

Ein neues Kalibrierobjekt für die Elektronenmikro- photogrammetrie

OLAF SINRAM, JÖRG ALBERTZ, Berlin, MARTIN RITTER, HENZ HOHENBERG, Hamburg,
& ANDREAS SCHERTEL, Feldkirchen

Zusammenfassung: Diese Arbeit stellt ein neues Kalibrierobjekt für die Rasterelektronenmikroskopie vor, welches den Anforderungen einer photogrammetrischen Auswertung gerecht werden soll. Für eine möglichst genaue Kalibrierung eines Aufnahmesystems werden viele, räumlich gut verteilte Passpunkte benötigt. In der Nahbereichsphotogrammetrie stellt dies in der Regel kein großes Problem dar. Kalibrierobjekte lassen sich hier unter Umständen sogar selbst herstellen, oder alternativ kann die Kamera zu einem vorhandenen Passpunktfeld gebracht werden. Beides lässt sich in der Elektronenmikroskopie nicht bewerkstelligen. Im Rahmen des laufenden, von der DFG unterstützten Forschungsprojekt 'Photogrammetrische Oberflächenrekonstruktion biologischer Objekte mittels REM Bildern' konnte ein neuartiges Kalibrierobjekt entwickelt werden, welches eindeutig identifizierbare, räumlich gut verteilte Passpunkte aufweist und durch sein Design eine gute und genaue Messbarkeit auch bei starken Kippungen gewährleistet.

Summary: *A new calibration object for electron microscope photogrammetry (microphotogrammetry).* This paper presents a new calibration object for Scanning-Electron-Microscopy, which is supposed to meet all requirements of photogrammetric evaluation. For a most accurate calibration of an image acquisition system, a sufficient number of spatially well distributed control points is required. This does not represent a major problem in close range photogrammetry. There, calibration objects can be selfmade eventually, or the sensor is taken to the nearest available control point field. Both solutions are not possible in electron microscopy. In the current research project, supported by the DFG, 'Photogrammetric surface reconstruction, using SEM images', a new pyramidal shaped calibration object was developed, which is equipped with clearly identifiable, spatially distributed control points. Due to its design, it also allows good and accurate measurements even when it is extremely tilted.

Einleitung

Die quantitative photogrammetrische Auswertung von rasterelektronenmikroskopischen Bildern ist nur unter Berücksichtigung verschiedener physikalischer und mathematischer Ansätze und mit speziellem geräte-technischem Aufwand zu bewerkstelligen. Es sollen im Folgenden die Punkte genannt werden, die die Voraussetzung für eine quantitative Auswertung bilden. Vor allem wird die Notwendigkeit eines speziellen Kalibrierobjektes für dieses Verfahren aufgezeigt. Dazu soll in Kapitel 2 die Entwicklung des Kalibrierobjektes von ersten Versuchen mit einem ebenen Gitter bis hin zur jetzigen

Form der Stufenpyramide nachvollzogen werden. Zum anderen werden erlangte Messergebnisse in Kapitel 3 vorgestellt, ein Ausblick über die weiteren Schwerpunkte des Projektes wird in Kapitel 4 gegeben.

1 Probleme bei der Elektronen- mikrophotogrammetrie

Die erste offensichtliche Herausforderung bei der Elektronenmikroskopie ist die Tatsache, dass der Sensor nicht bewegt werden kann. Das führt nicht nur bei der Kalibrierung, sondern auch bei jeder folgenden räumlichen Auswertung zu Schwierigkeiten,

da in diesem Falle Objektaufnahmen aus mehreren Richtungen erforderlich sind. Um diese bei einem feststehenden Sensor zu erhalten, muss das Objekt bewegt (gekippt) werden. Die Vakuumkammer des Mikroskopes limitiert dabei sowohl die Ausmaße des Gerätes, mit welcher die Probe bewegt und gekippt wird, als auch die Probengröße selbst. Die Entwicklung eines speziellen Positioniergerätes durch die Firma Kleindiek Nanotechnik (siehe Abb. 1) ermöglichte uns hierfür die exakte Positionierung und Kippung auf engstem Raum.

