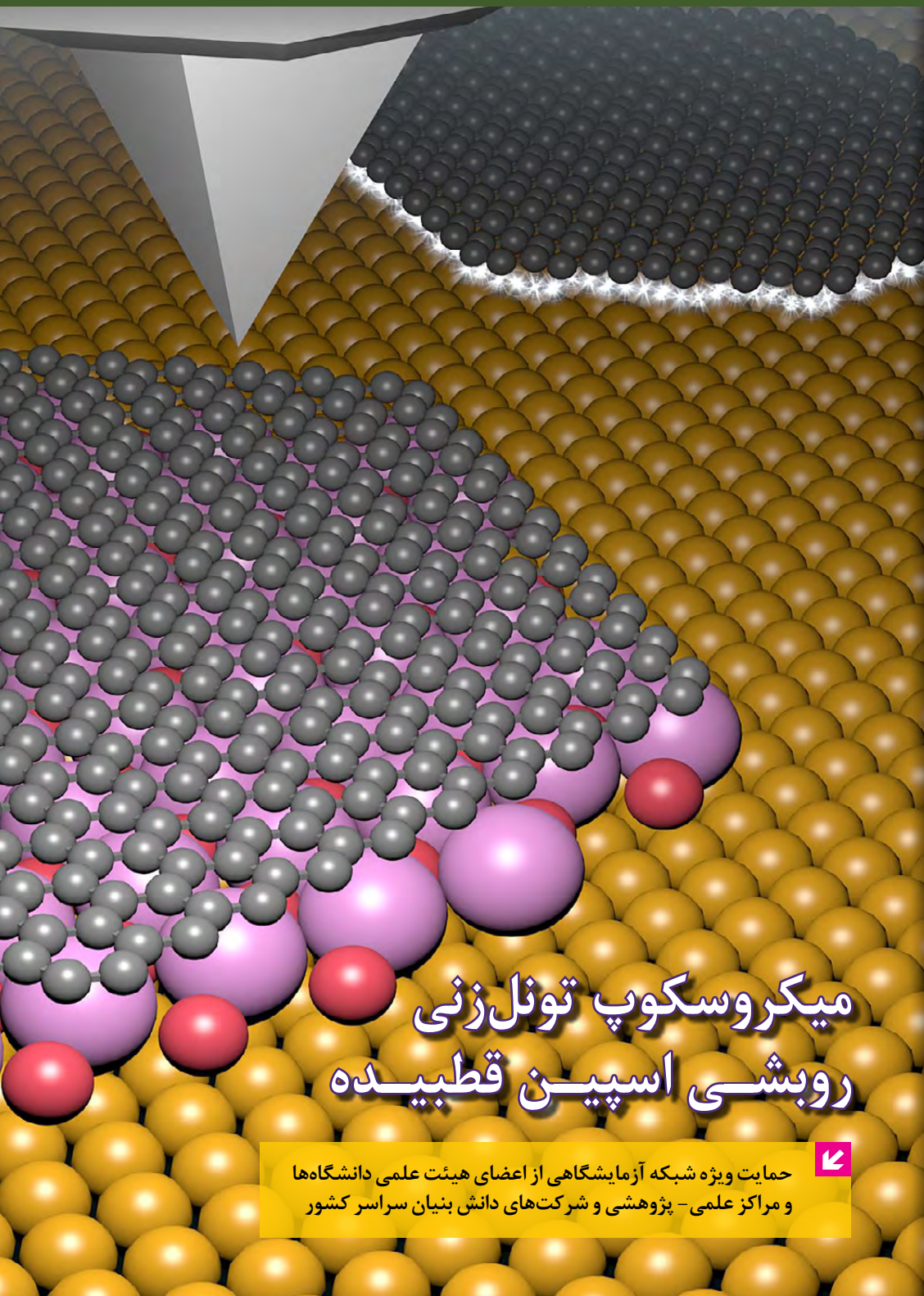
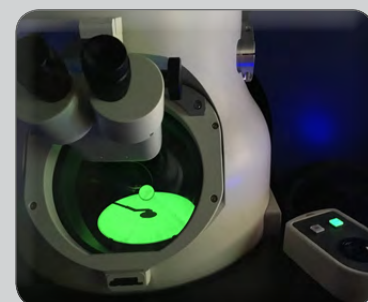
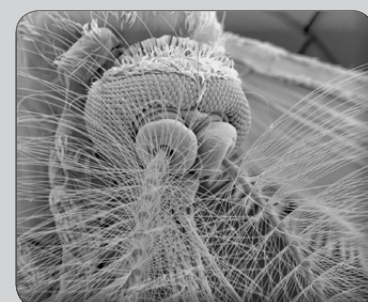


## دانش آزمایشگاهی ایران

سال هفتم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۸ ■ شماره پیاپی ۲۵

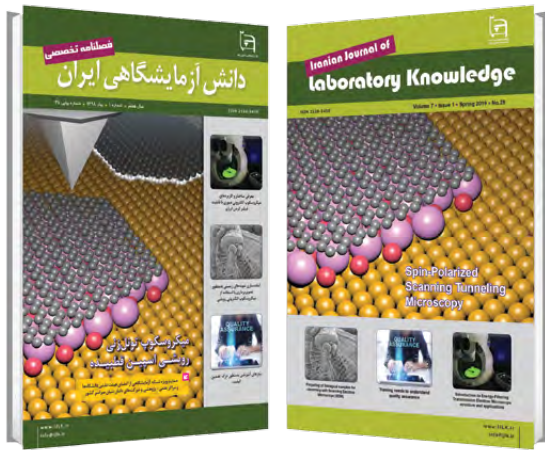
ISSN 2538-3450

میکروسکوپ تونل زنی  
روبشی اسپین قطبیدهحمایت ویژه شبکه آزمایشگاهی از اعضای هیئت علمی دانشگاهها  
و مراکز علمی - پژوهشی و شرکت‌های دانش بنیان سراسر کشورمعرفی ساختار و کاربردهای  
میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت  
فیلتر کردن انرژیآماده‌سازی نمونه‌های زیستی به منظور  
تصویربرداری با استفاده از  
میکروسکوپ الکترونی روبشینیازهای آموزشی به منظور درک تضمین  
کیفیت



عید است و دلمر خانه ویرانه، بیا  
این خانه تکاندیم ز بیگانه، بیا  
یک ماه تمام، میهمانت بودیم  
یک روز به مهمانی این خانه بیا

اللهم عجل لولیک الفرج



فصلنامه تخصصی

# دانش آزمایشگاهی ایران

سال هفتم ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۳۹۸ ■ شماره پیاپی ۲۵

ISSN 2538-3450

## فهرست مطالب

صاحب امتیاز: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

سرمدبیر: رضا اسدی فرد

مدیرمسئول: مجتبی نسب

مدیریت اجرایی: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

دبیر مقالات: داود قزایلو

همکاران این شماره: فریبا علی، حمیدرضا نبوی  
 مریم حسن زاده مها، سیداحمد ظهیرمیردامادی  
 مریم بنازاده امیرخیز، مریم خانی نور، مسعود رسولی  
 نفیسه هاشمیان، ساناز شبیکه، زهرا ثبات، مریم دارایی  
 صدیقه صادق حسینی، ندا رحمانی

طراحی و صفحه آرایی: سیمین رفیع پور لنگرودی

ویراستار: زینب زرینچه

نشانی: تهران، صندوق پستی ۳۴۴-۱۴۵۶۵

تلفن: ۰۲۱ ۶۳۱۰۳۴۵۳

پایگاه اینترنتی: www.IJLK.ir

پست الکترونیکی: info@ijlk.ir



شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

اخبار

استاندارد

مقالات

حمایت ویژه شبکه آزمایشگاهی  
 از اعضای هیئت علمی دانشگاه‌ها و مراکز علمی - پژوهشی و  
 شرکت‌های دانش بنیان سراسر کشور

۴ <



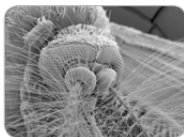
راهنمای استاندارد برای تصحیح اثرات بین عنصری  
 در آنالیز به روش طیف سنجی پرتو X  
**ASTM: E1361-02 (2014)**

۴ <



نیازهای آموزشی به منظور درک تضمین کیفیت

۵ <



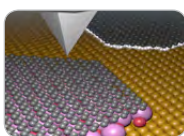
آماده‌سازی نمونه‌های زیستی به منظور  
 تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی  
 روبشی

۱۳ <



معرفی ساختار و کاربردهای میکروسکوپ الکترونی  
 عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی

۲۷ <



میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده

۲۸ <



## حمایت ویژه شبکه آزمایشگاهی از اعضای هیئت علمی دانشگاه‌ها و مراکز علمی- پژوهشی و شرکت‌های دانش بنیان سراسر کشور

معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری در سال ۱۳۹۸ با هدف حمایت از اعضای هیئت علمی دانشگاه‌های سراسر کشور (دانشگاه‌های وابسته به وزارت علوم، وزارت بهداشت و دانشگاه آزاد اسلامی و مراکز علمی و پژوهشی معتبر سراسر کشور) و شرکت‌های دانش بنیان و محققین سراسر کشور، یارانه ویژه‌ای برای دریافت خدمات آزمایشگاهی مورد نیاز پژوهشگران، در قالب اعتبار طرح‌های تخفیف اختصاص داده است.

شرکت‌های دانش بنیان برای استفاده از تخفیف ۳۰ درصدی در زمان دریافت خدمات آزمایشگاهی، با مراجعه به پایگاه اینترنتی شبکه آزمایشگاهی به نشانی [WWW.LabsNet.ir](http://WWW.LabsNet.ir) و ثبت نام در باشگاه مشتریان، می‌توانند از این اعتبار استفاده کنند. مهلت استفاده از اعتبار مذکور، تا پایان اسفندماه ۱۳۹۸ تعیین شده است.

باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی بیش از ۱۶،۵۰۰ عضو حقیقی و حقوقی دارد که از ابتدای سال ۱۳۹۸ تا کنون، در حدود ۲،۰۰۰ عضو به تعداد اعضای باشگاه اضافه شده است. دانشجویان، اعضای هیئت علمی، پژوهشگران مراکز علمی و تحقیقاتی، صنعتگران و شرکت‌های دانش بنیان برای دریافت خدمات و حمایت‌های شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و بهره‌مندی از طرح‌های تخفیف،

شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، طرح ویژه‌ای با عنوان «تخفیف ویژه اعضای باشگاه مشتریان- بهار ۹۸» ارائه شده است که ۲۰ درصد از هزینه خدمات آزمایشگاهی متقاضیان را تا سقف ۱۰ میلیون ریال، پوشش می‌دهد. ظرفیت پیش‌بینی شده برای ثبت نام در این طرح نیز ۴،۰۰۰ فرد و یا شرکت است و ۴۰ میلیارد ریال یارانه از سوی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری برای این منظور اختصاص یافته است.

همچنین شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی در راستای کمک به رشد و توسعه شرکت‌های دانش بنیان و فراهم آوردن شرایط مناسب برای دریافت خدمات آزمایشگاهی مورد نیاز واحدهای تحقیق و توسعه آن‌ها، یارانه ۳۰ میلیون ریالی را به هر شرکت دانش بنیان تخصیص می‌دهد.

بر این اساس در گام نخست، طرح‌های تخفیف بهار ۹۸ با مهلت ثبت نام تا پایان خرداد ۹۸ و مهلت استفاده تا ۳ ماه پس از فعال‌سازی اعتبار، برای بهره‌مندی اعضای هیئت علمی سراسر کشور و اعضای باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی فعال شده است.

هر عضو هیئت علمی با ثبت نام در باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی و انتخاب طرح «تخفیف ویژه اعضای هیئت علمی- بهار ۹۸» از ۳۰ میلیون ریال اعتبار با ۳۰ درصد تخفیف بهره‌مند می‌شود. شایان ذکر است ظرفیت ثبت نام این طرح در بهار ۹۸، تعداد ۲،۰۰۰ نفر است و ۶۰ میلیارد ریال یارانه برای این طرح تخصیص داده شده است.

در همین راستا، برای هر شخص حقیقی یا حقوقی عضو باشگاه مشتریان

راهبردی از ابتدای سال ۹۸ تا کنون، به تعدادی از اعضای باشگاه مشتریان که از خدمات مراکز عضو شبکه استفاده نموده‌اند، به مناسبت اعیاد نیمه شعبان، ولادت امام حسن مجتبی (ع) و عید سعید فطر، اعتبارات ویژه‌ای در قالب کد تخفیف ۱۰۰ درصدی دریافت خدمات آزمایشگاهی اختصاص داده است. تا کنون اعتبار مربوطه به بیش از ۶۵۰ نفر از اعضای باشگاه مشتریان تعلق گرفته است.

نخبگان، پژوهشگران منتخب فدراسیون سرآمدان علمی ایران و منتخبین پسا دکتری خارج از کشور فعال هستند. شایان ذکر است برگزیدگان سال تحصیلی ۹۸-۹۷ بنیاد ملی نخبگان از ۲۰ میلیون ریال اعتبار، منتخبین پسا دکتری خارج از کشور از ۵۰ میلیون ریال اعتبار و برگزیدگان بنیاد ملی نخبگان در طرح شهید احمدی روشن از ۲۰ میلیون ریال اعتبار، با تخفیف ۹۰ درصد می‌توانند استفاده نمایند. شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های

می‌توانند در باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی عضو شوند. اعضای باشگاه برای مدیریت اعتبارات خود، مشاهده فهرست خدمات آزمایشگاهی دریافت شده از آزمایشگاه‌ها، انتقال اعتبار خود به شخص دیگر و ثبت درخواست انجام آزمون توسط آزمایشگاه‌ها، می‌توانند از امکاناتی که در باشگاه مشتریان وجود دارد استفاده نمایند.

علاوه بر اعتبار طرح‌های تخفیف ویژه بهار ۹۸، اعتبارات و طرح‌های تخفیف ویژه برگزیدگان بنیاد ملی



## ۵۰۰ هزار ریال اعتبار

ویژه اعضای **جدید** باشگاه مشتریان

شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی

اگر تا کنون در باشگاه مشتریان شبکه آزمایشگاهی ثبت نام نکرده‌اید، می‌توانید با ثبت نام در این باشگاه، ۵۰۰ هزار ریال اعتبار جایزه عضویت دریافت کنید و از طرح‌های تخفیف متنوع این باشگاه برای دریافت خدمات از مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی تا سقف اعتبار مذکور بهره‌مند شوید. برای کسب اطلاعات بیشتر در این خصوص به پایگاه اینترنتی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی مراجعه کنید.



### ۱۰ میلیون ریال اعتبار

ویژه اعضای باشگاه مشتریان

۲۰ درصد تخفیف



### ۳۰ میلیون ریال یارانه

ویژه اعضای هیئت علمی سراسر کشور

۳۰ تا ۵۰ درصد تخفیف



### ۳۰ میلیون ریال یارانه

ویژه شرکت‌های دانش بنیان

۵۰ درصد تخفیف



### تخفیف ۹۰٪

ویژه پسا دکترای خارج از کشور  
ویژه سرآمدان علمی کشور  
ویژه اعضای بنیاد ملی نخبگان

## مترجم

فریبا علی<sup>۱\*</sup>، حمیدرضا نبوی<sup>۲</sup>مریم حسن زاده مها<sup>۳</sup>

f.ali.ars@gmail.com

۱. کارشناسی ارشد فیزیک، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی امیرکبیر
۲. کارشناسی ارشد زمین شناسی، مرکز پژوهش متالورژی رازی
۳. کارشناسی ارشد فیزیک، دانشگاه سمنان
۴. عضو کارگروه تخصصی X-Ray

## راهنمای استاندارد برای تصحیح اثرات بین عنصری در آنالیز به روش طیف سنجی پرتو X

### ASTM: E1361-02 (2014)

اثرات ماتریس در طیف سنجی پرتو X به خاطر جذب و افزایش پرتوهای X در نمونه بوجود می‌آید. جذب اولیه زمانی اتفاق می‌افتد که نمونه پرتو X را از منبع جذب می‌نماید. وسعت جذب به ماهیت ترکیب نمونه، نحوه توزیع انرژی خروجی منبع برانگیختگی، نظیر لوله پرتو X، و هندسه طیف سنج بستگی دارد. جذب ثانویه زمانی اتفاق می‌افتد که پرتو مشخصه تولید شده در نمونه توسط عناصر موجود در نمونه جذب شوند. هنگامی که عناصر ماتریس، خطوط پرتو X با طول موج کوتاه (انرژی بالا) را نشر می‌دهد که بر لبه جذب آنالیت واقع می‌گردد، آنالیت علاوه بر برانگیختگی مستقیم توسط منبع می‌تواند به کمک این پرتوها برای نشر پرتو مشخصه برانگیخته گردد. این پدیده فلورسانس ثانویه یا افزایش یافته نامیده می‌شود.

استاندارد ASTM 1361-02 (2014)، مقدمه‌ای برای روش‌های ریاضی تصحیح اثرات بین عنصری (ماتریس) در تجزیه کمی به روش طیف سنجی پرتو X می‌باشد. تنها اثرات بین عنصری در نمونه‌هایی با ترکیب شیمیایی همگن را شرح می‌دهد. این آثار به اندازه ذرات، فازهای معدنی یا متالورژیکی در نمونه که عملیاتی بر روی آن‌ها انجام نشده است، بستگی دارد. این روش‌ها برای هر دو نوع طیف سنجی تفکیک طول موج و انرژی کاربرد دارد جایی که نمونه بی‌نهایت ضخیم، صاف و نسبت به عمق نفوذ پرتو X همگن در نظر گرفته می‌شود.

این استاندارد در گام نخست، پس از معرفی واژگان تخصصی در این مبحث، به بررسی مفاهیم اصلی پدیده اثرات بین عنصری در نمونه‌های مورد آزمون پس از تابش پرتو ایکس از منبع و تاثیر اثرات ماتریس بر شدت فلورسانس پرتو رسیده به آشکارساز می‌پردازد. و در بخش بعدی، تاریخچه تلاش محققین برای حذف این اثر به منظور بدست آوردن غلظت اصلی عناصر در ماده آزمون را به طور مختصر بیان می‌کند. در ادامه روش‌های تصحیح ضرایب نفوذ و پارامترهای بنیادی به عنوان شیوه‌های اصلی تصحیح اثرات بین عنصری به تفصیل شرح می‌دهد. و همچنین نرم افزارهای کاربردی پارامترهای بنیادی را معرفی می‌کند.



ASTM INTERNATIONAL

## نویسندگان

فریبا علی<sup>۱\*</sup>سیداحمد ظهیرمیردامادی<sup>۲</sup>مریم بنازاده امیرخیز<sup>۳</sup>

\*f.ali.ars@gmail.com

# QUALITY ASSURANCE

## نیازهای آموزشی به منظور درک تضمین کیفیت

### چکیده

تضمین کیفیت به عنوان بخشی از مدیریت کیفیت تعریف می‌شود که بر حصول اطمینان در رابطه با برآورده کردن الزامات کیفیت تمرکز دارد؛ دیگر بخش‌های آن، برنامه‌ریزی کیفیت، کنترل کیفیت و بهبود کیفیت هستند. این موارد برای تمام فعالیت‌های اقتصادی در ارتباط با محصولات، خدمات و رویه‌های دربردارنده امور ارزیابی انطباق، حائز اهمیت است. تضمین کیفیت نه تنها برای یک فعالیت خاص بلکه برای فعالیت‌های دیگر مرتبط با آن نیز اهمیت دارد که می‌تواند شامل تامین، تولید، بازاریابی، ارزیابی انطباق، اعتباربخشی، مقامات ذی‌صلاح و مشتریان باشد. این مقاله به برخی از نیازهای آموزشی تمرکز دارد که به جنبه‌های خاصی از توجه طرف‌های اصلی درگیر در هر مورد اشاره دارد. براساس تجربه به‌دست آمده در سازمان اعتباربخشی قبرس، در این مقاله نمونه‌هایی از اهمیت آموزش و آگاهی برای درک جنبه‌های مختلف تضمین کیفیت توسط تمام طرفین را به تصویر می‌کشد تا آن‌ها بدانند که دنبال چه چیزی هستند، چه میزان انطباق با الزامات مستند و چگونه ارزیابی انطباق تایید می‌شود. این مقاله به آزمایشگاه‌ها و فعالیت‌های مرتبط با اشاره به الزامات اعتباربخشی و استانداردهای صدور گواهینامه قابل اعمال در هر مورد تاکید می‌کند. درک عمومی از جنبه‌های اصلی تضمین کیفیت و استفاده از آن‌ها به‌عنوان ابزارهایی در یک زبان فنی مشترک، نیاز به آموزش و آگاهی در همه سطوح دارد تا تضمین کیفیت به درک انتظارات و اهداف کلی کیفی و اقتصادی جامعه کمک کند. بدین‌گونه فرهنگ کیفیت ایجاد و تقویت می‌شود.

### واژه‌های کلیدی

تضمین کیفیت، آموزش و آگاهی، ارزیابی انطباق، اعتباربخشی و گواهینامه.

امروزه اصطلاحات مربوط به کیفیت و فعالیت‌های پشتیبانی کننده از آن، به کار می‌روند؛ برای همه ما زمان قابل ملاحظه‌ای به طول می‌انجامد تا اصطلاحات را به درستی درک و از آن‌ها به صورت هماهنگ استفاده کنیم. این امر با استفاده از منابعی مانند استانداردهای ISO 9000 [۱] و ISO/IEC 17000 [۲] و واژگان بین‌المللی اندازه‌گیری دقیق ISO/IEC Guide 99/VIM [۳] تسهیل می‌شود. سوالی که در اینجا مطرح می‌شود این است که چقدر میزان اصطلاحات و مفاهیم توسط کسانی که از آن‌ها استفاده می‌کنند، درک می‌شود؟ کاربرد هر روزه این اصطلاحات مبین آن است که سعی و تلاش بیش از پیش مورد نیاز است تا اطمینان حاصل شود که جنبه‌های اساسی تضمین کیفیت<sup>۵</sup> و نیز استفاده ابزاری آنها به‌عنوان یک زبان فنی مشترک توسط همه اعضا، بطور یکسان درک شود. این امر به آزمایشگاه‌ها، سازمان‌های دیگر، مشتریان آنها و دیگر خدمات گیرندگان، به‌عنوان مثال، صنعت، مقامات ذیصلاح، مقامات/سازمان‌ها و افراد طرف قرارداد اشاره دارد. این مقاله ضمن اشاره به موارد خاصی که سبب سردرگمی می‌شوند، نیازهای آموزشی و آگاهی لازم برای جنبه‌های خاص را برای استفاده طرف‌های ذینفع به‌طور مختصر بیان کند. اگر چه بیشتر جنبه‌های اساسی، مربوط به تمام نهادهای ارزیابی انطباق<sup>۶</sup> و ذینفعان آن‌ها است، ولی تأکید بیشتر بر آزمایشگاه‌ها است.

سیستم مدیریت کیفیت به معنی سیستم مدیریت برای هدایت و کنترل یک سازمان از نظر کیفیت است [۱].  
سیستم مدیریت به معنای سیستمی برای تعیین خط مشی و اهداف و دستیابی به آن اهداف است [۱].  
خواننده می‌تواند به ISO 9001 برای تعریف و همبستگی بین تمام اصطلاحات مربوط به کیفیت و تضمین کیفیت مراجعه کند.

### اهمیت تضمین کیفیت

تضمین کیفیت، نه تنها برای یک فعالیت خاص، بلکه برای فعالیت‌های مرتبط با آن حائز اهمیت است که می‌تواند شامل عرضه، تولید، بازاریابی، ارزیابی انطباق، اعتباربخشی، مقامات صالح، مشتریان / کاربران باشد (توجه داشته باشید: در موارد ذیل، «مشتری» به هر دو اصطلاح اشاره می‌کند).  
تضمین کیفیت و اصطلاحات مرتبط با تمام فعالیت‌های اقتصادی با توجه به محصولات، خدمات و رویه‌ها، از جمله فعالیت‌های ارزیابی انطباق، اعمال می‌شود. در هر مورد ضروری است که محتوای جامع تضمین کیفیت را مطابق با الزامات خاص با اشاره به نکات زیر مشخص کنید:

- ماهیت فعالیت و محصولات و خدمات مرتبط؛
- استفاده از نتیجه آن فعالیت؛
- دیگر الزامات و قوانین.

### چه کسی الزامات را معرفی می‌کند؟

الزامات به‌طور عمده با توجه به اینکه آیا آن‌ها اجباری هستند یا خیر، تغییر می‌کنند. قوانین هم در سطح ملی و هم منطقه‌ای در تعدادی از بخش‌ها، مانند غذا، دارو، دستورالعمل جدید، مقررات محصولات ساختمانی، قوانین زیست محیطی، خدمات بهداشتی و کشاورزی ارگانیک مجموعه‌ای از الزامات مورد نیاز را مشخص می‌کند. علاوه بر این، خود بازار مانند سازمان‌های بزرگ، رقابت

## کیفیت و تضمین کیفیت

### تعاریف کلی

مجموعه‌ای از منابع، اصطلاحات بنیادی مربوط به کیفیت و ابزار و فعالیت‌های مرتبط با آن را ارائه می‌دهند. این منابع به‌طور عمده شامل استانداردهای ISO 9000 [۱] و ISO/IEC 17000 [۲] به علاوه لغت‌نامه بین‌المللی واژگان عمومی و پایه در علم اندازه‌شناسی، VIM<sup>۷</sup> [۳] و راهنمای Eurachem [۴] مربوطه است. قانون شماره 2008/765 مقررات پارلمان و شورای اروپا<sup>۸</sup> [۵] مبنای قانونی را برای برخی از تعاریف ارائه می‌کند. با وجود شناخت این اسناد و استفاده گسترده از آن‌ها، عدم وجود زبان مشترک عاملی است که همچنان حداقل برای برخی از تعاریف و اصطلاحات خاص، نمی‌تواند به راحتی برطرف شود، ترجمه به زبان‌های مادری همیشه نمی‌تواند تمایز بین اصطلاحات مختلف مرتبط را تضمین کند.  
موارد زیر اصطلاحات اساسی لازم به‌منظور درک کیفیت و تضمین کیفیت برای نیازهای ذینفعان اصلی است:

- کیفیت، میزانی از ویژگی‌های ماهیتی، الزامات و یا خواسته‌ها را برآورده می‌سازد [۱].
- مدیریت کیفیت، به معنای فعالیت‌های هماهنگ شده برای هدایت و کنترل یک سازمان از نظر کیفیت است [۱].
- تضمین کیفیت به‌عنوان بخشی از مدیریت کیفیت که بر ایجاد اطمینان از این که الزامات و یا خواسته‌های مربوط به کیفیت برآورده خواهند شد، تمرکز دارد [۱].
- کنترل کیفیت<sup>۹</sup> به‌عنوان بخشی از مدیریت کیفیت متمرکز بر الزامات کیفیت مؤثر است [۱].
- ارزیابی انطباق، اثبات اینکه الزامات مشخص شده در رابطه با یک محصول فرایند، سیستم، شخص یا نهاد برآورده شده است [۲].
- نهاد ارزیابی انطباق، نهادی که خدمات ارزیابی انطباق را ارائه می‌دهد [۲] که شامل آزمایشگاه‌های آزمون / کالیبراسیون، بازرسی و صدور گواهینامه‌ها است [۴].



