые соединяются друг с другом, если они ориентированы в одном направлении. По мере соединения все большего числа векторов определяется расположение отдельных волокон, что показано на рис. 5.33c.

4. Сглаживание. Аппроксимация формы волокон полиномами, описанная в главе 4, применялась и в данном случае. Это позволило получить гладкое расположение центра волокон, как показано на рис. 5.33d.

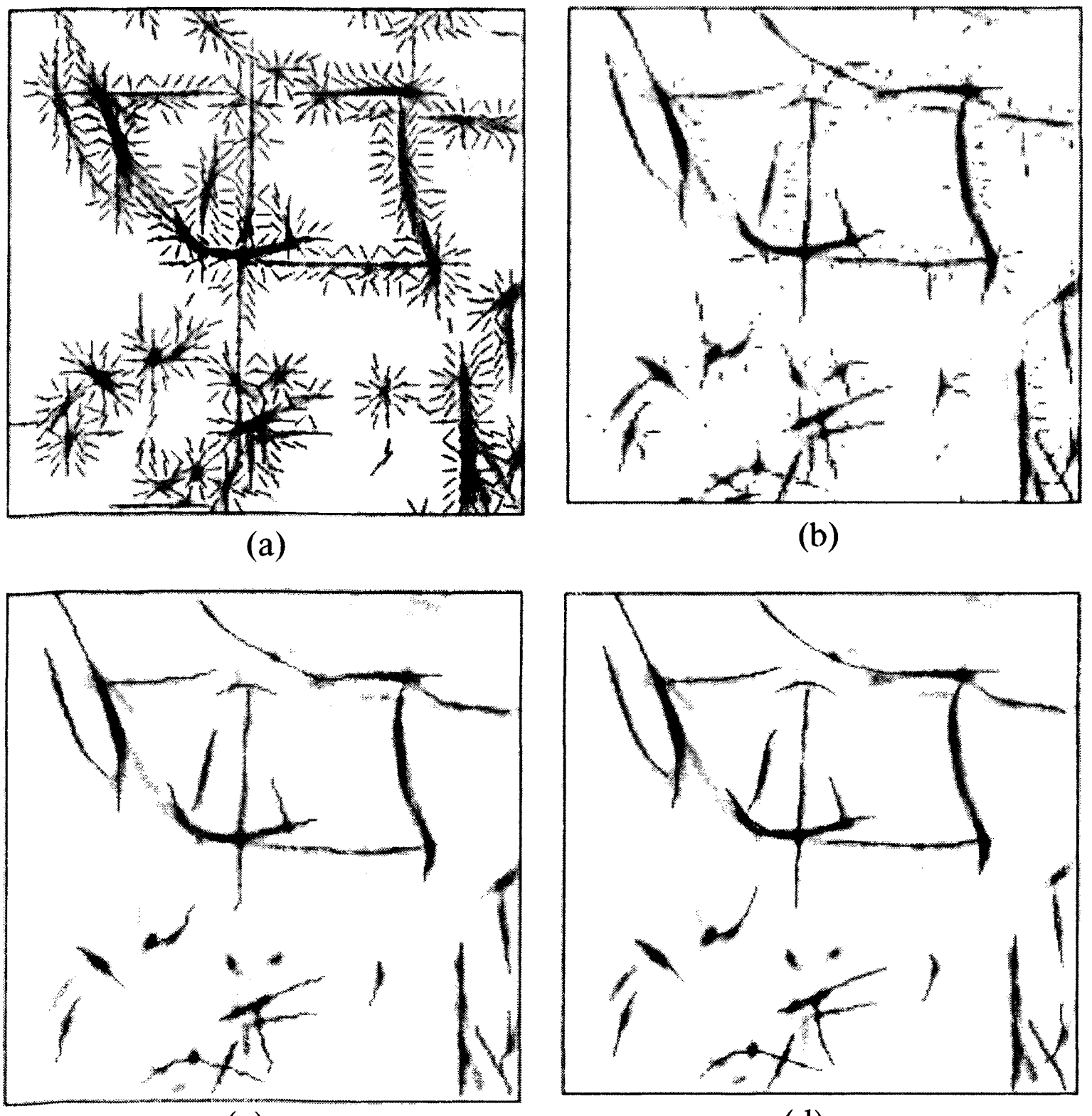


Рис. 5.33. Последовательность шагов при объединении сегментов и исключении шума, т.е. случайных сегментов волокон. (a) и (b) - Процедура уменьшения количества векторов; (c) - соединение наиболее схожих сегментов; (d) - векторы после полиномиального сглаживания.

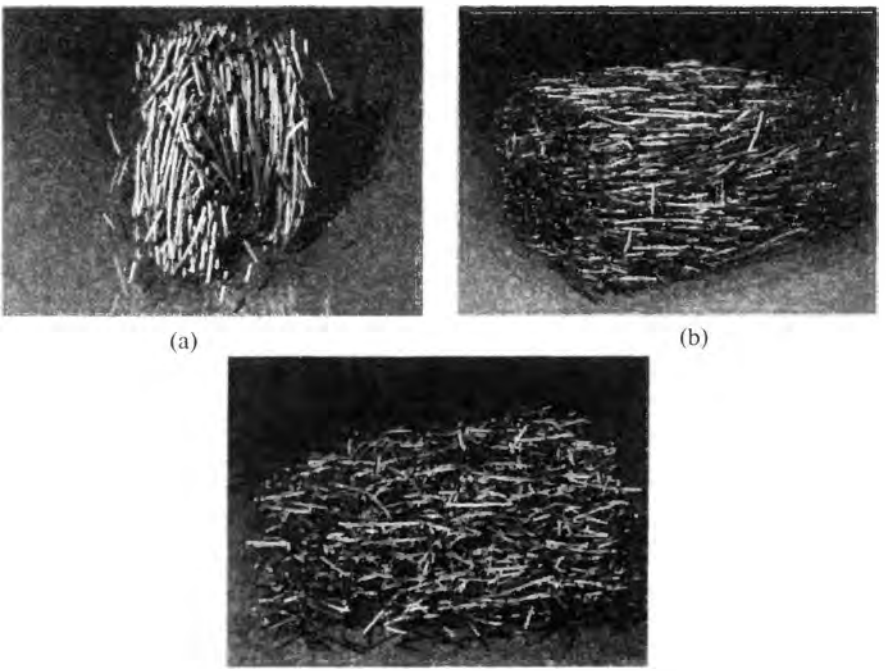


Рис. 5.34. Реконструкция трехмерной структуры различных волокнистых материалов. (a) – Комплексная нить; (b) - волокнистый композиционный материал и (c) - нетканый материал.

Массивы данных, получаемые для создания трехмерных изображений, могут использоваться и для количественной характеризации микроструктуры. Например, на рис. 5.35 показана часть графика изменения ориентации волокон по толщине пластины, полученной методом литья под давлением. График был построен на основании данных о трехмерной структуре, приведенной на рис. 5.34b. Сканированию подверглось лишь немногим более половины толщины пластины. Ориентация волокон характеризуется элементами тензора ориентации a_{xx}, a_{yy} и a_{zz}. Приведенные данные свидетельствуют о том, что структура приповерхностной и центральной областей пластины резко отличается.

Еще одним примером служит исследование изгиба и скрученности элементарных волокон в комплексной нити (рис. 5.34a) методом «пространственной кривой». Результаты приведены на рис. 5.36 и 5.37. Анализировались лишь волокна длиной более 1 мм. Насколько нам известно, распределение скрученности волокон, приведенное на рис. 5.37, получено впервые. График был построен на основе измерений координат каждого волокна в десяти точках вдоль его длины. Отметим два пика в распределении при ±0,5 рад/мм. Это объясняется скрученностью двух нитей между собой. Меньший отрицательный пик может быть вызван скручиванием внутри каждой связки волокон.

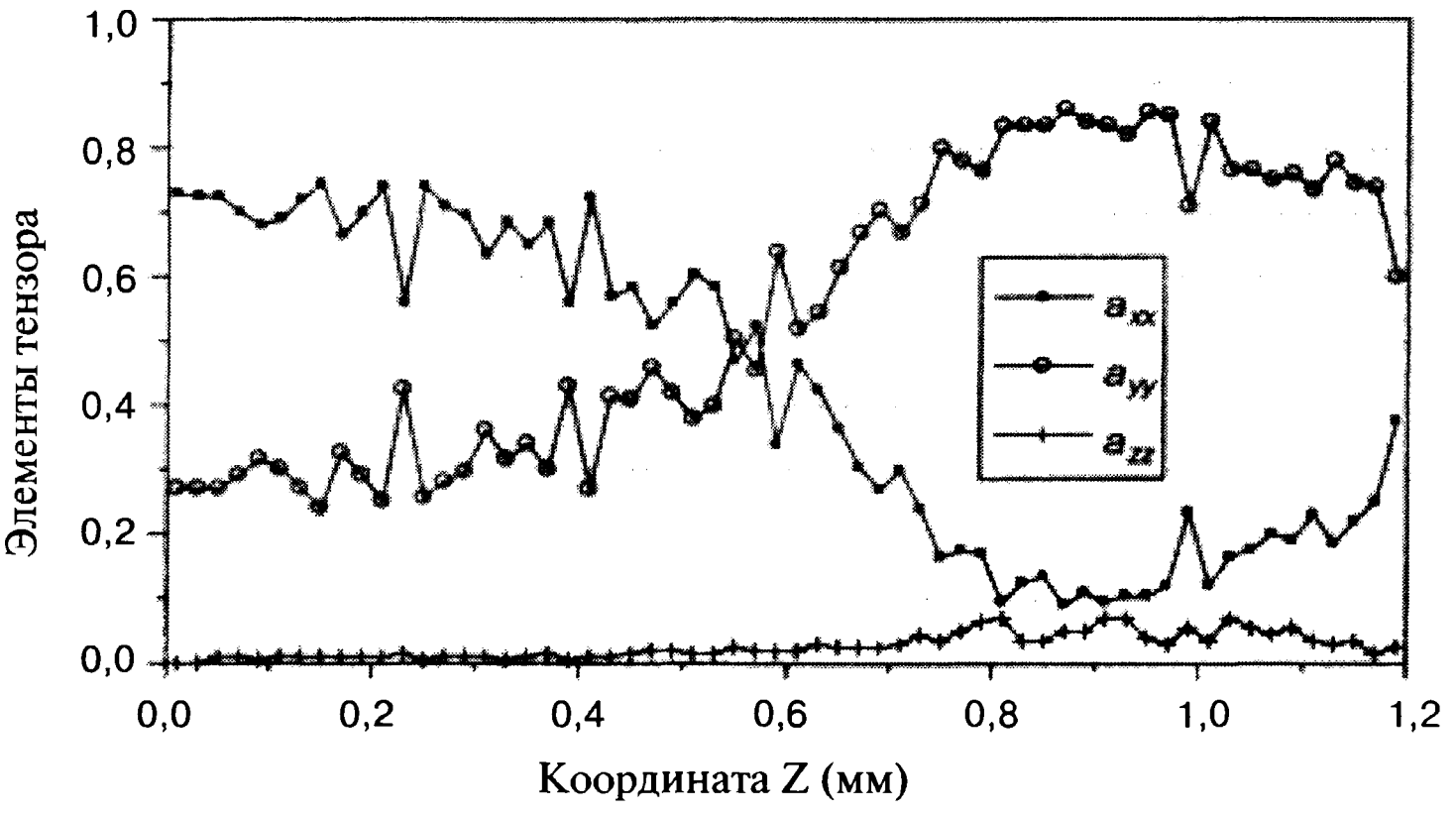


Рис. 5.35. Элементы тензора ориентации волокон a_{xx}, a_{yy} и a_{zz}, полученные анализом данных, представленных на рис. 5.34b. Пластина волокнистого композита получена литьем под давлением. Поверхностная и внутренняя области пластины явно различаются.

Рис. 5.36. Частотное распределение кривизны волокон в нити, представленной на рис. 5.34a, получено методом пространственной кривой.

5.6.8. Выводы

Рентгеновский метод очень привлекателен из-за простоты подготовки образцов. Он не приносит желаемых результатов, если различные фазы материала имеют недостаточный контраст вследствие сходности спектров поглощения рентгеновских лучей. В этом случае иногда удается усилить контраст введением в матрицу контрастирующей добавки, например, раствора иода низкой концентрации (концентрация не должна быть высокой, чтобы не изменилась текучесть системы).

Для оценки погрешности измерений можно сравнить результаты, полученные методами конфокальной микроскопии и рентгеновской микротомографии. Сравнивая данные рентгеновской томографии с конфокальной микроскопией, можно определить реальную разрешающую способность рентгеновской установки.

Рис. 5.37. Частота распределения кривизны волокон в нити, показанной на рис. 5.34а. График построен с использованием метода пространственной кривой.

Несмотря на достаточно убедительные трехмерные реконструкции структуры волокнистых систем, получение объективных количественных характеристик зависит от разрешения измерительной системы, размера волокон и уровня шумов при определении координат волокон. Следует с осторожностью относиться к представлению трехмерных параметров и их интерпретации.

С нашими последними результатами о применении рентгеновской микротомографии можно ознакомиться в работе [88]. Рентгеновская микротомография выглядит многообещающим методом исследования материалов, особенно если установки начнут удовлетворять строгим санитарно-гигиеническим нормам и требованиям безопасности, предъявляемым к таким приборам. Исследовательская группа профессора Пирза в Ольборге встроила механическое растягивающее устройство в рентгеновский томограф Skyscan, что позволило исследовать механические напряжения в рабочих изделиях. Этот подход может обеспечить дальнейшее развитие методов исследования динамического поведения композиционных материалов, необходимых для улучшения и подтверждения существующих математических расчетов методом конечных элементов.

5.7. Литература

1. Danuser G. (2001), Super-resolution microscopy using normal flow decoding and geometric constraints, J. Microsc-Oxford, 204, 136-149.
2. Gustafsson M.G.L. (2000), Surpassing the super-resolution limit by a factor of 2x using two objective lenses, J. Microsc-Oxford, 198, 82-87.
3. Toraldo dj Francia G. (1995), Resolving power and information, J. Opt. Soc. Am., 45, 497-501.
4. Weber R.L. (1980), Pioneers of Science, Institute of Physics Publishers.
5. Raman C.V. and Krishnan K.S. (1928), A new type of radiation, Nature, 121, 501.
6. Smekal A. (1923), Zur Quantentheorie der Dispersion, Naturwiss., 11, 873-875.
7. Ferraro J. and Nakamoto K. (1994), Introductory Raman Spectroscopy, Academic Press Inc., New York.

8. Ayars E.J., Jahncke C.L., Paesler M.A. and Hallen H.D. (2000), Fundamental differences between micro- and nano-Raman Spectroscopy, J. Microsc-Oxford, 202, 142-147.
9. Williams K.J.P., Pitt G.D., Balchelder D.N. and Kip B.J. (1994), Confocal Raman micro-spectroscopy using a sligmatic spectrograph and CCD detector, Appl. Spectrosc., 48, 232-235.
10. Baldwin K.J., Batchelder D.N. and Webster S. (2001), Raman Microscopy: Confocal and Scanning Near-Field, Chapter 4 in The Handbook of Raman Spectroscopy, eds. I.R. Lewis and H.G.M. Edwards, Marcel Dekker Inc., New York.
11. Woodbury E.J. and Ng W.K. (1962), Ruby laser operation in the near IR, Proceedings of the Institute of Radio Engineers, 50, 2367.
12. Turrell G. and Corset J. (eds.) (1996), Raman Microscopy: Developments and Applications, Academic Press, London.
13. Moskovits M. (1985), Surface-enhanced Spectroscopy, Reviews of Modern Physics, 57(3), Part 1, 783.
14. Betzig E., Finn P.L. and Weiner J.S. (1992), Combined shear force and nearfield optical microscopy, Appl. Phys. Lett., 60, 2484.
15. Goetz M., Drews D., Zahn D.R.T. and Wannamacher R. (1998), Near-field Raman speclroscopy of semiconductor heterostructures and CVD diamond layers, J. Lumin., 76-77, 306-309.
16. Young R.J. (1997), Analysis of composites using Raman and fluorescence microscopy - a review, J. of Microsc-Oxford, 185, Part 2, 199-205.
17. Young R.J. (1996), Evaluation of composite interfaces using Raman Spectroscopy, Key Engineering Materials, 116, 173-192.
18. Gaiiotis C. (1998), Micromechanics of reinforcement using laser Raman Spectroscopy, Chapter 8 in Microstrncmml Characterisation of Fibre-reinforced Composites, ed. J. Snmmerscales, Woodhead Publishing Ltd.
19. Binnig G., Rohrer H., Gerber C.H. and Weibel E. (1982), Surface studies by scanning tunnelling microscopy, Phys. Rev. Lett, 49, 57-61.
20. Binnig G., QuateCF. and Gerber C.H. (1986). Atomic force microscopy, Phys. Rev. Lett., 56, 930-933.
21. Umeda N., Ishizaki S. and Uwai H. (1991), Scanning attractive force microscope using photothermal vibration. J. Vac. Sci Tech. B, 9, 1318-1322.
22. Yang J., Tamm L.K., Sonlyo L.P. and Shao Z. (1993), Promises and problems of biological AFM, J. Microsc-Oxford, 171, Part 2, 183-198.
23. Hu J., Xiao X.D., Ogletree D.F. and Salmeron M, (1995), Scanning polarisation force microscopy: a technique for imaging liquids and weakly adsorbing layers, Appl. Phys. Lett., 67, 466-468.
24. Hsiao J. (1999), Correcting scan errors, Microscopy Today.
25. Abbe E., (1873), Archiv f. Microskop. Anal, 9, 413.
26. Synge E.H. (1928), A suggested method for extending microscopic resolutions into the ultra-microscopic region, Phil. Mag., 6, 356-362.
27. Pohl D.W., Denk W. and Lanz M. (1984), Optical stethoscopy - image recording with resolution lambda/20, Appl. Phys. Lett., 44, 651-653.
28. Mariani T., Ascoli C., Baschieri P., Frediani C. and Musio A. (2001), Scanning force images through the 'Milliscope' - a probe microscope with a very wide scan range, J. Microsc-Oxford, 204, Part 1, 53-60.

29. Kalkbrenner T., Ramstein M., Mlynck J. and Sandoghdar V. (2001), A single gold particle as a probe for apertureless scanning near-field optical microscopy, J. Microsc-Oxford, 202, 72-76.
30. Frohn J.T., Knapp H.F. and Stemmer A. (1997), True optical resolution beyond the Rayleigh limit achieved by standing wave illumination, PNAS, 7232-7236.
31. Zayats A.V. and Sandoghdar V. (2001), Apertureless near-field optical microscopy via local second-harmonic generation, J. Microsc-Oxford, 202, Part 1, 94-99.
32. Subramaniam V. (2001), Biological applications of multi-photon NSOM with multiple spectroscopic modes, Microscopy & Analysis, January, 13-14.
33. Hamann H.F., Kuno M., Gallagher A. and Nesbitt N.J. (2001), Molecular fluorescence in the vicinity of a nanoscopic probe, J. Chem Physics, 114(19), 8596-8610.
34. Milner R.G. and Richards D. (2001), The role of tip plasmons in near-field Raman microscopy, J. Microsc., 202, 66-71.
35. Yamaguchi M., Sasaki Y., Sasaki H., Konada T., Horikawa Y., Ebina A., Umezawa T. and Horiguchi T. (1999), Imaging of optical disc using reflection-mode, scattering type, scanning near-field optical microscopy, J. Microsc-Oxford, 194, 552-557.
36. Inouye Y. and Kawata S. (1997), Reflection-mode, near-field, optical microscope with a metallic probe tip for observing fine structures in semiconductor materials, Opt. Comtnun., 134, 31-35.
37. Silva T.J., Schultz S. and Weller D. (1994), Scanning near-field optical microscope for the imaging of magnetic domains in optically opaque materials, Appl Phys. Lett., 65, 658-660.
38. Smith D.A., Webster S., Ayad M., Evans S.D., Fogherty D. and Batchelder D.N. (1995), Development of a scanning near-field optical probe for localised Raman spectroscopy, Ultramicroscopy, 61, 247-252.
39. Webster S., Smith D.A. and Batchelder D.N. (1998), Raman microscopy using a scanning near-field optical probe, Vibrat. Spectrosc., 18, 51-59.
40. Webster S., Batchelder D.N. and Smith D.A. (1998), Sub-micron resolution measurement of stress in silicon by near-field Raman spectroscopy, Appl. Phys. Lett., 72, 1478-1480.
41. Bonera E., Fanciulli M. and Batchelder D.N. (2002), Raman spectroscopy for a micrometric tensorial analysis of stress in silicon, Appl Spec., 56(5), 560-563.
42. DeWolf I., Maes H.E. and Jones S.K. (1996), Stress measurements in silicon devices through Raman spectroscopy: Bridging the gap between theory and experiment, J. Applied Phys., 79, 7148-7156.
43. Narita Y., Tadokoro T., Ikeda T., Saiki T., Mononobe S. and Ohtsu M. (1998), Near-field Raman spectral measurement of polydiacetylene, Appl. Spectrosc., 52(9), 1141-1144.
44. Webster S., Demangeot F., Bonera E., Sands H.S., Bennett R., Hayward I.P., Marchi F.. Smith D.A. and Batchelder D.N. (2002), Development of a combined confocal and scanning near-field microscope for deep UV laser excitation, in press.
45. Schultz C.P. (2001), Precision infrared spectroscopic imaging: the future of FT-IR spectroscopy, Spectroscopy, 16(10),
46. Hersehel W. (1800), Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects, Phil. Trans. Roy. Soc. London, 90, 255-283.
47. Hersehel W. (1800), Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun, Phil Trans. Roy. Soc. London, 90, 284-292.

48. Hersehel W. (1800), Experiments on the solar, and on the terrestrial rays that occasion heat: Part I, Phil. Trans. Roy. Soc. London,, 90, 293-326.
49. Hersehel W. (1800), Experiments on the solar, and on the terrestrial rays that occasion heat: Part II, Phil. Trans. Roy. Soc. London, 90, 437-538.
50. Birtwell N.C., Clarke A.R., Marsden P.L., Reehal J.S. and Smith C.D. (1983), Observations of large scale emission in the far infrared, Proc. of the VIth ESA-PAC Symposium on European Rocket & Balloon Programmes & Related Research, Interlaken, April 1983 (ESA Publication, SP-183 June 1983), pp. 435-443.
51. Fellgett P.B. (1984), 3 concepts make a million points, Infrared Physics, 24(2-3), 95-98.
52. Jacquinot, P. (1984), How the search for a throughput advantage led to Fourier Transform Spectroscopy, Infrared Physics, 24(2-3), 99-101.
53. Connes, P. (1986), From Newtonian fits to Wellsian heat rays - the history of multiple beam interference, J. Opt., 17(1), 5-28.
54. Tsien R.Y. and Poenie M. (1986), Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling, Trends Biochem. Sci., 11, 450-455.
55. Cole M.J., Siegel J.. Webb S.E.D.. Jones R., Dowling K., Dayel M.J., Parsons-Karavassilis D., French P.M.W., Lever M.J., Sucharov L.O.D., Neil M.A.A.. Juskaitis R. and Wilson T. (2001), Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning, J. Microsc-Oxford, 203, Part 3, 246-257.
56. Neil M.A.A., Squire A., Juskaitis R., Bastiaens P.I.H. and Wilson T. (2000), Wide-field optically sectioning fluorescence microscopy with laser illumination, J. Microsc-Oxford, 197, 1-4.
57. Carlsson K. and Liljeborg A. (1998), Simultaneous confocal lifetime imaging of multiple fluorphores using the intensity-modulated multiple-wavelength scanning (IMS) technique, J. Microsc-Oxford, 191, 119-127.
58. Straub M. and Hell S,W. (1998), Fluorescence lifetime three-dimensional microscopy with picosecond precision using a multi-focal, multi-photon microscope, Appl Phys. Lett., 73, 1769-1771.
59. Verveer P.J., Hanley Q.S., Verbeek P.W., Van Vliet L.J. and Jovin T.M. (2001); Theory of confocal fluorescence imaging in the programmable array microscope (PAM), J. Microsc-Oxford, 189, Part 3, 192-198.
60. Liang M., Stehr R.L. and Krause A.W. (1997), Confocal pattern period in multiple-aperture confocal imaging systems with coherent illumination, Opt. Lett., 22, 751-753.
61. Hanley Q.S., Verveer P.J., Gemkow M.J., Arndt-Jovin D. and Jovin T.M. (1999), An optical sectioning programmable array microscope implemented with a digital micromirror device, J. Microsc-Oxford, 196, 317-331.
62. Hanley Q.S., Verveer P.J., Gemkow M.J., Arndt-Jovin D. and Jovin T.M. (2000), Three-dimensional spectral imaging by Hadamard transform spectroscopy in a programmable array microscope, J. Microsc-Oxford, 197, 5-14.
63. Heintzmann R., Hanley Q.S., Arndt-Jovin D. and Jovin T.M. (2001), A dual path programmable array microscope (PAM): simultaneous acquisition of conjugate & non-conjugate images, J. Microsc-Oxford, 204, Part 2, 119-137.
64. Dunkers J.P., Pamas R.S., Zimba C.G., Peterson R.C., Flynn K.M., Fujimoto J.G. and Bouma B.E. (1999). Optical coherence tomography of glass-reinforced polymer composites, Composites Part A: Applied Science & Manufacturing, 30, 139-145.