Eine weitere Hürde besteht darin, dass zwar generell mit dem Elektronenmikroskop über eine sehr große Spannweite an Vergrößerungen gearbeitet werden kann, etwa von $100\times$ bis über $150\,000\times$. Für hohe Vergrößerungen wird dann aber das Sichtfeld sehr klein. Für die Kalibrierung des Systems bedeutet dies, dass die erforderlichen Passpunkte auf dem Kalibrierobjekt sehr genau auf kleiner Fläche positioniert sein müssen.

Beim Rasterelektronenmikroskop wird die speziell behandelte Oberfläche mit einem feinen Elektronenstrahl abgetastet und die gestreuten Elektronen werden detektiert. Diese Methode ist besonders gut zur hochauflösenden Betrachtung von Oberflächen geeignet. Der Unterschied zu einem üblicher Weise in der Photogrammetrie benutzten Sensor ist, dass das Bild nicht wie in einer photographischen Kamera durch ein mehr

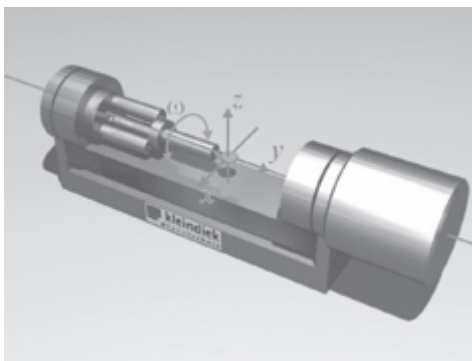


Abb. 1: Kippgenauer Probenstisch (ca. $7\text{ cm} \times 2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$).

oder weniger festes Linsensystem zur Bildebene gelangt. Stattdessen bestehen die Linsen im Elektronenmikroskop aus elektrischen und magnetischen Feldern.

Dieses Linsensystem unterliegt den Einstellungen des Mikroskopes (Vergrößerung, Beschleunigungsspannung, Strahldurchmesser, usw.) und hat keine Bildebene im herkömmlichen Sinn. Dennoch lässt sich die Bilderzeugung durch die Zentralperspektive modellieren, bzw. durch die Parallelperspektive, wenn eine Vergrößerung von ca. $1000\times$ oder mehr angenommen wird (HEMMLER 2001).

Die im o. a. Forschungsprojekt gewählten Vergrößerungen lassen es zu, die Parallelperspektive als Standardfall anzunehmen. Die daraus resultierende mathematische Problemstellung, die schließlich zur Entwicklung des hier vorgestellten Kalibrierkörpers geführt hat, soll im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

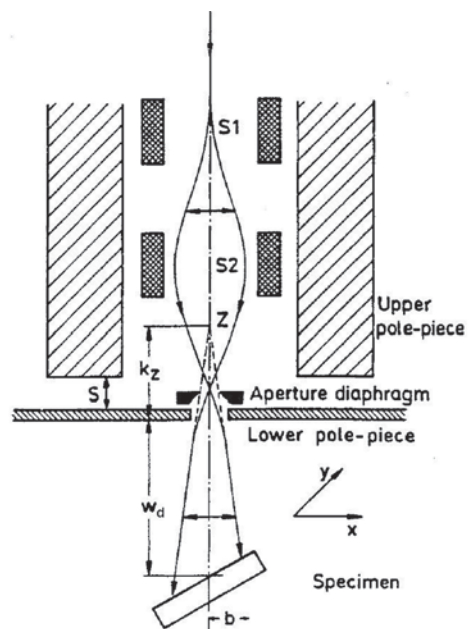


Abb. 2: Virtuelles Projektionszentrum Z (REIMER 1985).