اروپایی برای اعتباردهی<sup>۱۴</sup> و اتحادیه بین‌المللی تایید صلاحیت<sup>۱۵</sup> و سازمان‌های علمی مثل Eurachem، Eurolab و همکاری در ردیابی بین‌المللی در شیمی تجزیه<sup>۱۶</sup>. اما تنها با این موارد نمی‌توان به هدف مورد نظر رسید و باید کار مضاعفی در خصوص سازگاری با نیازها و اولویت‌های محلی، زبان و ویژگی‌های فرهنگی انجام داد.

### دیدگاه‌های بنیادی از منظر صدور گواهی و تأیید صلاحیت

صدور گواهی، به معنی تصدیق محصولات، فرایندها، سیستم‌ها و افراد (ISO/IEC 17000 cl. 5.5) توسط شخص ثالث است. تصدیق، به بیان کردن یک تصمیم به دنبال بازبینی اشاره دارد که موجب تحقق الزامات خاصی شده است [۲]. طبق نکته در مرجع ذکر شده، صدور گواهی برای همه موارد ارزیابی انطباق به جز خود نهادهای ارزیابی انطباق قابل اجراست که برای آن‌ها اعتباربخشی<sup>۱۷</sup> قابل اطلاق است.

آیا احراز گواهینامه اجباری است؟ پاسخ منفی است. اما افزایش نیاز بازار، به‌عنوان مثال، دعوت برای مناقصه، خریدهای کلان و در بعضی موارد قوانین، آن را به شدت توصیه می‌کنند. این راحت‌ترین راه برای تأمین نظرات مشتریانی است که بدنبال شاهد و مدرکی برای وجود مؤثر سیستم تضمین کیفیت هستند. برای اطمینان از این مدرک، گواهینامه باید توسط سازمانی معتبر صادر شود.

تایید صلاحیت، به معنی ارزیابی توسط شخص ثالثی است که در ارتباط با یک CAB باشد که نشان دهد صلاحیت ارزیابی انطباق‌های خاص (ISO/IEC 17000, cl.5.6) را دارد [۲]. تا اینجا، اختلاف کلیدی تأیید صلاحیت با صدور گواهی، داشتن صلاحیت و نمود آن است.

آیا تأیید صلاحیت اجباری است؟ به‌طور کلی، ارزیابی یک آزمایشگاه داوطلبانه است؛ با وجود این بعضی مواقع، طبق قوانین اروپا و یا قوانین ملی ارزیابی و اعتباربخشی الزامی است.

شکل (۱) مراحل حصول اطمینان از کار آزمایشگاه را از طریق به تصویر کشیدن اختلاف بین الزامات تأیید صلاحیت و صدور گواهی برای یک آزمایشگاه را نشان می‌دهد. بر این اساس به راحتی می‌توان توضیح داد که چرا اخذ گواهینامه برای یک آزمایشگاه مناسب نیست، زیرا به عوامل صلاحیت و اعتماد ارجاع نمی‌شود. بدین ترتیب به سوال یک پاسخ داده شده‌است ولی هنوز «تأیید صلاحیت یا صدور گواهینامه برای یک آزمایشگاه» گیج‌کننده [۱۶ و ۱۷] و مطابق با متن صریح ISO/IEC 17000:2004 است (تعریف گواهینامه در بالا ذکر شده‌است) [۲]. حتی غیر از این (بدون توجه به این مطلب) ممکن است یک آزمایشگاه بخواهد گواهینامه اخذ کند، بخصوص وقتی تحت نظارت یک سازمان مادر باشد.

یک آزمایشگاه ارزیابی نشده می‌تواند خودش، خودش را طبق تمام جوانب استاندارد، ارزیابی کند؛ این بدین معنی است که می‌تواند به پله بالاتر در شکل (۱) صعود کرده و عملکرد و اعمال تضمین کیفیت خود را مستند کند. آنچه که وجود ندارد، تأیید مستقل است که فقط می‌تواند توسط سازمان اعتباربخشی<sup>۱۷</sup> انجام

فزاینده و همچنین مصرف کنندگان آگاه و سخت‌گیر، الزامات اضافی‌ای را بوجود می‌آورند که اگر چه اجباری نیست، اما برای اطمینان از سهم خوب محصولات و خدمات در بازار هستند. فهرست منابعی که باید توسط سازمان درگیر شامل یک آزمایشگاه در نظر گرفته شود عبارتند از:

- ▶ قانون (ملی، منطقه‌ای، بین‌المللی)؛
- ▶ استانداردهای اصطلاحات، روش‌ها و رویه‌ها؛
- ▶ استانداردهای مدیریت و اعتباربخشی؛
- ▶ الزامات بازار.

مجموعه رویه‌هایی وجود دارد که در بخش‌ها و فعالیت‌های تعریف شده، اجرا می‌شود. مثال‌های اصلی آن، به عملیات خوب آزمایشگاهی<sup>۱۰</sup> [۶]، روش‌های خوب ساخت<sup>۱۱</sup> [۷]، مدیریت کیفیت (ISO 9001) [۸]، مدیریت زیست محیطی (ISO 14001) [۹]، تجزیه و تحلیل خطر و شناسایی نقاط کنترل بحرانی<sup>۱۲</sup> [۱۰] در ارتباط با ISO 22000 [۱۱] و سلامت و ایمنی شغلی (18001) [۱۲] برمی‌گردد. با وجود تفاوت‌های قابل توجه بین آن‌ها، هر سازمانی برای رسیدگی به یک برنامه خاص، نیاز به بررسی همه منابع خارجی ذکر شده در بالا را دارد. علاوه بر این، باید اسناد داخلی خود، به‌طور مثال، سیستم مدیریت کیفیت که اساساً شامل یک کتابچه راهنمای کیفیت و مجموعه‌ای از رویه‌ها و دستورالعمل‌های کاری است، تهیه کند. یک سیستم مناسب برای مستندسازی مدارک، پیاده‌سازی سیستم مدیریت و همچنین سوابق خدمات ارائه شده نیز مورد نیاز است. این عناصر باید آماده، اجرا و بازبینی شوند به طوری که نیازهای عمومی و ویژه آن فعالیت خاص را بازتاب دهد. در مورد آزمایشگاه، وظیفه اصلی این است که چگونه نتایج قابل اعتماد را بدست آوریم و این به چندین تابع نیاز دارد که در محل آزمایشگاه به روشی عملیاتی و کارآمد فراهم باشد. الزامات صلاحیت آزمایشگاه در ISO / IEC 17025 [۱۳] تعریف شده‌است. برای آزمایشگاه‌های پزشکی، ISO 15189 [۱۴] در حال اجرا است، در حالی که برای هر نوع دیگر از CABها استاندارد ISO / IEC 17000 برای اعتباربخشی [۱۵] در دسترس است.

## آموزش و آگاهی

### سردرگمی و درک نادرست

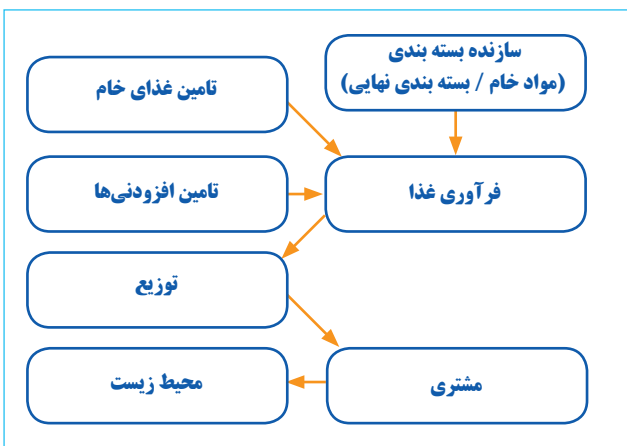
بعضی از موضوعات گاهی سبب سردرگمی و فهم نادرست و اشتباه می‌شوند. براساس تجارب حاصل از عملکرد دهه اول مرجع تایید صلاحیت مصر، چنین موضوعاتی شناسایی شده و به دقت در برنامه‌های آموزشی مداوم و امور آگاهی دهنده مورد بررسی و تجزیه تحلیل قرار گرفتند. چند مثال در ذیل مورد بحث قرار گرفته است.

بسیاری از سازمان‌ها نقش بسزایی در آموزش مستمر و افزایش آگاهی طرفین ذینفع ایفا می‌کنند؛ این سازمان‌ها عبارتند از: مراجع تایید صلاحیت و سازمان‌های اعتباربخشی منطقه‌ای مانند اتحادیه

نشان می‌دهد. بنا به ماهیت سیستم مدیریت و تضمین کیفیت باید جوانب مشخص و معینی در طراحی و پیاده‌سازی آن در نظر گرفته شوند. این جوانب در برگیرنده هر دو نوع وظایف اجباری و اختیاری هستند. شکل (۳) یک مورد خاص از زنجیره تأمین مواد غذایی را نشان می‌دهد؛ هر مرحله باید به‌طور مقتضی در نظر گرفته شود.



شکل (۲): تعامل یک فعالیت صنعتی بسته به ماهیت و محصولات آن. (علامت CE اظهار صلاحیت محصول براساس دستورالعمل رویکرد جدید مقتضی توسط تولیدکننده) [۵].



شکل (۳): دیاگرام زنجیره تأمین مواد غذایی.

### محیط آزمایشگاه

یک آزمایشگاه آزمون یا کالیبراسیون را نمی‌توان مجزا از محیطش در نظر گرفت. آزمایشگاه متعهد می‌شود که براساس درخواست‌های مشتریان و طبق مقررات قانونی به آن‌ها خدمات دهد. شکل (۴) محیط یک آزمایشگاه را با تمامی رابطه‌ها و مقتضیات طبیعی مورد نیاز در هر مورد نشان می‌دهد. درخصوص آزمایشگاه‌های طبی، نمودار طوری تنظیم می‌شود که مبین نیازهای مقتضی مربوط به استانداردهای ممیزی و قانونی ملی و نیز اروپایی این بخش باشد [۱۹ و ۲۰] (به شکل (۵) رجوع کنید).

در بین عناصر مختلف نشان داده شده در شکل‌های (۴) و (۵)، بعضی مثل برنامه‌ریزی آزمون‌های مهارت<sup>۲۱</sup>، مواد مرجع<sup>۲۲</sup> و خدمات کالیبراسیون در کنترل مستقیم آزمایشگاه نیستند. در این گونه موارد آزمایشگاه باید به ارائه‌کنندگان این خدمات یعنی انجام‌دهندگان آزمون‌های مهارت، تولیدکنندگان مواد مرجع و آزمایشگاه‌های کالیبراسیون اطمینان و مستندات

شود که سبب تسهیل پذیرش تأمین‌کننده ارزیابی (اعتباردهی) شده توسط مشتری است. به‌طور محتمل، این خلاء به دلایل بازاریابی مهم است، حتی در مواردی که ارزیابی (ممیزی) ضروری نباشد. بنابراین، مشتری در صورتی که بخواهد، می‌تواند بررسی کند و تشخیص دهد که خدمات ارائه شده در راستای انتظاراتش است. تأیید صلاحیت، شواهدی برای صلاحیت تکنیکی و فنی و نیز تشخیص معتبر بودن نتایج براساس محدوده‌های موجود را ارائه می‌دهد. نهاد تأیید صلاحیت ملی<sup>۱۸</sup>، که طبق ISO/IEC 17011 عمل می‌کند [۱۸] به‌طور کامل توسط سازمان ارزیابی‌کننده منطقه‌ای مانند EA ممیزی شده‌است. NAB عضو موافقت‌نامه چندجانبه<sup>۱۹</sup> با EA برای دامنه معین شامل فعالیت‌های تأیید صلاحیت در زمینه‌هایی که خودش با موفقیت مورد ارزیابی کامل قرار گرفته بود، می‌گردد.

### قابلیت اطمینان

- احراز صلاحیت پرسنل
- مناسب بودن تجهیزات
- قابلیت ردیابی اندازه شناسی
- کنترل کیفیت داخلی
- مقایسات بین آزمایشگاهی
- روش صحت‌گذاری / تصدیق
- اندازه‌گیری عدم قطعیت

سیستم مدیریت کیفیت ← صدور گواهینامه

شکل (۱): مراحل اطمینان از کار آزمایشگاه [۱۳].

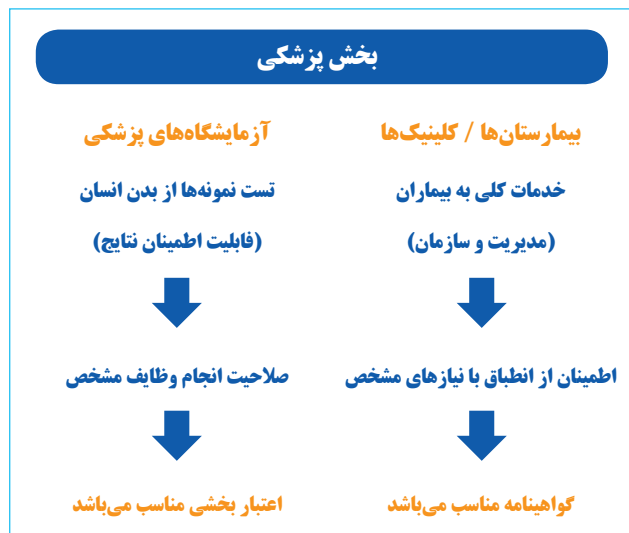
بر این اساس، NAB عضو موافقت‌نامه شناسایی متقابل<sup>۲۰</sup> با نهادهای تأیید صلاحیت بین‌المللی می‌شود که درخصوص تأیید صلاحیت آزمایشگاه، این نهاد ILAC است. در واقع، NAB در جهان شناخته می‌شود. همان‌طور که قبل از آن اشاره شد، ممکن است تمام فعالیت‌های آن را پوشش ندهد. شایان ذکر است که بر طبق قانون (EC) شماره 2008/765 [۵]، فقط نهادهای ارزیابی انطباق تأیید صلاحیت شده از نیازهای حوزه نظارتی مطلع می‌شوند، به شرط این که نهاد تأیید صلاحیت نیز از قبل به‌طور کامل و موفق برای دامنه MLA خاصی مورد ارزیابی قرار گرفته شده باشد.

### در عمل چه اتفاقی می‌افتد؟

بازار واحد و حرکت آزادانه کالاها و خدمات بستگی به تعهد و مسئولیت‌پذیری تک تک سهامداران درخصوص تضمین کیفیت و همین‌طور مستندسازی مناسب آن دارد. در تعدادی از موارد، الزامات و قوانین خاصی وضع شده‌است. دستورالعمل‌های رویکرد جدید مثالی عینی هستند. درک عمومی از آنچه مورد نیاز است و اینکه چگونه باید مستند شود، می‌تواند ضمن برآورده کردن انتظارات، عملکرد بازار را نیز تسهیل کند.

در مثال‌های ذیل، نیاز به یک زبان فنی واحد نشان داده شده‌است. شکل (۲) چهار چوب عمومی یک فعالیت صنعتی را

است. شکل (۶) وظایف و نیازهای متفاوت را نشان می‌دهد. در برخی موارد، استفاده از اصطلاح اعتباربخشی در گواهینامه‌های مربوط به بیمارستان‌ها و کلینیک‌ها و دیگر اسناد که توسط بعضی از سازمان‌های گواهی دهنده صادر می‌شود، مناسب نیست و گاهی اوقات همراه کننده است. قانون (EC) شماره ۲۰۰۸/۷۶۵ به وضوح سازمان‌های اعتبار دهنده ملی را به منظور تضمین اعتباربخشی، فراهم آورده است.



شکل (۶): اعتباربخشی و گواهینامه در بخش طبی [۲۰].

### گواهینامه‌های تأیید صلاحیت

مشتری‌ای که به خوبی از خدمات آزمایشگاهی آگاه باشد، در صورت امکان می‌تواند از گواهینامه تأیید صلاحیت به‌عنوان ابزاری اساسی برای سطح خدماتی که ارائه شده‌است، استفاده کند. تمامی گواهینامه‌های اعتباربخشی به وضوح مربوط به دامنه دقیقی است که آزمایشگاه برای آن اعتبار گرفته‌است؛ معمولاً این دامنه تمام طیف فعالیت‌های آزمایشگاه را پوشش نمی‌دهد. به این منظور، مشتری باید به خوبی از دامنه تأیید صلاحیت و صحت گواهینامه آگاه باشد. این اطلاعات در گواهینامه تأیید صلاحیت که معمولاً دامنه فعالیت‌ها نیز به‌صورت پیوست با آن همراه است، قابل دستیابی است. اگرچه این امر می‌تواند در وبسایت سازمان اعتبار دهنده نیز تصدیق شوند؛ این وبسایت تنها مرجع اطلاعات به روز شده است و به یاد داشته باشید که امکان لغو اعتباربخشی یا کم کردن دامنه آن وجود دارد. بر پایه این اطلاعات، مشتری می‌تواند تصدیق کند که آیا گزارش آزمون یا گواهی کالیبراسیون که توسط آزمایشگاه فراهم شده‌است، به اندازه کافی می‌تواند نتایج روش‌های معتبر یا نامعتبر را نشان دهد یا خیر. لازم است به گواهی‌های کالیبراسیون و مدارک مربوط به ردیابی نتایج اندازه‌گیری گزارش شده توجه ویژه داشت (ILAC P 10) [۲۱].

### گزارش‌های آزمون‌ها و گواهینامه‌های کالیبراسیون

استانداردهای تأیید صلاحیت با جزئیات مشخص می‌کنند که چه مواردی باید در گزارش‌های آزمون‌ها و گواهینامه‌های

لازم در این خصوص را تهیه کند. مستندات مزبور باید مناسب بودن محصولات و خدمات ارائه شده را به‌صورت واضح نشان دهند. طبق دستورالعمل EC/۷۹/۹۸ برای تجهیزات تشخیص آزمایشگاهی، کنترل‌ها (RM) و کالیبراتورها باید دارای علامت CE<sup>۲۳</sup> بوده تا قابل ردیابی باشند. علاوه بر این، تجهیزات، معرف‌ها و کیت‌های تشخیصی نیز باید دارای علامت CE باشند. مشتری باید بقدر کافی از تمامی جوانب مربوط به کیفیت و تضمین کیفیت آگاهی داشته باشد تا مستندات قرار داده شده در اختیارش را بطور کامل بفهمد.



شکل (۴): محیط آزمایشگاه کمیته بین‌المللی برای اوزان و مقیاس‌ها<sup>۲۴</sup> [۱۳].



شکل (۵): محیط آزمایشگاه تشخیص طبی [۱۹ و ۲۰].

### نیازهای ویژه در بخش طبی

با توجه به بخش طبی، تمایز قائل شدن میان نیازهای آزمایشگاه‌های طبی و دیگر فعالیت‌های یک بیمارستان یا کلینیک، حائز اهمیت

اعتباربخشی روی آن باشد، فراهم آورد، این مورد ممکن است برای مشتری گیج کننده/گمراه کننده باشد.

تا چه اندازه مشتریان گواهینامه کالیبراسیون را می‌فهمند و بهترین استفاده را از آن می‌کنند؟

### ■ مشارکت در طرح‌های PT

آیا تامین کنندگان PT باید تائید صلاحیت شوند؟ این مورد از الزامات ISO/IEC 17025 نیست؛ اگرچه با افزایش تعداد طرح‌های PT اعتباردهی شده، آزمایشگاه‌ها تامین کنندگانی که اعتباردهی شده‌اند را ترجیح می‌دهند. در غیر این صورت، آزمایشگاه باید از معیار مناسبی برای انتخاب تامین کنندگان PT، متناسب با هدفش استفاده کند؛ مدارک مربوطه ضروری است. در مورد آزمایشگاه‌های پزشکی، ISO 15189 ضرورت طرح‌های PT به منظور برآورده کردن الزامات استاندارد ISO/IEC 17043 را مشخص می‌کند. در مواردی که اعتباردهی وجود ندارد، این بر عهده آزمایشگاه است که به دنبال مدارک کافی برای چنین انطباقی باشد و به شکل مناسبی آن را مستند کند.

این مساله که مشارکت در طرح‌های PT ابزاری برای نشان دادن صلاحیت پرسنل (جدید و در حال کار)، بهبود مستمر، آموزش و تصدیق قابل اطمینان بودن را فراهم می‌کند؛ هیچ‌گاه به خوبی درک نشده‌است؛ این از مسئولیت‌های مدیر آزمایشگاه است که تضمین کند سیاست و عملکرد آزمایشگاه به‌طور موثری تمامی این جنبه‌ها را پوشش می‌دهد.

### ■ استفاده از مواد مرجع

آیا تولید کننده مواد مرجع باید اعتباردهی شود؟ در حال حاضر، چنین الزامی وجود ندارد.

تا همین اواخر، اعتباربخشی بر مبنای ISO/IEC 17025 و ISO Guide 34 بود. الان این موضوع تغییر کرده است؛ فقط از ISO Guide 34 [۲۳] استفاده می‌شود.

انتخاب مستند شده مواد مراجع قابلیت ردیابی را ممکن می‌سازد.

در مورد آزمایشگاه‌های طبی، همان‌طور که تا الان اشاره شده‌است، الزامات مشخصی برای مواد مرجع (کنترل‌ها) وجود دارند [۱۹ و ۲۰].

### ■ عدم قطعیت اندازه‌گیری‌ها

مفهوم عدم قطعیت هنوز به خوبی توسط مشتریان درک نشده‌است. ممکن است مشتریان، آزمایشگاه‌هایی که نتایج‌شان «عدم قطعیت» دارند، را انتخاب نکنند. همه مشتریان برای نتیجه‌ای که عدم قطعیتی کمی دارد هزینه پرداخت نمی‌کنند و آن‌ها نمی‌دانند که بیان عدم قطعیت برای نشان دادن قابلیت اطمینان به نتایج ضروری است و مبین آن است که نتیجه گزارش شده به درستی تخمین زده شده است.

چطور سیستم مدیریت کیفیت یک آزمایشگاه را «بسازیم»؟ «ساختار» سیستم مدیریت کیفیت و عملیات یک آزمایشگاه

کالیبراسیون وجود داشته باشند. سوال رایج این است که آیا نشان تائید صلاحیت باید روی گزارش صادر شده توسط آزمایشگاه اعتباردهی شده وجود داشته باشد یا خیر. متأسفانه استفاده از آن روی گزارش‌های آزمون و حتی روی گواهینامه‌های کالیبراسیون الزامی نیست و این موجب دشواری‌هایی می‌شود. مشتری چطور باید تشخیص دهد که آیا نتایج مشخص، واقعا از روش‌های معتبری که به‌صورت صحیح انجام شده‌اند، حاصل شده‌است یا خیر؟ در مورد گواهینامه‌های کالیبراسیون، مشکل بزرگ‌تر است؛ کاربر چگونه باید بین دو گواهینامه صادر شده توسط آزمایشگاه کالیبراسیون معتبر که یکی مربوط به کالیبراسیون در دامنه اعتباربخشی و دیگری شامل نتایج بررسی عملکرد قسمتی از دستگاه است، بدون نشان اعتباربخشی تمایز قائل شود؟

وقتی خدمات غیرمعتبر به‌صورت محتمل بیشتر به دلیل مسائل اقتصادی، ترجیح داده می‌شوند، ضروری است که مشتریان و مسئولین با صلاحیت به خوبی از جنبه‌های اصلی که باید به‌منظور ارزیابی قابلیت اطمینان خدمات ارائه شده در سطحی مناسب برای هدف بررسی کنند، مطلع باشند.

در هر صورت، آزمایشگاه باید هم مدارک صلاحیت فنی و هم مدارک تامین کنندگان خود را مستند و فراهم کند، از جمله:

■ خدمات کالیبراسیون (ILAC P10 [۲۱] و [۱۳] ISO/IEC 17025)؛

■ آزمایشگاه‌های آزمون (ISO/IEC 17025 [۱۳] یا در مورد آزمایشگاه‌های پزشکی [۱۴] ISO 15189)؛

■ مدارک آزمون مهارت (ISO/IEC 17043 [۲۲])؛

■ تولید کنندگان مواد مرجع (ISO Guide 34 [۲۳])؛

■ سازندگان تجهیزات و معرفی‌ها (ISO 9001 [۸]).

## جنبه‌های دیگری که به‌طور متناوب موجب بحث و گفتگو می‌شود

### ■ خدمات کالیبراسیون

آیا لازم است تامین کننده خدمات کالیبراسیون اعتباربخشی شود؟ این مورد از الزامات ISO/IEC 17025 (نه ISO 15189) نیست اما بعد از ILAC P10:2013 به شدت ارجح است.

در مواردی که هیچ خدمات کالیبراسیون معتبری برای یک عامل مشخص در کشور موجود نیست، این بر عهده مشتری است که مدارک کافی که قابل ردیابی باشند را درخواست کند.

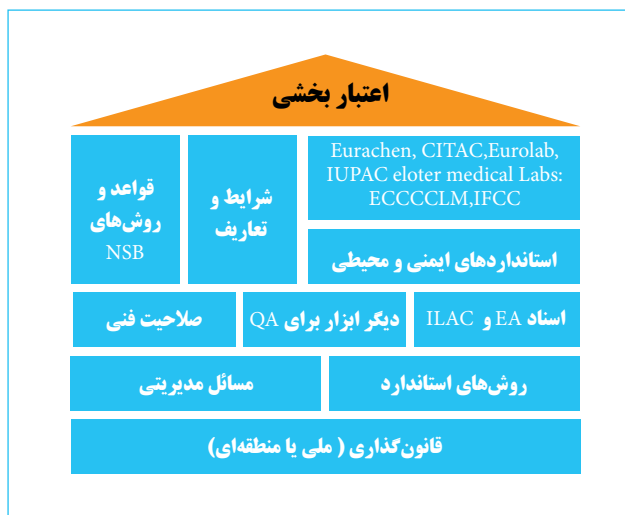
بازبینی قرارداد چطور؟ این بر عهده مشتری است که موارد الزامی را مشخص کند؛ از آزمایشگاه کالیبراسیون انتظار می‌رود که تایید کند خدمات ارائه شده می‌توانند این الزامات را برطرف کنند.

در صورتی که آزمایشگاه کالیبراسیون گواهینامه‌ای را برای عاملی که در دامنه اعتباربخشی آن است، بدون اینکه نشان

## نتیجه گیری

برای آن که اطمینان از کیفیت به درک انتظارات سرمایه‌گذاران و کیفیت کلی و هدف‌های اقتصادی جامعه کمک کند؛ تمرین و آگاهی در همه سطوح مورد نیاز است. این‌گونه است که فرهنگی با کیفیت ایجاد می‌شود و ارتقا می‌یابد. از عملکرد یک بازار واحد و جریان روان کالاها و خدمات در شرایط اطمینان حاصل می‌شود که درک متداولی از معانی و ابزار موجود برای مستند کردن رعایت الزامات کیفی وجود داشته باشد. در هر دو بخش اجباری و اختیاری، اطمینان از کیفیت بسیار حائز اهمیت است. سیستم اعتباربخشی قبرس تاکید قابل توجهی روی آموزش و آگاهی کرده است؛ با ورود به تقریباً دومین دهه فعالیت خود نتایج این تلاش و اثر آن بر توجه جامعه به کیفیت، به وضوح قابل مشاهده است.