65. Kenney J.M., JacobsenC., KirzJ., Rarback H., Cinotti F., Thomlinson W., Rosser R. and Schidlovsky G. (1985), Absorption microanalysis with a scanning soft x-ray microscope: mapping and distribution of calcium in bone, J. Microsc-Oxford, 138, 321-328.
66. Zhang X., Balhorn R., Mazrimas J. and Kirz J. (1996), Mapping and measuring DNA to protein ratios in mammalian sperm head by XANES imaging, J Struct. Biol., 116, 335-344.
67. Meyer-Use W., Medecki H., Jochum L., Anderson E., Attwood D., Magowan C., Balhorn R., Moronne M., Rudolph D. and Schmahl G. (1995), New high resolution zone plate microscope at Beamline 6.1 of the ALS, Synchrotron Radiation News, 8, 29-33.
68. Meyer-Use W., Denbeaux G., Johnson L.E., Bates W., Lucero A. and Anderson E. (1999), The high resolution X-ray microscope, XM1, X-ray Microscopy: Proc. 5th Int. Conf. on X-ray Microscopy, Berkeley August 2-6 (ed. Meyer-Use, Warwick & Attwood) pp 129-134. AIP Conf Proc 507, American Institute of Physics, College Park.
69. Niemann B., Rudolph D. and Schmahl G. (1983), The Gottingen X-ray microscopes, Nucl. Inst. Methods, 208, 367-371.
70. Ice G. and Bai J.M. (2000), www.ornl.gov/news, as reported in 'Letting the grains show their strains', Materials World, May, 20-2J.
71. Berglund M., Rymell L., Peuker M., Wilhein T. and Hertz H.M. (2000), Compact water-window transmission X-ray microscopy, J. Microsc-Oxford, 197, Part 3, 268-273.
72. Darlington M.W., McGinley P.L. and Smith G.R. (1976), Structure and anisotropy of stiffness in glass fibre-reinforced thermoplastics, J. Mat. Sci,, 11, 877-886.
73. Geier M.H. (1994), Quality Handbook for Composite Materials, Chapman & Hall Publishers, pp. 225-232.
74. Maisl M., Scherer T., Reiter H. and Hirsekorn S. (1988), Nondestructive investigation of fibre reinforced composites by x-ray computed tomography, in Nondestructive Characterisation of Materials, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C. Ruud and R. Green, Spring er-Verlag, pp 147-154.
75. Awaji M., Suzuki Y., Takeuchi A., Takano H., Kamijo N.. Tamura S. and Yasumoto M. (2001), X-ray imaging microscopy at 25 keV with Fresnel zone plate optics, Nucl. Instrum. Meth. A., 467(2), 845-848.
76. Herman G.T. (1980), Image Reconstruction from Projections: the Fundamentals of Computed Tomography, Academic Press, New York.
77. Shepp L.A. and Vardi Y. (1982), Maximum likelihood reconstruction for emission tomography, IEEE Trans. Med. Imaging, 1, 113-122.
78. Feldkamp L.A., Davic L.C. and Kress J.W. (1984), Practical cone-beam algorithm, J. Opt. Soc. Am., 1(6), 612-619.
79. Hsieh J. (1995), Image artifacts, causes, and correction, in Medical CT and Ultrasound: current technology and applications, eds. L.W. Goldman and J.B. Fowlkes. Advanced Medical Publishing, Madison.
80. Gong R.H. and Newton A. (1996), Image-analysis techniques Part II: The measurement of fibre orientation in nonwoven fabrics, J. Text. L, 87(2), 371-388.
81. Pourdehyhimi B., Dent R., Jerbi A., Tanaka S- and Deshpande A. (1999), Measuring fiber orientation in nonwovens, Part V: Real webs, Text. Res. J., 69(3), 185-192.

82. Xu B.G. and Yu L. (1997), Determining fiber orientation distribution in nonwovens with Hough transform techniques, Text. Res. J., 67(8), 563-571.
83. Tao X.M. (1996), Mechanical properties of a migrating fibre, Text. Res. J., 66(12), 754-762.
84. Huh Y., Kim Y.R. and Ryu W.Y. (2001), Three-dimensional analysis of migration and staple yarn structure, Text Res. J., 71(1), 81-90.
85. Papathanasiou T.D. and Guell D.C. (eds.) (1997), Flow-induced Alignment in Composite Materials, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
86. Kang T.J. and Lee S.H. (1999), Characterization of reinforcing web structures in needle punched nonwoven composites, J. Сотр. Mater., 33(22), 2116-2132.
87. Eberhardt C.N. and Clarke A.R. (2002), Automated reconstruction of curvilinear fibres from 3D datasets acquired by X-ray microtomography, J. Microsc-Oxford, 206, Part 1, 41-53.
88. Jia X., Gopinathan N., Williams R.A., Eberhardt C.N. and Clarke A.R. (2001), X-ray Microtomography Facilitated Modelling of Microstructures, Proc. 2nd World Congress on Industrial Tomography, Hannover, Germany, August, pp. 451-460.
89. Pyrz R. (1999), Application of X-ray microtomography to the study of polymer composites, Proceedings of the ICCM12, Paris, July, p. 479.

Глава 6

Другие микроскопические методы

Резерфорд предложил своим аспирантам, Гейгеру и Марсдену, исследовать рассеяние альфа-частиц высокой энергии тонкой металлической фольгой. Когда те сообщили, что одна из 8000 частиц отклонилась на угол, превышающий прямой, Резерфорд заметил: «Это как если бы Вы выстрелили из 15-дюймового корабельного орудия по бумажной салфетке и снаряд отразился бы от нее под прямым углом и попал в Вас!»

... из книги " Пионеры науки" Р.Л. Вебера

Имеются три причины применения неоптических методов исследования структуры:

1. Чтобы достичь более высокого разрешения, чем в оптическом микроскопе.
2. Чтобы исследовать материалы, непрозрачные в оптическом диапазоне.
3. Чтобы определить физические параметры, которые не удается измерить с помощью электромагнитного излучения.

Пространственное разрешение различных экспериментальных методов описано в главе 1. Согласно критерию Рэлея разрешение повышается при использовании излучения с более короткой длиной волны (вследствие наличия дифракционного предела разрешения, свойственного линзам микроскопа и апертурам). Следовательно, разрешение можно улучшить, если использовать ультрафиолетовое или рентгеновское излучение.

Де Бройль предположил, что элементарные частицы с импульсом p представляют собой волну, длина которой λ определяется формулой:

$$\lambda = h/p, \tag{6.1}$$

где h - постоянная Планка. Как следствие, возможно создание микроскопов нового типа. Если электроны высокой энергии удастся фокусировать подобно лучам света, то предел разрешения согласно критерию Рэлея будет равен их длине деб-

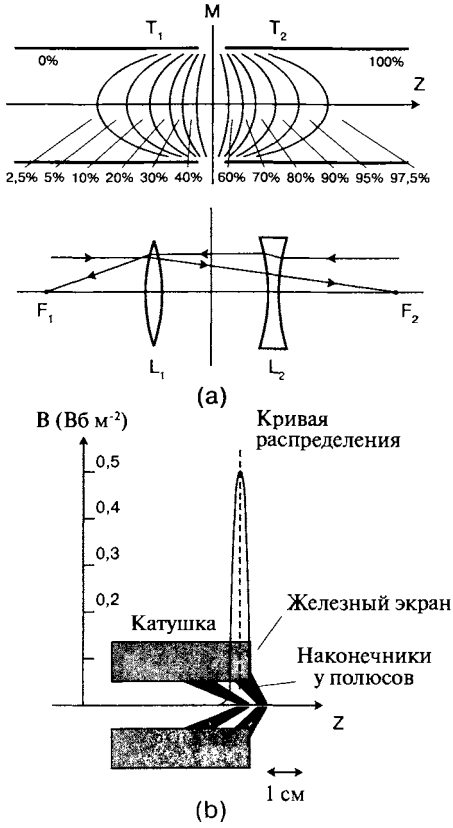


Рис. 6.1. Использование магнитных и электростатических линз для преломления и фокусировки пучка электронов. (а) – Создание разницы потенциалов между двумя цилиндрическими трубами порождает показанное распределение эквипотенциалей. Электроны, движущиеся через трубы вблизи оси Z, будут отклоняться точно так же, как преломляются (и фокусируются) лучи света системой из собирающей линзы L_1 и расссеивающей линзы L_2. (b) - Альтернативный метод фокусировки электронов состоит в использовании магнитной катушки, окруженной железным экраном и имеющей форму наконечника у полюсов для концентрации магнитного поля при пропускании тока через катушку. Данная конструкция представляет собой короткофокусную линзу

ройлевской волны. В электронных микроскопах траекторией электронов управляют с помощью электростатического и магнитного полей. Электроны фокусируются так же, как стеклянные линзы фокусируют свет в оптических микроскопах (рис. 6.1 и 6.2). Взаимодействие электронов с образцом (который обычно помещается в вакуумной камере для предотвращения рассеяния электронов молекулами воздуха) позволяет получать разрешение порядка нанометра [1, 2].

В настоящее время благодаря новым методам сканирования достигнуто пространственное разрешение атомного масштаба [3]. В 1986 г. Эрнст Руска вместе с немецкими учеными Гертом Биннигом и Генрихом Рорером получили Нобелевс-

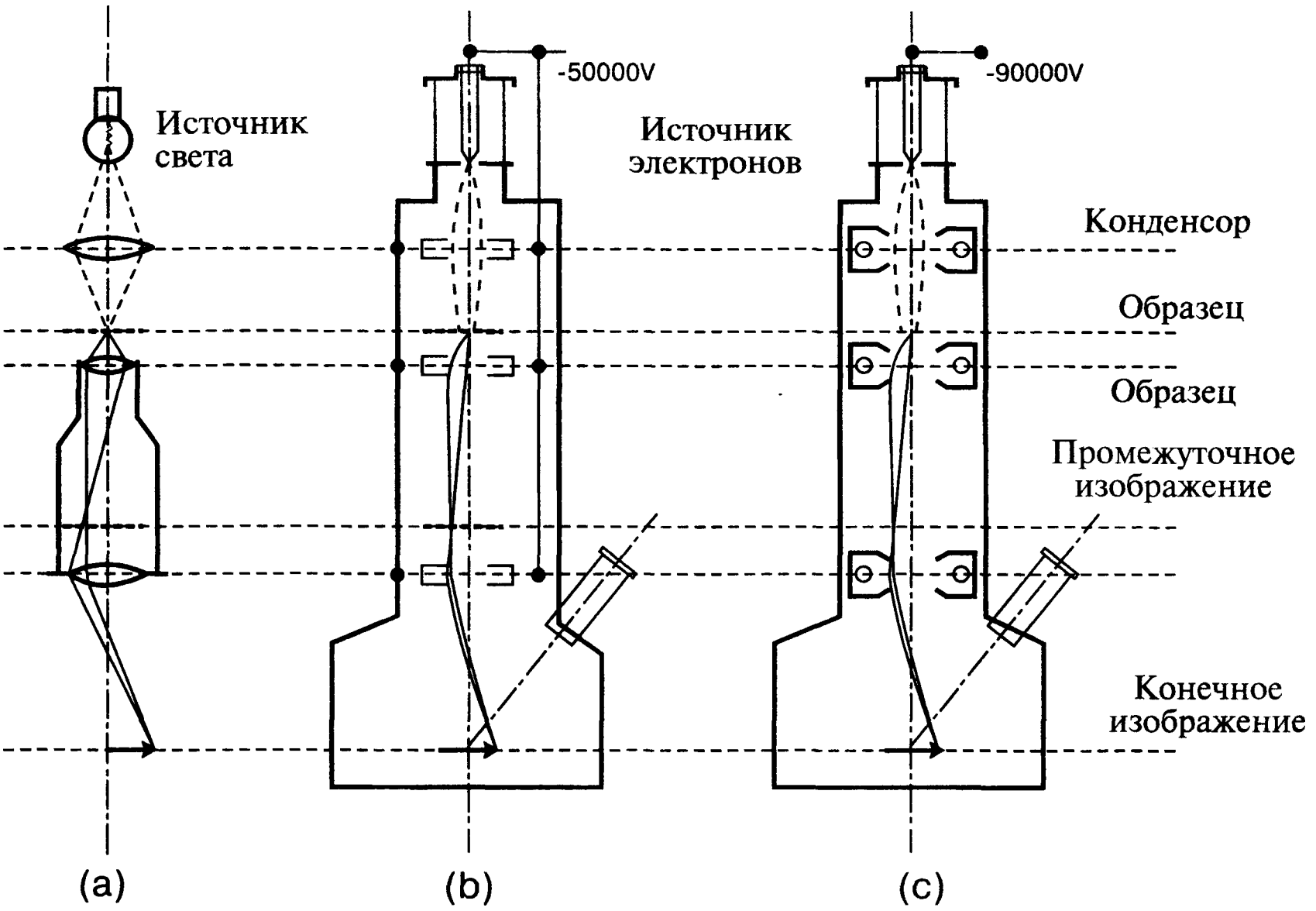


Рис. 6.2. Принципы работы оптического микроскопа (a), электронного микроскопа с электростатической фокусировкой (b) и электронного микроскопа с магнитной фокусировкой (c)

кую премию по физике за развитие в 1981 г. сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) [4, 5]. Роль этого микроскопического метода будет расти в связи с развитием нанотехнологии. Однако по сравнению с СТМ электронные микроскопы при столь же высоком разрешении имеют значительно большую глубину (около 10 мкм), и поэтому широко используются в материаловедении при исследованиях микро- и мезоструктуры материала.

Методы сканирующей атомной микроскопии в основном применяются для изучения поверхности образца, а другие методы позволяют выявлять неоднородности в его толще. Структуру материала можно исследовать с помощью нейтронов, рентгеновских лучей или электронов. Нейтроны взаимодействуют с ядрами атомов, рентгеновское излучение – с электронами, а электроны – с электростатическими потенциалами. Поскольку рентген и нейтроны поглощаются значительно слабее электронов, применение нейтронных и рентгеновских методов обеспечивает значительно большую глубину проникновения в образец.

6.1. Растровая и просвечивающая электронная микроскопия

Существуют электронные микроскопы двух типов: растровый электронный микроскоп (РЭМ) и просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ). На рис. 6.3 изображен первый коммерческий электронный микроскоп, выпущенный в 1965 г. фирмой Cambridge Instruments. Современный электронный микроскоп, поставляемый на рынок фирмой Philips, показан на рис. 6.4. Это дорогостоящие устройства, требующие создание вакуума в рабочей камере. Исключением являются

РЭМ, работающие в условиях окружающей среды. Кроме того, образец должен обладать проводимостью, и поэтому, например, на поверхность биологического объекта необходимо нанести слой золота. При использовании просвечивающего электронного микроскопа образец должен иметь очень малую толщину, а контраст изображения обусловлен пространственными вариациями интенсивности пучка электронов, прошедшего через него при сканировании. В РЭМ изображение можно получить разными способами – начиная от сигнала вторичных электронов, вылетающих из образца, вплоть до рентгеновского излучения, вызываемого неупругими столкновениями первичного пучка со связанными электронами.

Идея построения электронного микроскопа состоит в том, что, подобно преломлению и фокусировке света оптической линзой, электронный пучок можно отклонять и фокусировать магнитным или электрическим полем. Пучок электронов можно фокусировать электрическим или магнитным полем. Схематическое изображение конфигурации ПЭМ приводится на рис. 6.2b и 6.2c. Электроны вылетают из нагреваемого катода, ускоряются по направлению к положительно заряженной решетке, пролетают сквозь электростатическую или магнитную линзу и направляются на объект. Для уменьшения рассеяния электронов при прохождении сквозь образец его располагают на тончайшей пленке. Пучок ослабляется в зависимости от толщины и состава объекта в конкретной точке. Затем он проходит через две линзы и проецируется на флуоресцентный экран, фотопластинку, на сцинциллятор фотоумножителя или на ПЗС-матрицу. Сцинциллятор является полупрозрачным материалом, излучающим свет при пролете электрона. Пространственное разрешение микроскопа определяется длиной дебройлевской вол-

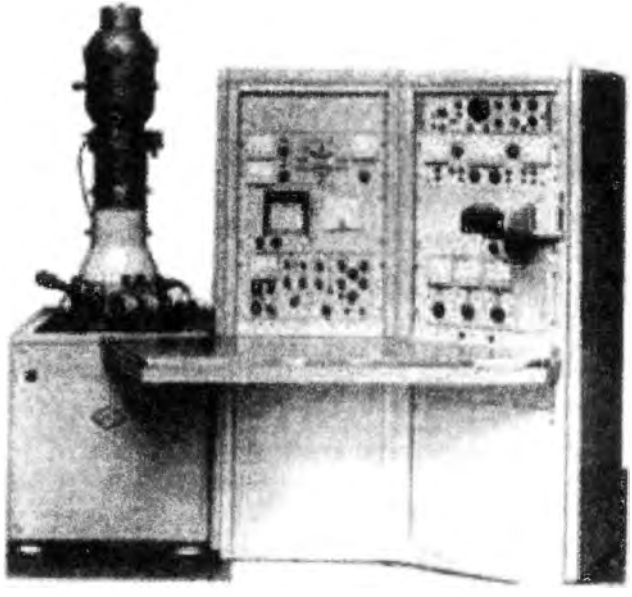


Рис. 6.3. Фотография первого промышленно выпущенного электронного микроскопа фирмы Cambridge Instruments Ltd (фото представлено с любезного разрешения фирмы Leica).

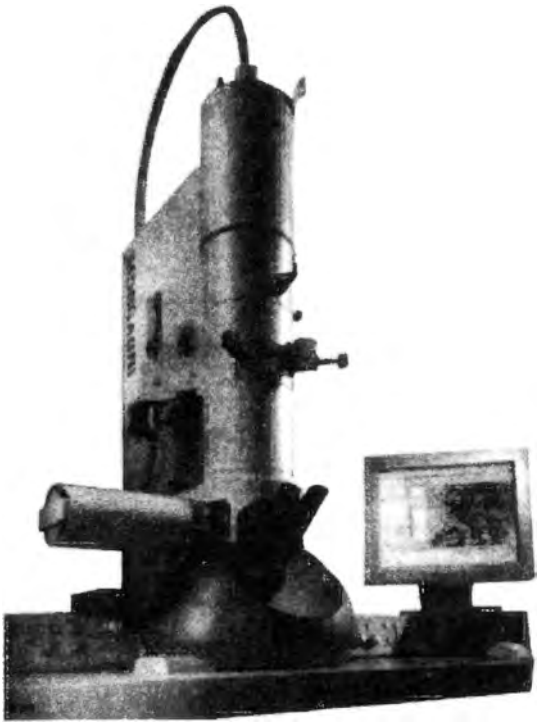


Рис. 6.4. Фотография одного из самых современных растровых электронных микроскопов, выпускаемых фирмой Philips.

ны электрона, которая при ускоряющих напряжениях порядка десятков кэВ в 105 раз короче длины световой волны.

В ПЭМ высокого (нанометрического) разрешения используют сверхтонкие микротомированные образцы толщиной 40–60 нм. При этом можно обнаружить особенности структуры размером менее одного нанометра. На рис. 6.2b и 6.2c приведена схема трансмиссионного электронного микроскопа. Пучок параллельных электронов рассеивается объектом, проходит через рассеивающую линзу L и создает в фокальной плоскости промежуточную дифракционную картину. Конечное оптическое изображение образуется в плоскости Гаусса. Чтобы увеличенное изображение являлось Фурье-образом исходной структуры, все лучи должны интерферировать с сохранением первоначальных фаз. Объектив вызывает появление дополнительных фазовых сдвигов. Эти сдвиги зависят от сферической аберрации линз C1, угла преломления 2θ относительно оптической оси и дефокусного расстояния Δf. Функция передачи K электронной линзы равна [6]:

$$K(u) = D(\lambda f u)e^{-i\chi(u)} \tag{6.2}$$

$$\chi(u) = \pi(C_s \lambda^3 u^4 - \lambda \Delta f u^2)/2, \tag{6.3}$$

где D - характеристическая функция объектива, $\chi(u)$ - функция аберрации, u – пространственная частота ($u = 2\theta/\lambda$), f – фокусное расстояние и λ – длина волны.

Объектив действует подобно пространственному фильтру, отбирая и изменяя фазу волн, что может создавать помехи в плоскости изображения.

Типичное ускоряющее напряжение составляет V = 120 кВ, и энергия электронов равна $E = 120$ кэВ. Один электронвольт (эВ) эквивалентен энергии $1{,}6\times10^{-19}$ джоулей, и длина волны де Бройля λ для таких электронов на основе выражения (6.4) оценивается как $3{,}35\times10^{-3}$ нм.

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2Em_e}}, \tag{6.4}$$

где m_e – масса электрона. Потенциально электронная микроскопия имеет самую высокую разрешающую способность по сравнению с другими микроскопическими методами, обсуждаемыми в настоящей книге. Пути оптимизации конструкции электронного микроскопа для получения наивысшей разрешающей способности обсуждаются в статье [7]. В этой работе утверждается, что традиционный критерий Рэлея для разрешения двух точечных источников является удобным эмпирическим правилом, но не подходит для новейших компьютерных микроскопических методов. Электронный (как и любой другой) микроскоп можно рассматривать как канал, несущий информацию от объекта к наблюдателю [8]. Чтобы извлечь как можно больше количественной информации, следует прибегнуть к комлексной модели получения изображения, описывающей:

(i) взаимодействие электрон-объект;
(ii) приборную функцию передачи информации, характеризующую микроскоп;
(iii) приборную функцию датчика, создающего изображение (например, ПЗС-матрицы).

Математическая модель, описывающая получаемую дифракционную картину, содержит заранее неизвестные параметры (координаты атомов), которые должны быть определены в ходе эксперимента. Определение структуры может быть достигнуто сопоставлением модели и опытных данных в рекуррентной процедуре, постепенно уточняющей искомые параметры. Это позволяет получить данные о деталях за пределами критерия разрешения Рэлея (и даже за информационным пределом микроскопа), поскольку при отсутствии шумов процедура подбора модели будет безупречной и позволит получать точные значения параметров модели! На практике, однако, результаты всегда ограничены шумом, например, порожденным дискретным характером подсчета, обусловленным количеством электронов в исходном пучке. В статье [7] обсуждается точность определения положения отдельного атома из ПЭМ-снимков.

В растровых электронных микроскопах (РЭМ) регистрируют вторичные электроны низкой энергии ($E_e < 50$ эВ) с помощью сцинцилляционного детектора или фотоумножительной трубки. При столь низких энергиях вторичные электроны могут испускаться лишь с глубины несколько нанометров от поверхности образца. Заметим, что разрешающая способность РЭМ близка к атомно-силовому микроскопу (АСМ), подробно обсуждавшемуся в главе 5. Так что закономерен вопрос о сравнительных преимуществах и недостатках этих микроскопов при исследованиях наноструктуры материалов.

Рассмотрим исследование поверхности тонких пленок. РЭМ способен получать изображение на большой площади (порядка нескольких миллиметров), а

типичная площадь съемки АСМ составляет 100×100 мкм. В РЭМ изменение наклона поверхности может вызвать рост интенсивности изображения, а градиент наклона поверхности определяется неоднозначно. Напротив, АСМ однозначно обнаруживает поверхностные градиенты. В производстве полупроводников эти методы используют для исследования структур с высокой степенью неровности (со множеством канавок). При использовании РЭМ образец раскалывают и получают изображение поверхности раскола. АСМ можно использовать без разрушения образца, но следует проявлять осторожность при выборе формы иглы консоли. Если на поверхности имеются «нависающие» структуры, игла АСМ обнаружить их не способна. Наконец, если образец имеет неровную поверхность (от сотен микрон до миллиметров по вертикали), можно использовать РЭМ (из-за большой глубины), а АСМ может регистрировать вертикальные элементы высотой лишь 5–10 мкм.

Традиционно электронные микроскопы работают в вакууме, в то время как АСМ обычно применяют в стандартных лабораторных условиях или при погружении в жидкость. Потребность в вакууме является серьезным недостатком многих методов исследования. Поэтому очевидна актуальность последних работ, направленных на создание растрового электронного микроскопа, функционирующего в условиях окружающей среды (ESEM) [9-12]. Хотя его разрешающая способность ниже, чем у вакуумных РЭМ, их появление открыло новые сферы применения электронных микроскопов.

На рис. 6.5 схематически показаны электроны и электромагнитное излучение, возникающие при ударе электронного пучка высокой энергии по образцу. Большинство электронных микроскопов имеет дополнительные устройства, позволяющие анализировать рентгеновское излучение или энергетические спектры вторичных электронов. Эти устройства являются мощным орудием изучения химического состава поверхности. Имеется множество сокращений, обозначающих различные методы электронной микроскопии. Например, методы изучения распределения энергии рентгеновских лучей (EDX), распределения длины рентгеновских лучей (WDX), обратную дифракцию электронов (EBSD), токи, индуцированные пучком электронов (EBIC), рентгеновскую фотоэлектронную спектроскопию (XPS) и электронную Оже-спектроскопию (AES). Ниже упоминаются только некоторые из них, а заинтересованные читатели могут посетить интернет-сайты фирм-производителей электронных микроскопов, например, Oxford Instruments и Leica [13], где они найдут более конкретную информацию.

Рис.6.5. При столкновении электронов с материалом появляются отраженные электроны, рентгеновское излучение и катодолюминесценция.

6.1.1. Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия и Оже-спектроскопия

Существует метод, оказавший большое влияние на исследование поверхности, и особенно анализа химического элементного состава поверхности образцов. Его называют рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией (РФС) [14]. Он основан на фотоионизации, возникающей при ударе о поверхность рентгеновского фотона. Образец помещают в вакуумную камеру, и на него направляют монохроматический пучок мягких рентгеновских лучей или электронов. Обычно выбирают рентгеновские K_α линии магния или алюминия. Рентгеновские лучи (или электроны) вызывают фотоионизацию, а кинетическую энергию излучаемых фотоэлектронов измеряют, пропуская их через анализатор энергии (времяпролетный магнитный анализатор или электростатический анализатор энергии). Энергетика процесса фотоионизации описывается уравнением:

$$h\nu = E_B + E_K, \tag{6.5}$$

где $h\nu$ - энергия падающего рентгеновского фотона (или электрона), E_B – энергия выхода (ионизации) электрона на определенном энергетическом уровне и E_K –

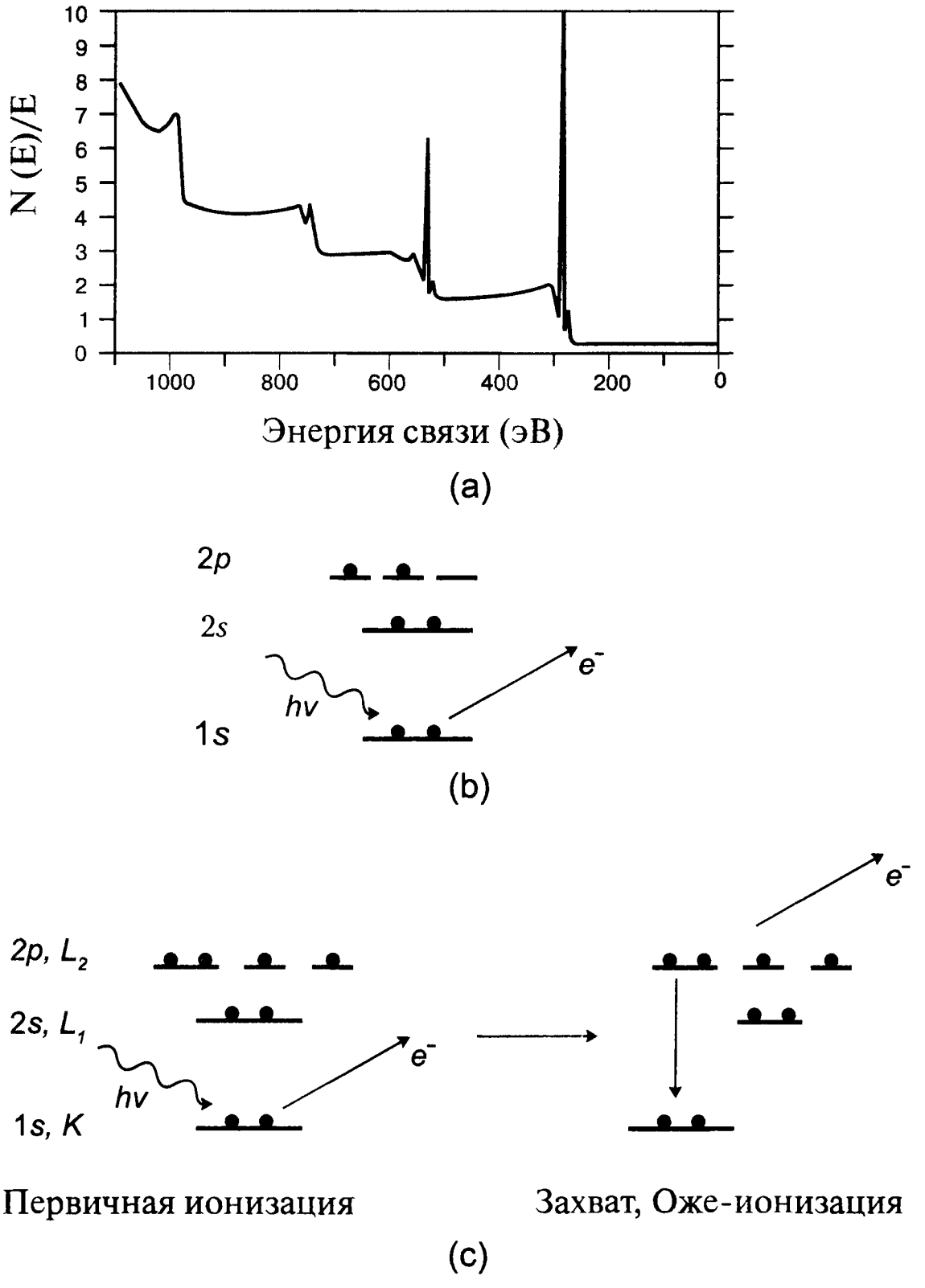


Рис. 6.6. (a) - Типичный спектр рентгеновских фотоэлектронов для армированного стекловолокнами композита на основе полиэфирной матрицы. (b) - Схема, демонстрирующая ионизацию 1s-электрона атома углерода и (c) - схема KLL Оже-процесса на примере атома кислорода.