2 Entwicklung des Kalibrierobjekts

Herkömmlicherweise werden für die Kalibrierung in der Rasterelektronenmikroskopie 2D-Teststrukturen, wie z. B. Gitterreplikas aus Kohlenstoff (mit 2160 Linien/mm) benutzt (Abb. 3), um damit den Maßstabsfehler und optische Verzerrungen zu erkennen und zu korrigieren.

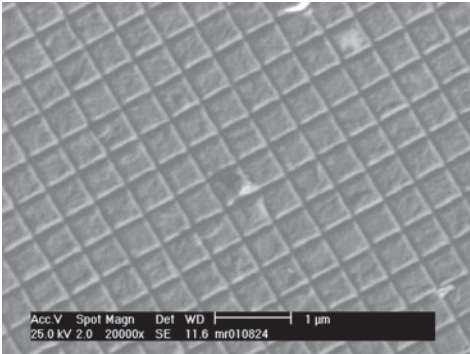


Abb. 3: 2D-Testgitter mit 2160 Linien/mm.

Die Schnittpunkte zweier Gitterlinien dienen dabei als Passpunkte für die Kalibrierung. Die Überlegung, ein derartiges Gitter auch für die photogrammetrische Kalibrierung des XL 30 ESEM bzw. des XL 30 FEG einzusetzen, wurde jedoch wieder verworfen. Versuche zeigten ungenaue und nicht reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich der Feststellung der Orientierungsparameter.

Bei der Parallelprojektion kommt es bei zweidimensionalen Strukturen, bzw. Punktfeldern, die auf einer Ebene liegen, zu mathematischen Instabilitäten (SINRAM et al. 2002). Praktisch alle kommerziell erhältlichen Kalibrierstandards (z. B. MikroMasch, Estland) sind entweder aus 2D-Strukturen aufgebaut oder aus 3D-Strukturen, die nur eine XY bzw. eine XZ Kalibrierung ermöglichen.

Um Mehrdeutigkeiten, die durch obengenannte mathematische Instabilitäten hervorgerufen werden können, bei der parallelperspektivischen Abbildung zu beseitigen, sind also Passpunkte notwendig, die nicht auf einer Ebene liegen. Das zweckmäßigste Konstrukt, das derart positionierte Pass-

punkte erlaubt, ist die Pyramidenform. Objekte dieser Form lassen sich jedoch nicht ohne weiteres mit herkömmlichen Verfahren herstellen. Mit dem „Gas-Induced Focused-Ion-Beam-Etching“ wurde eine Methode gewählt, bei der pyramidenförmige Strukturen mit hoher Genauigkeit hergestellt und mit Passpunkten versehen werden können.

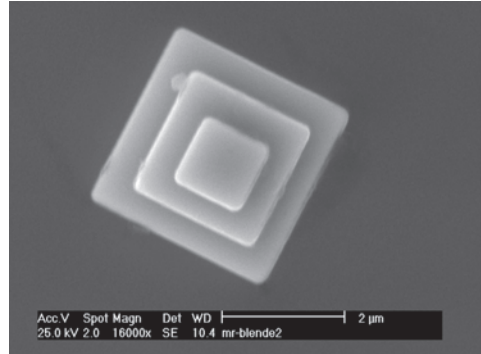


Abb. 4: Erste Form der Kalibrierpyramide mit senkrechten Seiten, ohne Passpunkte.

Abb. 4 zeigt einen ersten Prototyp der Pyramide, bestehend aus drei Stufen, mit senkrechten Seiten. Die Schnittpunkte der Stufenkanten sollten als Passpunkte dienen. Bei dieser Objektform lag die größte Schwierigkeit darin, die Kanten überhaupt zu identifizieren, da ungünstigerweise im REM die Außenkanten im Bild sehr stark überstrahlen und nur sehr vage zu bestimmen sind. Abb. 5. zeigt das Ergebnis einer Kantenextraktion, angewandt auf ein verhältnismäßig günstiges Bild (CANNY 1986, SUTHU 1999).