نیاز به در نظر گرفتن و استفاده صحیح از یک سری عناصر دارد. این عناصر، همان‌طور که در بخش‌های قبلی بررسی کردیم برای عملکرد موثر همه روابط آزمایشگاه مورد نیاز هستند. شکل (۷) ساختار کلی را نشان می‌دهد. سقف آزمایشگاه مربوط به اعتباردهی آن است. نمادگرایی برای به ذهن سپردن نقش اعتباربخشی در مستندات صلاحیت فنی آزمایشگاه و قابلیت اطمینان نتایج آن، حائز اهمیت است.



شکل (۷): «ساخت» یک آزمایشگاه: جنبه‌های اصلی‌ای که باید در سیستم مدیریت آزمایشگاهی در نظر گرفته شوند؛ کنفدراسیون انجمن‌های اروپایی شیمی بالینی و آزمایشگاه پزشکی<sup>۲۵</sup>، فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و آزمایشگاه پزشکی<sup>۲۶</sup>، اتحادیه بین‌المللی شیمی خالص و کاربردی<sup>۲۷</sup> [۱۳ و ۱۴].

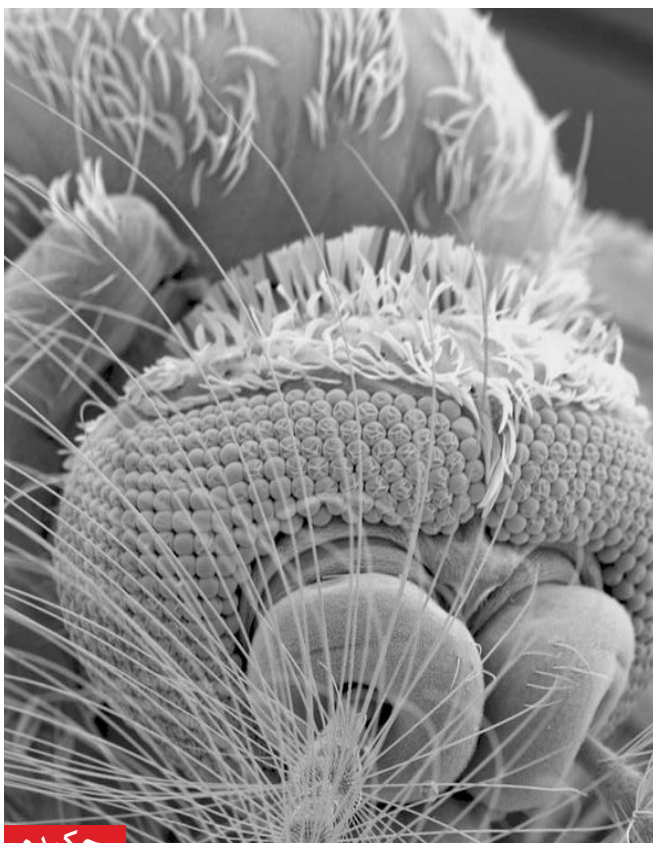
## پی‌نوشت

۱. کارشناسی ارشد فیزیک، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی امیرکبیر
۲. کارشناسی ارشد مدیریت دولتی، مدیر کیفیت پژوهشگاه مواد و انرژی
۳. کارشناسی ارشد شیمی زیستی بالینی، مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴. عضو کارگروه استاندارد و کالیبراسیون
5. Quality Assessment (QA)
6. Conformity Assessment Body (CAB)
7. International Vocabulary of Metrology (VIM)
8. European Parliament and the Council (EC)
9. Quality Control (QC)
10. Good Laboratory Practice (GLP)
11. Good Manufacturing Practice (GMP)
12. Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)
13. Occupational Health and Safety (OHSAS)
14. European cooperation for Accreditation (EA)
15. International Laboratory Accreditation Coopera-

tion (ILAC)

16. Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC)
17. Accreditation Body (AB)
18. National Accreditation Body (NAB)
19. Multilateral Arrangement (MLA)
20. Mutual Recognition Arrangement (MRA)
21. Proficiency Testing (PT)
22. Reference Materials (RM)
۲۳. علامت CE روی یک محصول، اعلام می‌کند که محصول مطابق با الزامات اساسی قوانین مربوط به سلامت، ایمنی و حفاظت از محیط زیست اروپا است.
24. International Committee for Weights and Measures (CIPM)
25. European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (ECCCLM)
26. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC)
27. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)

- [1] ISO 9000 (2005) Quality management systems—fundamentals and vocabulary. International Organization for Standardization, Geneva
- [2] ISO/IEC 17000 (2004) Conformity assessment—Vocabulary and general principles. International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Committee, Geneva
- [3] ISO/IEC Guide 99 (2007) International vocabulary of metrology—basic and general concepts and associated terms (VIM 3rd edn; <http://www.bipm.org/vim>)
- [4] Barwick VJ, Prichard E (eds) (2011) Eurachem guide: terminology in analytical measurement—introduction to VIM3. ISBN 978-0-948926-29-7. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- [5] Regulation (EC) No 765/2008 of the European Parliament and the Council setting out the requirements for accreditation and market surveillance relating to the marketing of products and repealing Regulation (EEC) No 339/93 (2008) OJ L 218/30
- [6] Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council on the harmonisation of laws, regulations and administrative provisions relating to the application of the principles of good laboratory practice and the verification of their applications for tests on chemical substances (2004) OJ L50/44
- [7] Commission Directive 2003/94/EC laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use (2003) OJ L 262/22
- [8] ISO 9001 (2008) Quality management systems requirements. International Organization for Standardization, Geneva
- [9] ISO 14001 (2004) Environmental management systems—requirements with guidance for use. International Organization for Standardization, Geneva
- [10] Council Directive 93/43/EEC on the hygiene of foodstuffs (1993) OJ L 175/1
- [11] ISO 22000 (2005) Food safety management. International Organization for Standardization, Geneva
- [12] OHSAS 18001 (2007) Occupational health and safety management. The Occupational Health and Safety Advisory Services, London
- [13] ISO/IEC 17025 (2005) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization/International Electrotechnical Committee, Geneva
- [14] ISO 15189 (2012) Medical laboratories— requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, Geneva
- [15] ISO 17000 series of accreditation standards. International Organization for Standardization, Geneva
- [16] Tsimillis KC (2010) Accreditation or certification for laboratories? In: Wenclawiak BW, Koch M, Hadjicostas E (eds) Quality assurance in analytical chemistry, 2nd edn. Springer, Heidelberg, pp 73–93
- [17] ILAC (2013) Securing testing, measurement or calibration services—the difference between accreditation and certification. International Laboratory Accreditation Cooperation. <http://ilac.org/publications-and-resources/ilac-documents/promotional-brochures>
- [18] ISO/IEC 17011 (2004) Conformity assessment—general requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies. International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Committee, Geneva
- [19] Directive 98/79/EC of the European Parliament and the Council Directive on in vitro diagnostic medical devices (1998) OJ L 331/1
- [20] Tsimillis KC, Michael S (2014) Quality management and quality assurance in medical laboratories. In: Moutzoglou A, Kastania A, Archontakis S (eds) Laboratory management information systems: current requirements and future perspectives, IGI Global, pp 136–153
- [21] ILAC P 10 (2013) ILAC Policy on Traceability of Measurement Results International Laboratory Accreditation Cooperation. <http://ilac.org/publications-and-resources/ilac-documents>
- [22] ISO/IEC 17043 (2010) Conformity assessment—general requirements for proficiency testing. International Organization for Standardization/International Electrotechnical Committee, Geneva
- [23] ISO Guide 34 (2009) General requirements for the competence of reference materials producers. International Organization for Standardization/International Electrotechnical Committee, Geneva



چکیده

میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۵</sup> یکی از بهترین روش‌های آنالیزی است که در حوزه‌های مختلف کاربردهای فراوانی دارد. این میکروسکوپ، امکان بررسی سطح و ریزساختار داخلی را در ابعاد میکرونی و نانومتری فراهم آورده است. امروزه یکی از حوزه‌های تخصصی و مورد توجه، نمونه‌های زیستی و بافت‌های زنده است. مشاهده این نمونه‌ها و بررسی ریز ساختارهای آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نیازمند آماده‌سازی خاصی است. به دلیل حساسیت بالای نمونه‌ها در صورتی که هر مرحله از آماده‌سازی با دقت کافی صورت نگیرد باعث ایجاد چروکیدگی، فروپاشی و یا آسیب به ساختار نمونه می‌شود و روی کیفیت تصاویر نهائی تاثیر می‌گذارد، بنابراین بسیار مهم است که شرایط و مراحل آماده‌سازی بافت با دقت و با روش استاندارد انجام پذیرد. روش‌های بسیار متنوعی برای آماده‌سازی انواع بافت‌های زیستی و آنالیز آن‌ها وجود دارند که با توجه به نوع بافت و ساختار آن متفاوت هستند.

در این مقاله به بررسی روش‌های کلی آماده‌سازی نمونه‌های زیستی و بافت‌های زنده شامل: (الف) تثبیت‌های مختلف (تثبیت شیمیایی و تثبیت فیزیکی)، (ب) آبگیری با درصد‌های مختلف الکل و (ج) روش‌های مختلف خشک کردن (خشک کردن در هوا، خشک کن نقطه بحرانی، خشک کن انجمادی و خشک کن‌های شیمیایی) به‌منظور مشاهده ساختارهای زیستی در نزدیک‌ترین حالت به ساختار زنده آن‌ها در SEM با قدرت تفکیک بالا پرداخته شده‌است.

## نویسندگان

مریم خانی‌نور<sup>۴</sup>\*مسعود رسولی<sup>۴</sup>نفیسه هاشمیان<sup>۴</sup>

\*M.khaninour@basu.ac.ir

# آماده‌سازی نمونه‌های زیستی به‌منظور تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی



## واژه‌های کلیدی

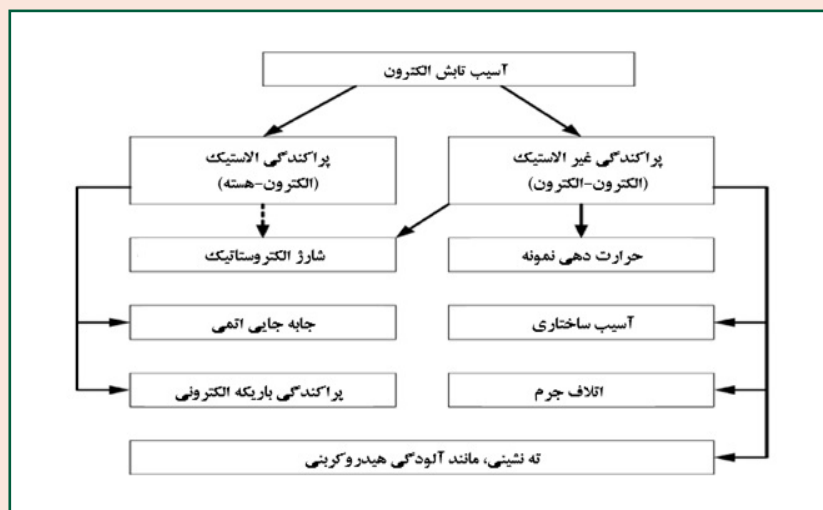
میکروسکوپ الکترونی روبشی، نمونه‌های زیستی، بافت‌های زنده، آماده‌سازی نمونه.

امروزه، میکروسکوپ الکترونی روبشی نه تنها در علوم مواد، شیمی و فیزیک به کار می‌رود، بلکه در زمینه‌های متعددی همچون علوم پزشکی و زیستی کاربرد دارد. قدرت تفکیک بالای SEM آن را به یکی از ابزارهای قدرتمند و جامع برای بررسی و تحلیل محدوده وسیعی از مشخصات ریزساختار نمونه‌ها در مقیاس نانومتر تا میکرومتر تبدیل می‌کند.

مواد زیستی، بافت‌های زنده‌ای هستند که در اصل ۹۹ درصد ساختار شیمیایی آن‌ها را عناصر سبک ( $Z=1-20$ ) تشکیل می‌دهند، به طوری که بیشتر از عناصر H, C, N, O و درصد کمتری از عناصر Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca ساخته شده‌اند. ۱ درصد باقیمانده به‌طور عمده از عناصر  $Z=24-30$  تشکیل شده‌اند که شامل عناصر کمیاب Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Zn و I است و در متالوآنزیم‌ها و کوآنزیم‌های مختلف نقش مهمی دارند. آب جزء اصلی نمونه‌های زیستی زنده است و ماکرومولکول‌های آلی پیچیده‌ای مانند پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها را شامل می‌شود. عناصر مختلف تشکیل دهنده سلول عبارتند از: ۵۹ درصد هیدروژن (H)، ۲۴ درصد اکسیژن (O)، ۱۱ درصد کربن (C)، ۴ درصد نیتروژن (N)، ۲ درصد دیگر موارد، مثل فسفر (P)، سولفور (S) و غیره [۲].

یکی از مهمترین چالش‌ها در تفسیر تصاویر SEM نمونه‌های زیستی، توانایی ایجاد تمایز بین ویژگی‌هایی است که منعکس کننده ساختار طبیعی و ویژگی‌هایی که در هنگام پردازش به‌صورت مصنوعی ایجاد می‌شوند، هستند. اگر این تمایز صورت نگیرد، حتی بهترین و با کیفیت‌ترین قدرت تفکیک‌ها می‌توانند تصاویر بی‌مفهومی را نتیجه دهند. این ساختارهای مصنوعی القا شده را آرتیفکت (مصنوعات) می‌نامند. مسئله تمایز ساختارهای واقعی از آرتیفکت‌ها با این واقعیت همراه است که بیشتر تصاویر میکروسکوپی به‌طور مستقیم از ساختارهای زیستی به‌دست نمی‌آیند، بلکه لکه‌ها، رنگ‌ها یا روکش‌ها نیز به نمونه‌ها اضافه می‌شوند تا بخش مورد نظر را قابل مشاهده سازند که خود عامل ایجاد آرتیفکت هستند [۳].

علاوه بر فراهم نمودن اطلاعات سودمند، باریکه الکترونی به کار رفته در یک SEM می‌تواند آسیب موقت یا دائمی را در ساختار سطحی و یا ساختار بالک نمونه ایجاد کند. روش دسته‌بندی این آسیب براساس نوع پراکندگی الکترونی (الاستیک یا غیرالاستیک) است (شکل (۱)) [۴]. مواد زیستی از رساناهای ضعیف یا نارساناهای حرارت و الکترونی هستند که نسبت به آسیب تابشی بسیار حساسند [۵].



شکل (۱): طبقه‌بندی آسیب تابشی با توجه به نوع الکترون و تاثیر ایجاد شده در نمونه [۴].

به‌منظور مشاهده ریزساختار بافت‌های زنده با استفاده از SEM، برخی ملاحظات مورد نیاز خواهند بود. SEM‌های متداول در حلال بالایی کار می‌کنند تا از تداخل مولکول‌های گازی با باریکه الکترونی اولیه و همچنین الکترون‌های ثانویه<sup>۶</sup> یا الکترون‌های پس پراکنده شده<sup>۷</sup> از نمونه جلوگیری کنند. این بدان معناست، هر نمونه‌ای که وارد SEM می‌شود باید کاملاً خشک و بدون هر گونه آلاینده آلی که ممکن است به‌صورت بالقوه در محیطی با حلال بالا گاز خارج کند، باشد. این قضیه مشکلی را در بررسی نمونه‌های زیستی که تا حد زیادی از آب تشکیل شده‌اند به وجود می‌آورد و اعمال مراحل آماده‌سازی اضافی به‌منظور حفظ ساختار طبیعی موجود زنده الزامی است. مراحل لازم به نوع نمونه و هدف

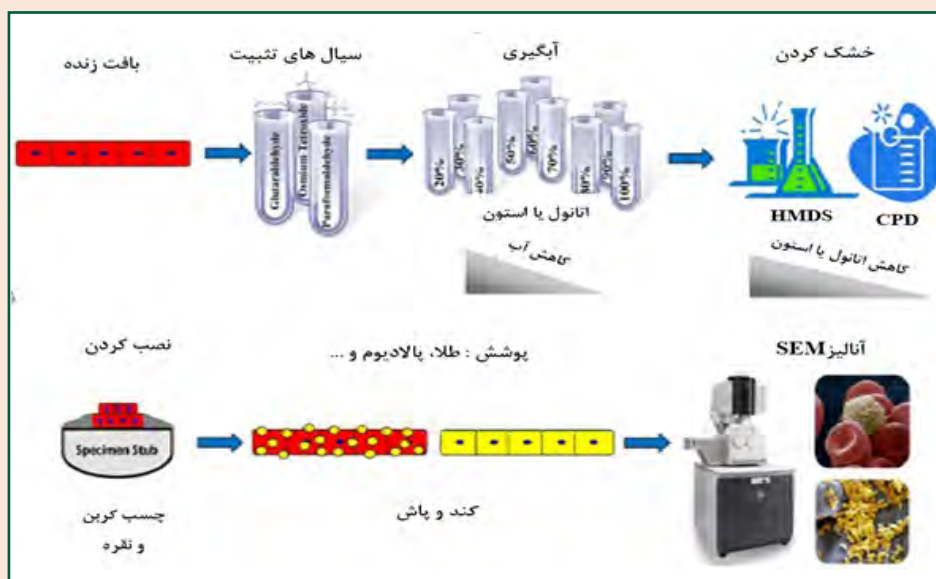
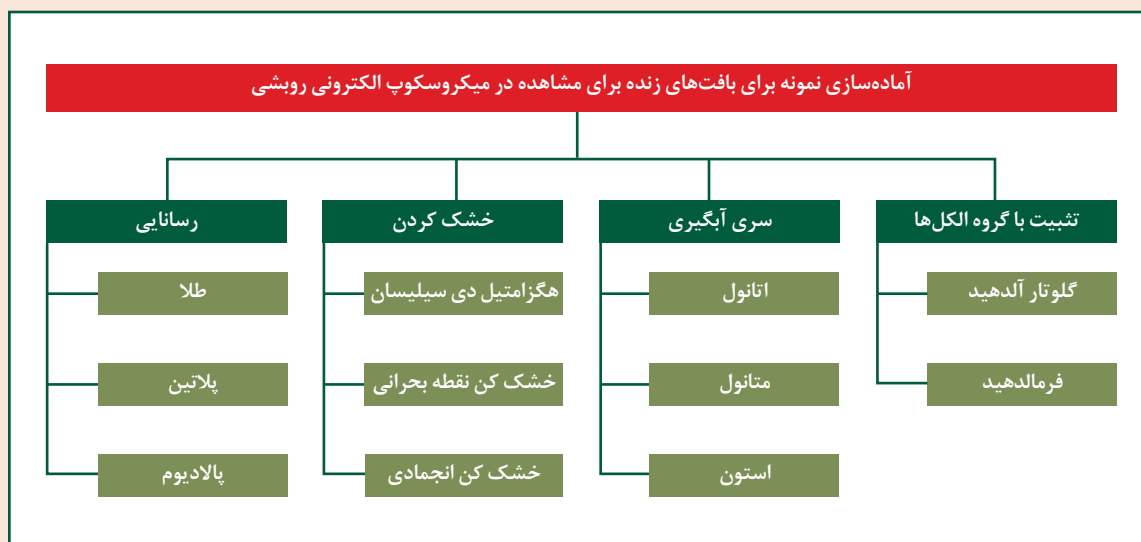


بررسی بستگی دارند، برخی از انواع بافت‌ها یا نمونه‌های زیستی نیازمند پردازش کمتری برای حفظ ساختار خود هستند در حالی که آماده‌سازی دیگر نمونه‌های حساس‌تر، به زمان و دقت بیشتری نیاز دارند تا از ایجاد آرتیفکت‌های ناشی از خشک شدن، مانند چروکیدگی و فروپاشی بافت جلوگیری شود [۵].

نتایج مطالعات مورفومتریک<sup>۱</sup> روی برش‌های بافت ممکن است به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر روش‌های آماده‌سازی نمونه مانند تثبیت، آگیری و جاسازی<sup>۱</sup> و در واقع نوع بافت قرار بگیرد. بسیاری از نمونه‌های زیستی از طریق تثبیت و آگیری آماده‌سازی شده و پس از خشک شدن با فلزی همچون طلا، پلاتینیوم یا پالادیوم روکش می‌شوند تا سطوح آن‌ها از نظر الکتریکی برای تحلیل SEM رسانا باشد. نمودار (۱) و شکل (۲)، به ترتیب مراحل اصلی به کار رفته در آماده‌سازی تمامی نمونه‌های زیستی برای مشاهده توسط SEM را شرح می‌دهند. ماهیت و ترکیب مراحل به کار رفته با توجه به ماهیت نمونه، نوع روش میکروسکوپی و اهداف خاص علمی متغیر است. به‌منظور بررسی بیشتر روش‌های مختلف آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای SEM، لطفاً به مراجع [۶-۸] مراجعه کنید. در اینجا هر مرحله به‌صورت مختصر توصیف می‌شود [۵].

جدول (۱): نمودار پیشنهادی آماده‌سازی بافت‌های زنده [۵].

جدول (۱): نمودار پیشنهادی آماده‌سازی بافت‌های زنده [۵].



شکل (۲): فرآیند آماده‌سازی بافت‌های زنده برای تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی [۵].

## ■ تثبیت شیمیایی

در مبحث تأثیرات تثبیت کننده‌های شیمیایی روی نمونه‌ها، چند عامل باید در نظر گرفته شود:

- ماهیت ماده تثبیت کننده؛
  - ساختار حاملی که ماده تثبیت کننده در آن حل شده‌است؛
  - شرایط فیزیکی که تثبیت تحت آن صورت گرفته است.
- مواد تثبیت کننده شیمیایی در دو دسته اصلی قرار می‌گیرند: آن‌هایی که با تغییر ماهیت و انعقاد ماکرومولکول‌های زیستی تثبیت می‌کنند و دسته دیگر با شبکه‌سازی کووالانسی ماکرومولکول‌ها باعث تثبیت می‌شوند. مواد تثبیت کننده‌ای مانند استون، اتانول، و متانول (که سبب تغییر ماهیت می‌شوند) سبب حفظ بسیار ضعیف ریزساختار شده و تقریباً فقط برای میکروسکوپی نوری<sup>۱۳</sup> سودمند هستند. در مقایسه، مواد تثبیت کننده شبکه‌ساز، از طریق معرفی شبکه‌های بین مولکولی و گاهی درون مولکولی بین ماکرومولکول‌ها، حفاظت ساختاری عالی را فراهم می‌کنند. رایج‌ترین مواد تثبیت کننده شبکه‌سازی شامل فرمالدهید برای میکروسوپ نوری و گلوآرالدهید و تتروکسید اوسمیوم برای SEM هستند [۵].

### فرمالدهید (FA)

فرمالدهید (FA) با فرمول (CH<sub>2</sub>O) یک مونو آلدهید است که با گروه‌های آمین واکنش داده و شبکه‌هایی را بین ماکرومولکول‌های مجاور، به‌طور عمده پروتئین‌ها، تشکیل می‌دهد. به دلیل آنکه شبکه‌سازی براساس تشکیل یک پل متیلن بین دو مولکول فرمالدهید است، شبکه‌ها کوتاه بوده و می‌توانند با هیدرولیز به حالت اولیه برگردند. فرمالدهید برای میکروسکوپ نوری بسیار سودمند است. کاربرد فرمالدهید برای قدرت تفکیک بالا محدود است. برای SEM، تثبیت فرمالدهید باید همراه با تثبیت بیشتر در گلوآرالدهید باشد [۵].

### گلوآرالدهید

گلوآرالدهید (GA) یک دی آلدهید است که می‌تواند به‌صورت هم‌زمان با دو آمین واکنش دهد تا شبکه‌های درون و بین مولکولی، به‌طور عمده با پروتئین‌ها، را به وجود آورد. گلوآرالدهید همچنین با خودش واکنش می‌دهد تا مولکول‌های شبکه‌ای چند ظرفیتی شاخه‌دار و بلندی را تشکیل دهد. این مولکول‌های شبکه‌ای می‌توانند فاصله بین پروتئین‌های مجاور را در بر بگیرند و شبکه‌های چندگانه و اساساً بازگشت ناپذیری را به وجود آورند که سیتوپلاسم کل سلول را به یک ژل ماکرومولکولی تبدیل کند. گلوآرالدهید یک ساختار ظریف را حداقل تا سطح تفکیک‌پذیری ماکرومولکولی حفظ نموده و آن را نسبت به مراحل پردازش مختلف مورد نیاز به‌منظور آماده‌سازی برای SEM بسیار مقاوم می‌سازد به طوری که این تثبیت کننده را به انتخابی ثابت، تقریباً برای تصویربرداری میکروسکوپی تمام نمونه‌های زیستی تبدیل می‌کند. با وجود آن گلوآرالدهید لیپیدها را تثبیت نمی‌کند، اما به خوبی سبب تثبیت غشاهای زیستی می‌شود که در مقابل استخراج با

## جمع‌آوری نمونه

جمع‌آوری نمونه از بافت‌ها حائز اهمیت و بر نتایج نهایی موثر است. در جمع‌آوری نمونه زیستی، برش بافت‌ها باید به دقت انجام شود. برای مثال، در زمان برش یک قسمت کوچک از بافت‌ها برای اهداف تشخیصی، باید در چگونگی نگه داشتن و برش نمونه دقت کافی به کار گرفته شود [۵].

## تثبیت

اولین و مهمترین مرحله پس از انتخاب نمونه برای مطالعه بافت‌های زنده، روش تثبیت سریع و مناسب آنهاست. هدف اولیه تثبیت، پایداری ساختار نمونه است به طوری که بتواند مراحل پردازش و آزمایش را با SEM تحمل کند. پیش از آنکه تجزیه سلولی بلافاصله پس از مرگ یک اندام زنده اتفاق بیفتد، باید سلول‌ها را تثبیت نمود تا از تغییرات ساختار از طریق تجزیه، جلوگیری به عمل آید. تثبیت متداول شامل شبکه‌سازی شیمیایی پروتئین‌ها (برای جلوگیری از حرکت آنزیم و گوارش) و حذف آب برای تغییر بیشتر پروتئین‌های سلولی است. یک ساختار تثبیت شده سبب توقف فرآیندهای سلولی شده و با هدف حفظ نمونه در نزدیکترین حالت ممکن به حالت طبیعی ایجاد می‌شود. مشخصات یک تثبیت کننده مناسب عبارتند از:

- نفوذ راحت به سلول‌ها؛
- عملکرد سریع؛
- تغییرناپذیری؛
- عدم ایجاد آرتیفکت‌های تثبیت [۵].

روش‌های تثبیت به دو نوع اصلی تقسیم می‌شوند: شیمیایی و فیزیکی (جدول (۲)). تثبیت شیمیایی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما استفاده از روش‌های فیزیکی، به‌خصوص انجماد، افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته است [۳].

جدول (۲): تثبیت کننده‌های زیستی رایج برای میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی [۳].