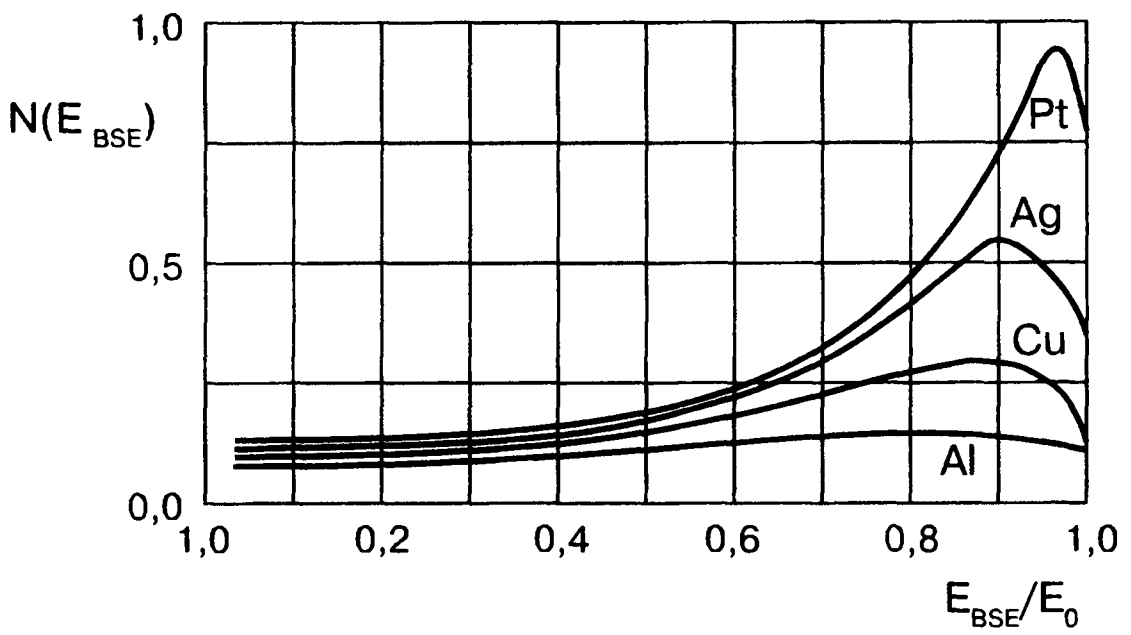


Рис. 6.7. Энергетические спектры отраженных электронов для мишеней из материалов с различным Z. Значительная доля отраженных электронов имеет энергию, близкую к начальной.

кинетическая энергия фотоэлектрона. Измерение кинетической энергии фотоэлектрона позволяет определелить энергию выхода и, как следствие, идентифицировать атом поверхности, из которого он был выбит. Это позволяет получить информацию о химической структуре поверхности. Типичный результат имеет вид графика числа выбитых электронов (пропорционального интенсивности сигнала) в зависимости от энергии связи или от их кинетической энергии, как показано на рис. 6.6a. Интерпретация такого графика для стеклопластика, облучаемого магниевым K_α источником рентгена, приведена на рис. 6.6b и 6.6c.

Пики в спектре указывают на присутствие кислорода и углерода, заметны также характеристические Оже-пики этих элементов. Энергия падающих рентгеновских фотонов (или электронов) более чем достаточна для выбивания электронов 1s, 2s и 2p уровней углерода и кислорода. Оже-процесс обусловлен вторичной ионизацией, когда «дырка», возникшая при выбивании электрона, захватывает электрон с более высокого энергетического уровня. Ионизированный электрон с верхнего уровня представляет собой Оже-электрон. Сокращенное название этого метода (AES) расшифровывается как «электронная Оже-спектроскопия». Встречается также обозначение X-AES для Оже-спектроскопии электронов, возбуждаемых рентгеновскими фотонами. Со сканирующей Оже-микроскопией можно познакомиться в работе [15]. Методом Оже-спектроскопии регистрируются все элементы, за исключением водорода и гелия. Применение сканирующей Оже-микроскопии обсуждается также в работе [16].

Привлекательной особенностью рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии является чрезвычайно высокая чувствительность. Вклад в пики энергетического спектра дают лишь электроны, которые не теряют энергию между точкой образования и датчиком электронного сигнала. Если они неупруго рассеиваются, теряют часть энергии и уходят в фон. Типичная глубина выхода электронов (с высокой вероятностью образования спектральных пиков) составляет 0,5–3 нанометра, что равно глубине проникновения. С применением этого метода для исследования композитов можно ознакомиться в работе [14].

6.1.2. Спектроскопия отраженных электронов и спектроскопия энергопотерь электронов

Отраженные электроны – это электроны первичного пучка, упруго столкнувшиеся с атомами мишени, изменившие свою скорость на противоположную и вы-

летевшие за пределы образца. Можно изучать энергию и распределение по углу рассеяния этих электронов, а также поперечную скорость в зависимости от энергии падающего пучка и угла наклона образца. На рис. 6.7 показано распределение энергии отраженных электронов в зависимости от энергии первичного пучка. Обратим внимание, что мишень с более высоким атомным номером дает большее количество высокоэнергетичных отраженных электронов. Это служит основой получения изображения. Одной из областей применения этого метода был анализ распределения неорганических частиц в костях [17], поскольку кальций по контрасту отличается от более легких углерода, кислорода и азота, составляющих органическую фракцию кости.

Для повышения точности измерения процесс отражения электронов моделируют методом Монте Карло [18,19]. Недавно в Интернете была размещена база данных, содержащая тысячи результатов исследования различных материалов методом отраженных электронов [20].

Аналогичным методом является спектроскопия энергетических потерь электронов [21]. Классическое рассеяние электрона состоит в его столкновении с ядром, экранированным электронным облаком. Амплитуда рассеяния определяется главным образом зарядом иона при малых углах рассеяния. Новые модели электронных микроскопов разрешают тонкую структуру спектров энергопотерь электронов вблизи края полосы поглощения, что позволяет определить про-

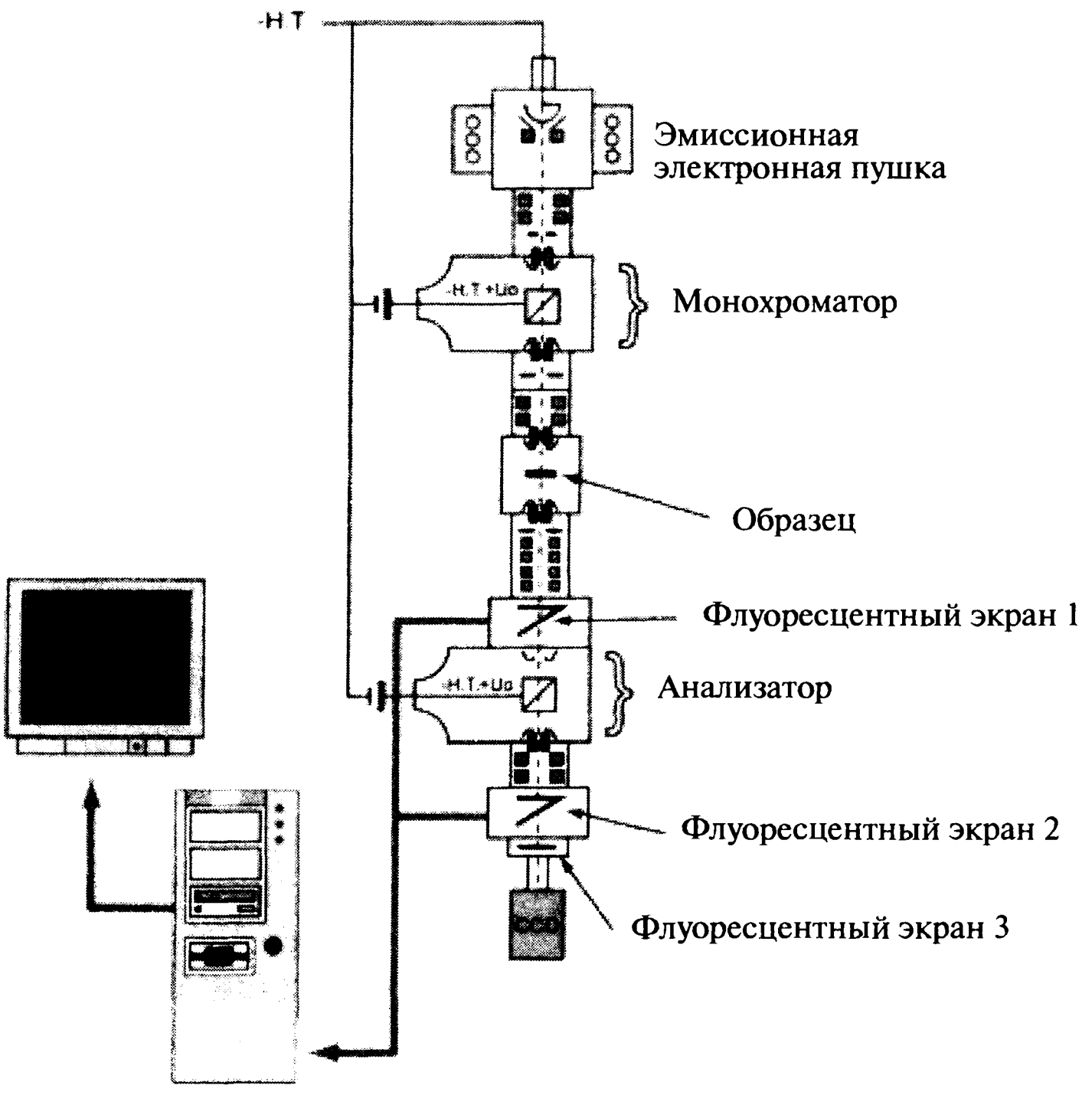


Рис. 6.8. Схема микроскопа высокого разрешения энергетических потерь электронов [21]. Как монохроматор, так и анализатор имеют фильтры Вина, использующие ортогональные электрические и магнитные поля, обеспечивающие уникальные характеристики микроскопа.

странственное распределение заряда в объемах нанометрического размера, а также исследовать симметрию и плотность электронов над уровнем Ферми.

На рис. 6.8 показана схема просвечивающего электронного микроскопа, использованного Тераучи с соавторами для изучения спектров энергетических потерь электронов [21]. Отметим монохроматор Вина, действие которого основано на том, что в перпендикулярных электрическом E и магнитном полях B электрон не будет отклоняться, если его скорость равна отношению E/B. Это позволяет создать фильтр, обеспечивающий прохождение лишь электронов определенной скорости (а значит и энергии). Повышенная энергочувствительность этой системы (рис. 6.9) позволила применять ее для исследования оптоэлектронных материалов, таких как нитрид галлия GaN. Другие применения метода энергетических потерь электронов описаны в [22, 23].

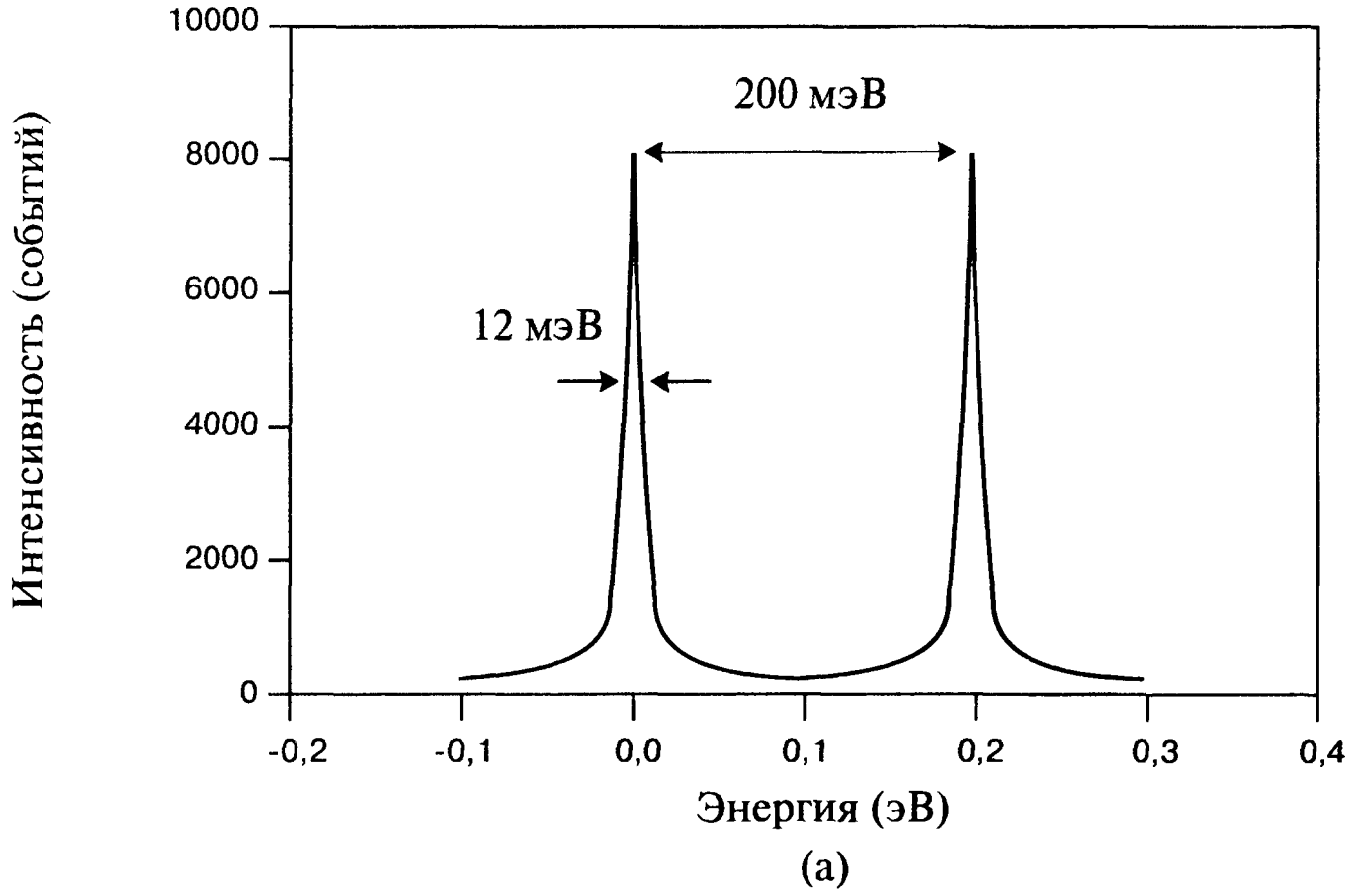


Рис. 6.9. (a) – Энергетическое разрешение спектроскопа энергопотерь электронов. Показана ширина пика пучка электронов при отсутствии энергопотерь. Ширина пика при половине максимальной интенсивности равна 12 мэВ. Разница энергии пиков составляет 200 мэВ. (b) - Спектр энергетических потерь электронов окисного сверхпроводника $Bi_2Sr_2CaCu_2O_8$, полученный с энергетическим разрешением 25 мэВ [20].

6.2. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)

Имеется несколько превосходных книг по ядерному магнитному резонансу [29, 30]. Ниже мы опишем лишь основы данного метода, уровень разрешения и примеры исследования материалов с его помощью.

6.2.1. Основные принципы ЯМР

Хорошо известно, что в присутствии внешнего магнитного поля энергетические уровни атома расщепляются (эффект Зеемана) вследствие его взаимодействия с магнитным моментом атома. Так как ядра атомов обладают магнитным моментом, в магнитном поле энергия ядра также расщепляется. Рассмотрим простейший случай атома водорода во внешнем магнитном поле. В поле $\boldsymbol{B}$ потенциальная энергия U магнитного момента μ определяется формулой:

$$U = -(\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{B}), \tag{6.6}$$

где скобки обозначают скалярное произведение векторов $\boldsymbol{\mu}$ и $\boldsymbol{B}$, равное $\mu B \cos\theta$, а θ – угол между ними (рис. 6.10a). Потенциальная энергия минимальна, когда магнитный момент направлен вдоль поля, и максимальна, если он направлен в противоположном направлении. Так как спин протона равен 1/2, возможны две ориентации магнитного момента во внешнем поле – вдоль него (спин вверх) и против него (спин вниз). Различие энергии соответствующих энергетических уровней (рис. 6.10b) равно:

$$\Delta E = 2\,\mu_{zp}\boldsymbol{B}, \tag{6.7}$$

где μ_{zp} – магнитный момент протона (равный приблизительно 2,8 eh/4πm$_p$ = 8.79×10^8 эВ/Т). Облучение атомов водорода фотонами с энергией ΔE вызывает

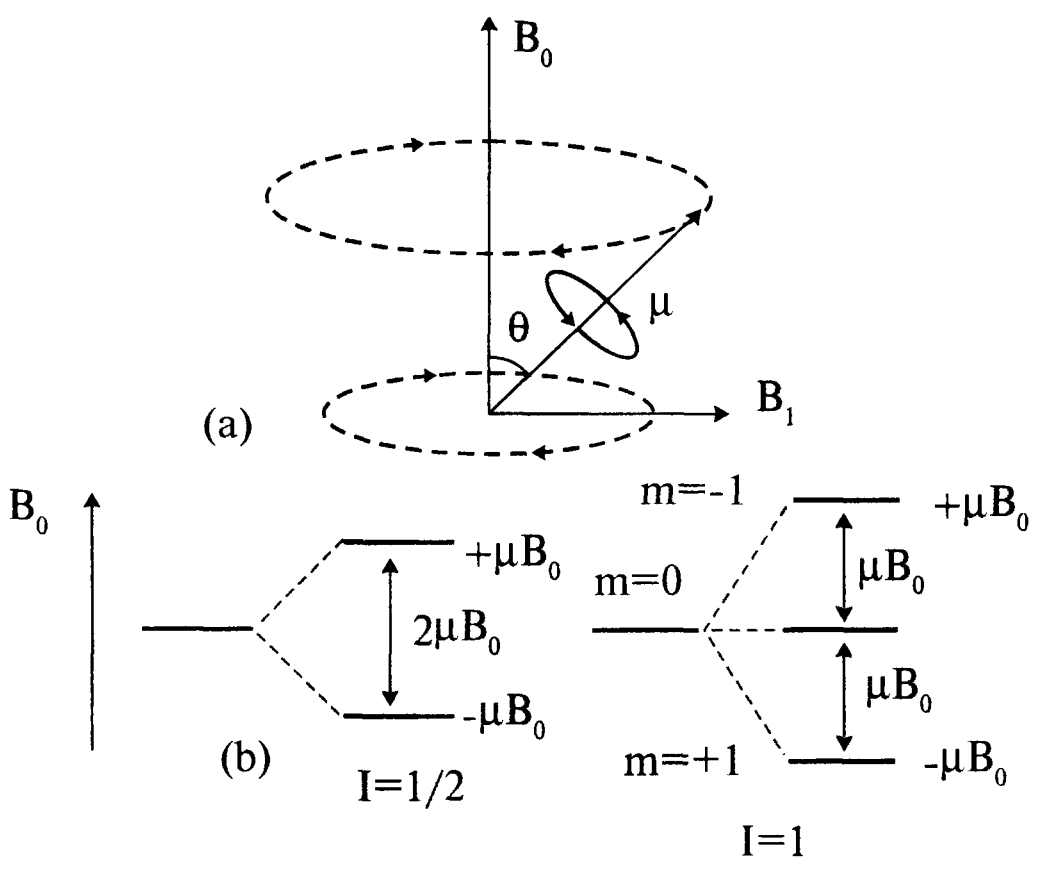


Рис.6.10. (a) - При помещении ядра в магнитное поле B_0 оно начинает прецессировать вокруг направления магнитного поля с ларморовской частотой. Если на систему накладывается второе магнитное поле B_1, частота которого равна ларморовской частоте, появляется резонанс. (b) – В магнитном поле появляется расщепление энергетических зеемановских уровней. Между этими уровнями возможны переходы, зависящие от спина ядра I и сопровождаемые излучением фотонов радиочастотного диапазона.

переход части ядер на более высокий уровень за счет резонансного поглощения. Затем ядра возвращаются в более низкое энергетическое состояние и излучают фотоны с энергией ΔE. Частота фотонов определяется формулой $\Delta E = h\nu$. В магнитном поле силой одна тесла частота этих фотонов равна 42,5 МГц, что соответствует радиочастотному диапазону. Точно измерив излучаемую радиочастоту, можно оценить величину полного внутреннего магнитного поля молекулы (равного сумме внешнего магнитного поля и локального поля окружающих атомов и атомного ядра). Этот принцип лежит в основе метода ЯМР. Образец облучают радиоволной и регистрируют испускаемые фотоны. На рис. 6.11 приведена фотография типичной промышленно выпускаемой ЯМР-установки.

6.2.2. Практические соображения

Принцип ЯМР основан на колебании атомных ядер в магнитном поле. Образец помещают в магнитное поле, которое ориентирует ядра в одном направлении. Затем его облучают радиоволной, поглощение которой изменяет ориентацию магнитного момента ядер. Ядра излучают поглощенные радиоволны и вновь выстраиваются вдоль магнитного поля. Измеряя частоту испускаемых ядрами радиоволн и скорость повторного выравнивания, спектроскописты получают информацию о молекулярной структуре и молекулярном движении. Эффект ЯМР позволяет строить изображения, помещая образец в неоднородное магнитное поле и регистрируя частоту ядерного резонанса в небольшом объеме материала.

Сигнал ЯМР зависит от времен ядерной релаксации T_1 и T_2, отражающих структуру среды, окружающей излучающее ядро. Существует несколько путей пространственной кодировки сигнала ЯМР. Первый состоит в наложении линейно изменяющегося магнитного поля на начальное статическое поле, что создает градиент магнитного поля в образце. В одномерном случае положение образца z связано с частотой ω_z отношением:

$$\Delta\omega_z = \omega_z - \omega_o = \gamma \frac{\partial B_z}{\partial z} z, \qquad (6.8)$$

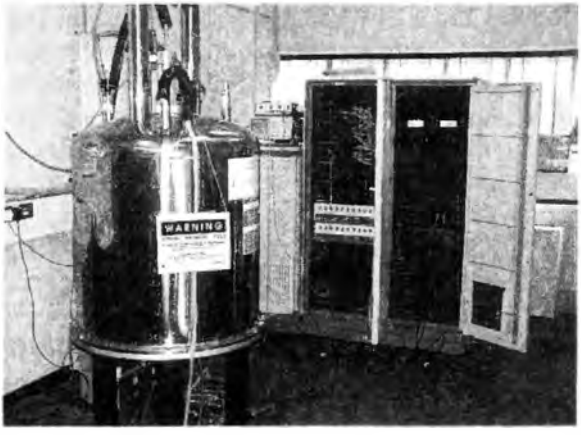


Рис. 6.11. ЯМР-установка Факультета физики и астрономии Лидского университета. Криостат обеспечивает хранение образцов при температуре ниже 0°С.

где γ – постоянная, называемая гиромагнитным отношением. Чтобы возбудить лишь ядра, занимающие соответствующее положение в z = направлении, прикладывается узкочастотный радиоимпульс. Амплитуда сигнала ЯМР, полученного с линии оси z, отражает количество резонирующих ядер.

Плотность и молекулярное окружение ядер отражаются амплитудой измеряемого радиосигнала и, следовательно, интенсивностью вокселей. Если постоянные времени T_1 и T_2 в гетерогенных образцах различны, данные различия можно использовать для создания изображения. Последовательность импульсов с целью повышения контраста называется «множественным спин-эхом», а сам процесс иллюстрирует рис. 6.12. Для улучшения соотношения сигнал/шум используют ряд радиоимпульсов и определяют среднее значение сигнала. Каждая проекция осуществляется импульсом под углом 90°, за которым следует импульс под углом 180°, индуцирующий спиновое эхо. Импульс 90° ориентирует магнитные моменты в плоскости XY, после чего они начинают терять фазу. Импульс волн 18° накладывают по прошествии времени t. Он вызывает переориентацию магнитных моментов за период времени $2t = TE$ после импульса 90°. Затем собирают данные. Частотно-кодированный градиент G_x вызывает прецессию спинов при различных частотах, в зависимости от их положения относительно статического магнитного поля. Фазово-кодированный градиент G_y ортогонален по отношению к G_x . Варьирование фазы G_y вызывает разориентацию спинов с различной скоростью, что позволяет создать второе измерение двумерного изображения. Градиент G_z определяет толщину изучаемого слоя, а 90° радиоимпульс гауссовой формы определяет его координату. Данные подвергают двумерному преобразованию Фурье, что обеспечивает получение изображения выбранного слоя. Интервал между двумя последовательными импульсами обычно составляет от 250 до 2 500 миллисекунд, а сбор данных является довольно длительным. Заметим, что минимальное время построения изображения ограничивается временем спиновой релаксации T_1.