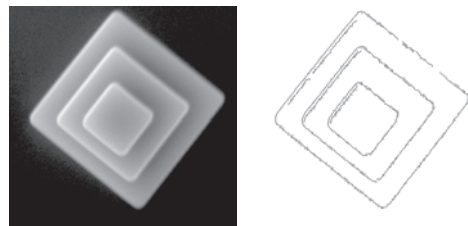


Abb 5: Ergebnis einer Kantenextraktion.

Die Schnittpunkte jeweils zweier ausgleichender Geraden, die durch die extrahierten Kantenpunkte gelegt wurden, sollten hierbei als Passpunkte dienen. Man erkennt deutlich die nur sehr unscharfe, breite Kante, deren Bestimmung – und damit auch die Bestimmung der Schnitt-, bzw. Passpunkte – nur mit großer Unsicherheit möglich ist. Wird zudem die Pyramide sehr stark gekippt, verschmelzen die Kanten miteinander und lassen die Passpunktbestimmung nicht mehr zu. Selbst eine interaktive, manuelle Messung und Bestimmung der Passpunkte

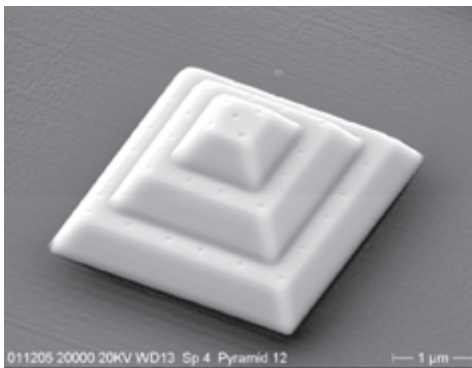


Abb. 6: Jetzige Form der Pyramide mit schrägen Kanten und Nanomarkern.

ist in diesem Falle nicht mehr zuverlässig durchführbar. Diese Unzulänglichkeiten veranlassten die Weiterentwicklung der Objektstruktur.

Die aktuelle und zuverlässig funktionierende Lösung fand sich in der in Abb. 6 gezeigten Form der Stufenpyramide mit schrägen Kanten und Nanomarkern, die als Passpunkte dienen. Die Pyramide hat eine Grundfläche von ca. 6 mm × 6 mm, mit einer durchschnittlichen Stufenhöhe von 700 nm.

Die Nanomarker werden mit einem Ionenstrahl in die Pyramidenstrukturen eingätzt und haben einen Durchmesser von 50 nm. Sie werden anschließend mit einem AFM (Rasterkraftmikroskop) hochgenau vermessen (siehe Abb. 7).

In diesem bislang optimalen Kalibrierkörper wurden die o. a. kritischen Punkte berücksichtigt. Darüber hinaus wurde eine Form gefunden, die einer Vielzahl von Anforderungen gerecht wird:

- Durch die Pyramidenform ist das Passpunktfeld räumlich verteilt.
- Die Passpunkte sind in Form von Nanomarkern auf den Pyramidenstufen eindeutig identifizierbar.