زمان آنالیز	ستون
استون الکل فرمالدهید <sup>۱۰</sup> گلوآرالدهید <sup>۱۱</sup>	روش‌های شیمیایی
تتروکسید اوسمیوم <sup>۱۲</sup> واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئینی	روش‌های فیزیکی
انجماد حرارت‌دهی	

### تثبیت بخار

به صورت کلی، همان‌طور که گفته شد، تثبیت نمونه‌های زیستی برای SEM از اصول و مواد یکسانی بهره می‌گیرد. اما برخی از نمونه‌ها به سادگی دچار آسیب می‌شوند، بنابراین غوطه‌وری در مایع برای آن‌ها مناسب نخواهد بود. این به خصوص برای هایف‌های<sup>۱۷</sup> قارچی و هاگدان‌های آن‌ها (کونیدی)<sup>۱۸</sup> که با لمس کردن از گیاه والد خود جدا می‌شوند حائز اهمیت است. تثبیت بخار شامل استفاده از یک قطره ماده تثبیت کننده در نزدیکی نمونه در یک محفظه کاملاً بسته است. در مورد ماده برگ، تتروکسید اوسمیوم ۴ درصد (ساخته شده در آب)، در حدود بعد از ۱ ساعت نمونه را تثبیت می‌کند. این نمونه در صورت تثبیت شدن به رنگ مشکی در می‌آید که این تغییر رنگ به ارزیابی پیشرفت کمک می‌کند. پس از تثبیت می‌توان نمونه را با قرار دادن در یک بلوک فلزی که با نیتروژن مایع خنک می‌شود، منجمد نمود و سپس به روش خشک کردن انجمادی (فریز درای)<sup>۱۹</sup> خشک کرد. معمولاً تثبیت کننده ثانویه تتروکسید اوسمیوم را می‌توان حذف کرد، ولی نمونه‌هایی که دارای «مشکل شارژ شدن» هستند و منجر به اعوجاج تصویر می‌شوند، بیشتر می‌توانند از تثبیت با محلول اسید اسمیک بهره‌مند شوند [۱۳].

### تثبیت فیزیکی

همان‌طور که قبلاً در جدول (۲) ذکر شد، دو جایگزین برای مواد شیمیایی به منظور تثبیت مواد زیستی حرارت‌دهی و انجماد هستند. هر دو روش برای میکروسکوپ نوری به کار می‌روند، اما انجماد (تثبیت کرایو) بهترین جایگزین برای تثبیت شیمیایی به منظور حفظ ساختار ظریف زیستی در میکروسکوپی با قدرت تفکیک بالا است [۵].

### تثبیت کرایو

انجماد سریع نمونه‌های زیستی پتانسیل خوبی در توقف همه حرکات‌های مولکولی دارد و تقریباً بلافاصله ساختار ظریف را در محل منجمد می‌سازد. آسیب به بلورهای یخ مانع اصلی برای یک تثبیت کرایوی خوب است. رشد بلور یخ تحت تاثیر سرعت انجماد قرار می‌گیرد، سرعت انجماد نیز به نوبه خود با نرخ انتقال حرارت خنک کننده و ابعاد نمونه تعیین می‌شود. برای اجتناب از آسیب فرا ساختاری به نمونه که به علت رشد بلورهای یخ بزرگ ایجاد می‌شود، انجماد سریع ضروری است. پروپان مایع با نرخ انتقال حرارت  $3900^{\circ}\text{C/s}$  موثرترین خنک کننده‌ای است که تاکنون آزمایش شده‌است و ارزان و خیلی راحت قابل استفاده است [۵]. برای بدست آوردن بلورهای یخ آزاد منجمد شده، سلول‌ها باید در نرخ بالای  $1000^{\circ}\text{C/s}$  منجمد شوند. نمونه‌های خیلی ریز مثل سلول‌های منفرد می‌توانند خیلی سریع منجمد شوند، اما نرخ انجماد پایین‌تر برای نمونه‌های ضخیم‌تر مانند بافت‌ها، منطقه آزاد بلور یخ را به یک لایه چند میکرومتری با نزدیک‌ترین فاصله از سطح یا محیط انجماد محدود می‌کند [۱۴ و ۱۵].

مواد شوینده مقاوم بوده و سلول‌های تثبیت شده با گلو تار آلدئید از لحاظ اسمزی برای مدتی پس از تثبیت فعال باقی می‌مانند [۳، ۶، ۹].

نسبت نفوذ گلو تار آلدئید به داخل بافت بسیار آهسته است، در بافت‌های فشرده نسبت نفوذ، کمتر از  $1\text{ mm/h}$  است. گلو تار آلدئید معمولاً به صورت تجاری در غلظت ۲۵ درصد وجود دارد که با استفاده از بافر فسفات<sup>۱۴</sup> (۰/۱ M) و یا بافر کاکودیلات<sup>۱۵</sup> (۰/۱ M) رقیق شده و غلظت بین ۱/۵ درصد تا ۳ درصد (با توجه به نوع بافت) به دست آمده و در شرایط دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و  $\text{PH} = 7/2 - 7/4$  مورد استفاده قرار می‌گیرد. گلو تار آلدئید باید در یخچال نگهداری شده تا از پلیمریزه شدن آن جلوگیری شود، از طرفی این تثبیت کننده بسیار سمی است به طوری که باید از تنفس و تماس با آن بشدت احتراز نمود و حتی الامکان در زیر هود قوی با این ماده سمی کار شود [۱۰].

### تتروکسید اوسمیوم

تتروکسید اوسمیوم (OT) به عنوان یک ماده تثبیت کننده ثانویه رایج برای SEM است، چرا که با بیشتر لیپیدها شبکه‌سازی کرده و آن‌ها را نسبت به استخراج توسط حلال‌های آلی به کار رفته در مرحله آبیگری مقاوم می‌سازد. با وجود آن که تتروکسید اوسمیوم از غشاهای زیستی محافظت می‌کند، اما سبب غیرفعال شدن آن‌ها از نظر اسمزی شده و آن‌ها را نسبت به آب نفوذپذیر می‌سازد. اما به دلیل آن که تتروکسید اوسمیوم می‌تواند به پروتئین‌ها و دیگر اجزا آسیب برساند، بهتر است که نمونه‌ها با اوسمیم تثبیت نشوند، مگر آن که علت خاصی برای استفاده از آن وجود داشته باشد [۱۱-۱۲].

نسبت نفوذ تتروکسید اوسمیوم  $0/5\text{ mm/h}$  است. نمونه‌هایی که از این اندازه بزرگتر باشند در وسط بافت تثبیت نشده باقی می‌مانند و برای میکروسکوپ الکترونی مناسب نیستند. تتروکسید اوسمیوم معمولاً با غلظت ۱ تا ۲ درصد و در زمان ۱ تا  $1/5$  ساعت استفاده می‌شود. بخار تتروکسید اوسمیوم هم برای چشم و هم برای تنفس بسیار سمی است و حتماً باید در زیر هود کار شود. تتروکسید اوسمیوم را می‌توان هم در آب مقطر و هم در بافر تهیه کرد و در ظرف شیشه‌ای داخل یخچال نگهداری نمود [۱۰].

### واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئینی

واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئینی دو عملکردی، شبکه‌های درون و بین مولکولی بین پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند، در نتیجه مشابه با گلو تار آلدئید عمل می‌کنند، به جز آنکه که برای تشکیل واکنش‌گرهای چند ظرفیتی به خود وابسته نیستند (با خود واکنش نمی‌دهند). فاصله‌ای که آن‌ها می‌توانند شبکه‌ها را تشکیل دهند، با طول مولکول بین دو انتهای واکنشی آن تعیین می‌شود.

انواع زیادی از واکنش‌گرهای شبکه‌سازی پروتئین دو عملکردی به صورت تجاری در بازار موجود هستند، که به طور عمده توسط پیرس<sup>۱۶</sup> معرفی شدند، اما تعداد کمی از آن‌ها به عنوان مواد تثبیت کننده برای میکروسکوپی آزمایش شدند [۳].

## ■ نکات کلی در خصوص تثبیت کردن نمونه‌ها

هنگام آماده‌سازی نمونه‌ها، یکی از اولین مفاهیم در نظر گرفته شده، تفاوت بین از بین بردن و تثبیت کردن نمونه است. بیشتر اوقات، اصطلاح تثبیت کردن برای هر دو فرآیند استفاده و گاهی باعث می‌شود فراموش کنیم که آن‌ها یکسان نیستند. بیشتر تثبیت کننده‌های اولیه که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرند از گروه تثبیت کننده‌های آلدئیدها هستند و به خوبی اثبات شده‌است که سلول‌ها پیش از مرگ، می‌توانند مدت زمان قابل توجهی را به‌منظور پاسخ به محلول‌های تثبیت کننده داشته باشند. آمیب کپک لجن رشد یافته روی یک سطح آگار می‌تواند به‌صورت گرد دیده شود و بعد از آن که مخلوط گلوآرآلدئید روی آن ریخته می‌شود، در ۳۰ ثانیه اول فضاهای بین مولکولی ایجاد می‌کند. اگر، ظرف پتری حاوی سلول‌ها ابتدا در معرض بیش از یک قطره تتروکسید اسمیوم ۱ درصد برای ۳ دقیقه قرار بگیرد، گلوآرآلدئید اضافی باعث هیچ گونه تغییر مورفولوژی واضحی در سلول‌ها نمی‌شود. بنابراین، بخارات بسیار فرار و سمی تتروکسید اسمیوم سلول‌ها را از بین می‌برد و سپس گلوآرآلدئید آن را تثبیت می‌کند. مهم است فراموش نکنیم که این فرآیندها منحصر به فرد نیستند و می‌توانند متفاوت باشند [۱۳].

به‌طور خلاصه تثبیت آلدئید معمولاً کافی است. دو تثبیت کننده اصلی برای این هدف، گلوآرآلدئید و فرمالدهید است. گلوآرآلدئید به سرعت و به‌صورت غیر قابل برگشت از طریق گروه‌های آمین‌هایشان به پروتئین‌ها متصل می‌شوند به طوری که به آرامی در داخل بافت نفوذ کرده و معمولاً به‌صورت ترکیبی با فرمالدهید به کار می‌رود. فرمالدهید به‌صورت قابل برگشت به پروتئین‌ها متصل شده اما به علت اینکه مولکولی کوچک است به سرعت در بافت نفوذ می‌کند [۱۶].

تعادل اسمولاریته<sup>۲۰</sup> محلول تثبیت کننده با اسمولاریته داخلی سلول‌ها یا بافت‌های تثبیت شده، به‌منظور حفظ مورفولوژی طبیعی و ساختار خوب حیاتی است [۱۷]. اگر اسمولاریته تثبیت کننده کمتر از سلول‌ها باشد، سلول‌ها آب‌دار و متورم خواهند شد و اگر بیشتر باشد سلول‌ها آب از دست داده و چروک می‌شوند. استرس اسمزی می‌تواند باعث پارگی محفظه‌های داخلی غشاء و توزیع مجدد اجزای داخل سلولی شوند. گلوآرآلدئید، فرمالدهید و تتروکسید اوسمیوم آزادانه از غشاء عبور کرده و فشار اسمزی به سلول‌ها و بافت‌ها کمک نمی‌کند [۳، ۷، ۱۷].

بسیاری از ساختارهای زیستی به دما حساس هستند. توصیه شده دمای محلول در ابتدای تثبیت شدن همان دمایی باشد که نمونه موقع زنده بودن در آن نگهداری شده‌است. پس از آن که نمونه به خوبی تثبیت شد، دما می‌تواند تا حد دمای اتاق و برای نگهداری طولانی مدت تا ۴ درجه سانتی‌گراد پایین بیاید. همچنین برای جلوگیری از آلوده شدن نمونه‌ها به مرور زمان، می‌توان آن‌ها را در یخچال نگهداری نمود. دیگر دلایل تثبیت نمودن در دماهای پایین‌تر (۰-۴°C) عبارتند از:

- کاهش تحرک جانبی پروتئین‌های غشاء؛
- کاهش انتشار مولکول‌های بین سلولی

■ کاهش نرخ تثبیت که باید با تتروکسید اوسمیوم یا مخلوط تتروکسید اوسمیوم و گلوآرآلدئید صورت گیرد [۳].  
زمان مورد نیاز کافی به‌منظور تثبیت سلول‌ها و بافت‌ها تا حد زیادی به سرعت پخش تثبیت کننده در نمونه و نرخي که تثبیت کننده با اجزای نمونه واکنش می‌دهد، بستگی دارد. حداقل زمان مورد نیاز برای تثبیت به نوع و اندازه نمونه بستگی دارد. به‌عنوان مثال، به نظر می‌رسد سلول‌های کشت تقریباً بلافاصله تثبیت شوند، اگر چه ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در (۳۷°C)، زمانی امن برای اطمینان از تثبیت کافی است. سلول‌های باکتریایی ممکن است فقط نیاز به ۳۰ دقیقه زمان داشته باشند، در حالی که به‌منظور اطمینان از نفوذ کامل تثبیت کننده، یک قطعه ضخیم‌تر از بافت یک حیوان یا گیاه نیاز به یک شب یا حتی چند روز (تقریباً ۸ ساعت) غوطه‌وری در تثبیت کننده خواهد داشت. در صورت لزوم، تقریباً تمام نمونه‌ها را می‌توان در گلوآرآلدئید سرد برای مدت زمان طولانی ذخیره نمود. اما نگهداری نمونه به‌صورت طولانی مدت در تتروکسید اوسمیوم می‌تواند بسیار مخرب باشد و باید اجتناب شود و در نهایت ماهیت برگشت‌پذیر پیوند فرمالدهید ذخیره‌سازی طولانی مدت در تثبیت کننده فرمالدهید را غیرممکن می‌سازد. در نهایت، باید تمام تثبیت کننده‌ها به‌منظور حفظ pH در حدود pH فیزیولوژیک نمونه، بافر شوند که به‌طور معمول برای بافت‌های پستانداران ۷/۲ تا ۷/۴ است [۳].

## آبگیری

برای مطالعه نمونه‌های زیستی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی لازم است قبل از آنالیز و تصویربرداری، آب و مایعات آلی از نمونه‌ها حذف و یا بی‌حرکت شوند. به عبارت دقیق‌تر، اصطلاح «آبگیری» برای توصیف حذف آب استفاده می‌شود. از آنجا که مواد زیستی به‌طور عمده از آب تشکیل شده‌اند، آبگیری آن‌ها به‌صورت بالقوه با توجه به موارد زیر، فرآیندی بسیار مخرب و ایجاد کننده آرتیفکت است:

۱. استخراج مولکول‌ها توسط حلال آب‌گیر؛
  ۲. از بین رفتن مولکول‌ها در اثر از دست دادن آب؛
  ۳. چروکیدگی نمونه به دلیل از دست دادن آب؛
  ۴. شکستن نمونه توسط فصل مشترک هوا و حلال.
- چروکیدگی یک آرتیفکت اجتناب‌ناپذیر در آبگیری است، زیرا از دست دادن حلال آب موجود در اطراف مولکول‌ها موجب به هم فشردگی زیاد مولکول‌ها می‌شود [۱۹، ۱۸، ۳]. بنابراین، نمونه‌ها باید طوری آبگیری شوند که به آهستگی منقبض شده و در اثر از دست دادن سریع آب از هم نپاشند [۳].

بدین منظور بسیاری از روش‌های مختلف از جمله خشک کردن در هوا و آبگیری شیمیایی معرفی می‌شوند. رایج‌ترین حلال‌های آبگیری متانول، اتانول و استون هستند. اتانول و استون به‌طور معمول به‌منظور آبگیری و حفظ ساختار اصلی نمونه‌های زیستی مانند بافت پروتئین استفاده می‌شوند. روند

نمود تا نمونه خشک نشود، نکته‌ای که خیلی از افراد نسبت به آن بی‌توجه هستند.

به‌طور کلی برای آگیری بافت‌های زنده مراحل زیر توصیه می‌شود:

۱. نمونه‌ها با بافر تازه (هیچگونه تثبیت کننده‌ای اضافه نشود) سه مرتبه زیر هود فیوم شستشو شود.
۲. سپس نمونه‌ها در کمترین غلظت الکل (اتانول) از سری غلظت‌های الکل در نظر گرفته شده برای آگیری، قرار داده شود (مثلا الکل ۵۰ درصد به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه).
۳. مراحل را به ترتیب با الکل‌های درصد بیشتر ادامه داده تا نمونه به الکل ۱۰۰ درصد برسد، سپس مراحل الکل ۱۰۰ درصد تکرار شود.
۴. نمونه‌ها اکنون آگیری شده و آماده خشک شدن هستند.

### خشک کردن

بسیاری از نمونه‌های زیستی حاوی مایعات (بیشتر آب) هستند. تخییر این مایعات می‌تواند تاثیر منفی بر عملکرد دستگاه داشته باشد، بنابراین، بهتر است نمونه قبل از گذاشته شدن در محفظه میکروسکوپ الکترونی روبشی کاملا خشک شود.

هنگامی که آگیری کامل شد، حلال باید بدون ایجاد آرتیفکت‌های ناشی از خشک کردن یا تنش سطحی در نمونه از بافت خارج شود. این امر از طریق استفاده از یک جریان انتقالی و معمولا به کمک دستگاه‌هایی مانند خشک کن در نقطه بحرانی<sup>۲۲</sup> و خشک کن سرمایشی<sup>۲۳</sup> و گاهی اوقات با استفاده از دی‌اکسید کربن مایع و یا یک سری از حلال‌ها مانند هگزامتیل دی سیلیزان<sup>۲۴</sup>، فرئون<sup>۱۱۳</sup>، تترامتیل سیلان<sup>۲۵</sup> و PELDRI II برای خشک کردن در هوا به دست می‌آید. روش‌های ذکر شده نیروهای کشش سطحی بالا را که باعث فروپاشی و چروکیدگی سلول‌ها و ویژگی‌های سطحی آن‌ها می‌شود، کاهش می‌دهد [۲۴، ۲۵، ۵].

اگر نمونه‌های زیستی پس از آگیری در هوا خشک شوند، آرتیفکت‌هایی از قبیل چروکیدگی و فروپاشی ساختارهای سطح به علت اثرات کشش سطحی می‌توانند مشکل‌زا باشند. همان‌طور که سطح مشترک بین آب و هوا، ابتدا از سطح و سپس از بخش توده‌ای نمونه می‌گذرد، نیروهای کشش سطحی مربوط به سطح مشترک می‌توانند تا ۱۳/۸ مگاپاسکال افزایش یابند که در نتیجه ۴۵ درصد چروکیدگی در مرحله نهایی خشک کردن در هوا رخ می‌دهد [۲۶]. همچنان که ساختارهای در حال خشک شدن کوچکتر می‌شوند این نیروها به‌طور فزاینده‌ای بزرگتر می‌گردند. افزایش چشم‌گیر نیروهای کشش سطحی به شدت ساختار یکپارچه نمونه‌های نرم را از شکل طبیعی خارج می‌کند و حتی می‌تواند منجر به فروپاشی کامل نمونه‌های توخالی شود. هر تغییر شکلی که رخ می‌دهد می‌تواند به‌صورت

آگیری با عبور بافت از یک سری غلظت‌های افزایش یافته الکل انجام می‌شود. بلوک‌های بافت به ترتیب در الکل‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد قرار گرفته و آگیری می‌شوند [۲۳-۲۰]؛ سپس برای اطمینان از اینکه تمام آب حذف شده‌است، بلوک‌ها مجددا در اتانول ۱۰۰ درصد قرار می‌گیرند. توجه داشته باشید که باید از اتانول خالص استفاده شود و از آنجایی که اتانول جاذب رطوبت است و بخار آب را از هوا جذب می‌کند باید اطمینان حاصل شود که هیچ گونه آبی جذب نشده و اتانول خالص است. به همین دلیل، معمولا شروع آگیری در ۱۵ درصد تا ۳۰ درصد حلال در آب است و غلظت حلال در گام‌های ۱۵ درصد تا ۲۰ درصد، در نهایت به ۱۰۰ درصد افزایش می‌یابد [۳]. مهم است که بین آگیری و خشک کردن تمایز قائل شویم، بافت‌ها هرگز نباید در مجاورت هوا خشک شوند. آگیری شامل خروج آهسته آب از بافت با یک حلال آلی است. آگیری باید نسبتا سریع صورت گیرد تا از استخراج بیش از حد الکل و ترکیبات محلول در استون جلوگیری شود، اما برای جلوگیری از پلاسمولیز<sup>۲۱</sup> به اندازه کافی آهسته باشد. کنترل استخراج اجزای نمونه دشوار است. کربوهیدرات‌ها به‌خصوص با وزن مولکولی پایین، حساس هستند چون اگر کربوهیدرات‌ها در تمام تثبیت کننده‌ها قرار بگیرند، معمولا اتصال ضعیفی برقرار می‌کنند. پروتئین‌ها در حین تثبیت اولیه و چربی‌ها در حین تثبیت ثانویه به ترتیب تمایل دارند به گلوپتارآلدهید و تتروکسید اوسمیوم متصل شوند. کربوهیدرات‌ها اساسا تثبیت نشده هستند. علاوه بر مشکل استخراج، مشکل چروکیدگی نیز وجود دارد، هر یک از این مشکلات در غلظت‌های پایین سری‌های آگیری بسیار جدی هستند. به‌طور کلی، راه حل این مسایل آگیری سریع است. با استفاده از الکل ۷۰ درصد بافت تا حد زیادی چروک نمی‌شود اما شروع به سخت شدن می‌کند. در حقیقت، دوره‌های طولانی آگیری در غلظت‌های بالاتر الکل، می‌تواند بافت را کاملا شکننده کند. اگر در مراحل تثبیت نمونه توقفی نیاز باشد، بیشتر بافت‌شناسان الکل ۷۰ درصد تا ۱۰۰ درصد را به‌عنوان مکان مناسبی برای توقف نمونه در طی شب می‌دانند. اگر در حین آگیری پلاسمولیز رخ دهد، ممکن است مراحل اضافه‌تر آگیری لازم باشد. غشاهای سلولی گاهی بعضی از فعالیت‌های اسمزی را پس از مدت کوتاهی از تثبیت حفظ می‌کنند. زمان‌های طولانی‌تر تثبیت در گلوپتارآلدهید می‌تواند حساسیت‌های اسمزی را به خوبی کاهش دهد. غشاها اساسا به تغییرات اسمزی پس از ۴۸ ساعت تثبیت در گلوپتارآلدهید غیرحساس می‌شوند. تثبیت ضعیف سبب تشدید مشکلات آگیری خواهد شد. آگیری در دمای یخچال کمی سبب کند شدن فرآیند شده و تمایل به سفت کردن بافت دارد و همچنین ممکن است پلاسمولیز را قدری کاهش دهد. بافت‌های زنده خیلی به آگیری ضعیف حساس هستند، بنابراین آگیری سرد (در دمای یخچال) برای اینگونه بافت‌ها توصیه می‌شود. همچنین باید در هنگام تعویض محلول دقت

به همین دلیل، کربن دی‌اکسید مایع برای خشک شدن در نقطه بحرانی به کار می‌رود. جدول (۲) دما - فشار بحرانی برخی از مواد را نشان می‌دهد.

جدول (۲): دما و فشار بحرانی مواد شیمیایی که در خشک کن نقطه بحرانی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳].

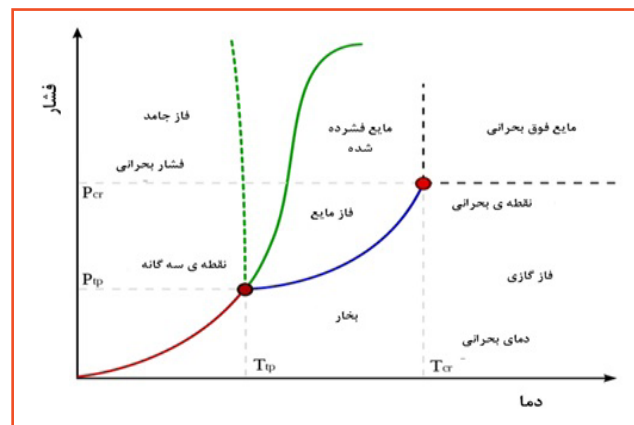
فشار بحرانی (MPa)	دمای بحرانی (C)	ماده شیمیایی
۲۲/۱۲	۳۷۵	آب
۷/۹۵	۲۴۰	متانول
۳/۸۷	۲۹	فرئون ۱۳
۷/۳۹	۳۱	دی‌اکسید کربن

نمونه‌ای که آبیگری شده‌است باید در مقدار کافی الکل درصد بالا (معمولاً اتانول ۱۰۰ درصد) که به‌طور کامل آن را می‌پوشاند، قرار بگیرد و در محفظه یک دستگاه خشک کن نقطه بحرانی قرار داده شود. محفظه مهر و موم می‌شود و با استفاده از آب خنک شده و سپس CO<sub>2</sub> مایع مکرراً وارد محفظه و اتانول خارج می‌شود تا هنگامی که تمام اتانول با CO<sub>2</sub> مایع جایگزین شود. در مرحله بعد، محفظه مجدد مهر و موم شده، خنک کردن محفظه متوقف می‌شود و در عوض به آرامی شروع به گرم کردن می‌کند. هنگامی که فشار از ۱۰۷۲ PSI و دمای محفظه از ۳۱°C تجاوز کرد یک نقطه بحرانی به‌دست می‌آید که طبق آن فاز مایع و گاز با هم در تعادل هستند. اگر دمای محفظه بالاتر برده شود و از دمای بحرانی عبور کند (برای مثال، ۳۸-۳۶°C)، دی‌اکسید کربن مایع ناپدید شده و محفظه می‌تواند گاز CO<sub>2</sub> را بدون هیچگونه احتمال تبدیل مجدد به CO<sub>2</sub> مایع و تولید کشش سطحی روی نمونه‌های زیستی، خارج کند. این فرآیند از پنجره محفظه قابل مشاهده است. در نهایت محفظه باید به آرامی از گاز CO<sub>2</sub> تخلیه شود، باید توجه داشت خروج گاز از طریق یک دیافراگم کوچک (دریچه تخلیه) در سرعت بالا منجر به کاهش دما خواهد شد اگر دما به زیر نقطه بحرانی افت کند سطوح نمونه می‌تواند دوباره مرطوب و آسیب‌های ناشی از کشش سطحی را متحمل شود، به همین خاطر داماسنج باید دائماً مشاهده شده و دما تحت نظر باشد [۱۳ و ۲۹]. زمانی که محفظه از فشار اتمسفر پر شد، باید به سرعت نمونه‌های کاملاً خشک زیستی را برداشته و بلافاصله آنها به ظرف در بسته منتقل و داخل دسیکاتور نگهداری نمود. این کار باید خیلی سریع انجام شود زیرا نمونه‌های بدون آب می‌توانند سریعاً آب اتمسفر را جذب کنند [۳]. در شکل (۴) دو نمونه از مدل‌های

اشتباه به‌عنوان ویژگی ذاتی نمونه یا به‌عنوان تاثیر یک رفتار اعمال شده خاص تشخیص داده شود. افزایش نیروهای کشش سطحی همچنین مشکلاتی برای نمونه‌های شامل محلول‌های آلی و غیر آلی حل شده ایجاد می‌کند [۵].