Два различных элемента объема будут отличаться на снимке, если градиент магнитного поля достаточен для сдвига резонансных частот элементов на величину, превышающую естественную ширину линии. Поэтому пространственное разрешение Δx определяется формулой:

$$\Delta x = \frac{\delta\omega}{\gamma \dfrac{\partial B_z}{\partial z}}, \qquad (6.9)$$

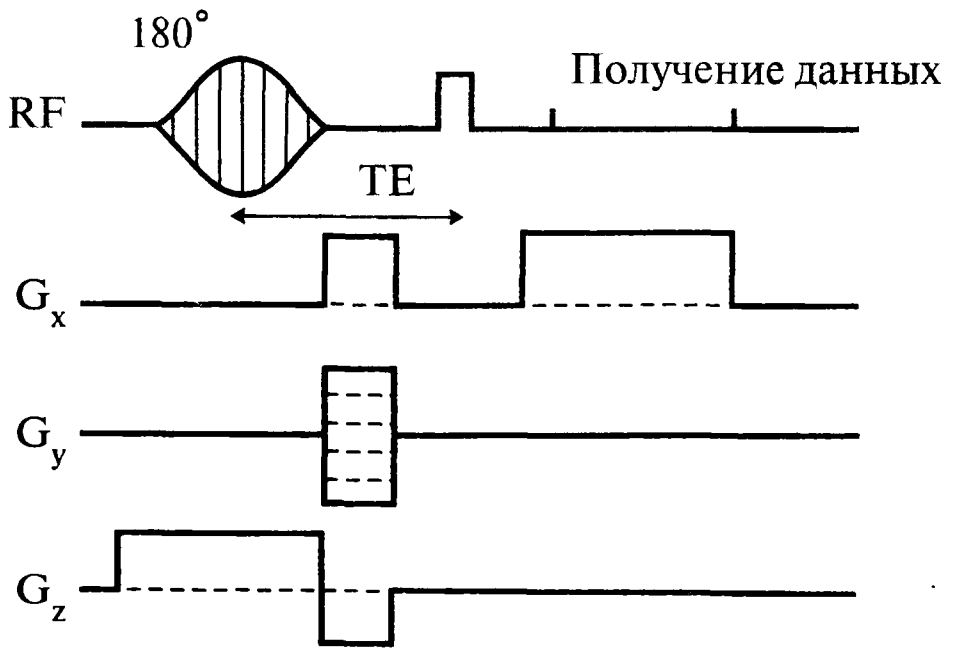


Рис. 6.12. Диаграмма хронометража сигналов, используемых в методе «спинового эха» ЯМР.

где $\delta\omega$ – ширина линии. Для подвижных жидкостей линии очень узкие, что обеспечивает высокое пространственное разрешение. Поэтому можно различать объемы порядка 10×10×100 мкм. Однако типичное разрешение жидкостей в пустотах в твердых телах или в смесях жидких и твердых материалов хуже и соответствует объему 40×40×100 мкм.

Получить изображение твердых тел гораздо сложнее, что вызвано большой естественной шириной линии, которая в 1000 раз превышает ширину соответствующих линий в жидкостях. Поэтому необходимо либо увеличить градиент магнитного поля в 1000 раз, либо разработать способ сокращения времени сбора информации. Эти методы выходят за рамки данной книги, и читателям следует обратиться к работе [30].

6.2.3. Применение ЯМР в материаловедении

Обзор применения ЯМР для исследования композитов и полимеров приведен в [31, 32]. ЯМР использовали для поиска дефектов, для определения локальных напряжений вблизи агломератов частиц наполнителя, а также для изучения диффузии и неньютоновского течения расплавов полимеров.

Разрешение ЯМР-микроскопии δx, δy и $\delta z \geq 10$ мкм, что хуже разрешающей способности оптических микроскопов. Однако увеличение градиента поля и количества импульсов должно улучшить разрешение этого метода. Его не без успеха применяли к композитам, однако он имеет один большой недостаток. Получение изображения стеклообразных полимеров типа эпоксидной смолы затруднено большим временем спиновой релаксации (T_1), что приводит к уширению линий, и очень быстрой спин-спиновой релаксацией (T_2), которую невозможно зарегистрировать с помощью существующей электронной аппаратуры. Поэтому образцы обычно пропитывают жидкостью, после чего исследуют релаксацию. Например, наличие пустот в стержнях выявляли путем их вымачивания в теплой воде в течение месяцев с последующим применением метода спинового эха [33].

Методом ЯМР можно получить изображение углепластика (за исключением областей, в которых слои ламината перпендикулярны направлению поля, поскольку проводящие слои экранируют поле) [34]. Если поле ЯМР ориентировано перпендикулярно углеродным волокнам, максимальная глубина, на которой можно создать изображение, равна 1 мм. Если поле параллельно волокнам, глубина достигает 3 см. Матцканин [31] приводит 55 ссылок, в которых композиты исследовали методом ЯМР. В частности, ЯМР применяли для выявления внутренних дефектов, внутренних деформаций, растрескивания вследствие воздействия внешней среды и т.д., вплоть до изучения динамики полимерных цепей (с использованием углерода-13 и дейтерия).

6.3. Ультразвуковая и сканирующая акустическая микроскопия

В этом разделе кратко описана акустическая микроскопия. Эта область очень обширна, и более подробную информацию можно найти в монографии Бриггса [35].

6.3.1. Введение

Акустические волны по своей природе совершенно отличны от электромагнитных волн. В однородном материале скорость акустической волны c_a определяется постоянной среды K и его плотностью ρ:

$$c_a = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \tag{6.10}$$

В упругих телах константа K представляет собой модуль Юнга Y или модуль сдвига S для продольных и поперечных волн соответственно. В случае звуковых волн в газе константа K равна модулю объемного сжатия B. Скорости этих волн в твердых телах составляют 1 600-5 000 м/сек, в жидкостях 900-1 600 м/сек, а в газах вроде воздуха – около 340 м/сек. Отметим, что скорость акустической волны зависит от температуры окружающей среды.

Пространственное разрешение микроскопа зависит от длины волны света. Поскольку скорость акустической волны намного ниже скорости света, частота при одинаковой длине волны также намного ниже, чем у света. Как следствие, сканирующие акустические микроскопы (САМ) работают на частотах 1–2 ГГц, что обеспечивает разрешение, типичное для обычного оптического микроскопа, в то время как ультразвук частотой 2–10 МГц дает миллиметровое разрешение. Ультразвук такой частоты можно использовать для изучения вариации модуля упругости, как описано в разделе 6.4. К сожалению, поглощение акустической волны пропорционально квадрату частоты, и при увеличении частоты глубина проникновения резко уменьшается. Поэтому приходится выбирать между разрешением и глубиной проникновения. В воздухе акустические волны ослабляются сильнее, чем в жидкостях, и поэтому между акустическим источником и образцом, а также между образцом и приемником обычно помещают воду.

В газах и жидкостях распространяются лишь продольные волны, а в твердых телах также и поперечные сдвиговые волны. Когда акустическая волна падает на границу раздела жидкости и твердого тела, часть волны отражается в жидкость, другая часть идет на возбуждение поперечных и продольных волн в материале

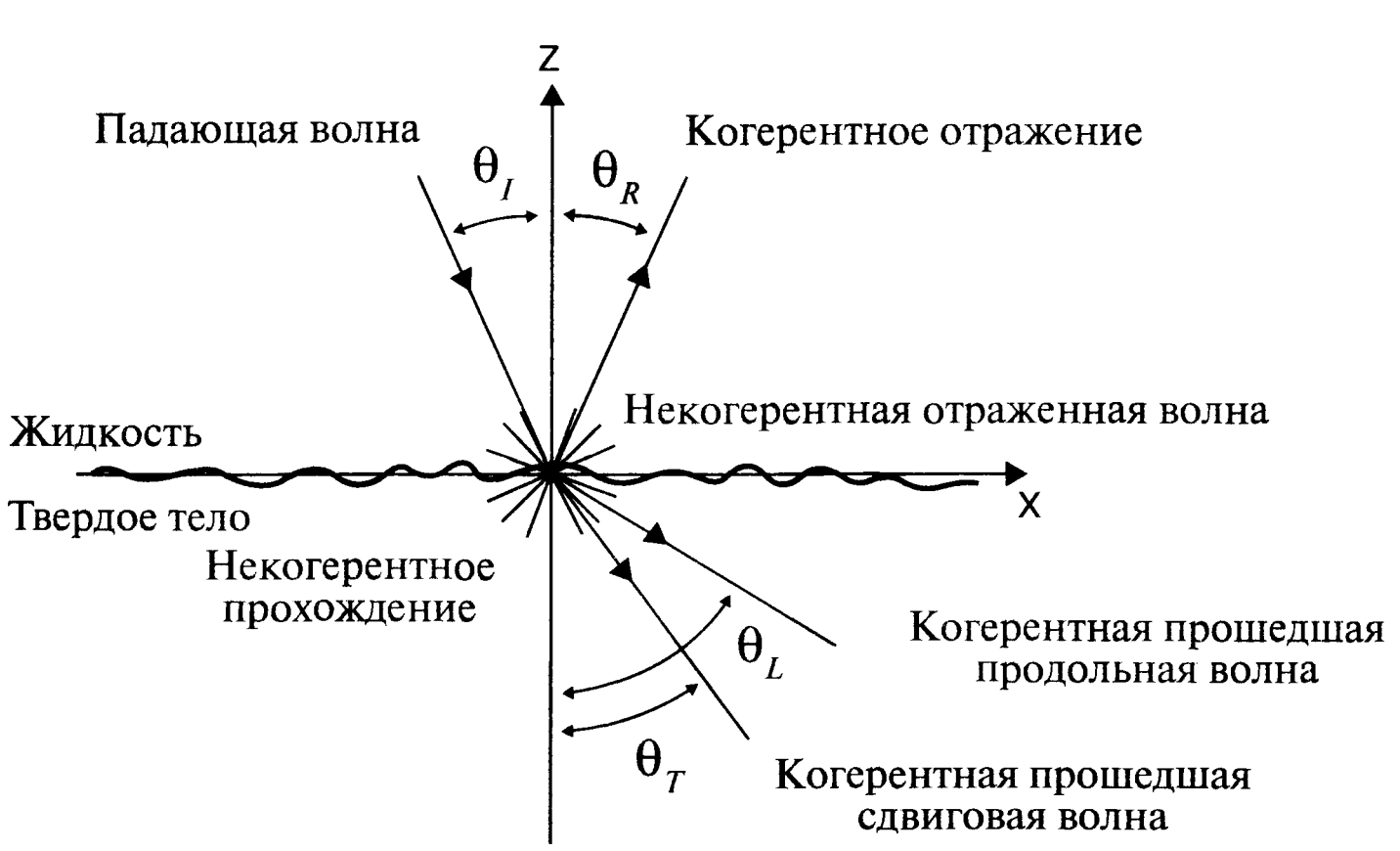


Рис. 6.13. Акустические волны, возникающие на границе жидкости и твердого тела с неровной поверхностью.

(рис. 6.13), а небольшая доля энергии ($\approx 10^{-5}$) идет на возбуждение поверхностной акустической волны. Существует два типа сдвиговых волн. Однако продольная волна в воде может возбуждать лишь вертикально-поляризованные сдвиговые волны в упругих телах (но не возбуждает горизонтально-поляризованные сдвиговые волны).

Низкочастотные акустические волны генерируются небольшими громкоговорителями (музыка в акустическом диапазоне имеет частоту 100-20 000 Гц). Волны более высокой частоты возбуждаются пьезоэлектрическими преобразователями малой массы, вследствие чего резонансная частота оказывается высокой. Большинство акустических систем использует ультразвуковые импульсы. Короткий импульс электрического напряжения воздействует на преобразователь, который генерирует акустическую волну.

За прошедшие несколько десятилетий взрыв интереса к акустическим методам породил появление разнообразных методов, начиная от акустической томографии [36] и до комбинированного ультразвукового и атомносилового микроскопов [37]. В работе [37] между проводящей консолью и пьезоэлектриком создавали переменное электрическое поле, которое за счет обратного пьезоэлектрического эффекта вызывало вибрацию образца. Вибрация ограничивалась областью контакта кончика датчика и поверхности образца.

6.3.2. Сканирующая акустическая микроскопия

В 1936 г. Соколов в патенте СССР № 49 впервые описал возможность создания акустического микроскопа. Его идеи были развиты в 1959 г. Донном и Фраем в

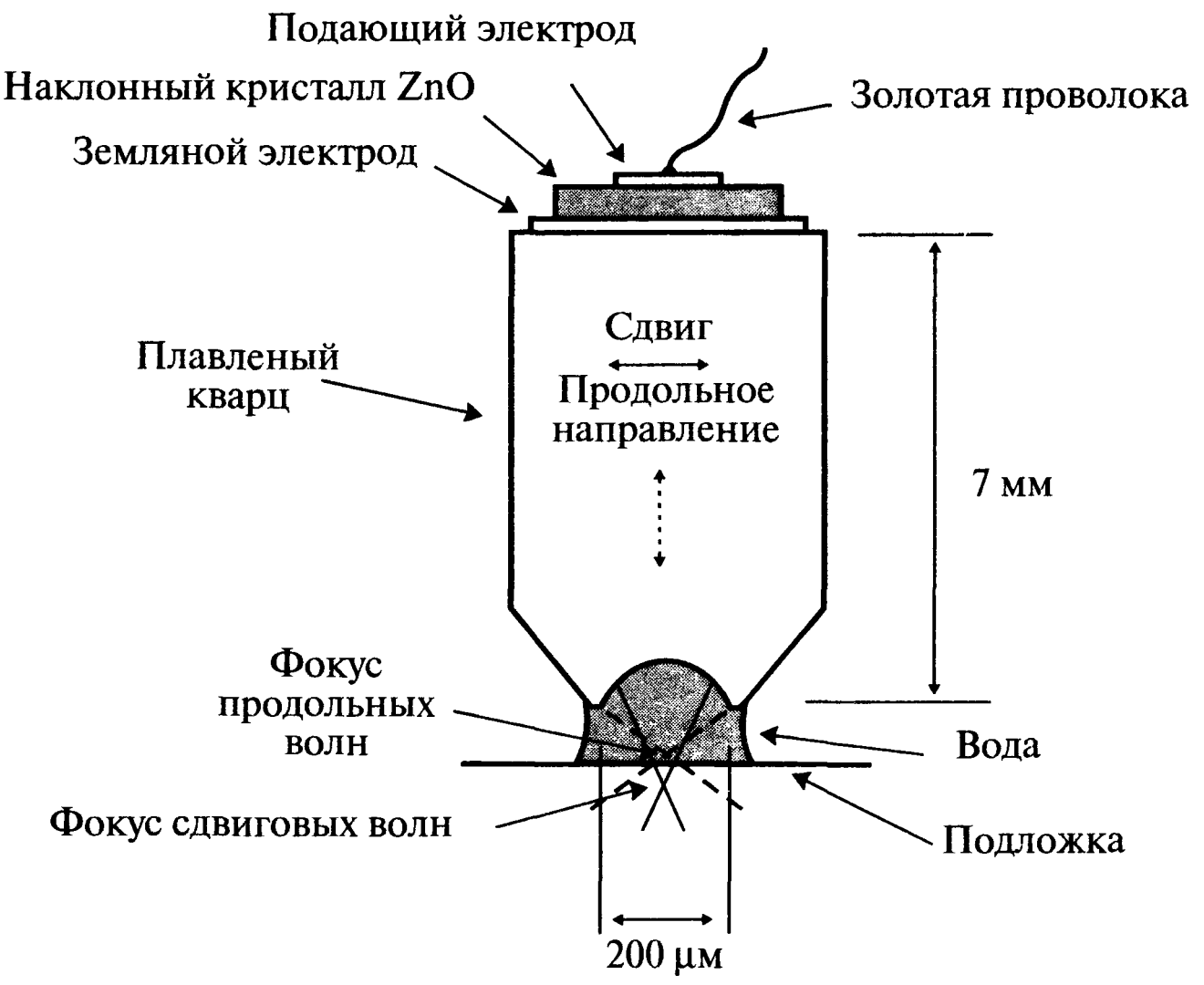


Рис. 6.14. Преобразователь из ZnO, акустически связанный с линзой из плавленого кварца (или сапфира), является основным элементом сканирующего акустического микроскопа (САМ). Наклонный преобразователь позволяет направлять на линзу как нормальные волны растяжения-сжатия, так и сдвиговые волны. Система работает на очень высоких частотах (от сотен МГц до нескольких ГГц).

Иллинойсском университете [38]. Разработка импульсных акустических систем позволила разделить отраженные акустические волны и посторонние сигналы, что привело к появлению современных акустических микроскопов, строящих изображение сканированием по образцу сфокусированным акустическим лучом.

На рис. 6.14 изображен типичный наклонный источник акустических волн, совмещенный с «линзой объектива» [35]. Из-за поглощения высокочастотных акустических волн в воздухе пьзоэлектрический преобразователь из окиси цинка ZnO плотно прикреплен к верхней поверхности плавленого кварца или сапфира. Преобразователь генерирует плоские волны, которые распространяются вниз в направлении вогнутой нижней поверхности кристалла сапфира. Для уменьшения отражения вогнутая поверхность покрыта «просветляющей» пленкой толщиной в четверть длины волны. Линза фокусирует акустические волны на образец через жидкость (обычно это вода).

Несмотря на то, что трансмиссионные акустические микроскопы уже созданы, существуют трудности в выравнивании преобразователя вместе с объективом и линзы вместе с принимающим преобразователем. Чаще используют схему, в которой преобразователь действует как источник и приемник акустических волн. Это достигается излучением импульса и переключением преобразователя в режим приема отраженного сигнала.

В акустическом микроскопе изображение создается сканированием точечного излучателя сигнала в плоскости XY. Особенности структуры, которые влияют на распространение акустических волн, определяют и жесткость образца. Приходится использовать либо высокочастотную акустическую волну с целью улучшения разрешения, как это делается в сканирующей акустической микроскопии (САМ), либо добиваться большей глубины проникновения при меньших частотах. Заметим, что при частоте 1 ГГц разрешение равно нескольким микронам, но глубина проникновения невелика, в то время как при частоте в несколько МГц длина волны имеет порядок миллиметров, но глубина проникновения достигает нескольких сантиметров. На высоких частотах проблемой является необходимость достаточно широкой полосы пропускания электронной системы, вследствие чего возникает шум, ограничивающий разрешение. Сканирующая акустическая микроскопия добилась за последние несколько лет больших успехов. Преобразователи, работающие на частотах менее 200 МГц, используют для трехмерного сканирования образцов с пространственным разрешением δx, δy и $\delta z \geq 20$ мкм [38]. Имеется возможность достижения хорошего контраста, однако работу полностью автоматизированной системы затрудняют артефакты. В частности, вокруг волокон и вблизи микротрещин появляются интерференционные полосы, обусловленные отражением акустических волн на границе матрица-волокно. Акустическая микроскопия позволяет дифференцировать различные фазы матрицы композита [40].

6.3.3. Сканирующие системы, измеряющие время распространения ультразвука

Чтобы достигнуть разрешения, сравнимого с оптическими микроскопами, работают на очень высоких частотах. Еще один принцип работы микроскопа состоит в измерении времени распространения волны. В этом случае разрешение приносится в жертву возможности построения изображения, отражающего изменение модуля упругости. Примером служит система, описанная в разделе 6.4.

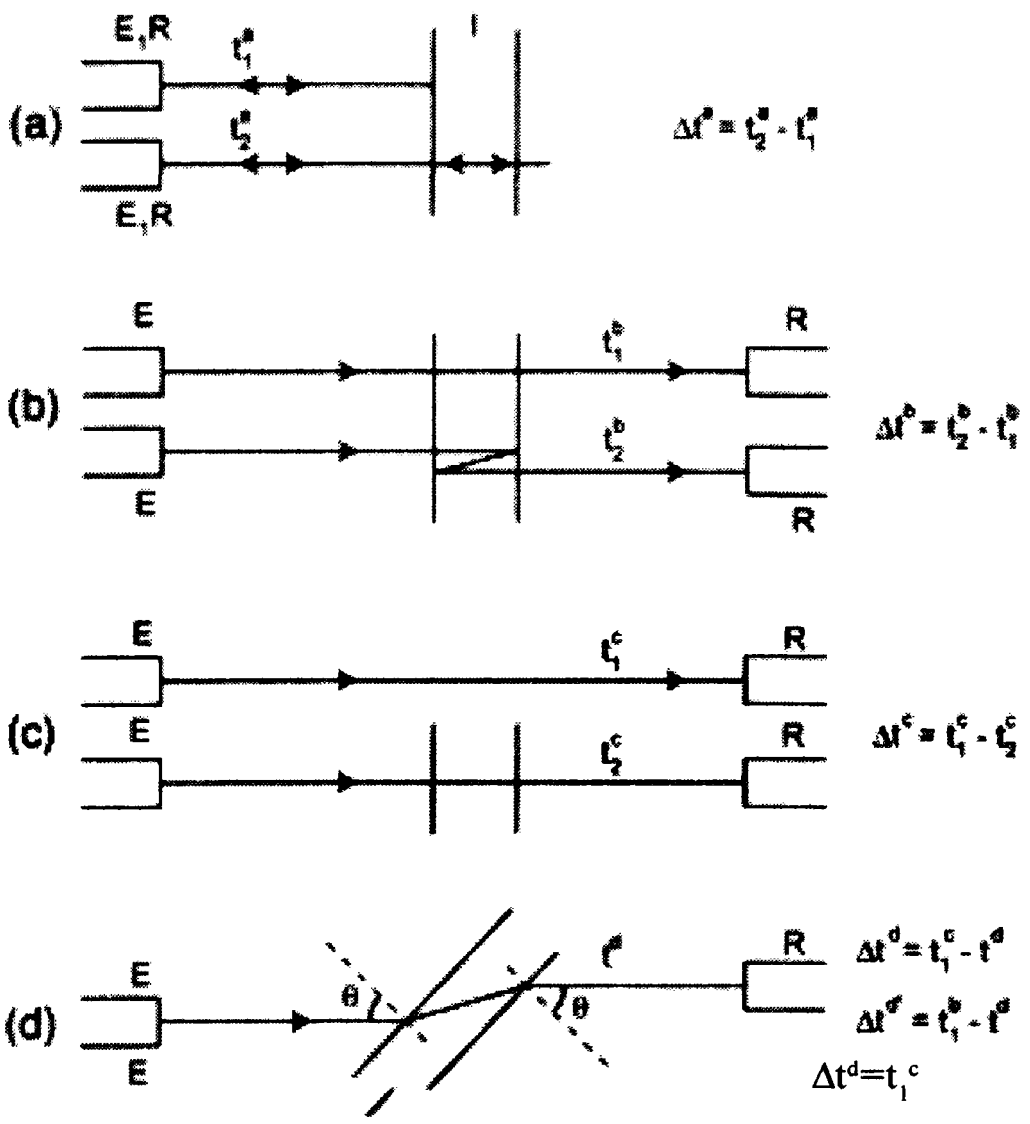


Рис. 6.15. Схемы отражения ультразвуковых импульсов. (a) - Один преобразователь используется и для возбуждения, и для приема сигнала; (b), (c) и (d) - используются два преобразователя.

Традиционно существует множество импульсных режимов работы системы, основанной на измерении времени распространения ультразвука, как показано на рис. 6.15. В некоторых системах преобразователь генерирует ультразвук и принимает эхо. Поскольку время распространения сигнала зависит от расстояния до отражающей особенности под поверхностью образца, для выбора «фокальной плоскости» изменяют время задержки сигнала. Эти методы широко использовали для обнаружения дефектов в очень крупных изделиях. Для подобных систем типична разрешающая способность Δz порядка 20–50 мкм. Изменяя длину волны и применяя Фурье-преобразование по времени прошедшего или отраженного импульса, обнаруживают мелкие пустоты [40]. Отметим, что интенсивность рэлеевского рассеяния убывает с длиной волны пропорционально λ^{-4}.

6.4. Ультразвуковая трехмерная картография констант упругости композиционных материалов

6.4.1. Введение

В главах 3, 4 и 5 описаны принципы исследования композитов. Там же говорилось о необходимости изучения их микроструктуры. Рабочие характеристики деталей из волокнистых композитов зависят от констант упругости (модуля Юнга, модуля сдвига и коэффициента Пуассона). Знание констант упругости крайне важно. В Лидском университете решили исследовать связь пространственного распределения волокон и констант упругости при помощи низкочастотных ультразвуковых и оптических методов определения ориентации волокон. Даже в самых последних теоретических работах при анализе распространения акустических волн в

гетерогенных материалах вроде композитов приходится делать некоторые предположения [42].

Деформация твердого тела под действием растягивающей силы описывается законом Гука:

$$Y = \sigma/\varepsilon, \tag{6.11}$$

где σ - нормальное напряжение (растягивающая или сжимающая сила в расчете на единицу площади), ε - деформация (изменение длины в расчете на единицу длины) и Y - модуль Юнга.

В твердом теле сложной формы под действием ряда сил (P_1, P_2 и P_3) появляются напряжения, показанные на рис. 6.16. Если тело находится в состоянии равновесия, $\sigma_{ij} = \sigma_{ji}$, и все напряжения определяются матрицей с девятью элементами, из которых независимы лишь шесть элементов:

$$\sigma_{ij} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{12} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{13} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{pmatrix} \tag{6.12}$$

В условиях равновесия эти напряжения приводят к деформации элемента объема. Компоненты тензора деформации σ_{ji} определяются формулой:

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2}\left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \tag{6.13}$$

что определяет аналогичную матрицу деформации:

$$\varepsilon_{ij} = \begin{pmatrix} e_{xx} & e_{xy}/2 & e_{xz}/2 \\ e_{xy}/2 & e_{yy} & e_{yz}/2 \\ e_{xz}/2 & e_{yz}/2 & e_{zz} \end{pmatrix} \tag{6.14}$$

где

$$e_{xx} = \frac{\partial u}{\partial x},\ e_{yy} = \frac{\partial v}{\partial y},\ e_{zz} = \frac{\partial w}{\partial z},\ e_{xy} = \frac{\partial u}{\partial y} + \frac{\partial v}{\partial x},\ e_{xz} = \frac{\partial w}{\partial z} + \frac{\partial u}{\partial z},\ e_{yz} = \frac{\partial v}{\partial z} + \frac{\partial w}{\partial z} \tag{6.15}$$

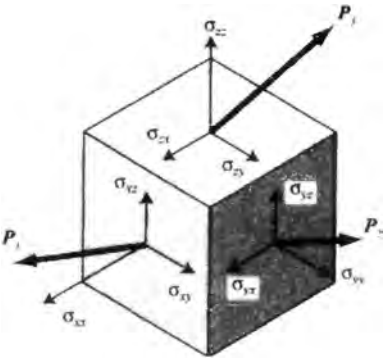


Рис. 6.16. Напряжения σ_{ij}, возникающие при приложении сил P_1, P_2 и P_3 к малому элементу объема.