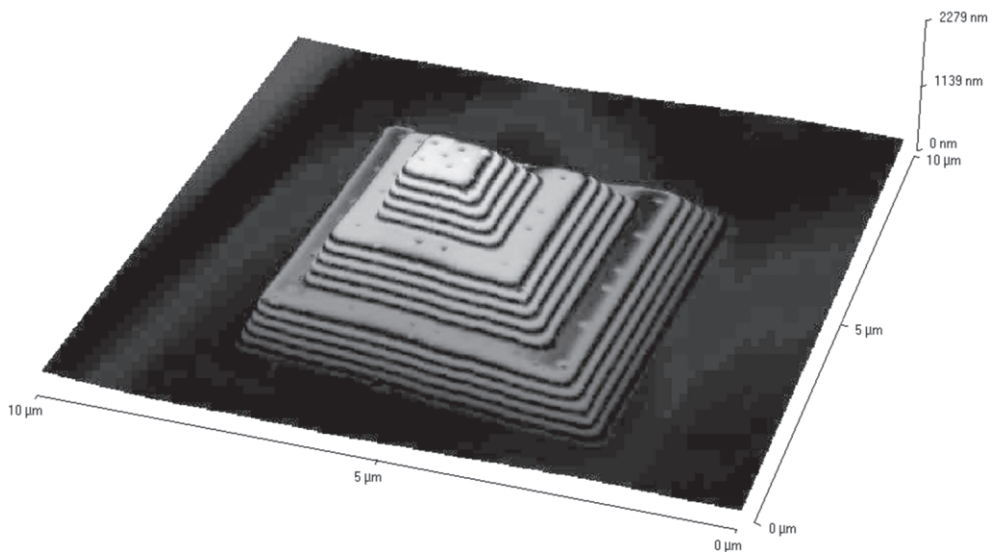


Abb. 7: AFM-Bild zur Vermessung der Nanomarker (Passpunkte).

- Durch eine gewollt asymmetrische Verteilung ist die Zuordnung der Punkte gewährleistet.
- Die schrägen Kanten erlauben Sicht zu allen Punkten selbst bei extremer Kippung.
- Die genaue Vermessung der Passpunkte mit einem AFM wird durch die schrägen Flanken erst zuverlässig ermöglicht.

Abb. 8a und b verdeutlichen die positiven Auswirkungen der schrägen Kanten auf die Sichtbarkeit der Punkte, bei extremen Kippungen.

Die 38 Passpunkte sind jeweils auf den Stufen der Pyramide angebracht (21 auf der unteren, 12 auf der mittleren und 5 auf der obersten), wobei die Punkte auf der unter-

ten Stufe bewusst unsymmetrisch angebracht wurden, um die Punktzuordnung sicherzustellen (siehe Abb. 8a, b, die rechte obere Ecke der Pyramide).

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht eine sehr große Spannweite an Vergrößerungen. Daher wäre es sinnvoll, ein skalierbares Kalibrierobjekt zu benutzen, um dieses für möglichst viele Vergrößerungen formatfüllend, also mit maximaler Anzahl von Passpunkten abbilden zu können. Aus diesem Grunde könnten mehrere Pyramiden verschiedener Größe auf einem Array zusammengefasst werden.

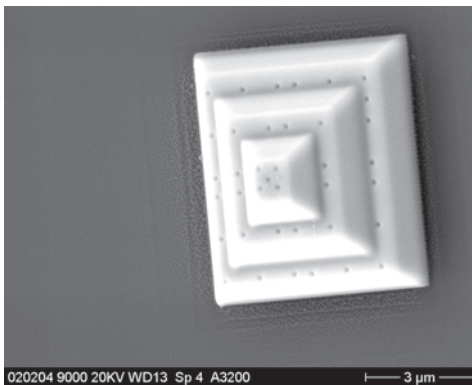
So ließen sich die verschiedenen Größen der Pyramiden nutzen, um in einem größeren Maßstab zu kalibrieren. Bei kleineren Maßstäben ließen sich mehrere Pyramiden zusammenfassen und abbilden, um das Bildformat zu füllen.