### ■ خشک کن نقطه بحرانی

خشک کن نقطه بحرانی (CPD) یک روش متداول آبیگری بافت‌های زیستی قبل از آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی است. این روش اولین بار به‌صورت تجاری برای آماده‌سازی نمونه‌های SEM توسط پلارن<sup>۲۶</sup> در سال ۱۹۷۰ معرفی شد. به‌طور سنتی نمونه‌های زیستی به‌منظور جلوگیری از چروکیدگی توسط CPD مورد پردازش قرار گرفته‌اند [۲۷ و ۲۸]. خشک کن نقطه بحرانی بر این اصل استوار است که در شرایط دما و فشار معین (در نقطه بحرانی)، یک مایع و بخار آن غیر قابل تشخیص خواهند شد (شکل (۳)). در این نقطه، تبادل یکسانی از مولکول‌ها بین فازهای مایع و گاز وجود دارد و کشش سطحی نمونه برابر صفر خواهد شد.



شکل (۳): نقطه بحرانی مایع - بخار در نمودار فاز دما فشار در دمای بالای مرز فاز گاز و مایع است. خطوط نقطه چین سبز رفتار غیرعادی آب را نشان می‌دهد [۵].

برای نمونه‌های زیستی که مساله اصلی حذف آب است نقطه بحرانی (برای آب) با مقادیر ۳۷۴°C و ۳۲۱۲ PSI نامناسب بوده و باعث آسیب حرارتی به نمونه می‌شود. دما و فشار بحرانی متانول و دیگر مایعات مشابه نیز بسیار بالاست. در مقابل، دماهای بحرانی فرئون ۱۳ (یک سرد کننده فلئوئور و کربنی) و دی‌اکسید کربن مایع کم هستند. با وجود فشار بحرانی کم برای فرئون ۱۳ اما فشار کربن دی‌اکسید مایع مقدار بالایی دارد. از این اطلاعات به نظر می‌رسد که فرئون ۱۳ و دیگر فلئوئورکربن‌های مشابه بهترین گزینه برای خشک کن نقطه بحرانی هستند. اما تصاویر گرفته شده از مواد زیستی نشان می‌دهد که یکپارچگی ساختاری بهتر، زمانی حفظ می‌شود که دی‌اکسید کربن مایع به جای فلئوئورکربن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. فلئوئورکربن‌ها به‌عنوان ماده سرد کننده ممنوع هستند، چرا که به‌طور مستقیم با تخریب لایه ازون و گرم شدن هوای جهان در ارتباطند و دیگر به‌طور کلی در دسترس نیستند.

بحرانی روش عالی نیست. چروکیدگی همچنان به میزان ۱ درصد، ۱۵ درصد در مواد سیستم عصبی مرکزی، ۱۲ تا ۱۳ درصد در جنین و بافت‌های جنینی و ۲۰ درصد چروکیدگی برای ریه، کلیه، کبد و پوست مشاهده شده است [۱۳، ۲۶، ۲۹، ۳۰].

همواره باید در نظر داشت، دستگاه خشک کن نقطه بحرانی که گاهی اوقات بمب نامیده می‌شود، در فشار بسیار بالا کار می‌کند و بطور بالقوه بسیار خطرناک است و باید صرفاً توسط افراد آموزش دیده و با رعایت دستورالعمل‌های سازندگان استفاده شود [۱].

### ■ خشک کن انجمادی

در تئوری باید خشک کن انجمادی (FD) چروکیدگی کمتری نسبت به خشک کن نقطه بحرانی (CPD) داشته باشد [۳۰]. همچنین خشک کن انجمادی از خطرات مشاهده شده (به علت فشار بالا) در فرآیند خشک کن نقطه انجمادی جلوگیری می‌کند. مراحل آماده‌سازی (تثبیت و آبگیری) نمونه با دستگاه خشک کن نقطه انجمادی یکسان است.

کاربرد خشک کن سرمایشی فراتر از آن است که تنها نمونه را به وسیله تصعید آبگیری نماید بلکه احتمالاً برای کارهای میکروسکوپی و آنالیز همواره به صورت یک فرآیند تجربی کاربرد خواهد داشت. اگرچه دستورالعمل‌های کلی برای کار با دستگاه وجود دارد، اما باید دستورالعمل‌های تجربی برای نمونه‌های مورد نظر در راستای بالا بردن کیفیت تصاویر میکروسکوپ الکترونی و صحت آنالیزهای شیمیایی در نظر گرفته شود [۱]. در کاربرد میکروسکوپی، دستگاه خشک کن انجمادی برای خارج ساختن حلال از ساختمان مواد زیستی و خشک کردن نمونه‌ها بواسطه ایجاد خلاء در دماهای بسیار پائین بدون تغییر در ساختار استفاده می‌شود. روش کلی کار به این صورت است که حلال منجمد شده موجود در نمونه به وسیله فرآیند تصعید به صورت بخار از نمونه خارج و سپس توسط پمپ خلاء از داخل محفظه خشک کن مکیده می‌شود. گرمای مورد نیاز برای تصعید از طریق هدایت یا تشعشع، تامین می‌شود.

عملیات خشک کردن انجمادی دارای سه مرحله است: انجماد اولیه، خشک کردن اولیه به صورت تصعید در شرایط خلاء و خشک کردن ثانویه با استفاده از تبخیر در شرایط خلاء. **انجماد اولیه:** هنگامی که نمونه در اتانول ۱۰۰ درصد است، می‌تواند در نیتروژن مایع یخ بزند یا به راحتی از حالت اصلی خود خارج شود.

**خشک کردن اولیه به صورت تصعید در شرایط خلاء:** نمونه در جا نمونه‌ای از پیش سرد شده در دمای  $40^{\circ}\text{C}$  تا  $80^{\circ}\text{C}$ - و در شرایط خلاء کم (۲ Pa - ۱/۳۳۱۰ یا کمتر) نگهداری می‌شود و برای بیشتر نمونه‌ها ۶-۸ ساعت، مونومرها تنها ۱ تا ۲ ساعت، و نمونه‌ای با ضخامت ۳-۱ mm ممکن است تا ۳ روز باقی بماند. هنگامی که دیگر یخ زدگی در جا نمونه‌ای قابل رویت نباشد، نشان می‌دهد که تمام اتانول منجمد شده تصعید شده است و به صورت بخار درآمده است [۵].

**خشک کردن ثانویه با استفاده از تبخیر در شرایط خلاء:** نمونه

مختلف دستگاه خشک کن نقطه بحرانی (CPD) نشان داده شده که ظاهر متفاوتی دارند اما در عملکرد و ساختار یکسان هستند.



شکل (۴): دو نمونه متفاوت از خشک کن نقطه بحرانی (CPD) با ظاهری متفاوت ولی عملکردی یکسان [۱].

### معایب خشک کن نقطه بحرانی

اگر چه خشک کن نقطه بحرانی مشکلاتی را که در اثر تأثیرات ناشی از کشش سطحی ایجاد می‌شود، برطرف می‌کند، شواهد قانع کننده‌ای وجود دارد آبگیری و سپس توسط خشک کن نقطه بحرانی می‌تواند به دو روش نمونه‌های نرم را تخریب کند:

■ یکپارچگی ساختاری: یک سری از مطالعات دقیق (بوید و همکاران، ۱۹۷۷ - بوید و مکنایچی، ۱۹۷۹) نشانگر آن است که خشک کن نقطه بحرانی سبب افزایش (تا ۷۰ درصد) تغییرات ابعادی ناخوشایند و نابرابر در بیشتر نمونه‌ها می‌شود. بوید و مکنایچی (۱۹۷۹)، وولوبر و همکاران (۱۹۸۱) و گاملیل (۱۹۸۵) در مورد مزایای افزودن فلزات سنگین مختلف، عناصر با چگالی بالا و افزودنی‌های آلی که می‌تواند در مراحل تثبیت صورت بگیرد و چروکیدگی را تا ۵ درصد کاهش دهد، بحث می‌کنند. گرچه فرسایش و اختلال ویژگی‌های سطح هنوز یک مسئله است [۳].

■ یکپارچگی شیمیایی: دی‌اکسید کربن مایع، که معمولاً دی‌اکسید کربن فوق بحرانی نامیده می‌شود، یک حلال قوی است. برای مثال، می‌تواند برای مواد فلزی، حل کردن یون‌های فلزی، چربی‌ها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها، بدون کافئین کردن چای و قهوه و حتی از بین بردن کل نیکوتین‌ها از برگ‌های پیچیده تنباکو مورد استفاده قرار گیرد. خشک کن نقطه بحرانی روشی نیست که برای مطالعات ساختاری با قدرت تفکیک بالا در نمونه‌های آلی حساس و ظریف یا بررسی‌های تحلیلی روی هر نوع نمونه استفاده شود. در بزرگنمایی پایین، به عنوان مثال، بزرگنمایی ۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ برابر، خشک کن نقطه بحرانی احتمالاً برای مطالعات ساختاری قابل قبول است. نمونه‌هایی که در خشک کن نقطه بحرانی در مقایسه با نمونه‌هایی که در هوا خشک می‌شوند خیلی کیفیت عکس الکترونی بالاتری دارند [۳].

در نهایت باید به این نکته اذعان کرد که خشک کن نقطه

آب یا حتی بدون آسیب ناشی از تبخیر اتانول (که در مورد CPD و FD دیده می‌شد) بخار می‌شوند. نمونه‌ها در حلال (ترجیحاً اتانول) می‌توانند ابتدا در یک محلول ۵۰:۵۰ اتانول و HMDS قرار گیرند و سپس به محلول ۱۰۰ درصد HMDS منتقل شود (۲ تغییر). در نهایت در محلولی که کاملاً روی نمونه را گرفته است برای تبخیر زیر هود فیوم قرار داده می‌شود. این مراحل برای نمونه‌های بسیار کوچک چند دقیقه و برای نمونه‌های بزرگ چند روز طول می‌کشد. هنگامی که نمونه‌ها برای محفظه خشک کن نقطه انجمادی مناسب نیستند عامل‌های شیمیایی جایگزینی مناسب برای این دستگاه است. با این وجود تمام نمونه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیزی با HMDS خشک نمی‌شوند؛ بنابراین، یک آزمایش و امتحان، قبل از اینکه این روش به‌عنوان یک روند استاندارد انتخاب شود، مفید است [۱۳ و ۳۲].

این روش برای کار با بیشتر انواع نمونه‌های زیستی ثابت شده‌است و با وجود این روش نیازی به کار با دستگاه گران و زمان‌بر خشک کن نقطه بحرانی احساس نمی‌شود.

این روش ساده است:

۱. نمونه را از اتانول ۱۰۰ درصد به محلول HMDS: اتانول ۱۰۰ درصد به نسبت ۲:۱ برای ۲۰ دقیقه در آن باقی بماند.
۲. نمونه را در محلول تازه HMDS: اتانول ۱۰۰ درصد به نسبت ۱:۲ برای ۲۰ دقیقه قرار دهید.
۳. اکنون نمونه را برای ۲۰ دقیقه در HMDS ۱۰۰ درصد قرار دهید و این مرحله را تکرار کنید.
۴. هنگامی که نمونه در محلول HMDS ۱۰۰ درصد غوطه‌ور می‌شود در حالی که محلول روی نمونه را کامل پوشانده است، به مدت یک شب در زیر هود قرار می‌گیرد.

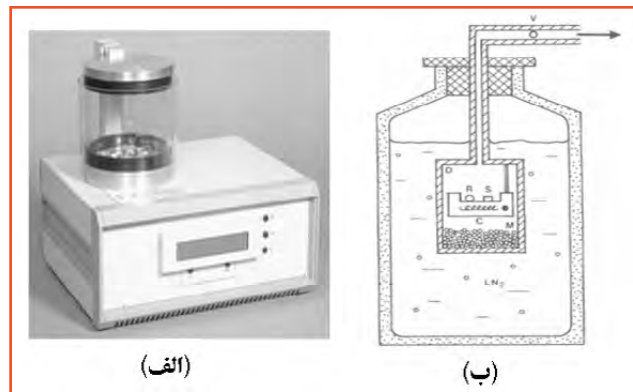
۵. تمامی مراحل HMDS نیاز دارند که در زیر هود فیوم انجام شوند و وسایل حفاظت فردی لازم پوشیده شود چون HMDS بسیار سمی است.

۶. HMDS تبخیر خواهد شد و نمونه برای پوشش دهی و تصویربرداری آماده است.

به‌عنوان نکته ایمنی توجه داشته باشید که بخار HMDS نباید تنفس شود و هر محلول مخلوط شده با اتانول نباید در یک بطری بسته شده ذخیره شود چون می‌تواند فشار بخار بسازد و باعث انفجار شود.

به‌طور خلاصه، خشک کن نقطه بحرانی دارای فرآیندی زمان‌گیر و با تکرارپذیری پایین نمونه بود، در حالی که روش خشک کردن HMDS همان‌طور که گفته شد ثابت کرد که می‌تواند جایگزینی مقرون‌بصرفه برای این روش باشد [۳۳]. قابلیت HMDS و TMS به‌عنوان یک حلال برای آخرین مرحله در آگیری نمونه‌های زیستی برای میکروسکوپ الکترونی روبشی امتحان شده بود. برای هر دو روش‌های خشک کردن HMDS و TMS ابتدا باید تثبیت نمونه و آگیری انجام شود. پس از مرحله نهایی آگیری، عامل آگیری با عامل شیمیایی خشک کردن جایگزین می‌شود و در نهایت HMDS و TMS در دمای اتاق تبخیر می‌شوند.

به تدریج در یک بازه ۶ ساعته یا بیشتر گرم می‌شود و هنگامی که دمای جانمونه‌ای و نمونه کمی بالاتر از شرایط محیطی قرار بگیرد، بخار موجود در محفظه می‌تواند تخلیه شود. جداسازی بخار، پرهزینه‌ترین بخش فرآیند است. عملی کردن روش خشک کن انجمادی متکی بر این مرحله خلاء است. پمپ خلاء علاوه بر این که بخار حلال منجمد را از محیط خارج می‌کند، موجب پایین نگه داشته شدن فشار در اتاقک خلاء در زیر فشار اتمسفری می‌شود. حذف گازهای غیرقابل میعان، مقاومت در مقابل حرکت بخار آب به داخل کندانسور را کاهش می‌دهد. چون این گازها، موجب کاهش راندمان خشک کن انجمادی می‌شود، پمپ خلاء به کار رفته باید قادر به کاهش فشار اتاقک خلاء تا حداقل ۰/۵ mbar، باشد [۱]. در شکل (۵) تصویر دستگاه خشک کن سرمایشی آورده شده‌است.



شکل (۵): (الف) نمایی از محفظه یک خشک کن سرمایشی خنک شده با نیتروژن مایع، (V): تخلیه، (D): محفظه خشک کننده، (S): نمونه یخ زده شده، (M): الک مولکولی، (LN<sub>2</sub>) نیتروژن مایع، (ب) تصویری کلی از دستگاه خشک کن سرمایشی [۱].

### معایب خشک کن سرمایشی

اگرچه به‌طور کلی خشک کن سرمایشی روشی بی‌نظیر برای حذف مایع از نمونه‌های زیستی، مرطوب و خیس مطرح می‌شود، اما آسیب نمونه و آرتیفکت می‌تواند اتفاق بیفتد. آسیب معمولاً در طی فرآیندهایی قبل از خشک شدن اتفاق می‌افتد. تثبیت شیمیایی ناقص یا ناکافی، شکست برای حذف محلول و اجزای سطح ذرات و سرد کردن ضعیف رطوبت نمونه فهرستی از مشکلات را ایجاد می‌کند. آسیب و آرتیفکت‌های ناشی شده از خشک کن سرمایشی می‌تواند در سه سطح آرتیفکت مولکولی، آرتیفکت ساختاری و در نهایت، آرتیفکت تحلیلی مطرح شود [۱].

### ■ عامل‌های خشک کننده شیمیایی

عامل‌های خشک کننده شیمیایی به‌منظور حذف نیاز به سرمایه‌گذاری مالی برای دستگاه‌های CPD یا FD و پیچیدگی‌های آن‌ها پیشنهاد شده‌است. تصاویر منتشر شده از نمونه‌های آماده شده با HMDS و TMS نقش موثر هر دو عامل شیمیایی را به‌عنوان محلول خشک کننده نشان می‌دهد [۱۳ و ۳۱]. این عامل‌ها به نوبه خود بدون فشار آوردن نیروی‌های کشش سطحی



## نصب نمونه‌های زیستی

نمونه‌ها باید بر نگهدارنده‌هایی نصب شوند که مخصوص دستگاه SEM است. بیشتر پایه‌های نمونه از جنس برنج یا آلومینیوم هستند، هر چند برنج از آلومینیوم گران‌تر است و هیچ مزیت بیشتری ندارد. نمونه‌ها یا روکش‌هایی با مواد پایدار ممکن است به پایه‌هایی با قلم نقره کلوییدی، چسب نقره کلوییدی، قلم کربن کلوییدی، چسب کربن یا چسب دوطرفه متصل شوند. اگر چسب دوطرفه نارسا استفاده شود، برخی از قلم‌های رسانا یا چسب‌های رسانا باید بین پایه و سطح نمونه اتصال برقرار کنند. در مورد پوشش‌ها که نارسا هستند هم باید به همان صورت عمل شود. این چسب‌ها و قلم‌های رسانا باید قبل از اینکه داخل محفظه SEM با خلاء بالا قرار بگیرند کاملاً خشک شوند، در غیر این صورت از ایجاد خلاء مناسب جلوگیری خواهند کرد [۱۳].

## پوشش کندوپاش و هدایت سطح

دو هدف اولیه برای پوشش دادن نمونه وجود دارد:

۱. به منظور رسانای الکتریکی ساختن نمونه‌ها بطوری که الکترون‌های اضافه‌ای که با استفاده از اتم‌های نمونه به دام افتاده‌اند بتوانند به زمین منتقل شوند.
  ۲. ایجاد کنتراست به منظور قابل مشاهده کردن آن‌ها در میکروسکوپ الکترونی.
- همان‌طور که قبلاً ذکر شد، به‌طور کلی بافت‌های زیستی عایق‌های خوبی هستند و منجر به آرتیفکت‌های تصویربرداری ناشی از شارژ در SEM می‌شود. هنگامی که نمونه‌ها خشک شوند، باید بر پایه‌های نمونه نصب شده، پوشش داده و با بیشترین سرعت ممکن بررسی شوند. اگر نمونه‌ها نیاز به ذخیره شدن دارند، باید در محفظه‌هایی برای به حداقل رساندن هیدراتاسیون<sup>۲۷</sup> مجدد ناشی از رطوبت هوا قرار گیرند. به‌طور خاص، اگر نمونه پوشش داده شده از نظر هیگروپلاستی<sup>۲۸</sup> متورم شود و یک شکستگی مویی را در پوشش نازک فلزی که به منظور افزایش رسانندگی روی آن قرار گرفته، ایجاد کند در معرض کاهش کیفیت تصویر قرار می‌گیرد.
- در خلاء بالای مناسب، جریان پرتو الکترونی اولیه هیچ راهی برای رسیدن به پتانسیل زمین ندارد، بنابراین اگر جریان نمونه خالص به زمین نرسد، نتیجه اعوجاج تصویر به این علت است که نمونه یک بار منفی از باریکه را تولید می‌کند و باریکه توسط بار منفی نمونه دفع می‌شود. سوختن نمونه در نواحی تولید شارژ، می‌تواند یک معضل باشد.

به استثنای کربن، از فلزات سنگین برای پوشش‌دهی الکتریکی نمونه‌های زیستی به منظور مشاهده با استفاده از میکروسکوپ‌های TEM، STEM، SEM استفاده می‌شود. فلزات سنگین برای ایجاد هدایت الکتریکی و منبعی از الکترون‌های ثانویه برای SEM مورد

استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از لایه نازک نانومتری از فلزات سنگین اجازه عبور الکترون‌ها از سطح نمونه به زمین، بدون تاثیر قابل توجهی بر خواص سطح نمونه را می‌دهد [۱].

فراهم کردن یک لایه چگال فلزی روی نمونه‌هایی که به‌طور عمده از عناصر سبک از قبیل کربن و نیتروژن تشکیل شده‌اند، همچنین به افزایش سیگنال‌های بازگشتی از عناصر سبک نمونه کمک می‌کند و کنتراست و جزئیات بیشتری از سطح را فراهم می‌آورد. نمونه‌های زیستی معمولاً در SEM با طلا، طلا - پالادیوم یا پلاتین پوشش داده می‌شوند چون اندازه دانه ظریف برای SEM معمولی مورد نیاز است. هنگام تفسیر تصاویر با قدرت تفکیک بالای پوشش داده شده توسط فلزات، سه مورد در نظر گرفته شده‌است:

۱. ضخامت پوشش فلزی؛

۲. یکنواختی پوشش فلزی؛

۳. دانه دانه بودن ذرات پوشش.

تمام پوشش‌ها موادی را به سطوح نمونه اضافه می‌کنند، ساختارها ضخیم‌تر و باعث می‌شود که آن‌ها در میکروسکوپ بزرگتر ظاهر شوند. اگر به اندازه کافی ضخیم باشد، پوشش زیرساختارهای نمونه پایه را مبهم خواهد کرد. بنابراین، به‌منظور کار با وضوح بالا، اندازه‌گیری فلز پوشش داده شده و استفاده از یک لایه تا اندازه ممکن نازک برای کارها، مهم است. اهمیت یکنواختی با استفاده از مواد پوشش داده شده روی نمونه با روش میکروسکوپی تغییر می‌کند. در SEM پوشش یکنواخت به منظور جلوگیری از شارژ الکتریکی ضروری است. مشکل اساسی با پوشش‌های فلزی این است که پوشش ممکن است زیر ساختار دانه‌ای خودش را داشته باشد که در تصاویر با وضوح بالا دیده خواهد شد. در برخی موارد دانه بودن پوشش می‌تواند جزئیات سطح نمونه را بهبود ببخشد، در حالی که در موارد دیگر، دانه دانه بودن پوشش ممکن است ساختارهای زیرین را نادیده بگیرد یا مصنوعات تولید کند. بنابراین، هنگامی که با وضوح بالا کار می‌کنید دانه دانه بودن پوشش در تفسیر تصاویر باید مورد توجه قرار بگیرد [۳]. برای SEM با قدرت تفکیک بالا، این مهم است که پوشش فلزی به اندازه لازم نازک و بدون دانه باشد به طوری که ساختار ماکرومولکولی که در زیر قرار گرفته مبهم نشده باشد. بنابراین، استفاده از فلزات مقاوم از قبیل تنگستن، تانتالیوم و نایبویوم ارتقاء داده شد، زیرا آن‌ها پوشش‌هایی را تولید می‌کنند که بسیار ریز دانه و تقریباً بدون دانه هستند. این اجازه می‌دهد، که فلزات در لایه‌های نازک پیوسته (۲-۵ nm) که از لحاظ الکتریکی رسانا هستند و تعداد کافی الکترون ثانویه برای میکروسکوپ الکترونی تولید می‌کنند، رسوب داده شود [۳۵، ۳۴، ۱۸].

به‌طور خلاصه، پوشش‌های رسانا سیگنال‌های الکترون ثانویه (و در نتیجه کنتراست) را افزایش می‌دهند. عناصر با عدد اتمی بالاتر نسبت به عناصری که عدد اتمی کمتری دارند (مواد زیستی) دارای بازده بیشتری از الکترون‌های ثانویه هستند [۵].

برای میکروسکوپ الکترونی روبشی هر مرحله مورد نیاز در آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای تصویربرداری می‌تواند ساختار نمونه را تغییر داده و ساختارهای جدید نامطلوبی مانند چروکیدگی و آرتیفکت را ایجاد کند. از این رو باید روش‌های فنی به‌منظور آماده‌سازی این نوع نمونه‌ها مورد توجه قرار گیرد. انجام مراحل آماده‌سازی با توجه به نوع بافت و ساختار برای هر نمونه در کلیات مانند تثبیت، آبگیری و خشک کردن یکسان اما در جزییات مراحل مانند نوع ماده تثبیت‌کننده، درصد‌های مختلف الکل و نوع الکل (اتانول و متانول) و طریقه خشک کردن (نوع دستگاه یا ماده) متفاوت است که از روی دستورالعمل‌های موجود یا برای نمونه‌های جدید به‌عنوان یک کار تجربی نو قابل دسترسی است.

## پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد فیزیک، دانشگاه بوعلی سینای همدان
۲. کارشناس فیزیک، دانشگاه صنعتی امیرکبیر تهران
۳. کارشناس ارشد مهندسی مواد، دانشگاه فردوسی مشهد
۴. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی روبشی

5. Scanning Electron Microscope (SEM)
6. Secondary Electron
7. Backscattered Electron
8. Morphometric
9. Embedding
10. Formaldehyde (FA)
11. Glutaraldehyde (GA)
12. Osmium tetroxide (OT)
13. Light Microscope (LM)
14. Phosphat buffer
15. Phosphat buffer
16. Pierce
17. hyphae

۱۸. کنیدی، اسپور غیرجنسی و غیرمتحرک قارچ است.

19. Freez-dry
۲۰. اسمولاریته، تعداد اسمول (تعداد ذرات معلق در محلول) در یک لیتر محلول است.
۲۱. پلاسمولیز، کنش وارون آماسیدگی (باد کردن و حجیم شدن یاخته‌های گیاهی در اثر ورود آب به درون یاخته) است.
22. Critical Point Drying (CPD)
23. Freeze-Drying (FD)
24. HexaMethylDiSilazane (HMDS)
25. TetraMethylSilane (TMS)
26. Polaron Ltd
۲۷. یون‌های منفی در محلول‌های آبی توسط جاذبه یون‌ها و اتم‌های هیدروژن مولکول آب، آبپوشیده می‌شوند. این عمل «هیدراتاسیون» یا «آبپوشی یون‌ها» نامیده می‌شود.
۲۸. هیگروپلاستی یا نم‌بینی به توان یک ماده در جذب مولکول آب از فضای پیرامون و نگهداری آن گفته می‌شود.