Обобщенный закон Гука, связывающий напряжение и деформацию, может быть записан в виде:

$$\sigma_{ij} = c_{ijkl}\varepsilon_{kl} = \sum_{kl} c_{ijkl}\varepsilon_{kl} \tag{6.16}$$

Коэффициенты c_{ijkl} называются константами упругости материала. Они определяют матрицу, состоящую из 81 элементов. Поскольку имеется лишь шесть независимых компонент напряжения и деформации, можно определить сокращенную 36-элементную матрицу упругости C_{pq}. Вследствие симметрии имеется только 21 независимая константа упругости:

$$C_{pq} = \begin{pmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & C_{14} & C_{15} & C_{16} \\ C_{12} & C_{22} & C_{23} & C_{24} & C_{25} & C_{26} \\ C_{13} & C_{23} & C_{33} & C_{34} & C_{35} & C_{36} \\ C_{14} & C_{24} & C_{34} & C_{44} & C_{45} & C_{46} \\ C_{15} & C_{25} & C_{35} & C_{45} & C_{55} & C_{56} \\ C_{16} & C_{26} & C_{36} & C_{46} & C_{56} & C_{66} \end{pmatrix} \tag{6.17}$$

Таким образом, связь напряжения и деформации может быть описана формулой:

$$\sigma_{xx} = C_{11exx} + C_{12eyy} + C_{13ezz} + C_{14exz} + C_{15eyz} + C_{16exy} \tag{6.18}$$

Аналогичным образом записываются и другие коэффициенты матрицы σ_{ij}.

Если растягивающая и сдвиговая силы не связаны, систему уравнений можно упростить, если направить оси координат вдоль осей симметрии материала. Можно показать, что в этом случае напряжения и деформации параллельны осям симметрии материала. Дальнейшие упрощения могут быть осуществлены для специфических материалов [45], например, для одноосно ориентированного слоя полимера. В этом случае материал является «поперечно изотропным», и число независимых констант упругости сокращается до шести.

$$C_{pq} = \begin{pmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & 0 & 0 & 0 \\ C_{12} & C_{22} & C_{23} & 0 & 0 & 0 \\ C_{13} & C_{23} & C_{33} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & C_{44} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & C_{55} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & C_{66} \end{pmatrix} \tag{6.19}$$

$$\text{где } C_{55} = C_{44} \text{ и } C_{66} = \frac{C_{11} - C_{12}}{2} \tag{6.20}$$

Уравнение непрерывности для малого элемента объема связывает константы упругости со скоростями ультразвука:

$$\frac{\partial \sigma_{ij}}{\partial x} = \rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2}, \tag{6.21}$$

где ρ - плотность материала. Выражая σ_{ji} через уравнение (6.16), получаем:

$$c_{ijkl}\frac{\partial^2 u_k}{\partial x_j \partial x_l} = \rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} \tag{6.22}$$

Это уравнение напоминает волновое уравнение, приведенное в главе 1. Существует три возможных волновых решения этого уравнения. Вектор смещения одной волны параллелен направлению распространения (продольная волна), а для двух других смещение ортогонально ему (поляризованные сдвиговые волны). Зависимость скорости продольной волны V_L и скоростей поперечных волн V_S от констант упругости приведена на рис. 6.23. На границе раздела могут возбуждаться поверхностные акустические волны, но они существуют только в непосредственной близости от границы и не распространяются внутрь материала [35].

6.4.2. Методология

Еще одним методом, позволяющим исследовать влияние трехмерной микроструктуры материала на его локальные механические свойства, является иммерсионный метод, в котором определяется время распространения ультразвука [44,45]. С целью проверки теоретических моделей, связывающих микроструктуру и макросвойства материала, можно изучать корреляцию результатов, полученных на ультразвуковой установке, с локальной ориентацией волокон, определенной при помощи конфокального оптического микроскопа. Первые подобные исследования были проведены в университете Лидса более 15 лет назад [46,47]. Хотя ультразвуковой прибор оказался весьма удачным, работать на нем было довольно утомительно. За последние шесть лет члены Группы молекулярной физики сумели построить полностью автоматизированный вариант этого прибора.

«Водноиммерсионная» испытательная установка, основанная на измерении времени распространения сигнала, описана в работах [48,49] (рис. 6.17 и 5.18). Ав-

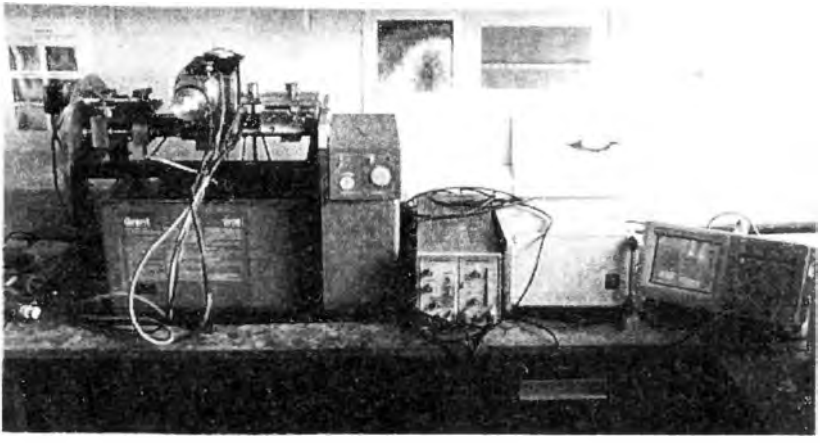


Рис. 6.17. Фотография ультразвуковой иммерсионной испытательной установки, состоящей из водяной термокамеры, держателя образцов, управляемого шаговым электродвигателем, устройств обработки сигнала, компьютерного интерфейса и цифрового осциллографа фирмы Tektronix. Управляющий компьютер на снимке не показан.

томатизированная ультразвуковая иммерсионная установка собрана из промышленно выпускаемых блоков и специально сделанных электронных и механических узлов. Субнаносекундный таймер был спроектирован и построен в университете Лидса, однако теперь его заменили на измеритель времени, являющийся частью цифрового запоминающего осциллографа Tektronix TDS220. Этот осциллограф выполняет функцию таймера, принимает импульсы и форматирует массив цифровых данных для передачи на компьютер через высокоскоростную серийную линию GPIB. Передатчиком и приемником служат иммерсионные преобразователи модели I3-0208-R фирмы Diagnostic Sonar Ltd. Одна пара преобразователей работает на частоте 2,25 МГц, а другая – на частоте 5 МГц. Ультразвуковые модули фирмы Metrotek генерируют возбуждающий импульс (пиковый пульсатор MP215) и обрабатывают полученные сигналы импульсов (приемник/усилитель MR101B).

Водяной термостат модели W28 изготовлен фирмой Grant, а четыре шаговых электродвигателя управляются компьютером через стандартную серийную линию RS432 и микропроцессорный контроллер STAMP. Один из шаговых двигателей перемещает излучатель относительно принимающего преобразователя. Это необходимо для определения скорости ультразвука в воде до помещения в термостат образца. Второй шаговый двигатель перемещает образец, находящийся между излучателем и приемником, в горизонтальном направлении, перпендикулярно направлению распространения ультразвука. Это обеспечивает горизонтальное

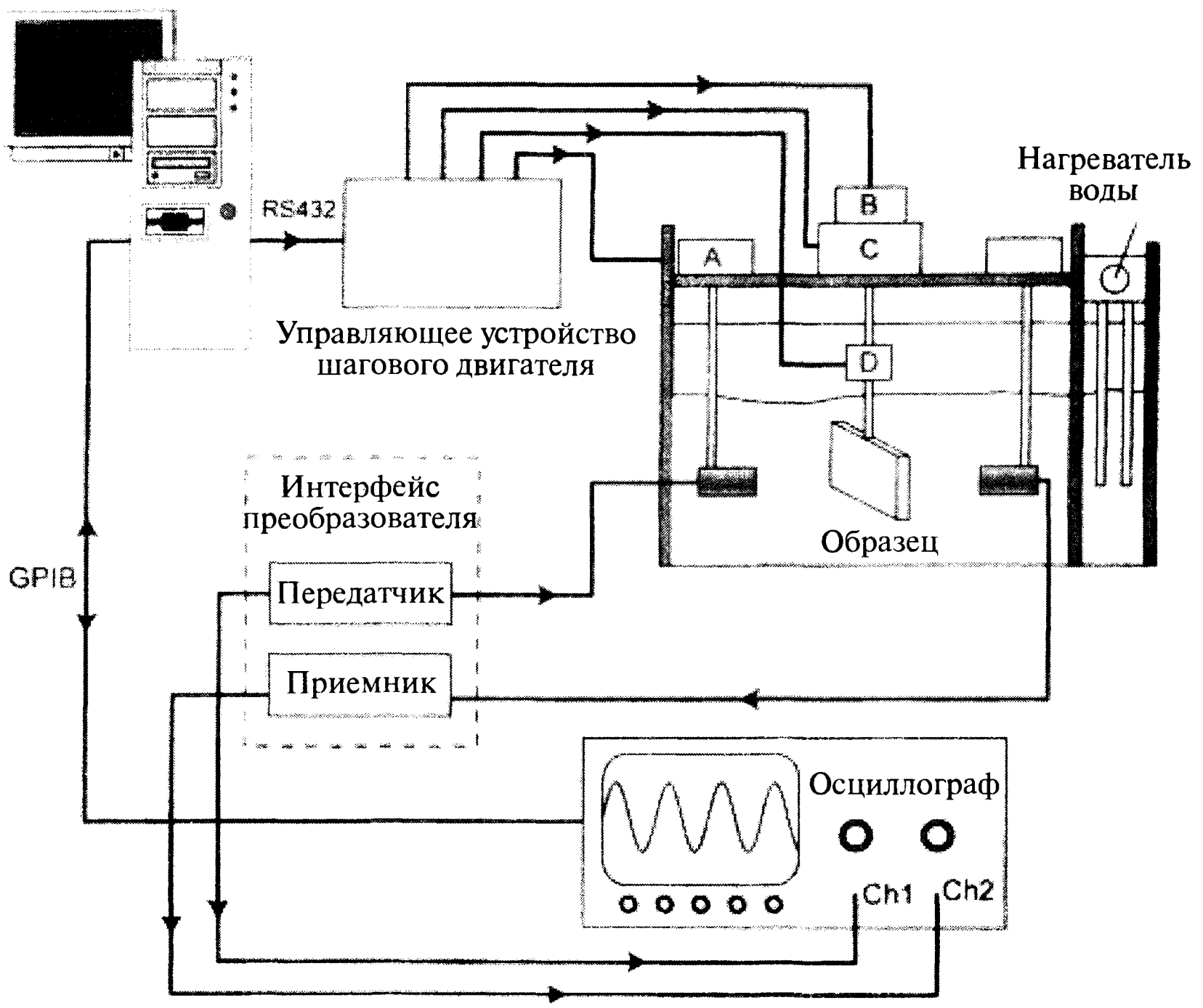


Рис. 6.18. Схема ультразвуковой установки, основанной на измерении времени распространения ультразвука. Показана взаимосвязь различных узлов установки и направления потоков сигналов и получаемой информации.

линейное сканирование образца пучком. Третий шаговый двигатель способен поворачивать образец на 360° шагами по 0,9° для изменения угла падения ультразвука. Четвертый шаговый двигатель может поднимать или опускать образец, обеспечивая его автоматизированное сканирование в неподвижном ультразвуковом пучке и позволяя строить двумерные карты времени распространения импульса и амплитуды принятого сигнала.

Запоминающий осциллограф Tektronix измеряет время задержки между излучением возбуждающего импульса и приходом акустического импульса для 1024

Рис. 6.19. (a) - Излучаемые и принимаемые импульсы; (b) - увеличенное изображение сигнала с разрешением 0,4 нс (определяемым электронной схемой памяти осциллографа).

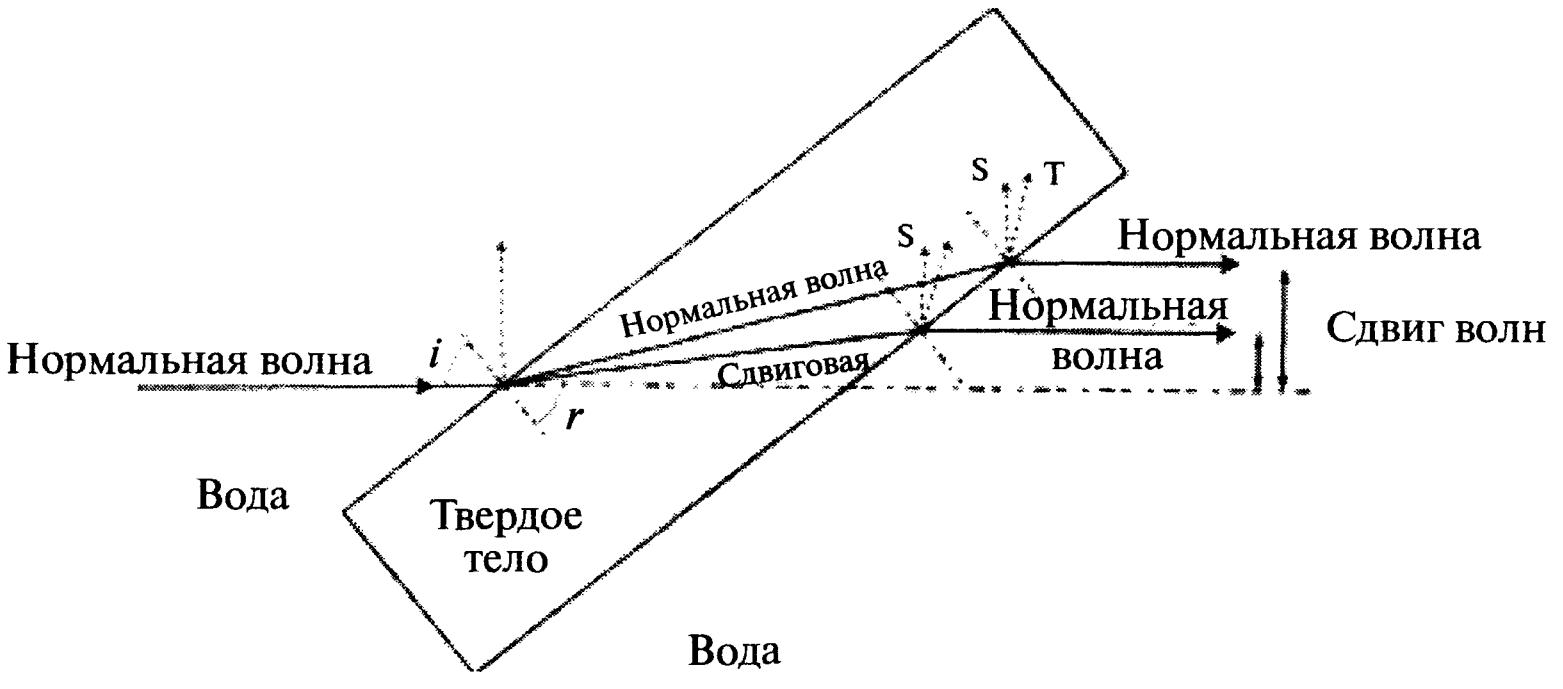


Рис. 6.20. Падающая, отраженная и преломленные ультразвуковые волны в пластине, погруженной в воду. Продольные волны в воде (возбуждаемые продольными и поперечными волнами в образце) смещены относительно оси падающей волны.

импульсных профилей (рис. 6.19). Измеряют время распространения сигнала в воде, а затем в воде с помещенным в нее образцом. Время измеряют с точностью выше одной наносекунды.

Если ультразвук падает на образец под прямым углом, скорость волны V_L определяется формулой:

$$\frac{1}{V_L} = \frac{1}{V_{\mathrm{w}}} - \frac{\Delta t}{d}, \tag{6.23}$$

где V_W - скорость продольной волны в воде, Δt - разница между временами распространения импульса в присутствии образца и без него, d - толщина образца.

$$\mathrm{tg}\, r = \frac{\sin i}{\cos i + q}, \tag{6.24}$$

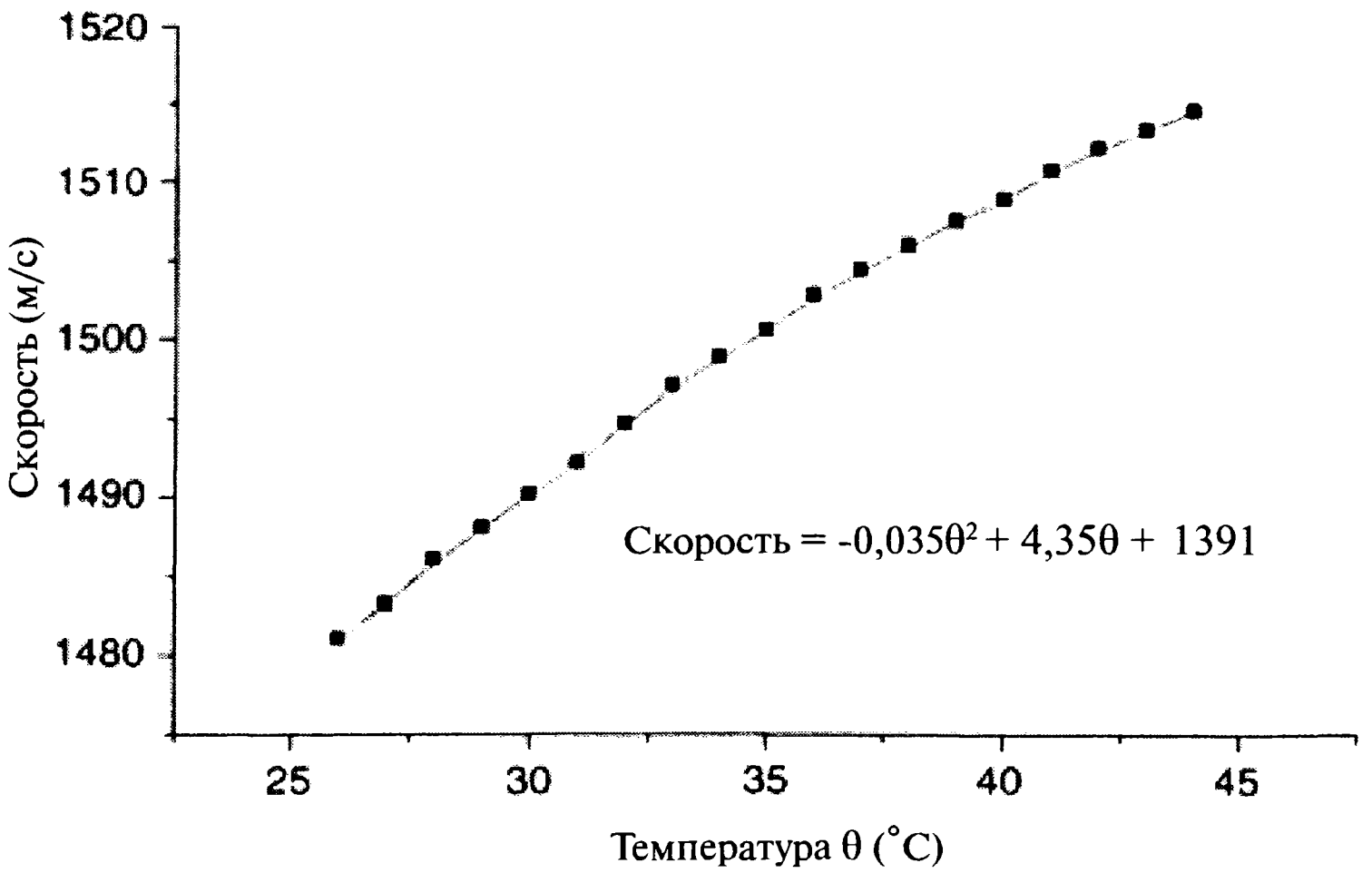


Рис. 6.21. Скорость ультразвука частотой 2,25 МГц в зависимости от температуры воды. График демонстрирует необходимость термостатирования образца.

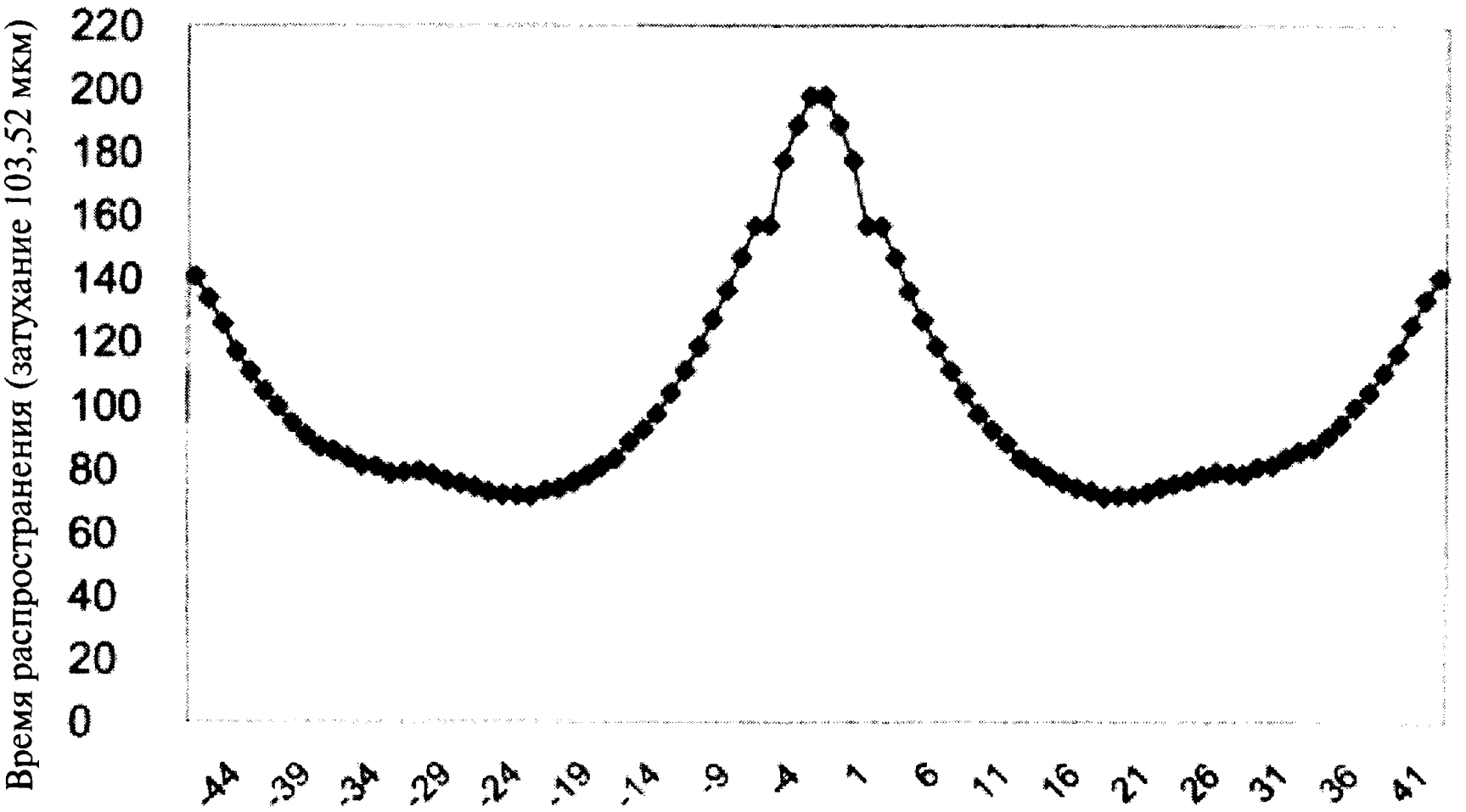


Рис.6.22. Типичная линия сканирования, демонстрирующая изменение времени распространения ультразвука при сканировании волокнистого композита. Образец перемещали перпендикулярно направлению ультразвуковой волны. Кривая симметрична. Видна воспроизводимость результатов измерения времени.

где

$$q = \frac{\Delta t}{d} V_w \tag{6.25}$$

Скорость сдвиговой волны V_S, преломленной под углом r, определяется законом Снелла:

$$V_S = V_W \frac{\sin r}{\sin i} \tag{6.26}$$

Аналогичное уравнение определяет и скорость нормальной волны растяжения-сжатия V_L.

Система вначале измеряет скорость звука в воде при постоянной температуре. Как показано на рис. 6.21, скорость нормальной (и сдвиговой) волны зависит от температуры, что может привести к серьезным ошибкам определения констант упругости.

Если поверхность образца перпендикулярна направлению ультразвука, то один из шаговых двигателей перемещает образец, обеспечивая его сканирование лучом при постоянном угле падения. Результаты сканирования стеклопластика приведены на рис. 6.22. Обратим внимание на симметричность этого графика. Компьютер регистрирует время распространения импульса через образец и амплитуду принимаемого сигнала один раз за миллисекунду. Следует отметить две особенности системы:

(а) - она суммирует множество измерений при одинаковых условиях и обеспечивает субнаносекундную точность измерения времени распространения импульсов, а также уточняет профиль принимаемых импульсов для Фурье-преобразования.

(b) - Система может осуществлять очень быстрое сканирование, способна корректировать влияние температуры и компенсировать шум, вызываемый внешними механическими колебаниями.

Шаговые двигатели обеспечивают линейное перемещение образца по оси X под неподвижным ультразвуковым пучком и перемещение в перпендикулярном направлении (по оси Y), что позволяет строить карты времени распространения и амплитуды принимаемого сигнала. Они позволяют быстро просматривать интересующий объем образца. Отметим, что для определения констант упругости необходимо получать набор данных при различных углах падения ультразвука.

6.4.3. Исследование полиметилметакрилата

Амплитуда полученного ультразвукового импульса определяется (i) коэффициентом отражения на первой границе раздела, (ii) поглощением волны в образце и (iii) коэффициентом отражения на второй границе. Рис. 6.23 демонстрирует ослабление ультразвука частотой 2,25 МГц в полиметилметакрилате (ПММА) при увеличении толщины образца. Водноиммерсионная система не позволяет прямо измерять коэффициент отражения на границе раздела, но принимаемый сигнал несет информацию о коэффициенте отражения на границе жидкость/твердое тело и твердое тело/жидкость. На рис. 6.24 приведена типичная карта времени распространения импульса при нормальном падении волны на пластину ПММА. На рис. 6.25 представлена корреляция времени распространения и амплитуды волны для всех пикселей двумерной карты. Корреляция не очевидна. Ее наличие может быть связано с вариацией толщины пластины.