3 Messungen

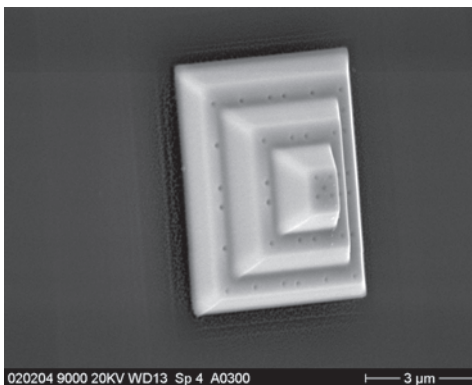
Ausgehend von unserem Standardfall der Parallelprojektion, kann für den verwendeten Sensor im einfachsten Fall mit einer einzigen Unbekannten gerechnet werden: dem Maßstab, der in gewissem Sinne die Kamerakonstante bei der Zentralprojektion ersetzt. Es lassen sich aber auch zusätzliche Parameter, wie Verzeichnung oder Affinität berücksichtigen, so dass insgesamt bis zu 7 Abbildungsparameter für den Sensor bestimmt werden können. Zudem gelten für jedes Bild 5 Unbekannte: 2 Translationen und 3 Rotationen, so dass für eine Auswertung insgesamt bis zu 12 Unbekannte in der Berechnung berücksichtigt werden müssen. Zum näheren Verständnis sei hier auf weiterführende Literatur verwiesen, z. B. (BURKHARDT 1981, MAUNE 1976).

Allein bei der Auswertung eines Bildes ergeben sich so 6 bis 12 Unbekannte (je nach Anzahl zusätzlicher Parameter), bei bis zu 76 Beobachtungen pro Bild (38×2). Das ergibt eine Redundanz von 64 bis 70. Diese lässt sich erhöhen, wenn man mehrere Bilder zur Kalibrierung heranzieht und einen Sensor für den ganzen Verband annimmt.

Exemplarisch sei hier das Ergebnis einer Auswertung mit 14 Bildern präsentiert. Da-



a) Kippung ca. -40°



b) Kippung ca. $+30^\circ$

Abb. 8: Durch die Abschrägung der Seiten bleiben die Passpunkte auch bei extremen Kippungen.

bei wurden 77 Unbekannte aus 1042 Beobachtungen bestimmt:

Die Aufnahmeanordnung ist in Abb. 9 dargestellt.

Tab. 1: Ergebnisse der REM-Kalibrierung.

Parameter	Wert
Maßstab m [$pixel/\mu m$]	94.612 ± 0.11
radiale Verz. A_1	$1.226e-007$
radiale Verz. A_2	$-1.204e-012$
tangentiale Verz. B_1	$-6.008e-006$
tangentiale Verz. B_2	$-2.145e-006$
Affinparameter C_1	$-4.810e-003$
Affinparameter C_2	$-1.535e-003$

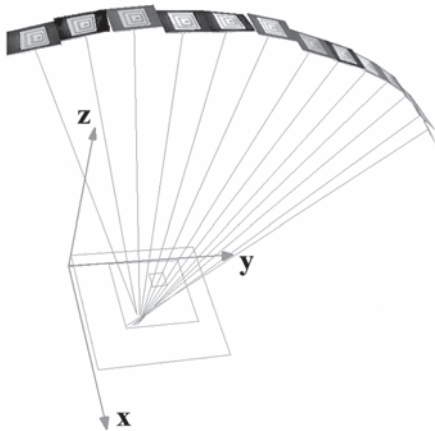


Abb. 9: Visualisierung einer Kippserie.

4 Ausblick

Der in dieser Arbeit vorgestellte Kalibrierkörper erlaubt zuverlässige und eindeutige Passpunktmessungen zur hochgenauen Bestimmung der Parameter des Elektronenmikroskops. Es wurde damit die Möglichkeit geschaffen, ein Rasterelektronenmikroskop zuverlässig über verschiedene Vergrößerungsbereiche hinweg zu kalibrieren. Zudem sind die mit dem AFM durch Kontaktmessung gewonnenen Koordinaten der Passpunkte auch auf andere bildgebende Systeme, wie z. B. das konfokale Lichtmikroskop übertragbar. Die Kalibrierung verschiedener bildgebender Systeme mittels

eines Kalibrierkörpers wird möglich und damit könnte auch erstmals im Vergleich eine Analyse über die quantitative Aussagekraft der gewonnenen Daten durchgeführt werden. Die quantitativen Aussagen verschiedener mikroskopischer Anwendungen könnten somit in ihrer Zuverlässigkeit erheblich gesteigert werden.