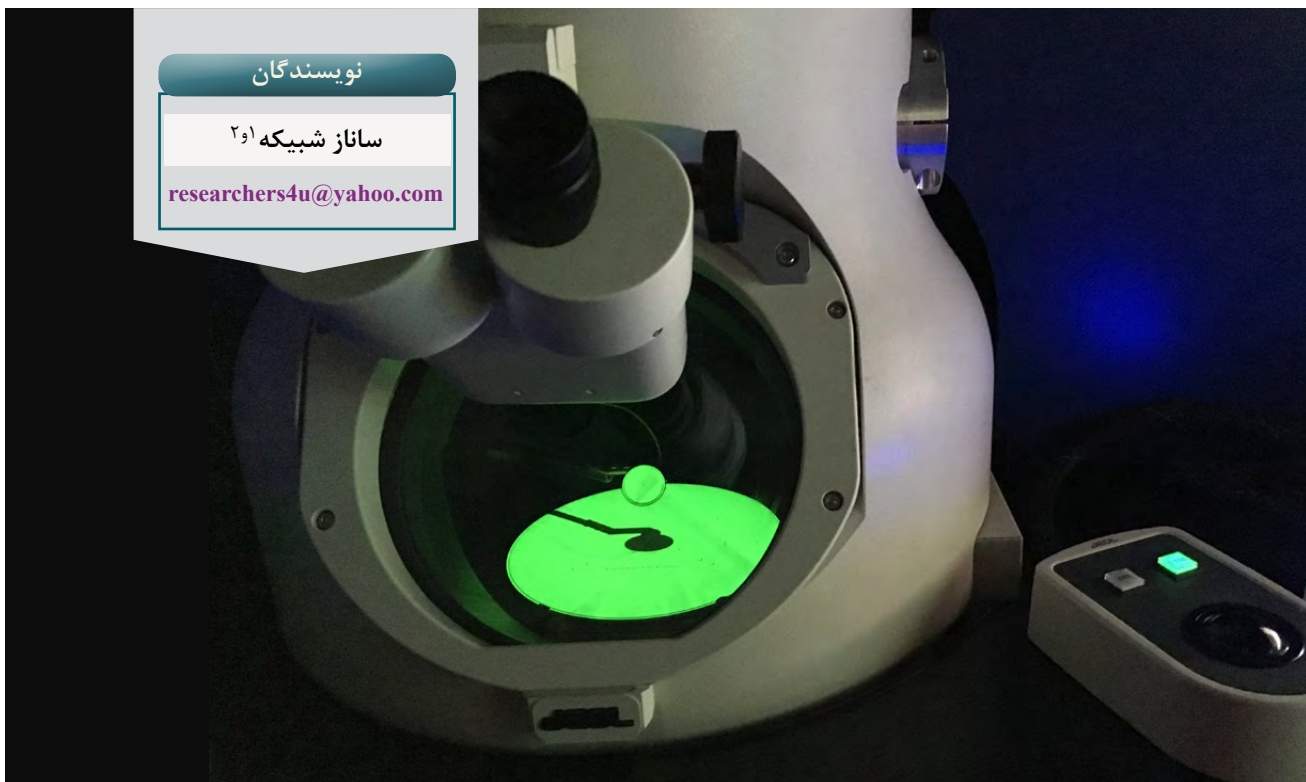
- [1] Echlin P. Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. UK: Springer; 2009.
- [2] Alberts A, Johnson J, Lewis J, Raff M, Roberts k, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5th ed. 2007.
- [3] Bell PB, Safiejko-Mrocza B. Preparing whole mounts of biological specimens for imaging macromolecular structures by light and electron microscopy. Intl J Imag Sys Tech. 1997; 8(3):225-39.
- [4] Egerton RF, Li P, Malac M. Radiation damage in the TEM and SEM. Micron. 2004; 35(6):399-409.
- [5] Mehdizadeh Kashi A, Tahermanesh K, Chaichian SH. How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). GMJ.2014; 3(2):63-80
- [6] Brunk U, Bell PB, Collins VP, Forsby N. SEM of cells in culture: Osmotic effects during fixation. SEM/IITRI. 1975; 8:379-86.
- [7] Arborgh B, Bell P, Brunk U, Collins VP. The osmotic effect of glutaraldehyde during fixation. A transmission electron microscopy, scanning electron microscopy and cytochemical study. J Ultrastruct Res. 1976; 56(3):339-50.
- [8] Anderson PJ. Purification and Quantitation of Glutaraldehyde and Its Effect on Several Enzyme Activities in Skeletal Muscle. J Histochem Cytochem. 1967; 15(11):652-61.
- [9] Torack RM. The extracellular space of rat brain following perfusion fixation with glutaraldehyde and hydroxyaldehyde. Zeitschrift für Zellforschung. 1965; 66(3):352-64.
- [10] احمدیان، شهین جزوه آموزشی آماده‌سازی نمونه‌های زیستی برای TEM، بهار ۱۳۸۵، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران.
- [11] Hayat MA. Glutaraldehyde: Role in electron microscopy. Micron and Microscopica Acta. 1986; 17(2):115-35.
- [12] Maupin-Szamier P, Pollard TD. Actin filament destruction by osmium tetroxide. J Cell Biol. 1978; 77(3):837-52.
- [13] Dykstra MJ, Reuss LE. Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting. 2nd Ed: Springer; 2003.
- [14] Dalen H, Lieberman M, LeFurgey A, Scheie P, Sommer JR. Quick-freezing of cultured cardiac cells in situ with special attention to the mitochondrial ultrastructure. J Microsc. 1992; 168(Pt3):259-73.
- [15] Dalen H, Scheie P, Nassar R, High T, Scherer B, Taylor I, Wallace NR, Sommer JR. Cryopreservation evaluated with mitochondrial and Z line ultrastructure in striated muscle. J Microsc. 1992; 165(Pt 2):239-54.
- [16] Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. CYTOCHEMISTRY AND ELECTRON MICROSCOPY: The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. J Cell Biol. 1963; 17(1):19-58.
- [17] Brunk U, Ericsson JE. The demonstration of acid phosphatase in in vitro cultured tissue cells. Studies on the significance of fixation, tonicity and permeability. In: Stoward PJ, editor. Fixation in Histochemistry: Springer US; 1973. P.121-35
- [18] Bell PB, Lindroth M, Fredriksson BA. Comparison of the effects of critical point-drying and freeze-drying on cytoskeletons and microtubules. J Microsc. 1988; 151(Pt 2):103-14.

- [19] Boyde A, Bailey E, Jones SJ, Tamarin A. Dimensional changes during specimen preparation for scanning electron microscopy. SEM/IITRI. 1977; 10:507-18.
- [20] Fazel Anvari-Yazdi A, Talaei-Khozani T, Yazdani A, Anarkoli AO, editors. Morphological and Viability Study of WJ-Stem Cells on Different Nano-Bioactive Ceramics for Bone Tissue Engineering Application. The 2nd international and the 7th joint conference of Iranian metallurgical engineering and Iranian foundry men societies; 2013; Semnan, Iran: Hamayeshnegar.
- [21] Fazel Anvari-Yazdi A, Talaei T, Yazdani A. The biocompatibility study of bio-inert and bio-active ceramics to Wharton's jelly mesenchymal stem cells. Artificial Organs. 2013; 37(7):A27-A50.
- [22] Fazel Anvari-Yazdi A, Yazdani A, Talaei T, Kalantar M. Extraction and Viability Checking of Various Carbonated Hydroxyapatite by Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell. Sci Intl. 2013; 1(5):132-8.
- [23] Moradi F, Bahktiari M, Joghataei MT, Nobakht M, Soleimani M, Hasanzadeh G, Fallah A, Zarbakhsh S, Hejazian LB, Shirmohammadi M, Maleki F. BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. J Neuro Res. 2012; 90(12):2335-48
- [24] Kan FW. Use of Peldri II as a sublimation dehydrant in place of critical-point drying in fracture-label cytochemistry and in backscattered electron imaging fracture-label. J Electron Microsc Tech. 1990; 14(1):21-31.
- [25] Kennedy JR, Williams RW, Gray JP. Use of Peldri II (a fluorocarbon solid at room temperature) as an alternative to critical point drying for biological tissues. J Electron Microsc Tech. 1989; 11(2):117-25
- [26] Hayat MA. Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy: University Park Press; 1978.
- [27] Bartlett AA, Burysten HP. A review of the physics of critical point drying SEM/IITRI. 1975; 8:305-16.
- [28] Cohen AL. A critical look at critical point drying theory, practice and artefacts. SEM/IITRI. 1977; 10:525-35.
- [29] Boyde A, Franc F, Maconnachie E. Measurements of critical point shrinkage of glutaraldehyde fixed mouse liver. Scanning. 1981; 4(2):69-82
- [30] Boyde A, MacOnnachie E. Volume changes during preparation of mouse embryonic tissue for scanning electron microscopy. Scanning. 1979; 2(3):149-63.
- [31] Forge A., Nevill G., Zajic G., Wright A. Scanning electron microscopy of the mammalian organ of Corti: assessment of preparative procedures. Scanning Microsc. 1992; 6(2):521-34
- [32] Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. J Biomed Mater Res. 1995; 29(9):1111-20.
- [33] Kühnel T, Köveker G, Müller GH. Drying with hexamethyldisilazane--a time-saving alternative to the "critical point" method. Handchir Mikrochir Plast Chir. 1989; 21(3):164-5.
- [34] Lindroth M, Bell PB, Fredriksson BA, Liu XD. Preservation and visualization of molecular structure in detergent-extracted whole mounts of cultured cells. Microsc Res Tech. 1992; 22(2):130-50
- [35] Bell PB, Lindroth M, Fredriksson BA, Liu XD. Problems associated with the preparation of whole mounts of cytoskeletons for high resolution electron microscopy. Scanning Microsc Suppl. 1989; 3:117-34

نویسندگان

ساناز شبیکه<sup>۱</sup> و<sup>۲</sup>

researchers4u@yahoo.com



## معرفی ساختار و کاربردهای میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی

واژه‌های کلیدی

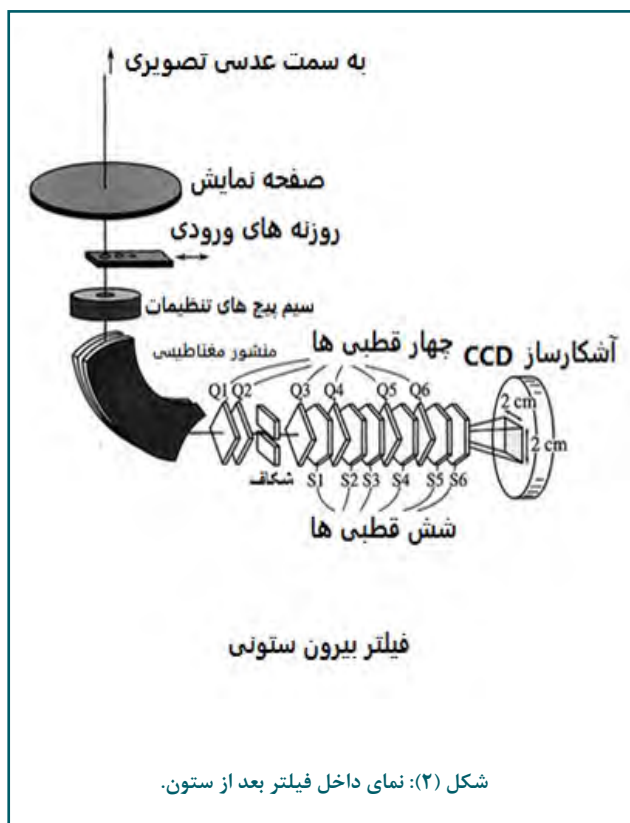
میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی، طیف‌سنجی افت انرژی الکترون، فیلتر درون ستونی، فیلتر بعد از ستون.

### چکیده

در مقاله پیشین با عنوان «معرفی اصول پایه‌ای میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی» منتشر شده در شماره ۲۴ - زمستان ۹۷ فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران، پیش زمینه‌ای جامع درباره اصول بنیادین چگونگی تشکیل تصویر نهایی در میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی<sup>۳</sup> در اختیار خواننده محترم قرار گرفته است. در این مقاله که هم اکنون مورد مطالعه قرار خواهد گرفت، ساختار دو فیلتر انرژی تجاری پر کاربرد با عناوین: فیلترهای درون ستونی و فیلترهای بعد از ستون که به ترتیب درون و زیر میکروسکوپ الکترونی عبوری مستقر بوده به‌طور تفصیلی بررسی شده‌است. کاربران حوزه‌های مختلف باید به‌منظور برطرف نمودن نیازمندی‌های خود، آشنایی مقدماتی با این دستگاه ارزشمند را داشته باشند. این امر به کاربران کمک می‌کند تا تشخیص دهند چه زمانی برای دستیابی به نتایجی خاص و مطلوب در حوزه‌های مشخص از دستگاه ارزشمند EFTEM استفاده کنند. لذا به‌منظور درک بهتر موارد استفاده خاص و مزایای میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی، کاربرد این دستگاه در حوزه‌های مختلفی نظیر: زیست‌شناسی، پلیمر، نیمه هادی‌ها و نانولوله‌های کربنی شرح داده شده‌است.

افزودن فیلترهای انرژی یا طیف‌سنج‌های مدرن به میکروسکوپ الکترونی عبوری مرسوم<sup>۴</sup> امکانات و فرصت‌های جدیدی برای محققان و دانشمندان فراهم آورده تا تحقیقات نظری خود را در عمل مورد آزمایش قرار دهند. پیش از پیدایش میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی، رویه معمول برای تحلیل طیف‌سنجی افت انرژی الکترون<sup>۵</sup> به این صورت بود که تنها یک طیف از منطقه‌ای منتخب از نمونه با CTEM ثبت می‌شد. پس از بکارگیری تجاری EFTEM، تصویربرداری از تمام اطلاعات موجود در طیف مورد نظر امکان‌پذیر شد. علاوه بر قابلیت فوق، در صورت انتخاب بخش معینی از طیف مورد نظر می‌توان تصاویری محتوای اطلاعات مختلف را بدست آورد. مجهز ساختن میکروسکوپ الکترونی عبوری به فیلترهای انرژی مطلوب منجر می‌شود کاربران حوزه‌های مختلف قادر باشند به اطلاعات تکمیلی مربوط به نمونه‌های به اندازه کافی نازک خود دسترسی پیدا کنند. قابلیت انتخاب هر ویژگی طیفی از یک طیف افت انرژی معین روش‌های تصویربرداری جدیدی را برای کاربران فراهم می‌آورد. یکی از روش‌ها، روش تصویربرداری افت صفر<sup>۶</sup> نام دارد. در این روش به دلیل حذف پراکندگی غیرالاستیک، کنتراست تصاویر TEM و الگوهای پراش به‌طور فوق‌العاده‌ای بهبود یافته است. روش دیگر تصویربرداری TEM با انرژی فیلتر شده نام دارد که به‌منظور تنظیم کنتراست نمونه‌های ناهمگن به کار برده می‌شود. یکی دیگر از روش‌ها، نگاشت ضخامت نسبی بوده که برای ثبت ضخامت نمونه مورد نظر بر حسب واحد متوسط فاصله آزاد غیرالاستیکی استفاده می‌شود. لازم به ذکر است، روش نگاشت عنصری برای نمایش توزیع دو بعدی عنصری خاص کاربرد دارد. همچنین روش نگاشت شیمیایی نیز به‌منظور تصویربرداری از ساختار الکترونیکی محلی نمونه تحت بررسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم‌اکنون برای دستیابی به روش‌های تصویربرداری فوق<sup>۲</sup> نوع فیلتر انرژی به‌صورت تجاری در بازار موجود است: فیلتر درون ستونی (معروف به امگا (Ω)) و فیلتر بعد از ستون (معروف به فیلتر تصویربرداری گاتان<sup>۷</sup>). فیلترهای درون ستونی همان‌طور که از نامشان نیز مشخص است درون ستون میکروسکوپ الکترونی عبوری بین عدسی‌های شیئی (یا تصویری) و میانی قرار گرفته‌اند. در این صورت، آشکارساز دوربین<sup>۸</sup> تنها الکترون‌هایی را دریافت می‌کند که از فیلتر درون ستونی عبور کند. بنابراین، تمام تصاویر و الگوهای پراش شامل الکترون‌هایی با انرژی معین هستند. البته می‌توان برای ثبت تصاویر TEM معمولی فیلتر مذکور را خاموش نمود. فیلترهای بعد از ستون در قسمت زیرین صفحه نمایش TEM مستقر شده‌اند که با توجه به موقعیت می‌توان به راحتی آنها را به‌از فرآیند تصویربرداری وارد/خارج نمود. درون فیلترهای نامبرده شکافی تعبیه شده که نواری از انرژی‌های (افت‌های انرژی) معین را از خود عبور می‌دهد. در فیلترهای امروزی به جای جابجایی شکاف مذکور یا تغییر جریان آهنربا به‌منظور انتخاب افت‌های انرژی مختلف، ولتاژ شتاب دهنده توسط افت انرژی مورد نظر افزایش پیدا می‌کند. در این شرایط الکترون‌ها پس از عبور از نمونه مربوطه همیشه دربر گیرنده انرژی یکسان هستند. در این صورت، جابجایی رنگی یا تغییر در بزرگنمایی رخ نمی‌دهد. همچنین دیگر نیازی به تغییر فرآیند تحریک عدسی‌های تصویربرداری یا چندقطبی‌های فیلتر تصویربرداری، که در گذشته امری چالش برانگیز بوده نیز نیست. به‌منظور آشنا ساختن خوانندگان محترم فعال در حوزه‌های مختلف با میکروسکوپ EFTEM مثال‌هایی کاربردی در این مقاله ارائه شده است. ساختار مقاله به شرح ذیل است:

در بخش (۱)، انواع فیلترهای انرژی تجاری بکار برده شده در میکروسکوپ EFTEM بررسی شده است. در بخش (۲)، با استفاده از مثال‌هایی ساده کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه زیست‌شناسی شرح داده شده است. در بخش (۳)، کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه پلیمر توضیح داده شده است. در بخش (۴)، کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه نیمه هادی‌ها ارائه شده است. کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه نانولوله‌های کربنی نیز در بخش (۵) نمایش داده شده است. نتیجه‌گیری مقاله در بخش (۶) درج شده است.



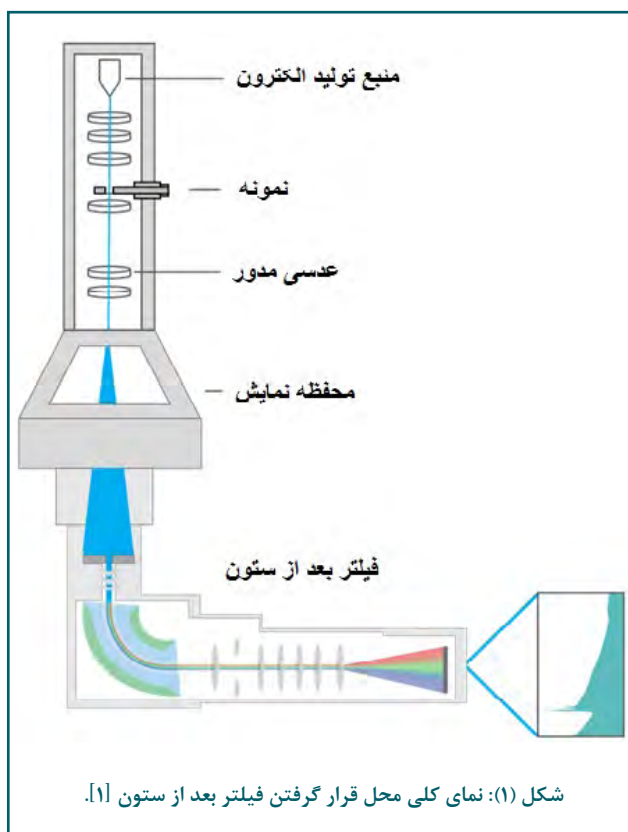
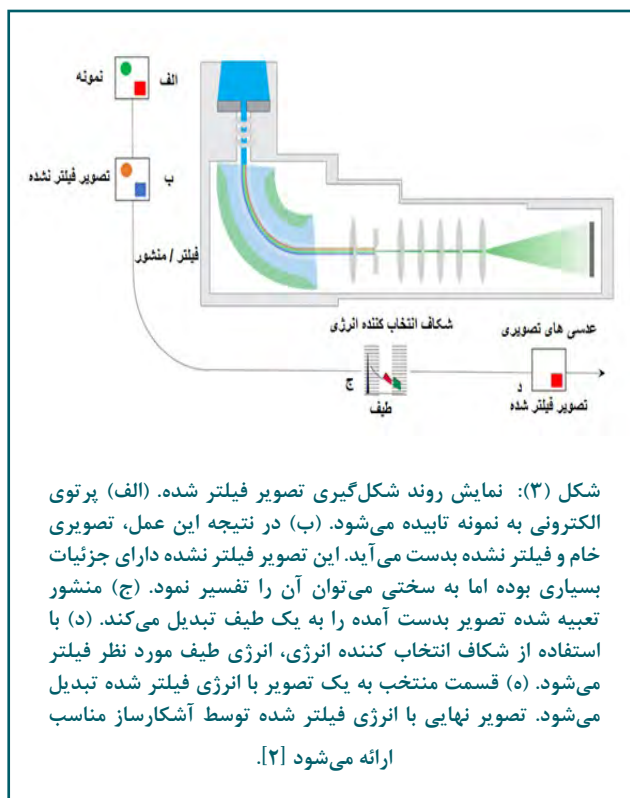
## ● انواع فیلترهای انرژی تجاری بکار برده شده در میکروسکوپ EFTEM

به طور کلی دو دسته فیلتر انرژی برای میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی به طور تجاری مورد استفاده قرار می گیرند:

### ▶ فیلترهای بعد از ستون<sup>۹</sup>

فیلترهای بعد از ستون در واقع یک منشور بوده که زیر محفظه نمایش میکروسکوپ الکترونی عبوری قرار می گیرد و به طور معمول در انتهای این منشور یک آشکارساز تعبیه می شود (شکل (۱)). همان طور که در شکل (۲) مشاهده می شود، میان منشور و آشکارساز یک شکاف<sup>۱۰</sup> انتخاب کننده انرژی قابل تنظیم قرار می گیرد.

الکترون های پراکنده نشده و پراکنده شده به صورت الاستیک با انرژی یکسان منتشر می شوند. آنها به منظور تشکیل تصویر مرسوم میکروسکوپ الکترونی عبوری از ستون عبور کرده، توسط منشور خم و از میان شکاف انرژی رد شده و به آشکارساز می رسند. در این حالت الکترون های پراکنده شده به صورت غیرالاستیک که انرژی کمتری دارند از ستون عبور کرده و توسط منشور، بیشتر خمیده می شوند و به جای عبور از شکاف، انرژی به بدنه این قسمت برخورد کرده، جذب شده و از تصویر نهایی حذف می شوند. روند شکل گیری تصویر نهایی با استفاده از این نوع فیلترها در شکل (۳) نمایش داده شده است.



مزیت های این نوع فیلترها عبارتند از:

- قابلیت نصب و تطبیق آنها در بیشتر ساختارهای TEM موجود؛
- عدم نیاز به باز کردن ستون حساس TEM؛
- قابلیت تصویربرداری و ثبت الگوهای پراش بدون بکارگیری فیلتر.





بدست آمده است:

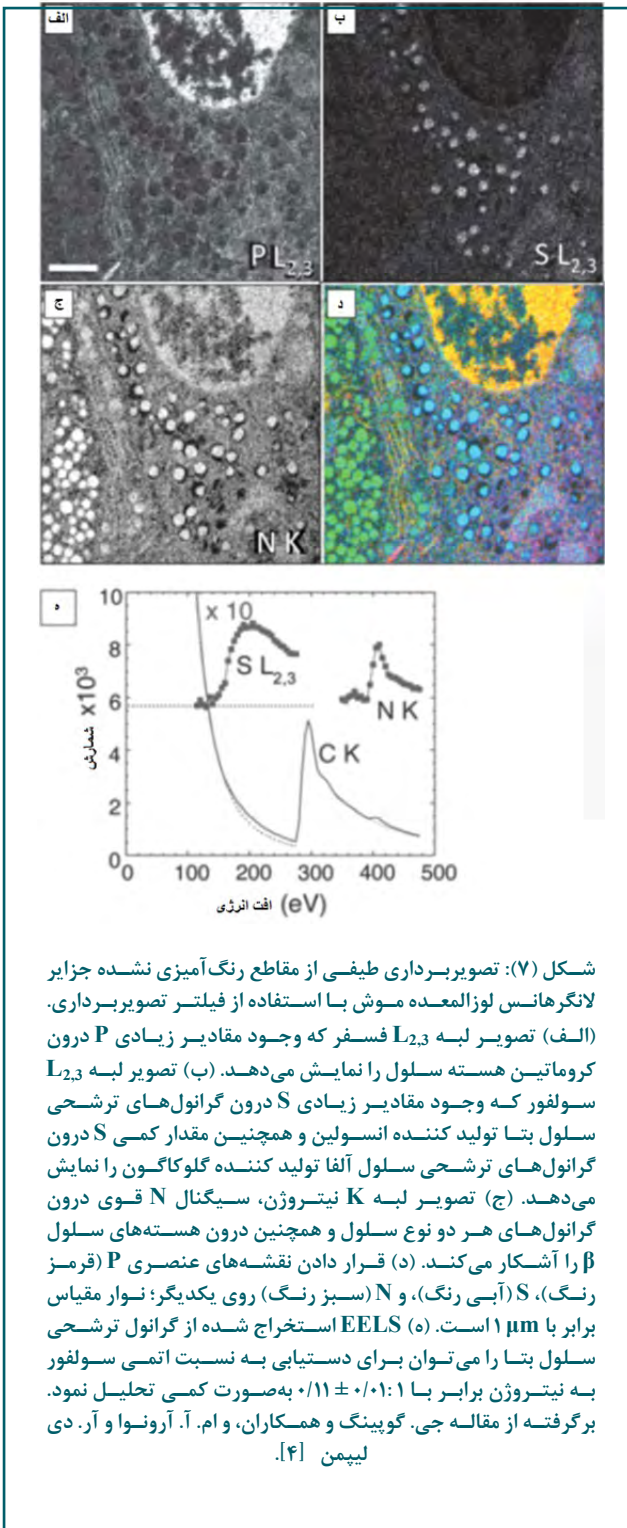
- تفکیک پذیری مکانی بهتر؛
- ارائه حساسیت بالاتر؛
- وجود قابلیت تشخیص عناصر سبک؛
- قابلیت تعیین حالات اکسایش یون‌ها.

اخیراً حساسیت بالای EELS درون میکروسکوپ STEM از طریق آشکارسازی تک اتم‌هایی از عناصر نظیر: آهن و کلسیم با نسبت‌های قابل قبول سیگنال به نویز اثبات شده است (لیپمن، ۲۰۰۳). اگر نمونه زیستی برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی به اندازه کافی به صورت نازک آماده شود، آنگاه آشکارسازی یک یا چند اتم درون نمونه مذکور امکان پذیر خواهد بود (شکل‌های (۶)-(۸)). تعیین کمیت تصاویر توزیع عنصری EFTEM نیز همانند تحلیل اشعه X از طریق تبدیل نقشه‌های عنصری به نقشه‌های غلظت در نمونه‌های زیستی و بلورین امکان پذیر است (هافر و همکاران، ۱۹۹۷). تهیه تصویر با استفاده از روش فیلتر کردن انرژی در مقایسه با میکروسکوپ الکترونی عبوری مرسوم در انرژی با افت صفر (انگرت و همکاران، ۲۰۰۰) یا قبل از لبه جذب معین کربن برای نمایش ریزساختار نمونه‌های زیستی دارای مزایای قابل توجهی است. حصول نتایج موفقیت آمیز از EFTEM در زمینه تهیه تصویر و تحلیل عنصری نمونه‌های زیستی به اجرای صحیح فرآیندهای فیکساسیون و آماده‌سازی نمونه بستگی دارد. در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های کرایو برای فیکس کردن و آماده‌سازی نمونه‌های زیستی باعث بالا رفتن قابلیت اطمینان نتایج به دست آمده شده است. به خصوص روش فیکس کردن از طریق انجماد با اعمال فشار زیاد<sup>۱۶</sup> یکی از پر کاربردترین ابزار برای EFTEM محسوب می‌شود. در صورت استفاده از روش فیلتر کردن انرژی، تصویر بدست آمده در محدوده قبل از لبه جذب معین کربن علاوه بر کنتراست بالا دربر گیرنده اطلاعاتی در مورد ماهیت زیست شیمیایی ساختارها نیز بوده و همچنین می‌توان در آنها اثرات رنگ آمیزی با فلزات سنگین که به احتمال زیاد ساختارهای حساس را پوشانده به طور کامل حذف نمود. در بیشتر موارد از روش رنگ آمیزی با فلزهای سنگین به منظور بالا بردن کنتراست نمونه‌های زیستی متشکل از عناصر سبک در هنگام تصویربرداری استفاده می‌شود. به همین دلیل، ظاهر ساختار مورد بررسی درون میکروسکوپ الکترونی عبوری با توجه به غلظت، ماهیت، و مدت زمان استفاده از فلزهای سنگین متغیر خواهد بود. از طرف دیگر، تجمع فلزهای سنگین مذکور در یک مکان منجر به پوشیده شدن سلول‌ها و کاهش شانس دستیابی به اطلاعات با تفکیک پذیری بالا می‌شود (کارل مالمت و همکاران، ۱۹۸۵). همچنین در روش برچسب گذاری با نانوذرات طلا رنگ آمیزی ثانویه با فلزات سنگین مانع از

به منظور عبور الکترون‌ها است. در صورت وجود منبع KV ۲۰۰، بیشترین ضخامت‌ها که الکترون‌ها قادرند بدون پراکندگی غیرالاستیک از آن عبور کنند برابر با ۱۰۰ nm است.