Описываемая система имеет еще один режим работы. Один из четырех шаговых двигателей может поворачивать образец относительно ультразвукового пучка.

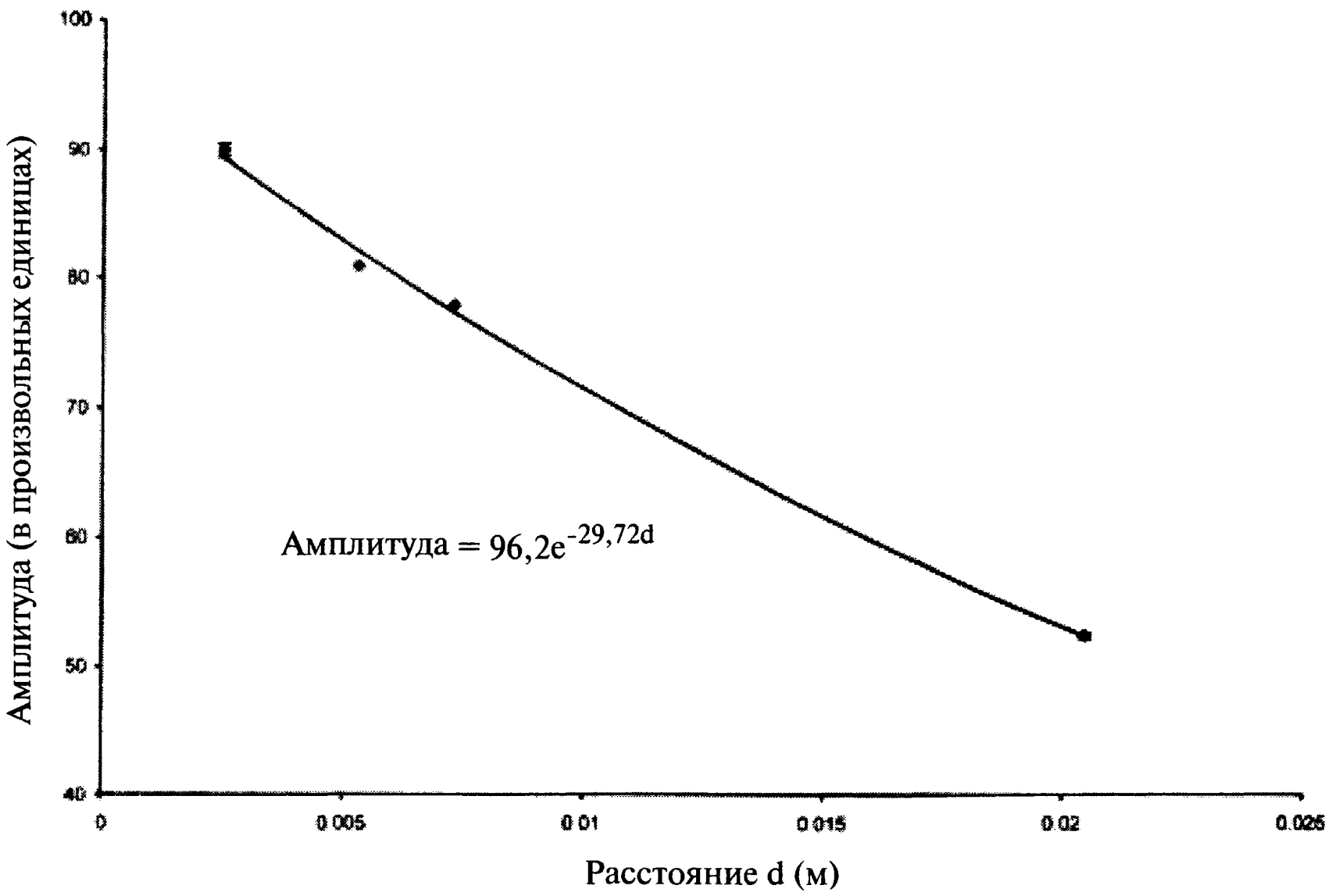


Рис. 6.23. Зависимость интенсивности ультразвука от толщины d пластины полиметилметакрилата. Частота ультразвука равна 2,25 МГц.

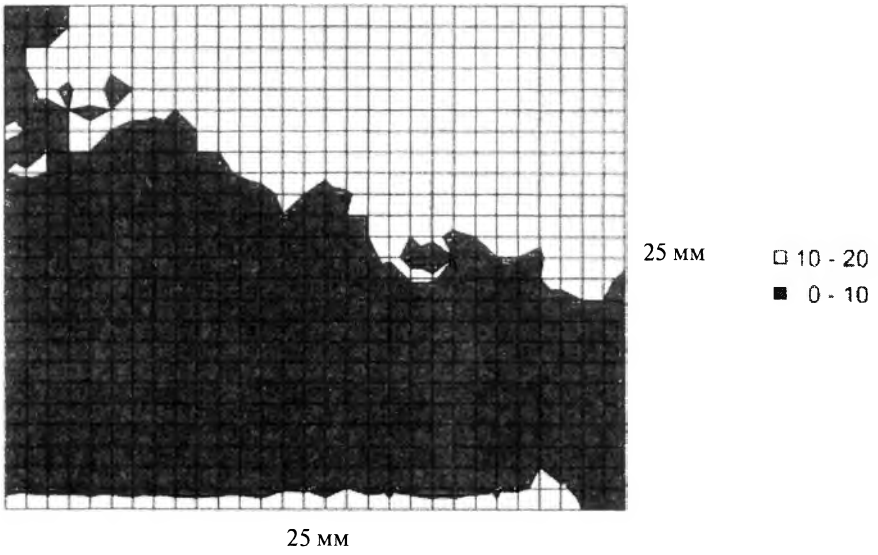


Рис. 6.24. Карта, иллюстрирующая время распространения импульса в ПММА при перпендикулярном падении пучка. Наблюдаются невыраженные мезоструктурные эффекты. Разница времени распространения в 20 нс скорее всего объясняется изменением толщины образца.

Рис. 6.26a демонстрирует изменение времени распространения сигнала в пластине ПММА при повороте образца. График демонстрирует изменение характера колебаний и переход от нормальных к сдвиговым колебаниям при повороте образца.

На рис. 6.26b представлена аналогичная зависимость амплитуды сигнала от угла падения для того же образца. Отметим наличие двух резко отличающихся областей на обоих графиках. Для углов падения около 0° (перпендикулярно образцу)

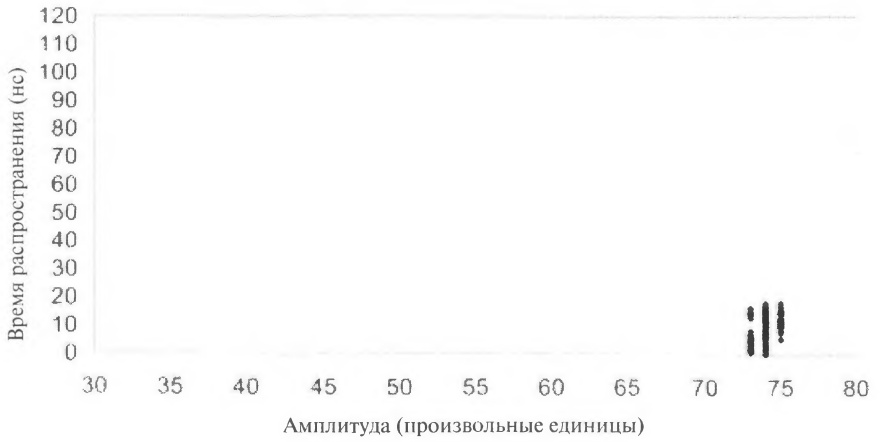


Рис. 6.25. Корреляция времени распространения и амплитуды импульса для образца ПММА, соответствующего рис. 6.24, показывает, что вариацией амплитуды сигнала можно пренебречь.

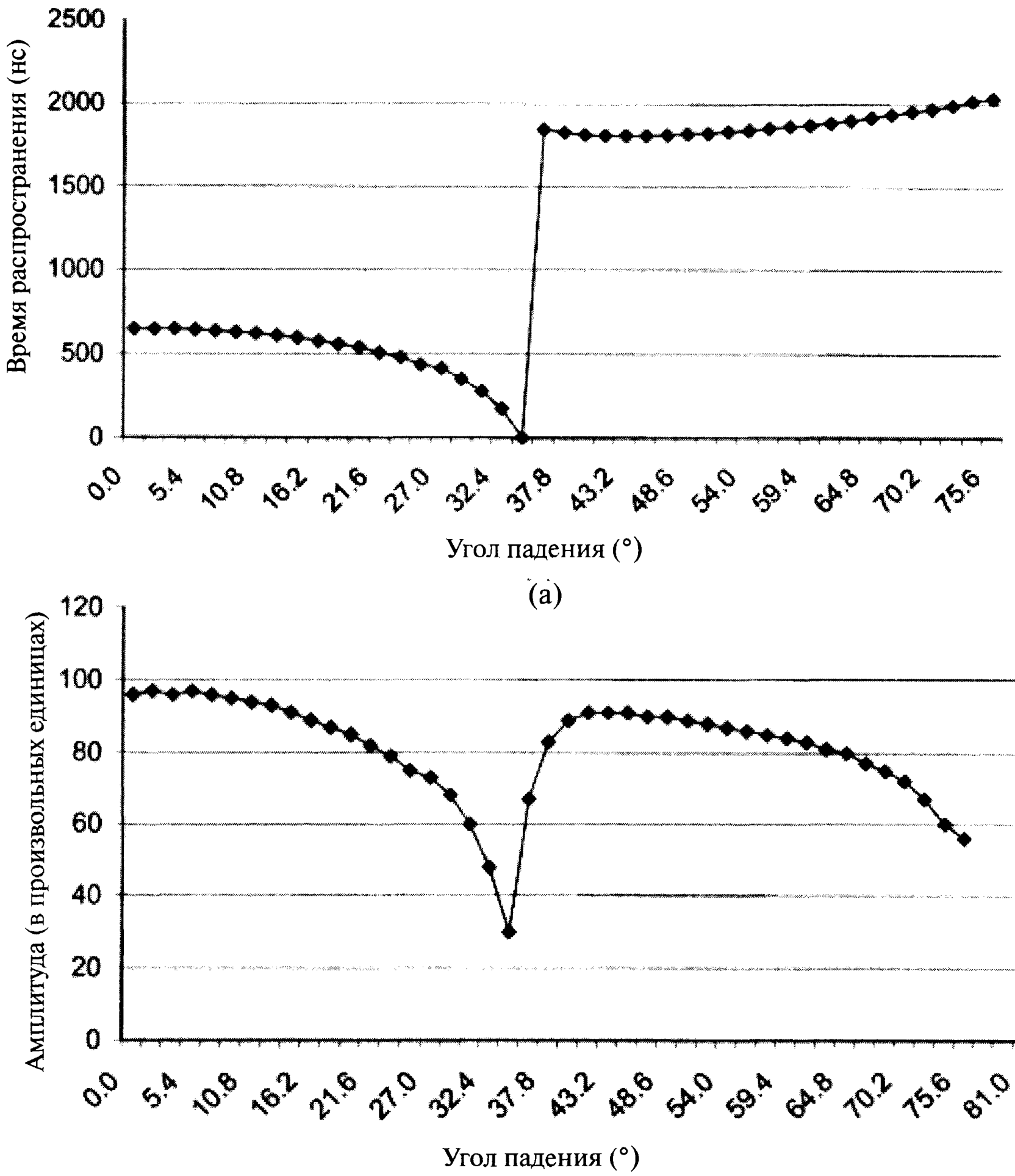


Рис. 6.26. Зависимость времени распространения (a) и амплитуды сигнала (b) от угла падения ультразвукового пучка для пластины ПММА толщиной 3 мм. В интервале углов падения от 0 до 37,8° данные соответствуют продольной волне, а выше 37,8° главную роль играет сдвиговая волна.

время распространения импульса определяется продольной волной растяжения-сжатия. Для углов падения в интервале от 38° до 55° время распространения определяется поперечной сдвиговой волной.

Используя приведенные выше уравнения, на основе данных о времени распространения импульса можно вычислить скорости продольной V_L и поперечной волн V_S в зависимости от угла преломления r. Затем с помощью уравнений Кристоффеля (6.27) – (6.31) из вычисленных скоростей V_L и V_S можно найти четыре константы упругости C_{pq}:

$$V_L^{\,2} = \frac{B_1 + B_2 + \sqrt{(B_2 - B_1)^2 + 4B_3^{\,2}}}{2\rho} \qquad (6.27)$$

и

$$V_L^2 = \frac{B_1 + B_2 - \sqrt{(B_2 - B_1)^2 + 4B_3^2}}{2\rho}, \quad (6.28)$$

где ρ - плотность образца,

$$B_1 = C_{11}\cos^2 r + C_{55}\sin^2 r \quad (6.29)$$

$$B_2 = C_{55}\cos^2 r + C_{33}\sin^2 r \quad (6.30)$$

$$B_3 = (C_{55} + C_{13})\cos r \sin r \quad (6.31)$$

Индексы констант упругости отражают необходимость вращения образца вокруг оси 2.

Заметим, что эти уравнения имеют несколько решений. Для уменьшения ошибок значений констант упругости используют четырехмерную процедуру минимизации. Сначала грубо оценивают значения всех констант упругости, а затем методом последовательных итераций находятся наиболее подходящие значения.

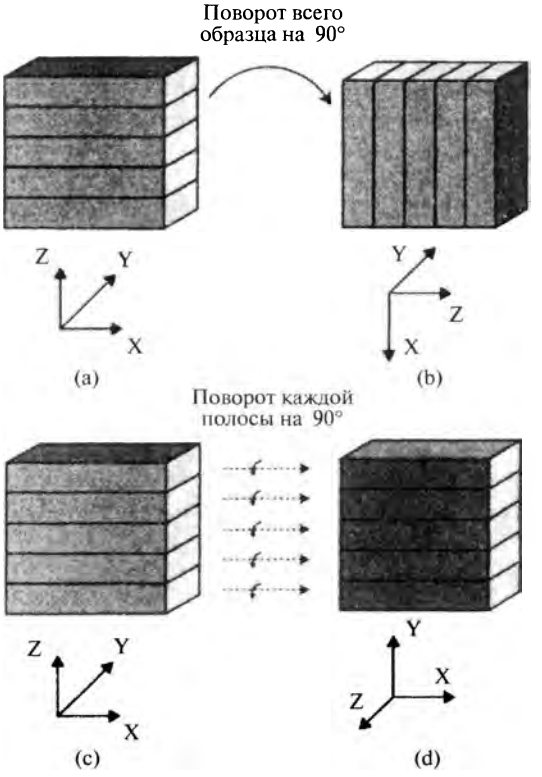


Рис. 6.27. Схема измерения констант упругости плоской пластины. (a) - Начальная ориентация образца, сканирование проводят при различных углах падения. (b) - После поворота образца на 90° его вновь сканируют при различных углах падения. (c) - Образец разрезают на полосы, каждую полосу поворачивают на 90°, после чего их вновь собирают вместе. (d) - Собранные полосы вновь сканируют при различных углах падения.

Если целью является изучение малых вариаций плотности или констант упругости, то процедура минимизации ошибок становится пятимерной. Другие постоянные упругости можно найти, ориентировав образец, как показано на рис. 6.27a и отсканировав его. Затем образец поворачивают на 90° (рис. 6.27b) и сканируют повторно при различных углах падения. Если симметрия образца такова, что необходимо получить все девять констант упругости, то образец разрезают на полосы, полосы поворачивают и вновь собирают воедино, как показано на рис. 6.27d. После этого осуществляют еще одно сканирование при различных углах падения волны.

Для вращения вокруг 1-й оси постоянные упругости C_{11}, C_{33}, C_{55} и C_{13} замененяют на C_{22}, C_{33}, C_{44} и C_{23}, а для вращения вокруг 3-й оси постоянные C_{11}, C_{33}, C_{55} и C_{13} заменяют на C_{22}, C_{11} , C_{66} и C_{12} соответственно. Эта процедура при ручной работе весьма утомительна. Автоматизация процесса сокращает время сбора и анализа данных в 15-20 раз и повышает чувствительность системы. Кроме того, возможность сканирования больших областей позволяет исследовать связь между распространением ультразвука и мезоструктурой образца, что невозможно сделать вручную.

Полный набор констант упругости ПММА (в ГПа) был получен иммерсионным методом при температуре 25°C и частоте ультразвука 2,25 МГц.

$$\begin{pmatrix} 8{,}16 \pm 0{,}02 & 3{,}85 \pm 0{,}02 & 3{,}94 \pm 0{,}01 & & & \\ 3{,}85 \pm 0{,}02 & 8{,}57 \pm 0{,}17 & 4{,}17 \pm 0{,}02 & & & \\ 3{,}94 \pm 0{,}01 & 4{,}17 \pm 0{,}02 & 8{,}44 \pm 0{,}22 & & & \\ & & & 2{,}25 \pm 0{,}01 & & \\ & & & & 1{,}99 \pm 0{,}01 & \\ & & & & & 1{,}99 \pm 0{,}03 \end{pmatrix}$$

Погрешность констант упругости ПММА составляет от ±0,2 до ±1,7%. Погрешности вычисляли исходя из известной ошибки измерения времени, плотности и толщины образца. Особый интерес вызывает оценка погрешности, возникающей в процессе минимизации. При рассмотрении волокнистых композитов ситуация оказывается более сложной, и появляется дополнительная погрешность, обусловленная пространственной вариацией модуля упругости на мезоструктурном уровне.

6.4.4. Углепластики, армированные непрерывными волокнами

Однонаправленные углепластики отличаются от ПММА коренным образом. Их жесткость вдоль оси волокон примерно в сто раз выше упругости в перпендикулярном направлении. На рис. 6.28 приведен набор кривых, демонстрирующих зависимость времени распространения от угла падения волны при различной ориентации волокон.

Чтобы оценить изменение поведения ультразвука при варьировании структуры композита, в пластине из однонаправленного углепластика вырезали отверстие диаметром 2 см, в которое можно было вставить круглый вкладыш с различной ориентацией волокон. На рис. 6.29 приведены две карты времени распространения ультразвука при ориентации вкладыша под углом 5° к остальной части плас-

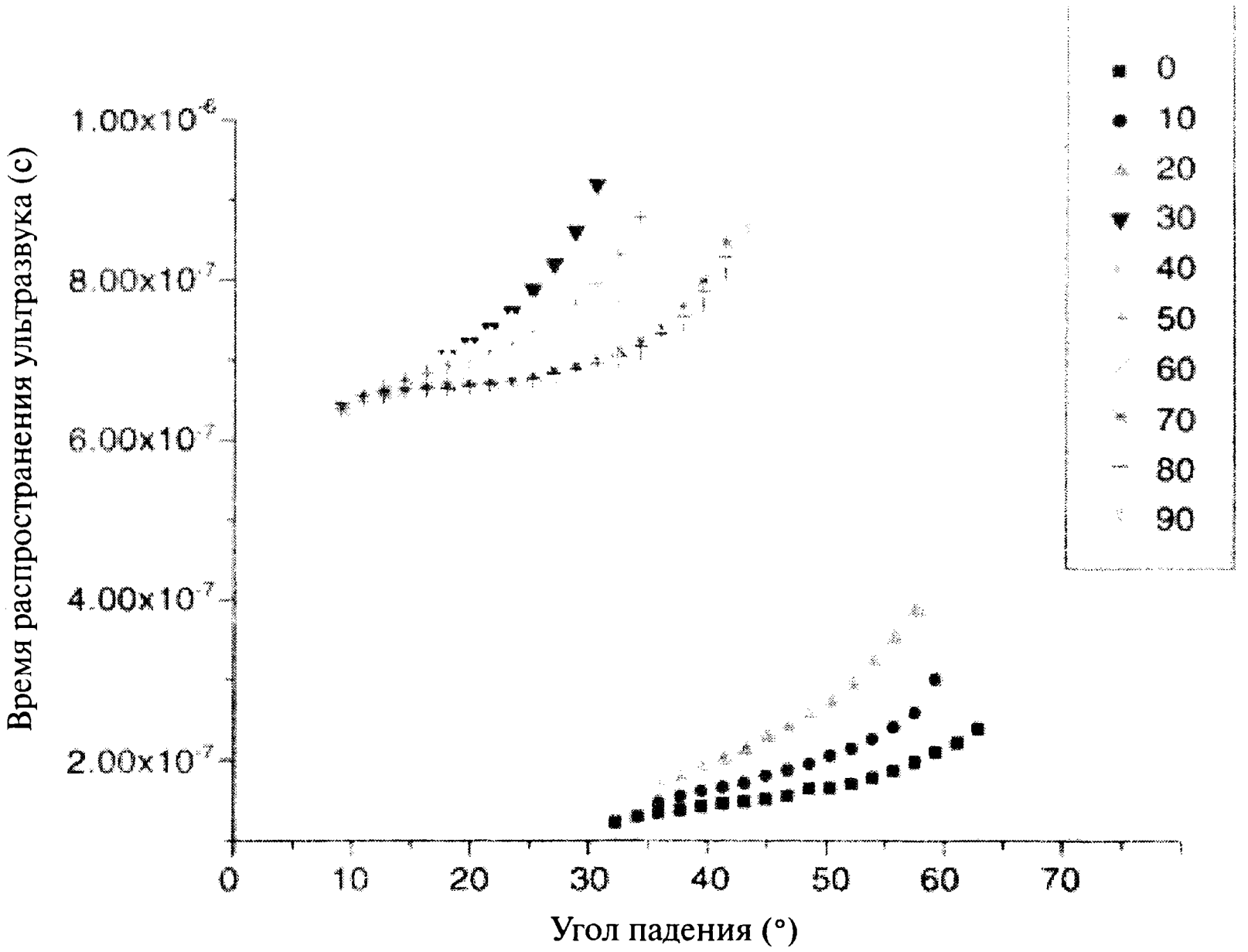


Рис. 6.28. Изменение времени распространения сдвиговой волны в однонаправленном углепластике. При изменении угла падения от 0 до 90° относительно направления волокон наблюдается сильное изменение времени распространения и амплитуды волны.

тины для продольных волн при перпендикулярном падении (a) и для сдвиговых волн при угле падения 40° (b). При перпендикулярном падении волны контуры полученных фигур имеют округлую форму, а для сдвиговых волн – форму эллипса. Градиенты при сканировании вкладыша (рис. 6.30) можно объяснить тем, что ультразвуковой пучок имеет значительный размер (его диаметр равен 1 см) и он постепенно перекрывает границу пластины и вкладыша.

В композитах, армированных короткими волокнами, ситуация может быть более сложной из-за случайной местной ориентации волокон. Для моделирования композита в одном из опытов тонкий слой однонаправленного углепластика поместили под углом 35° к ультразвуку (для возбуждения сдвиговой волны) и провели сканирование, после чего пластину несколько раз поворачивали на 10° и каждый раз проводили сканирование. На рис. 6.31 представлена корреляция времени распространения и амплитуды волны при различной ориентации волокон. Этот график иллюстрирует диапазон изменения времени распространения и амплитуды волны в материалах, состоящих из слоев с различной ориентацией волокон. Наблюдаемое изменение времени распространения и амплитуды значительно превосходит вариацию, вызванную различиями толщины.

6.4.5. Стеклопластик, полученный методом литья под давлением

На протяжении нескольких последних лет нашей главной целью было получение карт констант упругости композитов. В частности, армированных короткими волокнами стеклопластиков, полученных литьем под давлением. Образцы, изго-

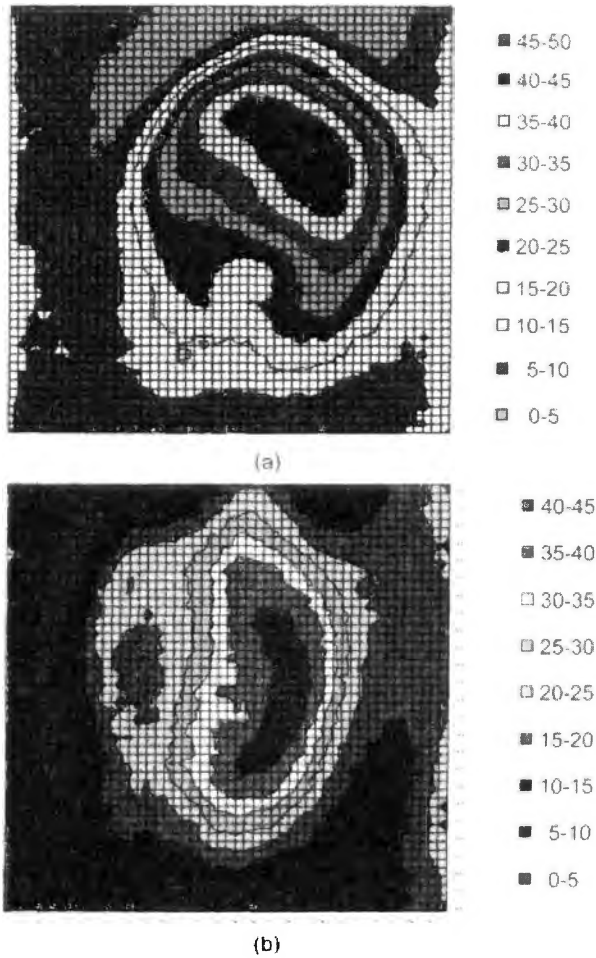


Рис. 6.29. (a) – Карта времени распространения нормальной волны растяжения-сжатия в пластине однонаправленного углепластика (с вкладышем диаметром 2 см) при перпендикулярном падении волны. (b) – Карта времени распространения сдвиговых волн, распространяющихся под углом 40°. Волокна вкладыша ориентированы под углом 5° к волокнам пластины. Размер области сканирования 2,5×2,5 см, а время дается в нс.

товленные в различных технологических условиях, изучали при помощи ультразвуковой водно-иммерсионной установки. Проект преследовал две цели. Первой было сравнение реальных констант упругости с теоретическими предсказаниями, полученными с помощью пакета компьютерных программ Moldflow™, а второй – исследование воспроизводимости констант упругости в различных образцах.