Die anfangs erwähnte Kippung der zu untersuchenden Objekte erfolgt über hochpräzise Kippbühnen, die im Inneren der Vakuumkammer installiert werden müssen. Neben den Sensoreigenschaften können auch die Zuverlässigkeiten solcher Kippbühnen über dieses Kalibrierobjekt kontrolliert werden, z.B. im Rahmen einer Bündelblockausgleichung. Damit wird also nicht nur die Bilderfassung möglichst genau modelliert, sondern auch die Geometrie der Aufnahmeanordnung.

Zukünftige Arbeiten sollen sich unter anderem auf eine semiautomatische Punktmessung konzentrieren, bei der unter Kenntnis der Objektkoordinaten, nach manueller Messung von einigen Initialisierungspunkten, die verbleibenden Punkte automatisch erkannt werden. Wir möchten die Messung der Kalibrierung auf diese Weise vereinfachen und beschleunigen, sowie individuelle Messfehler möglichst ausschließen.

5 Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der DFG für die Förderung des Projektes ‚Photogrammetrische Oberflächenrekonstruktion biologischer Objekte mittels REM-Bilddaten‘. Weiterer Dank gebührt der Firma Kleindiek Nanotechnik, in D-72770 Reutlingen, deren hochpräziser Nanopositionierer bei der Probenausrichtung unverzichtbare Dienste leistet und Dr. ANDREAS DÖRING, Universität Ulm, für die AFM-Vermessung der Pyramide.

Literatur

BURKHARDT, R., 1981: Die stereoskopische Ausmessung elektronenmikroskopischer Bildpaare und ihre Genauigkeit. – Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, Abschnitt 4.2.2.

- CANNY, J., 1986: A computational approach to edge detection. – IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 8 (1986), Heft 6: 679–698.
- HEMMLEB, M., 2001: Photogrammetrische Auswertung elektronenmikroskopischer Bilddaten. – Dissertation, Technische Universität Berlin. http://edocs.tu-berlin.de/diss/2001/hemmlieb_matthias.pdf
- MAUNE, D. F., 1976: Photogrammetric Self-Calibration of Scanning Electron Microscopes. – Photogrammetric Engineering and Remote Sensing, Vol. 42, No. 9: 1161–1172.
- REIMER, L., 1985: Scanning Electron Microscopy. – Springer, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo 1985.
- SINRAM, O. & RITTER, M., 2002: Calibration of an SEM, using a nano positioning tilting table and a microscopic calibration pyramid. – ISPRS-Conference 2002, Commission V, Close-Range Vision Techniques, Korfu, Griechenland.
- SUTHAU, T., 1999: Photogrammetrische Vermessung von superelastischen Drähten mit CCD-Kameras. Diplomarbeit, TU Berlin.
- Anschriften der Autoren:
- Dipl.-Ing. OLAF SINRAM, Prof. a. D. Dr.-Ing. JÖRG ALBERTZ, Technische Universität Berlin, Photogrammetrie und Kartographie
Straße des 17. Juni 135, D-10623 Berlin
Tel.: 030-314-23991, Fax: 030-314-21104
sinram@fpk.tu-berlin.de
albertz@fpk.tu-berlin.de
<http://www.fpk.tu-berlin.de/>
- Dipl.-Natw. (ETH) MARTIN RITTER,
Dr. HEINZ HOHENBERG,
Heinrich-Pette-Institut, Arbeitsgruppe
Elektronenmikroskopie und Mikrotechnologie
Martinistraße 52, D-20251 Hamburg
Tel.: 040-48051-254, Fax: 040-48051-252
ritter@hpi.uni-hamburg.de
hohenberg@hpi.uni-hamburg.de
<http://www.hpi-hamburg.de/>
- Dr. ANDREAS SCHERTEL, FEI Deutschland
GmbH, Kirchenstraße 2, D-85622 Feldkirchen
andreas.schertel@de.feico.com
<http://www.feico.com/>

Manuskript eingereicht: August 2002

Angenommen: September 2002