۲. نمونه باید در محیط‌های خاص (نظیر: خلاء) پایدار باشد. معمولاً منطقه اطراف نمونه در شرایط خلاء بوده، البته در برخی از TEMها یا نگهدارنده‌های نمونه ویژه فشارهای بیشتری در مجاورت نمونه مذکور اعمال می‌شود که این امر در نهایت منجر به پایین آمدن قدرت تفکیک پذیری تصویر می‌شود. بسیاری از مواد قادر به تحمل شرایط خلاء هستند. البته مواد دارای آب یا ماده فرار درون محیط خلاء تبخیر می‌شوند. به منظور غلبه بر این چالش می‌توان یک سری مواد شیمیایی را به گونه‌ای جایگزین آب درون نمونه کرد که ریزساختار اولیه آن تغییر نکند. یک روش دیگر، منجمد کردن نمونه و نگاه داشتن آن در دمای انجماد در طول مراحل تصویربرداری است.

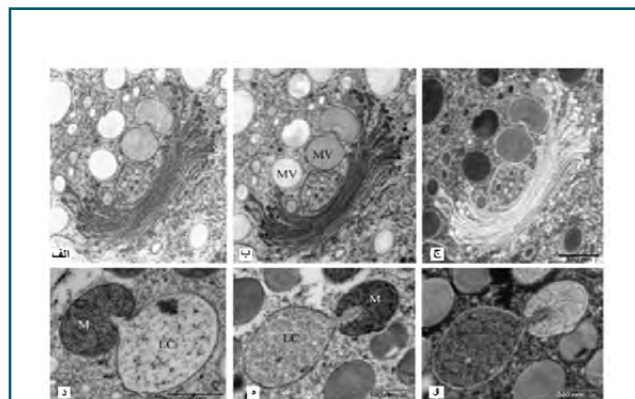
در صورت انتخاب روش دوم، عملیات انجماد باید بسیار سریع انجام شود. در غیر این صورت بلورهای یخی بزرگی درون نمونه ایجاد و ریزساختار آن را نابود می‌کنند. میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری ویژه ارائه شده برای تحقق این روش با عنوان میکروسکوپ الکترونی عبوری کرایو<sup>۱۲</sup> شناخته شده‌اند. در ادامه، کاربردهای میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در برخی از حوزه‌ها بررسی می‌شود. همان‌طور که در بخش‌های پیشین نیز ذکر شد، در میکروسکوپ الکترونی عبوری مرسوم (CTEM) الکترون‌های پراکنده شده به صورت الاستیک و غیرالاستیک از یکدیگر تمیز داده نمی‌شوند. الکترون‌هایی با مقدار معینی افت انرژی در اثر برخورد با نمونه (الکترون‌هایی با پراکندگی غیرالاستیک) توسط طیف‌سنج آشکار شده و از آنها برای ایجاد تصویر یا تحلیل فرآیندهای توزیع عناصر استفاده می‌شود. مقدار انرژی تلف شده الکترون‌ها در اثر برخورد با اتم‌های نمونه و همچنین لبه‌های یونیزاسیون پوسته هسته تعیین کننده نوع عنصر است (ریمر، ۱۹۹۵). طیف‌های افت انرژی الکترون (EELS) از طریق جداسازی الکترون‌هایی با مقدار معینی از افت با استفاده از طیف‌سنج شکل می‌گیرند. از طریق بکارگیری روزنه‌ای که تنها پهنای باند معینی از انرژی را عبور داده می‌توان قسمت‌هایی از طیف بدست آمده را برای شکل‌دهی تصاویر طیف نگاری الکترونی<sup>۱۳</sup> و نمایش فرآیندهای توزیع عناصر استفاده نمود. به دلیل اینکه لبه جذب مشخصه هر عنصر روی پس زمینه نامشخص به خوبی قابل تشخیص نبوده، لذا برای دستیابی به تصویر توزیع شبکه‌ای عنصری معین، پس زمینه باید به طور دقیق حذف شود. میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه بررسی نمونه‌های زیستی از روش تحلیل تفکیک انرژی اشعه X<sup>۱۴</sup> که به طور معمول درون TEMها و میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری-رویشی<sup>۱۵</sup> مورد استفاده قرار گرفته برتر است. این برتری به دلایل اثبات شده ذیل



### ● کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه پلیمر

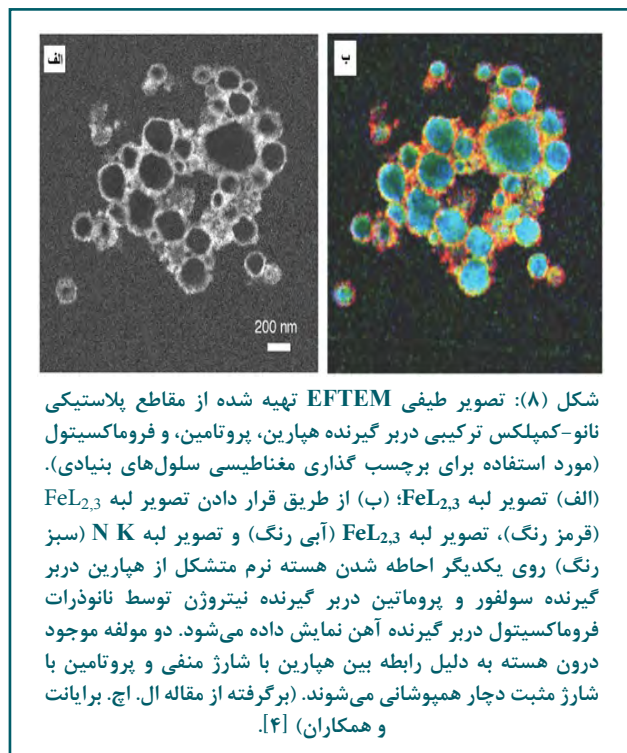
با وجود اینکه به‌طور مرتب از پلیمرها به‌عنوان مولفه‌هایی در آمیزه‌ها و آلیاژهای پلیمری نظیر پلی‌آمید<sup>۲۰</sup> و پلی‌متیل متاکریلات<sup>۲۱</sup> استفاده شده اما تحقیقات کمتری در زمینه تصویربرداری از توزیع عنصری آنها انجام پذیرفته است. احتمالاً یکی از دلایل ذیل نظیر: حساسیت پایین N و O درون EELS

آشکارسازی و تعیین کمیت مارکرها شده یا در بهترین شرایط کیفیت این فرآیند را به شدت کاهش می‌دهد. البته در صورت حذف رنگ‌آمیزی ثانویه، بررسی همپوشانی آنتی‌ژن مورد نظر نسبت به جزئیات ساختاری دشوار می‌شود. حتی زمان بکارگیری روش‌های پیشرفته فیکس کردن کرایو (نظیر: جایگزینی تدریجی فرآیند انجماد و HPF) و همچنین ظاهر ساختار نمونه‌ها به حضور فلزهای سنگین مورد استفاده در رنگ‌آمیزی ثانویه بستگی داشته و همین امر قابلیت اطمینان نتایج را کاهش می‌دهد. دو حالت برای فیلتر کردن انرژی در میکروسکوپ الکترونی عبوری و تهیه تصویر از نمونه‌های زیستی وجود دارد. حالت میدان روشن الاستیکی فیلتر شده مبنی بر انرژی با افت صفر (ریمر، ۱۹۹۵) که به منظور ارتقای کنتراست تصویر شکاف انتخاب کننده انرژی به گونه‌ای تنظیم شده که الکترون‌های پراکنده شده به صورت غیرالاستیک حذف شوند. حالت دیگر، کنتراست مبتنی بر عنصر نام داشته که اطلاعات مربوط به ترکیب زیست شیمیایی ساختار مورد بررسی را نیز ارائه می‌دهد. در صورت بکارگیری نمونه‌های زیستی این حالت هنگامی قابل دستیابی بوده که کربن را به‌عنوان عنصر اصلی برای تصویربرداری در نظر گرفت [۳].

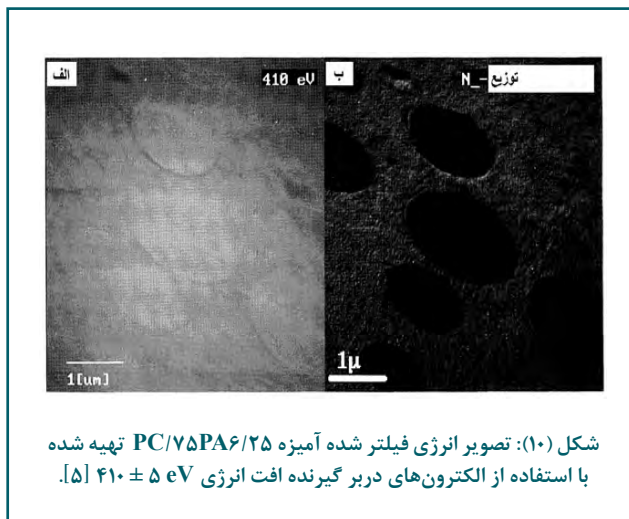
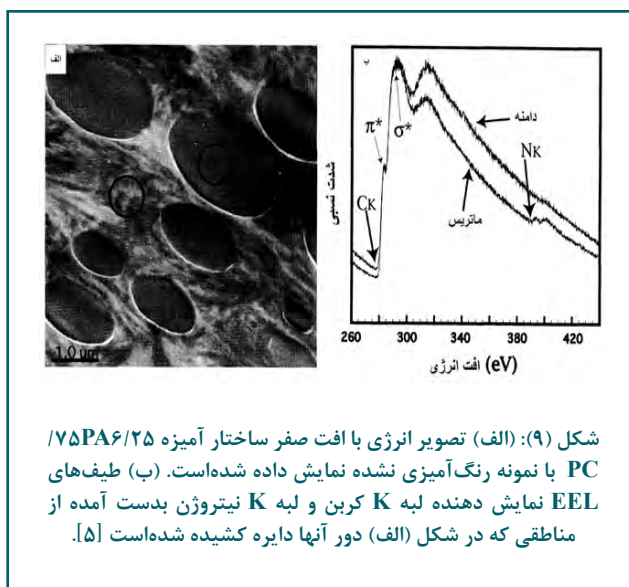


شکل (۶): تهیه تصویر EFTEM از مقاطع  $50 \text{ nm}$  نانومتری رنگ آمیزی نشده میکراستریاس جلبک سبز. (الف-ج) نمایش دیکتیوزوم پس از اعمال روش‌های فیکس کردن انجماد با اعمال فشار زیاد و جایگزینی تدریجی فرآیند انجماد. (الف) فیکس شده از طریق مواد شیمیایی و فیلتر شده مبتنی بر انرژی با افت صفر. (ب و ج) فیلتر شده براساس ناحیه زیر لبه جذب معین کربن (افت انرژی  $(\pm 10 \text{ eV}) 250 \text{ eV}$ ). کنتراست و اطلاعات ساختاری این تصاویر در مقایسه با تصویر (الف) مطلوب‌تر است. کیسه‌های لعاب<sup>۱۷</sup> در درجات مختلفی پر شده‌اند. (ب) تصویر معکوس شده از طریق روش پردازش. (ج) تصویر فیلتر شده اصلی با کنتراست «منفی» (برگرفته از مقاله لوتز میندل و آچینگر (۲۰۰۴)). (د-و) نمایش تعامل‌های میان اندامک‌ها در روش انجماد با اعمال فشار زیاد و سلول‌های فیکس شده از طریق روش جایگزینی تدریجی فرآیند انجماد. تصاویر مورد نظر براساس ناحیه زیر لبه جذب معین کربن (افت انرژی  $(\pm 10 \text{ eV}) 250 \text{ eV}$ ) فیلتر شده‌اند. محفظه‌های لیتیک<sup>۱۸</sup> برآمدگی‌هایی را به درون میتوکندری<sup>۱۹</sup> تشکیل می‌دهند. تصاویر (د) و (ه) با استفاده از پردازش معکوس شده‌اند. تصویر (و) نیز تصویر فیلتر شده اصلی است (برگرفته از مقاله آچینگر و لوتز میندل (۲۰۰۵)) [۳].

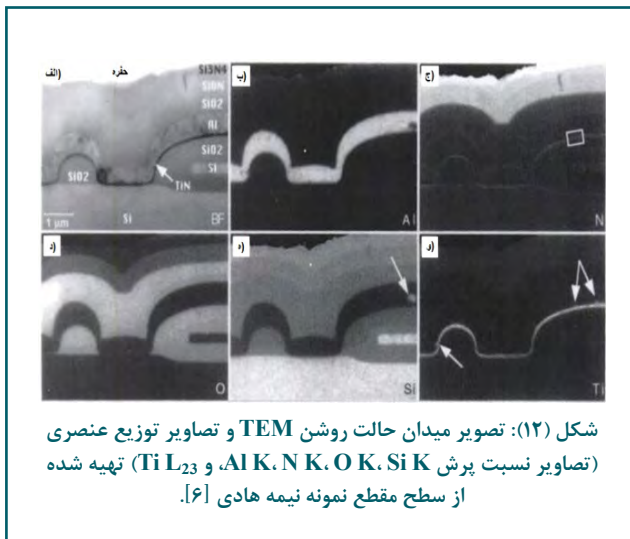
M حاصل شده از محدوده گسترده‌ای از عناصر دربر گیرنده عدد اتمی بالاتر می‌شود. بیشتر مواد نرم نظیر پلیمرها دارای غلظت بالایی از کربن، نیتروژن، اکسیژن و هیدروژن بوده و ساختار الکترونیکی مربوط به ترکیبات مولکولی درشت این نوع عناصر منجر به ایجاد ساختار ریز متمایزی در لبه‌های یونیزاسیون می‌شود (شکل‌های (۹) - (۱۱)). در بیشتر مواقع فازهای پلیمری مختلف را می‌توان براساس ترکیبات نسبی آنها از یکدیگر تشخیص داد. مشخصه حالات پیوندی ترکیبات چندگانه (به‌خصوص) کربن ساختار ریز بهینه‌ای از ظرفیت-الکترون درون مواد نرم ارائه می‌دهد. طیف‌های افت پایین (محدوده نمونه‌برداری از افت‌های انرژی بین چند eV تا تقریباً ۵۰ eV که ناحیه ظهور حالات ظرفیت در نظر گرفته شده) نوع دیگری از روش تشخیص فازهای پلیمری براساس خواص شیمیایی نسبی نمونه‌های پلیمری را فراهم می‌آورند [۱۱]. در دهه اخیر محققان به‌منظور بررسی جوانب مختلف ریخت‌شناسی<sup>۲۲</sup> پلیمر چند فازی انواع متنوعی از ترکیبات، آمیزه‌ها و همبسط‌های دسته‌ای<sup>۲۳</sup> از میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی استفاده نموده‌اند.



در صورت بررسی نمونه‌ای که عنصر غالب آن کربن بوده، از بین رفتن عناصر سبک به دلیل آسیب تابش و دشواری آماده‌سازی لایه‌های نازک به‌خصوص از نمونه PA (ضروری برای کاهش پراکندگی غیرالاستیک دسته‌جمعی) منجر به کاهش تمایل محققان این حوزه برای استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی شده‌است. استفاده از EFTEM برای نمونه‌های پلیمری منجر به حصول نقشه‌های توزیع عنصری و تصاویر EELS شده که آنها نیز به نوبه خود قابلیت دستیابی به منحنی‌های غلظت اکسیژن و نیتروژن در سرتاسر رابطه‌ها با تفکیک پذیری کمتر از ۱۰ nm را فراهم می‌آورند [۵]. لازم به ذکر است غالب عناصر تشکیل دهنده پلیمرهای مصنوعی همانند نمونه‌های زیستی از نوع عناصر سبک بوده که در اثر برخورد الکترون با آنها فرآیند پراکندگی الاستیک ضعیفی به وقوع می‌پیوندد. به همین دلیل تولید تصاویری با کنتراست بالا یکی از چالش‌های این حوزه است. البته پراکندگی‌های غیرالاستیک به وجود آمده در اثر برخورد الکترون با مواد نرم نسبتاً قدرتمند بوده لذا می‌توان به طیف نگاری بهینه‌ای دست یافت (اما در عوض نمونه در برابر تابش پرتو آسیب‌پذیر است). پراکندگی‌های غیرالاستیک منبع مهمی برای دستیابی به نگاشت کمی ترکیبات، خواص شیمیایی و توزیع فازها درون مواد بدون نیاز به اعمال مرحله رنگ‌آمیزی با فلزات سنگین است. در صورت تعبیه EELS درون میکروسکوپ الکترونی عبوری می‌توان افت‌های انرژی در ناحیه زیر KeV را به خوبی تحلیل کرد. این ناحیه شامل تحریک یا تهییج‌های هسته‌ای مهم پوسته K بدست آمده از کربن (۲۸۴ eV)، اکسیژن (۵۳۲ eV) و نیتروژن (۴۰۱ eV) و همچنین تحریک‌های پوسته L و پوسته

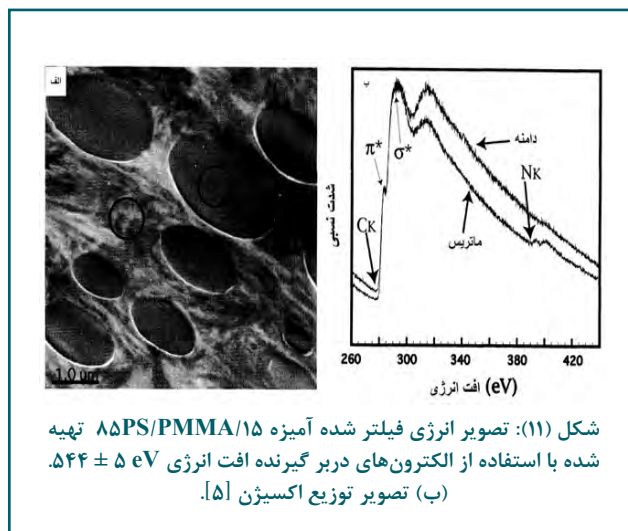


فرز یونی است. به منظور درک بهتر کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه نیمه هادی‌ها، مثالی در قسمت ذیل ارائه شده است. همان‌طور که در شکل (۱۲) مشاهده می‌شود، سطح گسترده‌ای از نمونه برای آشکارسازی سریع نواقص موجود آماده شده است [۶].



شکل (۱۲): تصویر میدان حالت روشن TEM و تصاویر توزیع عنصری (تصاویر نسبت پرش Si K، O K، N K، Al K، و  $Ti L_{2,3}$ ) تهیه شده از سطح مقطع نمونه نیمه هادی [۶].

در شکل (۱۲-الف)، تنها ساختارهای خاصی مشهود بوده، در صورتی که تمام ساختارها و فازها درون تصاویر توزیع عنصری قابل مشاهده هستند. در شکل (۱۲-ه) با استفاده از لبه Si K نقشه سیلیکون تهیه شده، لذا مناطق روشن متناظر با ویفر سیلیکونی و لایه نازک پلی‌سیلیکون به خوبی رویت می‌شوند. مناطق خاکستری به ترتیب نشانگر لایه‌های دی‌اکسید سیلیکون، اکسی نیتريد سیلیکون، و نیتريد سیلیکون هستند. در این روش تصویربرداری آشکارسازی شیب کوچک درون غلظت سیلیکون (حاصل شده از طریق بکارگیری فرآیند آرایش<sup>۲۸</sup> با برن<sup>۲۹</sup> و فسفر<sup>۳۰</sup>) واقع در لایه دی‌اکسید سیلیکون نیز امکان‌پذیر است. همچنین ناخالصی غنی از سیلیکون درون لایه رسانش (آلیاژ Al-Si-Cu) در حاشیه سمت راست شکل‌های (۱۲-ب) و (۱۲-ه) قابل مشاهده است (روش‌های مرسوم قادر به آشکارسازی این ناخالصی نبودند). نقشه تیتانیوم در شکل (۱۲-و) با استفاده از لبه  $Ti L_2$  ثبت شده و لایه روشن  $TiN$  که نمایانگر جهش‌های لحظه‌ای به درون لایه رسانش بوده نیز به وضوح قابل مشاهده است. نقشه آلومینیوم نیز در شکل (۱۲-ب) با استفاده از لبه Al K ثبت شده و لایه رسانش را به وضوح نمایش می‌دهد. در این شکل، نقص غنی از سیلیکون و جهش‌های لحظه‌ای غنی از تیتانیوم به صورت مناطق تاریک نمایش داده شده‌اند. در شکل (۱۲-ج) که نقشه ثبت شده نیتروژن بوده می‌توان لایه نیتريد تیتانیوم، اکسی نیتريد سیلیکون، و بالای ساختار مورد نظر نیتريد سیلیکون<sup>۳۱</sup> را مشاهده نمود. به‌طور مشابه، نقشه اکسیژن ثبت شده در شکل (۱۲-د) نیز فازهای اکسی نیتريد سیلیکون و اکسید سیلیکون را نمایش می‌دهد. به‌منظور بررسی لایه نیتريد تیتانیوم و رابط‌های آن با جزئیات کامل باید نقشه‌های توزیع عنصری در بزرگنمایی بالاتر تهیه شوند. در اینجا، علاوه بر نقشه‌های توزیع

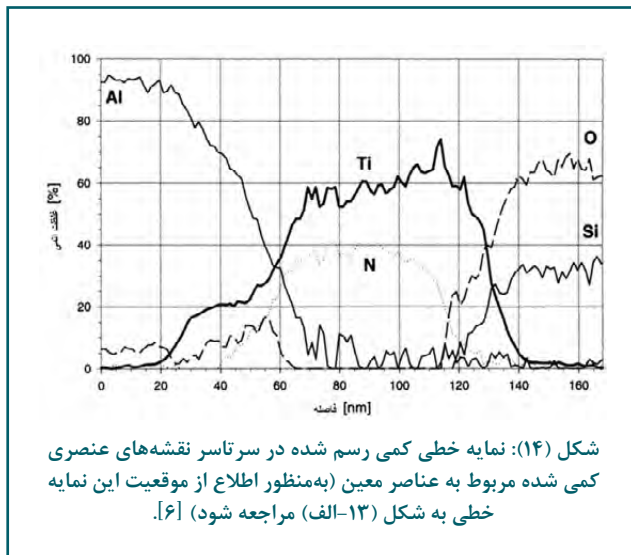


شکل (۱۱): تصویر انرژی فیلتر شده آمیزه ۸۵PS/PMMA/۱۵ تهیه شده با استفاده از الکترون‌های دربر گیرنده افت انرژی  $5.44 \pm 0.05$  eV. (ب) تصویر توزیع اکسیژن [۵].

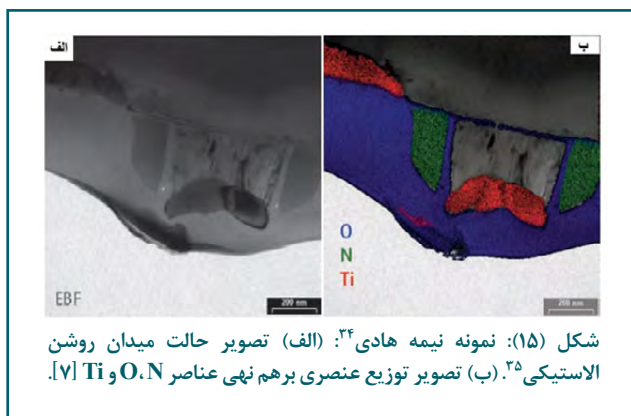
## ● کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه نیمه هادی‌ها

با توجه به کاهش روز افزون ابعاد نیمه هادی‌ها استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری در زمینه تحلیل و بررسی این نوع قطعات افزایش چشمگیری داشته است. در طول دهه اخیر از میکروسکوپ الکترونی عبوری به‌منظور ارزیابی و تعیین فناوری‌ها و ماژول‌های فرآیند نوین ساخت و همچنین کنترل کیفیت قطعات نیمه هادی استفاده شده است. پیشرفت‌های سریع انجام پذیرفته در حوزه فناوری منجر شده کارخانجات تولید تراشه برای رقابت هر چه بیشتر با یکدیگر، همواره به دنبال جای دادن تعداد بی‌شماری قطعه نیمه هادی درون مدارات مجتمع<sup>۲۴</sup> باشند. بدین منظور استفاده از TEM برای بررسی کیفیت ساختارهای بلورین و آشکارسازی نواقص بلوری موجود درون قطعات نیمه هادی (نظیر: نابجایی و نقص‌های انباشتگی) در مقیاس نانومتر اجتناب‌ناپذیر است. یکی دیگر از دلایل محبوبیت بکارگیری TEM در این حوزه، قابلیت دستیابی سریع به نمای سطحی و نمای سطح مقطع از نمونه به اندازه کافی نازک است. همچنین قابلیت ترکیب روش‌های تحلیلی پیشرفته نظیر: طیف‌سنجی پراش انرژی الکترون پرتو ایکس<sup>۲۵</sup> و مهمتر از همه طیف‌سنجی افت انرژی الکترون (EELS) با میکروسکوپ الکترونی عبوری منجر شده محققان فعال در حوزه نیمه هادی‌ها بیش از پیش نیاز خود به این نوع میکروسکوپ را حس کنند. در صورت تعیبه روش EELS درون میکروسکوپ الکترونی عبوری و دستیابی به محصول نهایی میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی به دلیل اینکه این نوع میکروسکوپ قادر به آشکارسازی بیشتر عناصر شیمیایی بوده و حساسیت بالایی نسبت به عناصر سبک وزن (در محدوده لیتیوم<sup>۲۶</sup> تا روی<sup>۲۷</sup>) داشته، لذا می‌توان به سرعت نمونه‌های نیمه هادی در مقیاس نانومتر را با استفاده از آن تحلیل کرد. یکی از روش‌های آماده‌سازی نمونه برای مشاهده نمای سطح مقطعی آن، استفاده از دستگاه

ساخته و در نتیجه می‌توان به نمایه‌های غلظت Si، O، N، Al و Ti دست پیدا کرد (شکل (۱۴)). شکل‌گیری لایه رابط متشکل از Al و Ti میان TiN و با استفاده از نمایه خطی به خوبی قابل مشاهده است. از طرف دیگر، رابط متمایل به سمت SiO<sub>2</sub> دارای یک لایه میانی دربرگیرنده O است [۶].