На рис. 6.32a схематически показана пластина толщиной 5 мм, полученная методом многократной инжекции расплава. Участок размером 0,2×5 мм сканировали с помощью анализатора изображения, описанного в главе 3. Приведенные данные выявляют изменение ориентации волокон по толщине пластины. Рис. 6.32b демонстрирует изменение элементов тензора ориентации. Микроструктура композита различна в приповерхностной области и в середине. Тол-

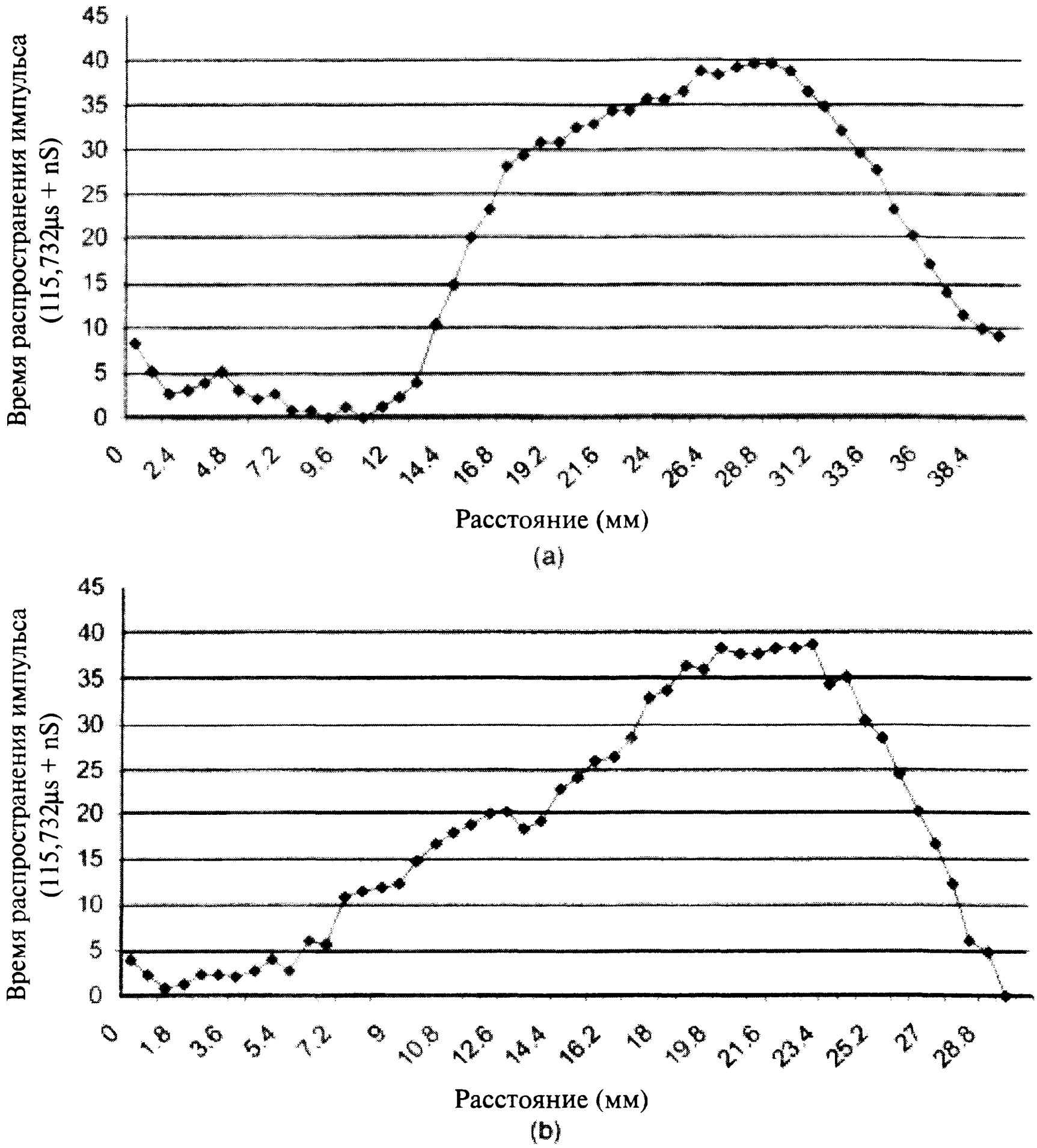


Рис. 6.30. Распределение времени распространения волны при поперечной ориентации круглого вкладыша из углепластика в случае перпендикулярного падения ультразвука (рис. 6.29 а). Рисунок иллюстрирует поведение системы при различной ориентации волокон. Постепенное изменение времени распространения волны на краях вкладыша объясняется перекрыванием пучка диаметром 1 см и границы вкладыша диаметром 2 см.

щина приповерхностной области изменяется достаточно сильно в зависимости от параметров технологического процесса и толщины пресс-формы. Как показывает испытание образца с вкладышем из углепластика, различия толщины приповерхностной области и ориентации волокон влияют на распространение ультразвуковых сдвиговых волн. Это вызвано тем, что локальные различия ориентации волокон приводят к варьированию констант упругости.

Для иллюстрации результатов сканирования образца сдвиговой волной рассмотрим рис. 6.33, на котором представлены картины времени распространения волны для трех участков стеклопластика, армированнного короткими волокнами. Первое место расположено около точки инжекции расплава (a, b). Второе соответствует середине пластины (c-d), а третье – концу пластины (e-f). Из по-

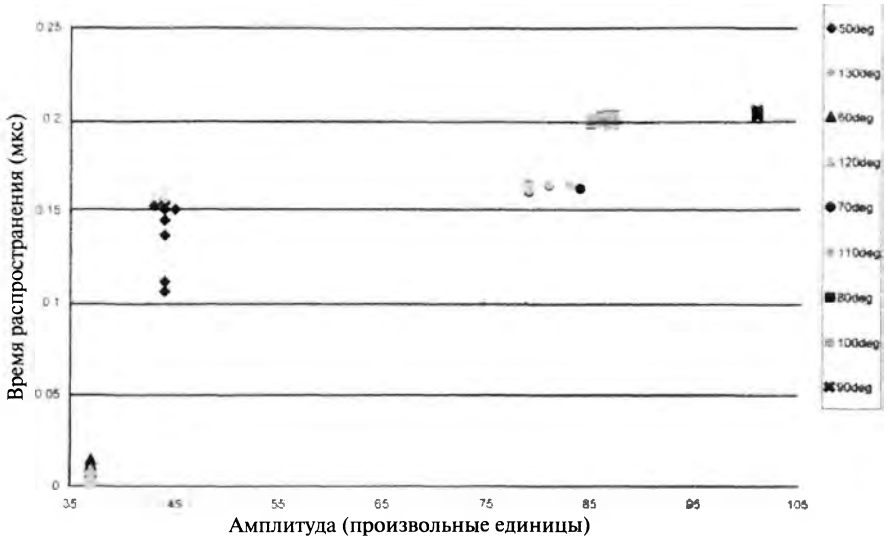


Рис. 6.31. Корреляция между временем распространения и амплитудой полученной сдвиговой волны при угле падения ультразвука 35°. Угол ориентации волокон в однонаправленном углепластике изменялся от 50 до 130° с шагом 10°. Время распространения и затухание сдвиговых волн зависит от ориентации волокон. Вариация локальной ориентации волокон в углепластиках, армированных короткими волокнами, приводит к аналогичному влиянию.

липропилена, армированного стеклянными волокнами, изготовили два образца. Участки размером 2×2 см с точки зрения морфологии имеют и сходства, и различия. На рис. 6.34 представлена корреляция между временем распространения и амплитудой волны для всех трех участков образца. Обратим внимание на постепенный сдвиг данных при сохранении общей корреляционной закономерности. Этот сдвиг может быть вызван постепенным изменением толщины пресс-формы или эффектом коробления, а резкие изменения времени распространения и амплитуды напоминают данные для углепластика, представленные на рис. 6.31. Это указывает на то, что изменения вызваны вариацией ориентации волокон и изменением толщины приповерхностных слоев. Заметим, что этот метод можно использовать для изучения воспроизводимости структуры композитов, изготовленных идентичным способом.

Данные, полученные сканированием образца при различных углах падения (в пределах от 0 до 60°), можно использовать для построения карты значений постоянных упругости. На рис. 6.35 показаны две такие карты. Упругость материала непостоянна, и на рис. 6.36 приведены соответствующие распределения констант упругости. Случайные погрешности измерений значительно меньше вариаций, вызванных изменением структуры материала. Например, среднее значение C_{xx} на данном участке образца составляет 19,5 ГПа при погрешности измерений менее ±2%, а различия, обусловленные вариацией мезоструктуры, достигают ±20%.Это невозможно было бы установить на неавтоматизированной установке.

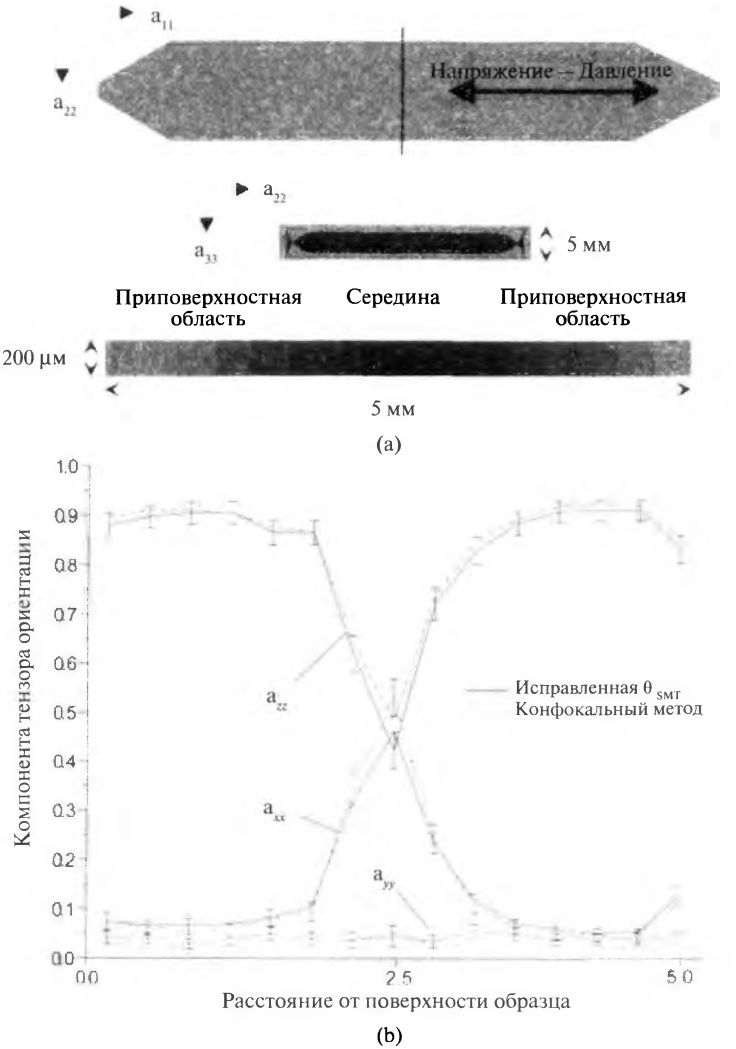


Рис. 6.32. (a) – Схема, демонстрирующая различие приповерхностной и центральной областей пластины из стеклопластика, изготовленного литьем под давлением. (b) – Величина элементов тензора ориентации волокон изменяется по толщине образца.

6.4.6. Выводы

Ультразвуковые исследования проводились в течение десятилетий. Казалось бы, эта область полностью освоена и не обещает никаких сюрпризов. Однако в гетерогенных материалах, таких как волокнистые полимерные композиты, многие вопросы требуют прояснения. Например, имеется несколько различных уравнений, предсказывающих коэффициент отражения акустической волны на границе жидкость-композит и композит-жидкость. Авторам известны четыре различные формулы, описывающие коэффициент отражения ультразвуковых волн на грани-

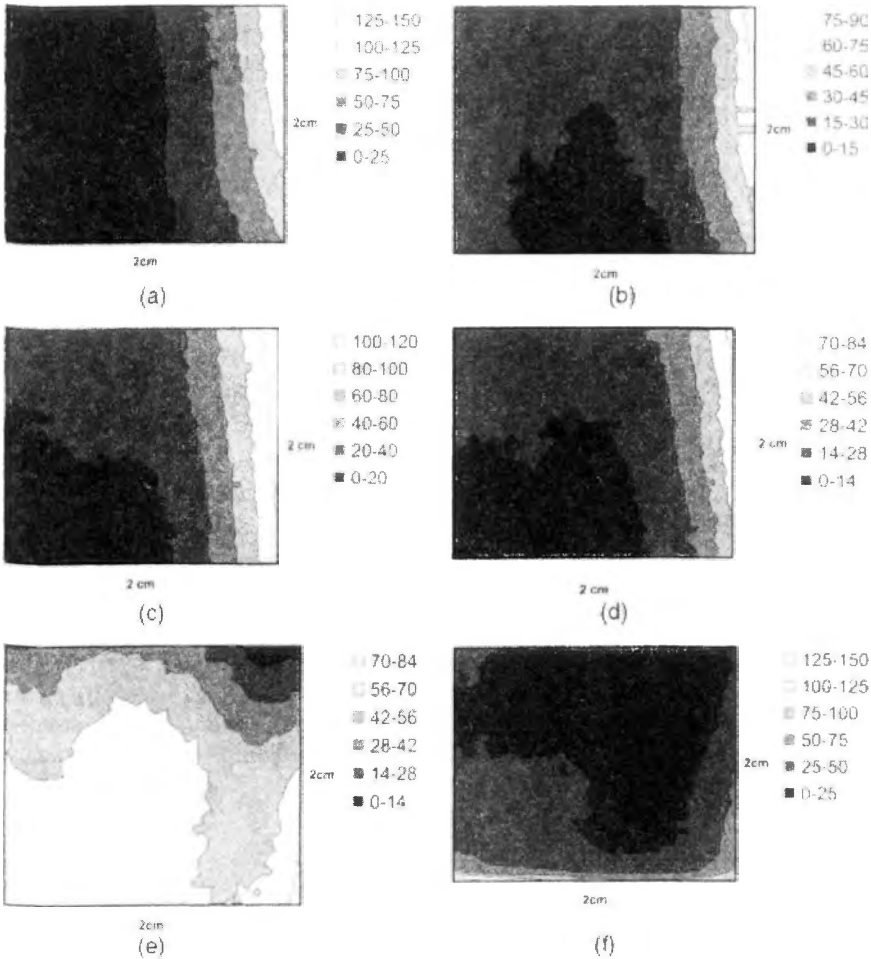


Рис. 6.33. Вариация времени распространения ультразвука в различных точках пластины из стеклопластика на основе полипропиленовой матрицы. (a) и (b) – Область рядом с точкой инжекции расплава, (c) и (d) - область в средней части пластины, (e) и (f) – область вдали от точки инжекции. Показаны одинаковые участки двух иготовленных идентичным способом образцов при угле падения волны 35°. Время распространения дано в нс.

це раздела жидкость/твердое тело [51–53, 42]. Однако экспериментальная проверка этих уравнений еще впереди.

В настоящее время уже получены корреляции между степенью ориентации волокон и некоторыми характеристиками распространения ультразвуковых волн. Однако необходимы новые исследования, направленные на получение информации, которая с разумной достоверностью позволила бы делать выводы об ориентации волокон в объеме образца. Хотя пока еще не хватает сведений о связи ориентации волокон с распространением ультразвуковых волн в изделиях сложной структуры, данный метод позволяет исследовать воспроизводимость свойств изделий при таких производственных процессах, как литье под давлением. Автома-

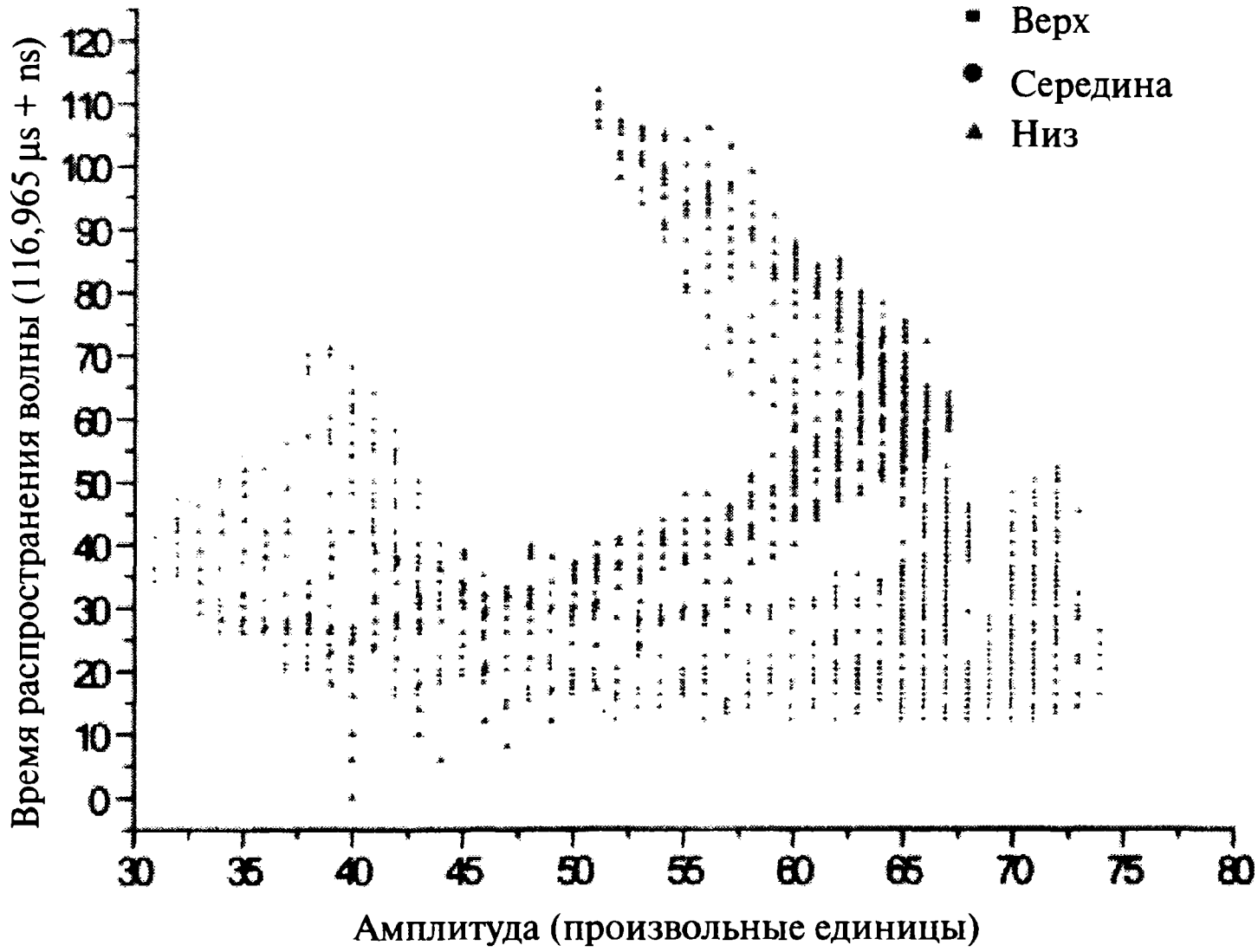


Рис. 6.34. Корреляция между временем распространения и амплитудой прошедшей волны для трех участков - верха, середины и низа образцов, изображенных на рис.6.33. Относительный сдвиг трех корреляционных графиков (от высокой амплитуды и короткого времени распространения до меньшей амплитуды и большего времени распространения) вызван различиями в толщине материала, однако форма корреляции указывает на наличие локальной вариации ориентации волокон.

тизация описанной выше водноиммерсионной установки значительно ускорила ее работу и существенно облегчила:

- определение интервала возможных значений констант упругости;
- обнаружение дефектов структуры;
- дифференциацию эффектов, связанных с вариацией толщины изделия, и более существенными техническими причинами.

Программное обеспечение, моделирующее трехмерную структуру и характеристики композитов, дает все еще не слишком точные результаты. Реальные константы упругости, полученные при помощи ультразвуковых методов, послужат тестом для численных пакетов программ и помогут проверить предположения, на которых основаны такие программы.

Мы продемонстрировали, что при сканировании образцов при фиксированном угле падения ($\theta_i = 35^\circ$) распространение ультразвуковых сдвиговых волн чувствительно к вариациям мезоструктуры в объеме образца. Сканирование можно использовать для выявления участков дальнейшего исследования с помощью двухмерного анализатора изображений или конфокального растрового лазерного микроскопа. Сканирование образцов при разных углах падения позволяет определить локальные значения констант упругости и, соответственно, более точно

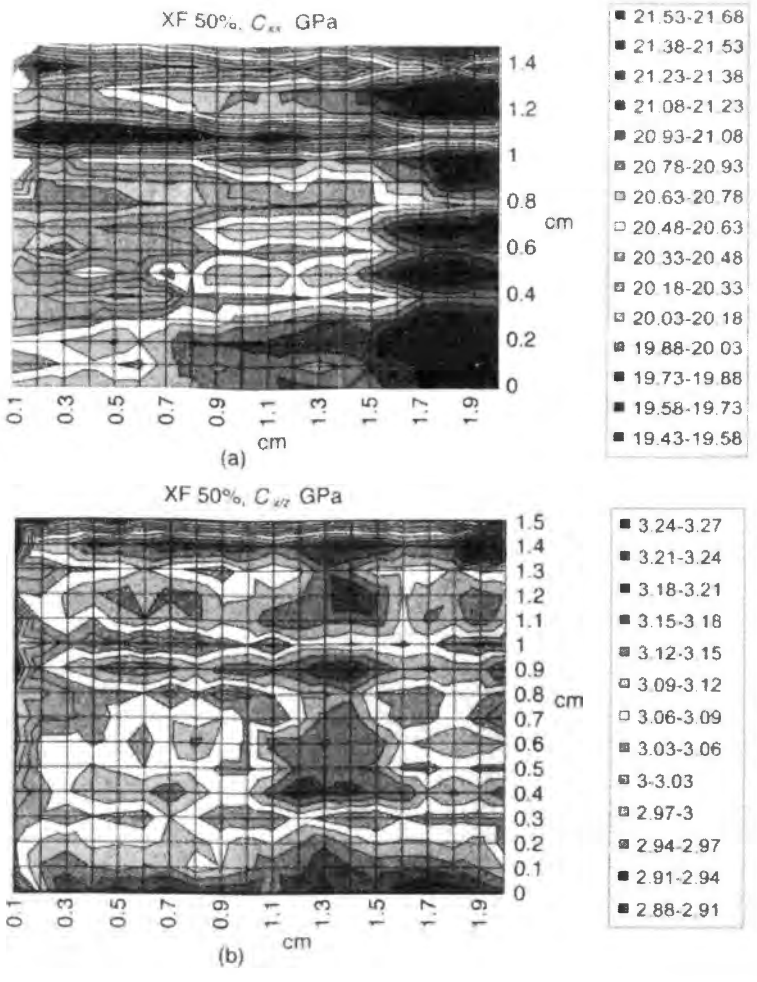
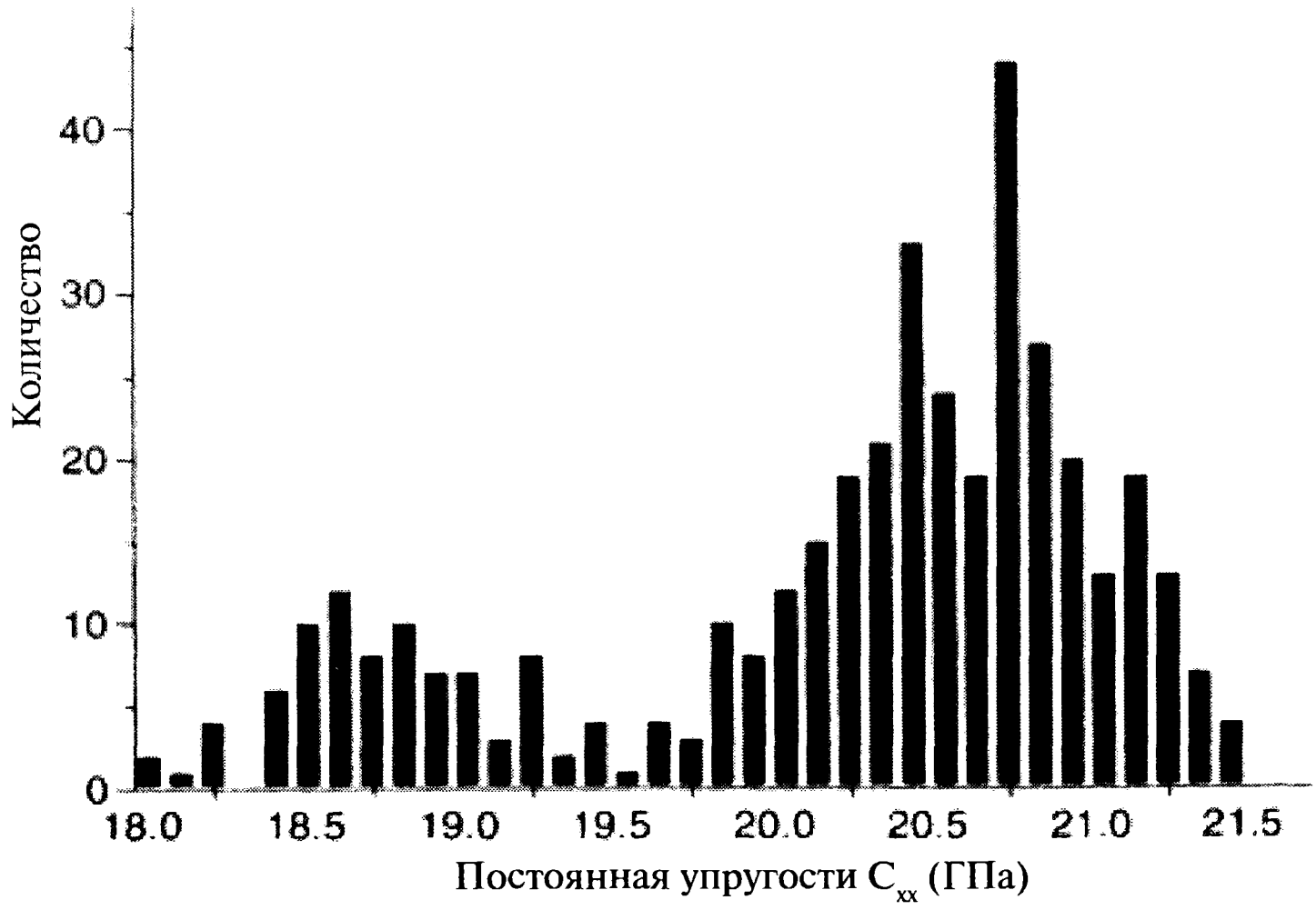


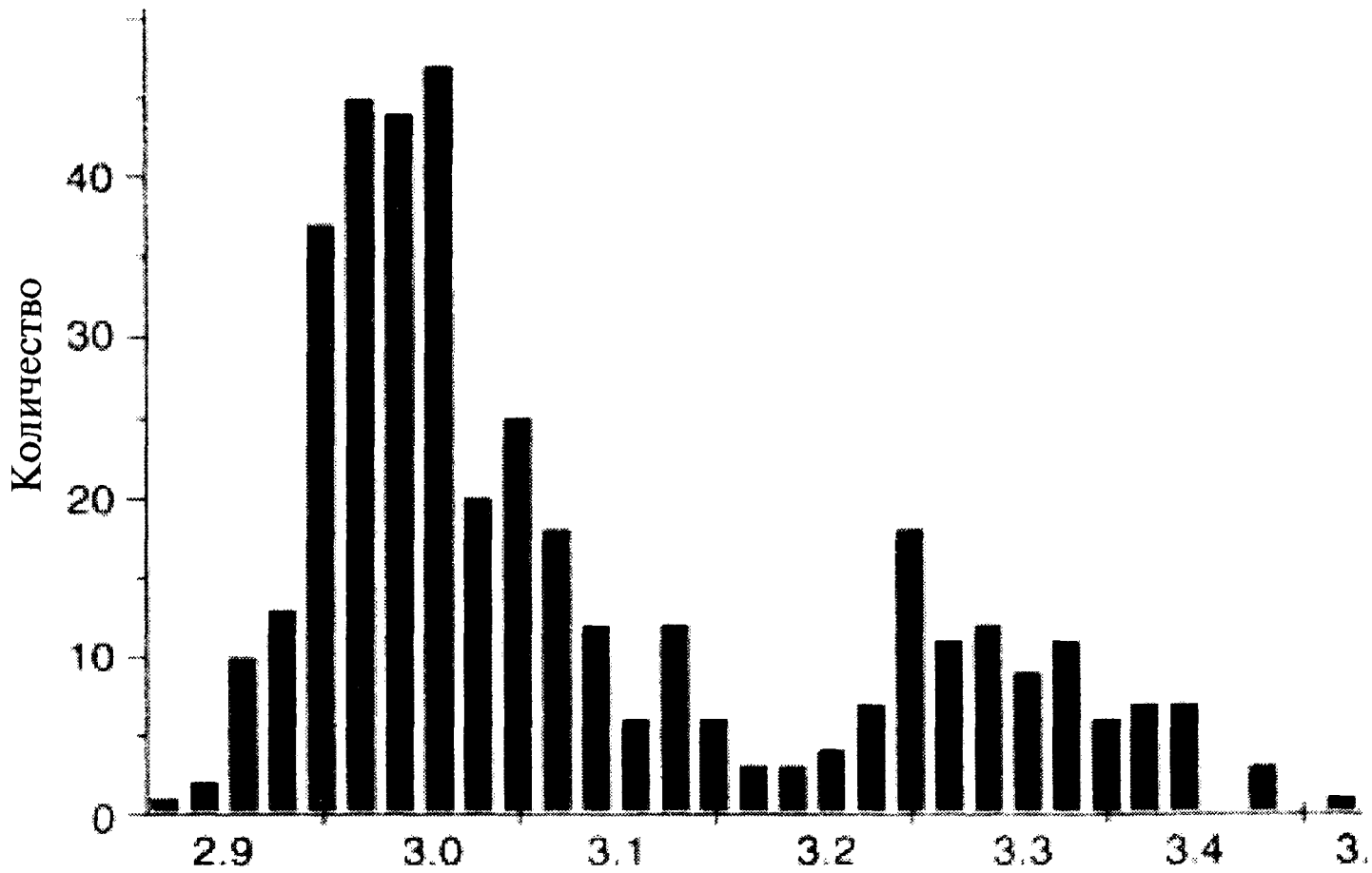
Рис. 6.35. На основе измерений времени распространения ультразвука при различных углах падения можно построить карты постоянных упругости. На рисунке приведены такие карты для стеклопластика на основе полиариламида. Пластина получена методом литья под давлением. Постоянные упругости Cxx (a) и Cxz (b) иллюстрируют мезоструктуру материала. Значения приводятся в ГПа.

вычислить упругость образцов на макроуровне. Кроме того, оно позволяет определить типичные величины вариации констант упругости.

Продолжается поиск модели, описывающей распространение ультразвуковых волн в гетерогенных композитах. Есть основания полагать, что распространение ультразвука в волокнистых композитах, полученных литьем под давлением, может быть описано простой моделью трехслойного слоистого материала, учитывающей ориентацию волокон.



(a)



(b)

Рис. 6.36. Распределение значений постоянных упругости C_{xx} (a) и C_{xz} (b) на рис. 6.35 демонстрирует, что случайная ошибка результатов на одном определенном участке значительно ниже, чем изменения, обусловленные вариацией мезоструктуры на том же участке.

6.5. Заключение

Существует множество методов, обеспечивающих пространственное разрешение, равное или даже превосходящее разрешение оптических микроскопов. Существуют и другие методы, позволяющие сканировать большие объемы образца. К сожалению, они оказались за рамками данной книги. Например, в недавних публикациях упоминались следующие методы:

- *Масс-спектрометрия вторичных ионов* (*SIMS*) [54].
- *Детекция токов Эдди* [55].
- *Регистрация локальной емкости* [56].
- *Спектроскопия аннигиляции позитронов* [57].
- *Трехмерная ионная микротомография* [58].
- *Трехмерный метод атомных зондов* [59].
- *Нейтронная радиография* [60].

На протяжении последних нескольких десятилетий по мере появления новых методов регистрации изображения и роста вычислительной мощности персональных компьютеров быстро развивались микроскопические методы, направленные на изучение структуры конструкционных материалов. За всеми новыми разработками угнаться трудно, но мы надеемся, что данная книга доказала несомненную жизненность микроскопии. Существует множество превосходных журналов, в которых можно получить более подробную информацию о новейших разработках. В их числе *Journal of Microscopy, Scanning, Reviews of Modern Physics и Reviews of Scientific Instrumentation*.

Данная книга была посвящена микроскопическим (в основном оптическим) методам изучения материалов. Одной из любопытных новых разработок стало появление интернетных «виртуальных инструментов». В главе 2 упоминалось лабораторное устройство Vela, включающее микропроцессор модели M6802 фирмы Motorola, которое при минимуме аппаратного обеспечения подражало работе «настоящих инструментов», имеющихся в школьных и университетских лабораториях. Идея была проста и состояла в том, что любой инструмент можно смоделировать с помощью компьютерной программы, даже если его рабочие характеристики будут ниже, чем у реально существующего прибора. Одновременно с разработками лаборатории Vela фирма National Instruments работала над развитием концепции «виртуального инструмента» для персональных компьютеров. В соответствии с ней, перед началом реальных измерений, подключив к компьютеру специальную карту для управления и сбора данных и установив программное обеспечение, созданное National Instruments, пользователь может использовать виртуальные инструменты и соединять их друг с другом на экране монитора.

С развитием Интернета появились и другие интересные возможности:

- *Передача изображений на расстояние*. Видеосвязь с разными частями мира создала круглосуточный доступ к микроскопическим изображениям.
- *Дистанционное управление микроскопом*. Растет число микроскопов, которыми можно управлять через Интернет. Например, в работе [61] описан пример дистанционного управления электронным микроскопом.
- *Образование*. На приборах, управляемых через Интернет, выделяют время для работы на них школьников, производственников и ученых.

Теперь попытаемся представить, как в ближайшем будущем достижения в создании искусственного разума, робототехники, миниатюрных источников света, глобальной информационной сети и «интеллектуальных материалов» повлияют

на развитие микроскопии? Как миниатюризация, вплоть до возможности работы на нанометрическом масштабе, затронет методы, упомянутые в данной книге? Интересно представить себе, что может произойти в течение нескольких ближайших десятилетий. Представим несколько возможных сценариев будущего развития микроскопии!

Сценарий 1. Будущее слияние компьютеров и контрольно-измерительных приборов, вероятно, приведет к тому, что ученый будет доставать из своего кармана складывающийся гибкий лист на полимерной основе. Этот лист будет представлять собой дисплей и миникомпьютер, имеющий небольшую вычислительную мощность, но связанный по радиотелеметрическому каналу с мощным компьютером, находящимся дома или на рабочем месте. Такой полимерный портал обеспечит пользователю доступ к лабораторному микроскопу, набору образцов, управлению микроскопом и, как следствие, даст возможность получать изображения, а также позволит приступать к анализу этих изображений, находясь в любой точке планеты.

Сценарий 2. Ученый при посещении промышленного предприятия-клиента, возможно, достанет из своего кармана устройство размером с ладонь. Этот прибор – оптический микроскоп, изготовленный при помощи нанотехнологий. Его можно будет поместить на анализируемый образец, и он начнет перемещаться по поверхности последнего, делая конфокальные снимки трехмерной структуры образца на различной глубине от поверхности. Другие возможные «мутанты» из семейства нанотехнологических микроскопов – разнообразные атомные силовые микроскопы. Разве это предположение чересчур фантастично? Вспомните ссылку в главе 4 на конструкцию миниатюрного конфокального микроскопа!

Несомненно одно – будущее микроскопии XXI века будет даже еще более интересным и захватывающим, чем перечисленные сценарии. Микроскопия всегда была богата сюрпризами и всегда пользовалась последними техническими достижениями и открытиями. Ее конечная цель – достоверное воспроизведение в трехмерной структуре материалов – быстро становится реальностью.

6.6. Литература

1. Klemperer O. (1961), *Electron Physics; The physics of the free electron*, Butterworths, London.
2. Everhart T.E. and Hayes T.L. (1972), The Scanning Electron Microscope, *Scientific American*, January, 54.
3. Grim P.C.M. and Had/iioannou G. (1994), Imaging and characterisation of materials by the new scanning probe techniques (STM/AFM), in *Characterisation of Polymer Composites*, ed. H. Ishida, Butierworth-Heinemann, Chapter 7, pp. 129-146.
4. Binnig G., Rohrer H., Gerber C.H. and Weibel E. (1982), Surface studies by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. Lett.*, **49**, 57-61.
5. Binnig G., Quate C.F. and Gerber C.H. (1986), Atomic force microscopy, *Phvs. Rev. Lett.*, **56**, 930-933.
6. Reimer L. (1989) *Transmission Electron Microscopy*, Springer-Verlag, Berlin.
7. Den Dekker A.J., Sijbers J. and Van Dyck D. (1999), How to optimize the design of a quantitative HREM experiment so as to attain the highest precision, *J. Microsc-Oxford*. **194**, Part I, 95-104.

8. Amelinckx S., Van Dyck D., Van Landuyt J. and Van Tendeloo G. (1997), *Handbook of Microscopy, Methods I and II*, VCH, New York.
9. Danilatos G.D. (1993), Introduction to the ESEM instrument, *Microsc. Res. Techn*, **25**, 354-361.
10 . Howie A. (1995), Recent developments in secondary electron imaging, *J. Microsc -Oxford*, **180**, 192-203.
11. Thiel B.L., Bache 1.C., Fletcher A.L., Meredith P. and Donald A.M. (1997). An improved model for gaseous amplification in the ESEM, *J. Microsc-Oxford*, **187**, 143-157.
12. Stelmashenko N.A., Craven J.P., Donald A.M., Terentjev E.M. and Thiel B.L. (2001), Topographic contrast of partially wetting water droplets in environmental scanning electron microscopy, *J. Microsc-Oxford*, **204**, Part 2, 172-183.
13. www.leica-microsystems.com, www.oxford-instruments.com and for historical information on electron microscopy, see www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/semhist-intro.htm.
14. Dillard J.G. (1994), X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA), in *Characterisation of Composite Materials*, ed. H. Ishida, Butterworth-Heinemann, Chapter 1.
15. Paparazzo E. (1994), Applications of scanning Auger microscopy to the analysis of materials, *Microscopy & Analysis*, Nov, 17-19.
16. Ferguson I.F. (1989), *Auger Microprobe Analysis*, Adam Hilger, Bristol.
17. Vajda E.G. (1998), Errors in quantitative back-scattered electron analysis of bone standardised by energy-dispersive X-ray spectrometry, *Scanning*, **20**, 527-535.
18. Farhang H., Napchan E. and Blott B.H. (1993), Electron back-scattering and secondary electron emission from carbon targets: comparison of experimental results with Monte-Carlo simulations, *J. Phys. D: Appl Phys.*, **26**(12), 2266-2271.
19 . Yasuda M., Kawata H. and Murata K. (1996), The spatial distribution of back-scattered electrons calculated by a simple model, *Phys. Stat. Sol. (a)*, **153**(1), 133-144.
20. Napchan E. (2001), Back-scattered electrons in the SEM, *Microscopy & Analysis*, January, 9-11.
21. Terauchi M., Tanaka M., Tsuno K. and Ishida M. (1999), Development of a high energy resolution electron energy-loss spectroscopy microscope, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 203-209.
22. Leapman R. (1992), *EELS Quantitative Analysis Transmission Electron Energy Loss Spectrometry in Materials Science* (eds. M.D. Disko, C.C. Ahn and B. Fulz) pp. 47-83, Electronic, Magnetic and Photonic Materials Division monograph series no. 2, The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale.
23. Lakner H., Rafferty B. and Brockt G. (1999), Electronic structure analysis of (In, Ga, Al) N heterostructures on the nanometre scale using EELS, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 79-83.
24. Liu CP., Preston A.R., Boothroyd C.B. and Humphreys CJ. (1999), Quantitative analysis of ultrathin doping layers in semiconductors using high-angle annular dark field images, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 171-182.
25. De Graef M., Nahfer N.T. and McCartney M.R. (1999), Phase contrast of spherical magnetic particles, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 84-94.
26. Knippelmeyer R. and Kohl H. (1999), Relativistic calculations of intensity distributions in elemental maps using contrast transfer functions, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 30-41.

27. Zipprich J., Fuller T., Banhart F., Schmidt O.G. and Eberl K. (1999), The quantitative characterisation of SiGe layers by analysing rocking profiles in CBED patterns, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 12-20.
28. Yakimov E.B. (2001), Modulated EBIC and photocurrent: diffusion length depth distributions, *Microscopy & Analysis*, January, 21-23.
29. Callaghan P.T. (1991), *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*, Oxford: Clarendon Press.
30. Koenig J.L. (1992), *Spectroscopy of Polymers*, ACS, Washington, Chapter 11.
31. Matzkanin G.A. (1989), A review of nondestructive characterisation of composites using NMR, in *Nondestructive Characterisation of Materials*, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C. Ruud and R.E. Green, Springer-Verlag, New York, pp. 655-669.
32. Blumich B. and Blumler P. (1993), NMR imaging of polymer composites, *Makromol Chem.*, **194**, 2133-2161.
33. Hoh K-P., Perry B., Rotter G., Ishida H. and Koenig J. (1989), Anlaysis of composite processing using magnetic resonance imaging, *J. Adhesion*, **27**(4), 245-249.
34. Jezzard P., Wiggins C, Carpenter T., Hall L., Barnes J., Jackson P. and Clayden N. (1992), Demonstration of NMRI for void detection in carbon-fibre reinforced polymer composites and comparison with ultrasound methods, *J. Mater. Sci*, **27**(23), 6365-6370.
35. Briggs A. (1992), *Acoustic Microscopy*, Monographs on the Physics and Chemistry of Materials, Clarendon Press, Oxford.
36. Li W. and Hoyle B.S. (1991), Ultrasonic process tomography using multiple active sensors for maximum real-time performance, *Chemical Engineering Science*, **52**(13), 2161-2170.
37. Rabe U., Kopyinska M., Hirsekorn S. and Arnold W. (2001), Evaluation of the contact resonance frequencies in Atomic Force Microscopy as a method for surface characterisation, *Proc Ultrasonics International '01, Delft July 2001*, Paper B 1.01.
38. Dunn F. and Fry W.J. (1959), Ultrasonic absorption microscope, *J. Acoustic Soc. Amer.*, **31**, 632-633.
39. Lisy F., Hiltner A., Baer E., Katz J.L. and Meunier A. (1994), Application of scanning acoustic microscopy to polymeric materials, *J. App. Polymer Set*, **52**, 329-352.
40. Fatkin D.G.P., Scruby C.B. and Briggs G.A.D. (1989), Review: acoustic microscopy of low-ductility materials, *J. Mat. Sci*, **24**, 23-40.
41. de Belleval J.F., Boyer Y. and Lecupu D. (1989), Porosity characterisation in thin composite plates by ultrasonic measurements, in *Nondestructive Characterisation of Materials*, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C. Ruud and R.E. Green, Springer-Verlag, New York, pp. 131-139.
42. Nayfeh A.H. (1995), *Wave Propagation in Layered Anisotropic Media*, North Holland Series in Applied Mathematics and Mechanics, Vol. 39, Elsevier Science B.V.
43. Ward I.M. (1985), *Mechanical Properties of Solid Polymers*, 2nd edn, John Wiley & Sons.
44. Markham M.F. (1970), Measurement of the elastic constants of fibre composites by ultrasonics, *Composites*, March, 145-149.
45. Read B.E. and Dean G.D. (1978), *The Determination of the Dynamic Properties of Polymers and Composites*, Adam Hilger, chapter 7, pp. 162-179.
46. Lord D. (1989), The determination of the elastic constants of fibre reinforced composites by an ultrasonic method, PhD Thesis, Department of Physics, University of Leeds.

47. Hine P.J., Davidson N.C., Duckett R.A., Clarke A.R. and Ward I.M. (1995), Hydrostatically extruded, glass fibre reinforced polyoxymethylene: I The development of fibre and matrix orientation, *Polym. Composites*, **17**(5), 720-729.
48. Enderby M., Clarke A.R., Patel M., Ogden P. and Johnson A.A. (1998), An automated, ultrasonic immersion technique for the determination of 3D elastic constants of polymer composites, *Ultrasonics*, **36**, 245-249.
49. Harper MJ. and Clarke A.R. (2002), Low frequency ultrasonic propagation through fibre-reinforced, polymer composites, *Ultrasonics*, **40**(1-8) 555-560.
50. Press W., Teukolsky S., Vetterling W. and Flannery B. (1992), *Numerical Recipes in C*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 125-139, 394-455.
51. Shutilov V.A. (1988), *Fundamental Physics of Ultrasound*, Gordon & Breach Science Publishers.
52. Mayer W.G. (1965), Energy partition of ultrasonic waves at flat boundaries, *Ultrasonics*, **3**, 62-68.
53. Krautkramer J., Krautkramer H. and Grabendorfer W. (1990), *Ultrasonic Testing of Materials*, Springer-Verlag, pp. 564-565.
54. Chandra S. (2001), Studies of cell division (mitosis and cytokinesis) by dynamic SIMS ion microscopy: LLC-PKX epithelial cells as a model for subcellular isotopic imaging, *J. Microsc-Oxford*, **204**, Part 2, 150-165.
55. Zorgati R., Bernard A., Pons F., Duchene B., Lesselier D. and Tabbara W. (1989), Modelling of the electromagnetic field diffracted by an inhomogeneity in metal: a first step in magnetic imaging, in *Nondestructive Characterisation of Materials*, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C. Ruud and R.E. Green, Springer-Verlag, New York, pp. 590-597.
56. Shull P.J., Clark A.V. and Auld B.A. (1989), Applications of capacitative array sensors to nondestructive evaluation, in *Nondestructive Characterisation of Materials*, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C. Ruud and R.E. Green, Springer-Verlag, New York, pp. 582-589.
57. Park Y.K., Lee J.O. and Lee S. (1989), Nondestructive characterisation of a deformed steel using positron annihilation, in *Nondestructive Characterisation of Materials*, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C. Ruud and R.E. Green, Springer-Verlag, New York, pp. 839-845.
58. Sakellariou A., Jameson D.N. and Legge G.J.F. (2001), Three-dimensional ion microtomography, *Nucl. Inst. & Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater.*, **181**, 211-218.
59. Vurpillot F., da Costa G., Menand A. and Blavette D. (2001), Structural analyses in three dimensional atom probe: a Fourier transform approach, *J. Microsc-Oxford*, **203,** Part 3, 295-302.
60. Mast H-U., Brandler T., Knorr E. and Stein P. (1989), Small neutron radiography systems and their applications, in *Nondestructive Characterisation of Materials*, eds P. Holler, V. Hauk, G. Dobmann, C Ruud and R.E. Green, Springer-Verlag, New York, pp. 707-714.
61. Tanaka M., Tsuda K., Terauchi M., Tsuno K., Kaneyama T., Honda T. and Ishida M. (1999), A new 200 kV π filter electron microscope, *J. Microsc-Oxford*, **194**, Part 1, 219-227.

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСТВА "ТЕХНОСФЕРА"

В.Миронов
ОСНОВЫ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Первое учебное пособие на русском языке, охватывающее всю область принципиально новых приборов для изучения поверхности твердых тел и наноструктур от туннельных до атомно-силовых и магнитно-силовых микроскопов. Подробно описаны применяемые конструкции и схемные решения аппаратуры, особенности применения. Для студентов и преподавателей физических, приборостроительных и материаловедческих специальностей.

Содержание:

Введение

Глава 1.

Техника сканирующей зондовой микроскопии

1.1. Принципы работы сканирующих зондовых микроскопов
1.2. Сканирующие элементы (сканеры) зондовых микроскопов
1.3. Устройства для прецизионных перемещений зонда и образца
1.4. Защита приборов от внешних воздействий
1.5. Формирование и обработка СЗМ изображений

Глава 2.

Методы сканирующей зондовой микроскопии

2.1. Сканирующая туннельная микроскопия (СТМ)
2.2. Атомно-силовая микроскопия (АСМ)
2.3. Электросиловая микроскопия (ЭСМ)
2.4. Магнитно-силовая микроскопия (МСМ)
2.5. Ближнепольная оптическая микроскопия (СБОМ)

Заключение

Литература

О. Егорова
ТЕХНИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ
Практика работы с микроскопами для технических целей
С микроскопом на "ты"
Издание 2-е, переработанное

Данная книга представляет собой развитие темы технической микроскопии, поднятой автором в книге "С микроскопом на "ты" (изд. Интерлаб, 2000 г., Санкт - Петербург). За прошедшее время произошли изменения в номенклатуре световых микроскопов, а также появились вопросы, связанные с технологией изготовления, измерения, оценки качества оптических систем и их тестированием.

В книге рассмотрены вопросы классификации технических микроскопов, подбора техники для решения задач микроскопических методов исследования образцов, а также вопросы стандартизации и методов контроля качества оптических деталей. Приведены основные формулы микроскопии.

Книга предназначена для специалистов – микроскопистов ЦЗЛ, студентов технических вузов, разработчиков оптических систем, менеджеров и маркетологов.

Содержание:

Вступление

Глава 1. Микроскопы для технических целей

1.1. Особенности микроскопии для технических целей

1.2. Теория образования изображения

1.3. Объекты микроскопии и микроскопы для технических целей

Глава 2. Классификация микроскопов для технических целей

2.1. Объект

2.2. Область применения

2.3. Уровень деятельности и сложности

2.4. Металлографические микроскопы

2.4.1. Предметный столик

2.4.2. Фокусировочный механизм

2.4.3. Узел крепления объектива

2.4.4. Объективы для металлографических микроскопов

2.4.5. Маркировка объективов

2.4.6. Стоимость объективов

2.5. Поляризационные микроскопы

2.6. Стереоскопические микроскопы

2.6.1. Особенности стереоскопических микроскопов

2.6.2. Методы контрастирования в стереомикроскопах

2.6.3. Новые стереомикроскопы

2.6.4. Особенности настройки стереомикроскопов

2.7. Специализированные микроскопы

2.7.1. Измерительные микроскопы

2.7.2. Макроскопы

2.7.3. Микроскопы сравнения

2.7.4. Микроскопы для микроэлектроники

2.7.5. Лазерные сканирующие микроскопы

2.7.6. Люминесцентные микроскопы

2.8. Аппаратно-программные комплексы для исследований и измерений в технической микроскопии

2.8.1. Классификация систем анализа изображения

2.8.2. Основные элементы аппаратно-программного комплекса

2.8.3. Микрофотография

Глава 3. Основные методы исследования и контрастирования

3.1. Методы светлого и темного поля в отраженном свете

3.1.1. Настройка методов светлого и темного поля

3.1.2. Измерения и счет

3.2. Поляризация

3.2.1. Поляризационный метод исследования в проходящем и отраженном свете

3.2.2. Стандартизация в поляризационной микроскопии и настройка поляризационных устройств

3.2.3. Настройка микроскопа для реализации поляризационного метода исследования и контрастирования

3.3. Дифференциально-интерференционный контраст

3.3.1. Основные принципы дифференциально-интерференционного контраста

3.3.2. Дифференциально - интерференционный контраст проходящего света

3.3.3. Дифференциально- интерференционный контраст отраженного света

3.3.4. Мини-интерферометр – метод TIC

3.4. Люминесценция

Глава 4. Практика работы с микроскопом. Стандарты микроскопии и правила ухода за микроскопом

4.1.Стандарты микроскопии

4.1.1. Основные формулы микроскопии

4.1.2. Стандарты металлографии и современная микроскопия

4.2. Правила настройки и ухода за микроскопом

4.2.1. Искажения в изображении, создаваемом микроскопом

4.2.2. Настройка микроскопа

4.2.3. Настройка бинокулярной насадки

4.2.4. Уход за микроскопом

Глава 5. Контроль качества изображения в микроскопе

5.1. Технологичность оптических конструкций

5.2. Сборка и юстировка объектива как оптического прибора

5.3. Техническое диагностирование объективов. Методы и тест-объекты

5.4. Объекты-микрометры

Глава 6. Методы оценки качества изображения объективов микроскопа

6.1. Аберрации оптических систем в терминах и определениях

6.2. Дифракционный метод для оценки сборки и качества изображения

6.3. Интерферометрические методы оценки качества изображения объективов микроскопа

6.4. Автоколлимационный метод мир для измерения разрешающей способности. Размультиплицированные миры

6.5. Автоколлимационный метод измерения светопропускания объективов микроскопа в видимом диапазоне длин волн 400-700 нм

6.6. Фотометрический метод оценки светорассеяния в микроскопе. Безрефлексные тест-объекты

6.7. Оценка качества изображения объектива микроскопа по полю. Набор тест-объектов

Глава 7. Заключительная, но не последняя...

Приложение А. Справочный материал

Приложение Б. Примеры применения современной микроскопии

Приложение В. На службе производства

Приложение Г. Использование приборов фирмы "Карл Цейсс" и специализированных систем анализа изображений при реализации Государственной программы "Развитие космической деятельности в Республике Казахстан на 2005-2007 годы"

Приложение Д. Настройка микроскопа для работы основным методом – методом светлого поля в проходящем свете

Литература

ИНФОРМАЦИЮ О НОВИНКАХ СМОТРИТЕ НА САЙТЕ:

www.technosphera.ru

Как заказать наши книги?
По почте: 125319 Москва, а/я 594
По факсу: (495) 9563346
E-mail: knigi@technosphera.ru
sales@technosphera.ru