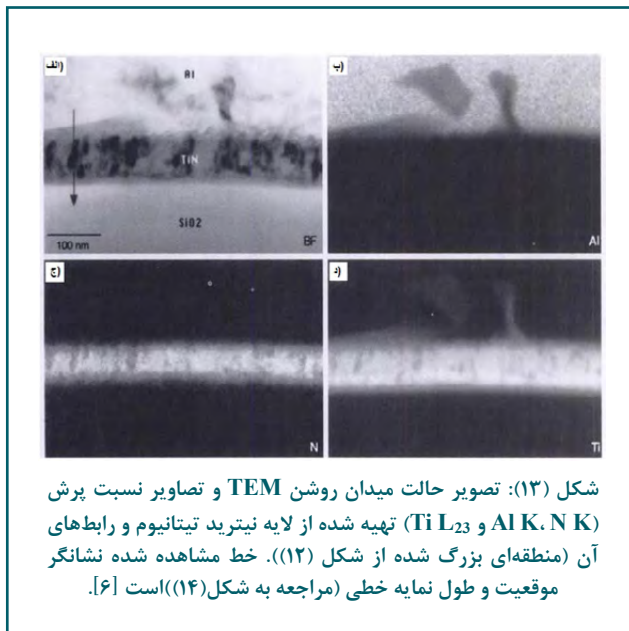
لازم به یادآوری است که نقشه‌های توزیع عنصری EFTEM روشی موثر و کارآمد برای تعیین دقیق ترکیب شیمیایی قطعات نیمه هادی است (شکل (۱۵)). تحلیل کمی نیمه هادی‌های جدید دربرگیرنده چندین لایه فوق نازک با ابعاد اتمی به منظور کنترل مشخصات نوری و الکترونیکی از اهمیت بالایی برخوردار بوده اما امکان اجرای تحلیل مذکور به دلیل محدودیت تفکیک‌پذیری روش‌های موجود بسیار دشوار است.



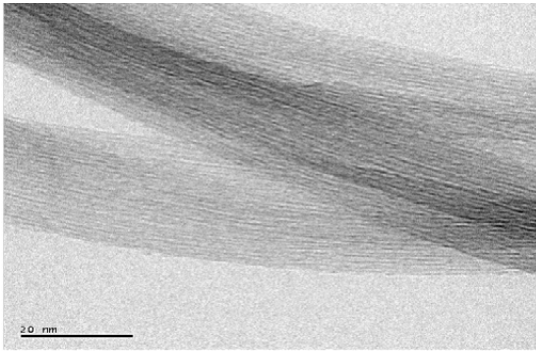
### ● کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی در حوزه نانولوله‌های کربنی

از زمان کشف نانولوله‌های کربنی<sup>۳۶</sup> توسط لیجیما در سال ۱۹۹۱ محققان دست به تحقیقات گسترده‌ای در این حوزه زده‌اند. نانولوله‌های کربنی تک دیواره<sup>۳۷</sup> به دلیل ویژگی‌های

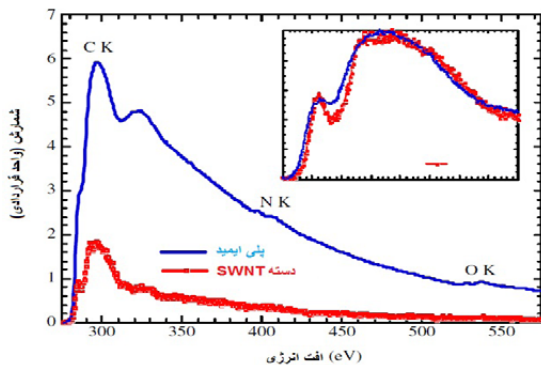
عنصری، تصاویر نسبت پرش نیز ارائه می‌شوند. تصاویر نسبت پرش کمتر تحت تاثیر کنتراست پرش قرار گرفته و نقشه‌های عنصری نیز برای فرآیند کمی‌سازی ضروری هستند. تصاویر نسبت پرش در شکل (۱۳) و نمایه خطی<sup>۳۴</sup> نیز با استفاده از نقشه‌های عنصری کمی شده در شکل (۱۴) نمایش داده شده‌اند.



لایه نیتريد تیتانیوم نمایش داده شده در شکل (۱۲) دربرگیرنده نواقص مشهودی بوده، لذا ناحیه مستطیلی در شکل (۱۲-ج) انتخاب و برای شکل (۱۳-الف) بزرگ شده‌است. تصویر حالت میدان روشن لایه نیتريد تیتانیوم با ضخامت ۹۰ nm در شکل (۱۳-الف) نمایش داده شده‌است. نقشه آلومینیوم ثبت شده در شکل (۱۳-ب) علاوه بر نمایش لایه رسانش (آلیاژ Al-Si-Cu)، مناطقی ناقص با غلظت آلومینیوم پایین‌تر را نیز آشکار می‌کند. نقشه تیتانیوم ثبت شده در شکل (۱۳-د) علاوه بر نمایش لایه نازک نود نانومتری، جهش‌های لحظه‌ای روشن نفوذ کننده به درون لایه رسانش را نیز آشکار می‌کند. از نقشه نیتروژن ثبت شده در شکل (۱۳-ج) می‌توان به این نتیجه دست پیدا کرد که ضخامت لایه نیتريد تیتانیوم موثر نازک‌تر (تقریباً برابر با ۷۰ nm) از ضخامت لایه تیتانیوم مورد نظر است. یکی از ویژگی‌های ضروری و قدرتمند EFTEM قابلیت کمی‌سازی<sup>۳۳</sup> است. همان‌طور که در مقاله‌های هافر و همکاران (۱۹۹۷) و گراگر و همکاران (۱۹۹۸) نیز نشان داده شده، نقشه‌های عنصری را می‌توان از طریق محاسبه تصاویر نسبت اتمی و ضرب کردن آنها در نسبت سطح مقطع یونیزاسیون مناسب (ضریب k) به صورت کمی نمایش داد. با استفاده از طیف‌های EELS بدست آمده از نواحی معینی از نمونه لایه نیتريد تیتانیوم و مناطق رابط آن می‌توان نقشه‌های غلظت را محاسبه کرد. با استفاده از این نقشه‌ها می‌توان مقادیر غلظت را بر حسب درصد اتمی برای هر پیکسل نمایش داد. نقشه‌های غلظت مورد نظر مشابه تصاویر نسبت پرش هستند. بکارگیری نقشه‌های غلظت فرآیند کشیدن نمایه خطی کمی در سرتاسر لایه نیتريد تیتانیوم را امکان‌پذیر



شکل (۱۶): تصویر فیلتر شده HREM بدون افت تهیه شده از دسته‌های خالص نانولوله کربنی تک دیواره [۸].



شکل (۱۷): طیف‌های افت انرژی الکترون SWNT خالص و پلی ایمید. لبه‌های جذب K کربن و پلی ایمید در نمودار کوچک داخلی نمایش داده شده‌اند [۸].

برتر الکتریکی، مکانیکی و حرارتیشان با ارائه یک مثال در اینجا مورد بررسی قرار می‌گیرند. در صورت بکارگیری SWNT درون کامپوزیت/ترکیب ماتریس پلیمری، استفاده موثر از ویژگی‌های فوق در مقیاس ماکروسکوپی آسان خواهد شد. پلیمرهای با دمای بالا نظیر: پلی ایمیدها برای کاربردهای الکترونیکی پیشرفته و فضایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پراکندگی یکنواخت SWNT درون ماتریس پلیمری به دلیل فقدان چسبندگی میان SWNT و پلیمر مورد نظر دشوار است. دستیابی به فرآیند پراکندگی یکنواخت و تقویت موثر SWNT درون ماتریس پلیمری مستلزم خیس کردن سطح غیرواکنشی SWNT با استفاده از پلیمر حلال پوشیده در طول مرحله تولید است. تحقیقات پیشین اثبات نموده که افزودن ۰/۱ wt درصد از SWNT به ماتریس پلی ایمید منجر به افزایش ۱۰ برابری رسانایی الکتریکی بدون وقوع افت قابل توجهی در انتقال و عبور نور می‌شود. این امر ویژگی‌های مکانیکی و حرارتی را نیز ارتقاء می‌بخشد. در شکل (۱۶) تصویری بدون افت از دو دسته از نانولوله‌های کربنی تک دیواره با قطر تقریبی ۱/۴ nm نمایش داده شده‌است (قطر هر دسته به‌طور تقریبی برابر است با ۴۰ nm). تصویر مذکور در شرایط حداقل آسیب تابشی و رانش حرارتی تهیه شده‌است. طیف‌های افت انرژی الکترون SWNT خالص و پلی ایمید در شکل (۱۷) نمایش داده شده‌اند. همان‌طور که در شکل (۱۷) مشاهده می‌شود، نیتروژن قادر است در طیف‌های EELS بدست آمده برای تمیز موثر دسته SWNT آغشته به پلی ایمید از دسته‌های معمولی SWNT کنتراست قابل قبولی را ارائه دهد. در صورت حصول سیگنالی قوی می‌توان با استفاده از قله نیتروژن پلی ایمید را از SWNT تشخیص داد [۸].

## نتیجه‌گیری

در این مقاله، ساختار دو فیلتر انرژی تجاری محبوب با عناوین: فیلترهای درون ستونی و فیلترهای بعد از ستون که به ترتیب درون و زیر میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی مستقر بوده به‌طور تفصیلی بررسی شده‌است. کاربران حوزه‌های مختلف باید به‌منظور برطرف نمودن نیازمندی‌های خود، آشنایی مقدماتی با این دستگاه ارزشمند را داشته باشند. این امر به کاربران کمک نموده تا زمان استفاده از EFTEM به‌منظور دستیابی به اهداف خود را به درستی تشخیص دهند. به همین منظور، کاربرد این دستگاه در حوزه‌های مختلف برای درک بهتر موارد استفاده خاص و مزیت‌های آن شرح داده شده‌است. لازم به ذکر است، قابلیت ثبت موثر اطلاعات مکانی توسط EFTEM منجر به حصول قابلیت نمایش کمیت‌های محاسبه شده به‌صورت نقشه‌های دو بعدی می‌شود. تاکنون بیشتر فرآیندهای تحلیلی EFTEM به تولید نقشه‌های توزیع عنصری محدود شده‌است. این نوع نقشه‌های تولید شده توسط روش‌های پیشرفته ابزاری مطلوب برای مشخصه‌یابی کیفی محسوب شده، اما فرآیند ارزیابی کمی هنوز چالش برانگیز باقی مانده است. در سال‌های اخیر، روش‌های زیادی برای بهبود تحلیل EFTEM ارائه شده‌اند. تمرکز اصلی محققان در این زمینه به سمت تعیین توزیع و ترکیب شیمیایی نمونه در سطح نانومتر به‌صورت کمی با سطح اطمینان بالا معطوف شده‌است. چنین تحلیلهایی به‌منظور شناسایی و درک بهتر ویژگی‌های ساختارها و مواد مدرن (نظیر: کاتالیست‌ها) توسط بررسی تغییرات صورت پذیرفته درون ترکیبات نانومتری از اهمیت بالایی برخوردار است. امروزه بیشتر تحقیقات پیشرفته باید در مقیاس زیر نانومتر انجام پذیرند، لذا ضرورت بهینه‌سازی میکروسکوپ الکترونی عبوری با قابلیت فیلتر کردن انرژی و تجهیزات جانبی آن به‌منظور بکارگیری در حوزه‌هایی همچون: زیست‌شناسی، پلیمر، نیمه هادی‌ها، چند لایه‌ای‌ها، چاه‌های کوانتومی و غیره بیش از پیش احساس می‌شود [۹].

## پی‌نوشت

19. Mitochondria (M)
  20. Polyamide (PA)
  21. Poly(methyl methacrylate) (PMMA)
  22. morphology
  23. block copolymer
  24. Integrated circuits (ICs)
  25. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXS)
  26. Lithium
  27. Zinc
  28. Doping
  29. Boron
  30. Phosphorus
  31. Silicon Nitride
  32. Line Profile
  33. Quantification
  34. Dynamic Random-Access Memory (DRAM)
  35. Elastic Bright Field (EBF)
  36. Carbon nanotubes (CNT)
  37. Single-Walled carbon Nanotube (SWNT)
۱. لیسانس الکترونیک، کارشناس آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری دانشگاه شیراز
  ۲. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی عبوری
  3. Energy-Filtering Transmission Electron Microscope (EFTEM)
  4. Conventional Transmission Electron Microscope (CTEM)
  5. Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS)
  6. Zero-Loss Imaging
  7. GATAN Imaging Filter (GIF)
  8. CHARGE-COUPLED DEVICE (CCD)
  9. Post-Column Filter
  10. Slit
  11. In-Column Filter
  12. CRYO-TEM
  13. Electron Spectroscopic Imaging (ESI)
  14. Energy Dispersive Analysis X-Ray (EDAX)
  15. Scanning-Transmission Electron Microscope (STEM)
  16. High-pressure freezing (HPF)
  17. Mucilage vesicles (MV)
  18. Lytic compartments (LC)

## مراجع

- [1] [www.eels.info/products/overview](http://www.eels.info/products/overview)
- [2] [www.eels.info/about/techniques/eftem](http://www.eels.info/about/techniques/eftem)
- [3] Use of energy filtering transmission electron microscopy for image generation and element analysis in plant organisms, Authors: Ursula Lu tz-Meindl.
- [4] Application of EELS and EFTEM to the life sciences enabled by the contributions of Ondrej Krivanek Authors: Richard D. Leapman
- [5] Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy for the Characterization of Polymer Blend Morphologies, Authors: Shin HORIUCHI, Kiyoshi YASE, Takeshi KITANO, Noboru HIGASHIDA, and Toshiaki OUGIZAWA.
- [6] Elemental mapping of semiconductor devices using energy-filtering transmission electron microscopy, Authors: Werner Grogger, Ferdinand Hofer, Peter Warbichler, O. Leitner.
- [7] Photo: Carl Zeiss NTS GmbH
- [8] Adhesion study of polyimide to single-wall carbon nanotube bundles by energy-filtered transmission electron microscopy, Authors: Cheol Park, Roy ECrooks, Emilie J Siochi, Joycelyn S Harrison, Neal Evans and Edward Kenik.
- [9] An introduction to energy-filtered transmission electron microscopy, Authors: P.J. Thomas and P.A. Midgleyz.
- [10] [www.uni-tuebingen.de/en/faculties/faculty-of-science/departments/physics/institutes/institut-fuer-angewandte-physik/forschung/electron-microscopy-and-applied-material-sciences/research-for-students.html](http://www.uni-tuebingen.de/en/faculties/faculty-of-science/departments/physics/institutes/institut-fuer-angewandte-physik/forschung/electron-microscopy-and-applied-material-sciences/research-for-students.html)
- [11] Advances in the Transmission Electron Microscopy of Polymers, Authors: MATTHEW R. LIBERA and RAY F. EGERTON
- [12] Transmission Electron Microscopy: Diffraction, Imaging, and Spectrometry, Authors: C. Barry Carter, David B. Williams
- [13] [www.resaltatech.com/resources/brochures/iTEM\\_EFTEM\\_RZ.pdf](http://www.resaltatech.com/resources/brochures/iTEM_EFTEM_RZ.pdf)
- [14] Progress in Transmission Electron Microscopy 1: Concepts and Techniques, written by: Xiao-Feng Zhang, Ze Zhang.

## نویسندگان

زهرا ثبات<sup>۱\*</sup>، مریم دارایی<sup>۲</sup>  
صدیقه صادق حسنی<sup>۳</sup>  
و ندا رحمانی<sup>۴</sup>

\* zsobat@gmail.com

## میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده

### چکیده

میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی<sup>۶</sup> به‌عنوان اولین عضو از خانواده میکروسکوپی پروبی روبشی، به دلیل ابعاد بسیار کوچک سوزن، می‌تواند کوچکترین پستی و بلندی موجود در سطح را (در حد نانومتر) حس کند. با توسعه روش‌های شناسایی نانو ساختارها، همواره یکی از اهداف اصلی افزایش توان تفکیک این میکروسکوپ برای بررسی ساختارهای کوچک‌تر و همچنین شناسایی نانو ساختارهای مغناطیسی بوده است. به این منظور، در سال‌های اخیر میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده<sup>۷</sup> به ابزاری قدرتمند برای بررسی ساختارهای مغناطیسی در مقیاس نانومتر تبدیل شده است. میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده به تکمیل مطالعات مغناطیسی در مقیاس نانومتر کمک می‌کند.

### واژه‌های کلیدی

نانو ساختارهای مغناطیسی، میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده، چگالی الکترون، میکروسکوپ پروبی روبشی.



در ابزارهای مدرن، نانو ساختارهای مغناطیسی دارای اهمیت فراوانی هستند. هم‌زمان با تمایل به کوچک‌سازی ابزارهای مغناطیسی، پرسش‌های جدید در مورد رفتار مغناطیسی ساختارهای کوچک شده در مقیاس نانو نیز افزایش یافته است. از طرفی، علاقه به تهیه تصویر از آرایه‌های مغناطیسی و دستیابی به ساختارهای آن در مقیاس نانو یا حتی اتمی از دیرباز مورد توجه دانشمندان بوده و انتظار می‌رود چشم‌اندازی بر رفتارهای جدید پدیده‌های مغناطیسی فراهم آورد. در میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی به‌عنوان اولین عضو خانواده میکروسکوپی پروبی روبشی، یک سطح رسانا با سوزنی که در موقعیت و وضعیت مناسبی نسبت به سطح قرار گرفته، روبش می‌شود. این میکروسکوپ به دلیل ابعاد بسیار کوچک سوزن، می‌تواند کوچکترین پستی و بلندی موجود در سطح را (در حد نانومتر) حس کند. برای این منظور، سوزن به‌وسیله یک سیستم کنترل‌کننده آنقدر به سطح نزدیک می‌شود تا برهم‌کنش‌های دلخواه بین سوزن و سطح نمونه پدید آید. در این فاصله بین سوزن و سطح نمونه که ممکن است در حد چند آنگستروم باشد، با اعمال ولتاژ مناسب (به بزرگی چند ده میلی‌ولت) بین سوزن و سطح، براساس پدیده تونل‌زنی مکانیک کوانتوم، جریان الکتریکی برحسب نانآمپر برقرار می‌شود. در میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی مقدار جریان تونلی، تابع فاصله سوزن از سطح، شکل و جنس سوزن، هندسه و جنس سطح و اختلاف ولتاژ بین سوزن و سطح است. در این روش، سوزن به بازوهای پیزوالکتریکی متصل بوده که به‌وسیله آنها سوزن با فاصله دلخواه، به نقطه موردنظر روی سطح نمونه منتقل شده و بدین ترتیب، امکان بررسی خواص آن نقطه از سطح نمونه فراهم می‌شود.

با توسعه روش‌های اولیه، یکی از تلاش‌های اصلی همواره ارتقاء توان تفکیک این روش میکروسکوپی برای بررسی ساختارهای کوچک‌تر بوده است. به این منظور، در سال‌های اخیر میکروسکوپی تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده و طیف‌سنجی تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده<sup>۸</sup> به دو ابزار قدرتمند برای بررسی ساختارهای مغناطیسی در مقیاس نانومتر تبدیل شده‌اند به‌گونه‌ای که حتی می‌توان تصویر سطوح آنتی‌فرومغناطیس را با این روش‌ها تهیه کرد. این روش‌ها همچنین می‌توانند برای مطالعه چگونگی خنثی‌سازی مغناطیسی در سطح لایه‌های نازک آنتی‌فرومغناطیس‌ها که در تماس مستقیم با پایه‌های مغناطیسی هستند و همچنین بررسی ویژگی‌های مرتبط با برهم‌کنش بین آنتی‌فرومغناطیس‌ها با فرومغناطیس‌ها، نیز به‌کار گرفته شوند [۱].

دارد. آزمایش‌های نشر میدان با سوزن‌های فرومغناطیس نشان داده‌اند [۴ و ۵] که در طول فرآیند تونل‌زنی از سوزن به‌خلاء، پلاریزاسیون اسپین چگالی حالت‌های سوزن، به‌صورت جزئی به الکترون‌های منتشر شده، منتقل و یک جریان اسپینی پلاریزه را به‌وجود می‌آورند. این امر با توجه به قانون فرمی قابل درک است. پلاریزاسیون نهایی بدلیل تفاوت تعداد الکترون‌ها در حالت‌های پیشینه و کمینه به‌وجود می‌آید. الکترون‌هایی که در حالت پیشینه قرار می‌گیرند، می‌توانند در فرآیند تونل‌زنی شرکت کنند. بررسی‌ها نشان می‌دهند، هنگامی که الکترون‌ها بین دو ماده فرومغناطیس تونل می‌زنند، نه تنها جریان اسپین - پلاریزه می‌شود بلکه اندازه جریان هم تحت تأثیر قرار می‌گیرد [۶]. در این مطالعات، دو لایه نازک مغناطیس به‌وسیله یک لایه نازک عایق از هم جدا می‌شوند تا یک اتصال تونلی مسطح را به‌وجود آورند. این وضعیت اجازه می‌دهد که جهت‌گیری مغناطیسی در دو لایه نازک مغناطیسی، به‌صورت موازی یا ضد موازی به‌عنوان تابعی از میدان مغناطیسی اعمال شده جهت‌گیری کند. بر این اساس، هدایت تونل‌زنی<sup>۱۰</sup>  $G$  (و بدین ترتیب مقاومت) به جهت‌گیری نسبی مغناطیس دو لایه بستگی دارد. این اثر، اثر مقاومت مغناطیسی تونل‌زنی<sup>۱۱</sup> نامیده می‌شود. هدایت ( $G$ )، کمیتی است که به توصیف خواص الکتریکی مواد می‌پردازد که براساس آن مواد به ترکیبات هادی، نیمه هادی و عایق تقسیم می‌شوند. برای یک مولکول کوچک، هدایت، تابعی از شدت جریان و اختلاف پتانسیل است. در الکترونیک مولکولی

## میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده (Sp-STM)

میکروسکوپ تونل‌زنی اسپین قطبیده، به‌عنوان یک روش تهیه تصویر مغناطیسی، با توان تفکیکی در مقیاس نانومتر است. این میکروسکوپ امکان ثبت تصاویر را در دو حالت جریان ثابت و ارتفاع ثابت، فراهم می‌کند. همچنین این توانایی را دارد که به‌طور هم‌زمان چگالی الکترون اسپین قطبیده را که مربوط به گشتاور مغناطیسی است، بررسی کند [۲].

در سال ۱۹۱۹ بارخوسن<sup>۹</sup> نخستین بار این ایده را مطرح کرد که یک ساختار مغناطیسی ممکن است شامل نواحی باشد که در آن نقاط مغناطیسی در جهت‌های مختلف قرار گرفته باشند [۳]. با طرح این ایده، روش‌هایی که امکان تهیه تصویر مستقیم الگوهای مغناطیسی را در فضای واقعی فراهم می‌نمودند، ابداع شد. در مطالعات بنیادی مغناطیسی، یکی از نیازهای اساسی تهیه تصویر مغناطیسی با توان تفکیک بالا است. Sp-STM در راستای مطالعات مغناطیسی در مقیاس نانومتر به‌کار می‌رود.

## ■ اثر مقاومت مغناطیسی تونل‌زنی

شکاف چگالی حالت‌های انرژی روی جریان تونل‌زنی اثر

سوزن سطح نمونه را روبش می‌کند، نوک سوزن روی خطوط جریان ثابت حرکت می‌کند و توپوگرافی نمونه را منعکس می‌سازد. پیش از این، در سال ۱۹۸۸، پیرس<sup>۱۳</sup> پیشنهاد کرد که یک دستگاه STM راه‌اندازی شود که در آن از مفهوم TMR برای تهیه تصویر هم‌زمان اثر مقاومت مغناطیسی و جریان تونل‌زنی نمونه استفاده شود [۹]. در این طرح تنها به یک جریان تونل‌زنی اسپین - قطبیده همراه با یک STM مورد نیاز است. او دو دیدگاه متفاوت را برای Sp-STM مطرح نمود. علاوه بر استفاده از فرومغناطیس، به‌عنوان مثال، سوزن‌های اسپین پلاریزه، او امکان استفاده از حامل‌های اسپین - پلاریزه‌ای که با نور برانگیخته می‌شوند را در سوزن‌های GeAs مورد بحث قرار داد. این سوزن‌ها توسط سوزوکی<sup>۱۴</sup> و همکارانش ابداع شده بودند [۱۰]. در رویکرد آنها، نوری که به‌صورت دایره‌ای پلاریزه شده‌است برای برانگیخته نمودن حامل‌های اسپین - پلاریزه در باند هدایت سوزن که بعداً به نمونه تونل می‌زند، استفاده می‌شود. به‌دلیل وابستگی اسپین به جریان تونلی، با مدوله کردن نور، مدولاسیون جریان نیز اجرا می‌شود. برای جدا کردن اطلاعات اسپین از اطلاعات توپوگرافی، مدولاسیون‌ها با یک تقویت‌کننده قفل‌شونده تشخیص داده می‌شود. به هر حال، به علت کنتراست نسبتاً پایین و کنتراست مغناطیسی - نوری اضافی ناخواسته در توان تفکیک جانبی، موفقیت این رویکرد محدود بود. از طرفی رویکرد مبتنی بر آزمایش‌های Sp-STM با سوزن‌های فرومغناطیس بسیار موفق‌تر بود. در گزارش منتشر شده از سوی پیرس، سه حالت تهیه تصویر کاربردی متفاوت برای Sp-STM پیشنهاد شده‌است. همه این روش‌ها به‌صورت تجربی اجرا شده و به‌طور خلاصه در ذیل این بخش شرح داده شده‌است [۲].

**حالت جریان ثابت:** در حالت جریان ثابت، تصاویر STM با سوزن‌های غیرمغناطیسی و غیرفرومغناطیسی گرفته و نتایج به‌دقت مقایسه می‌شوند. ویسندانجر<sup>۱۵</sup> و همکارانش نخستین افرادی بودند که نتایج بدست آمده با این حالت [۱۱] را روی سطح لایه‌ای غنی از ماده آنتی‌فرومغناطیس Cr(001) گزارش کردند [۱۱]. آنها در این حالت با استفاده از سوزن‌های تنگستنی و به کمک پله اتمی ایجاد شده در اثر تغییر جریان، توانستند پله‌های اتمی را روی Cr(001) آشکار کنند که ارتفاع آن در حد انتظار ۰/۱۴ nm بود. در حالی که استفاده از سوزن فرومغناطیس CrO<sub>2</sub> ارتفاع پله را به مقادیر ۰/۱۶ nm و ۰/۱۲ nm تغییر می‌دهد. این امر به اثر TMR بین سوزن فرومغناطیس و اتم‌های Cr که به‌صورت فرومغناطیسی روی تراس‌ها جهت‌گیری کرده‌اند، نسبت داده می‌شود. هنگامی که پلاریزاسیون اسپین سوزن و اتم‌های Cr واقع در تراس موازی باشند، جریان تونل‌زنی به‌دلیل اثر TMR ارتقاء می‌یابد و در حالت جریان ثابت STM، سوزن به‌مقدار اندکی (۰/۰۲ nm) عقب رانده می‌شود [۱۲]. بنابراین، روی این تراس اثر TMR باعث کاهش جریان می‌شود و سوزن STM تقریباً نزدیک سطح می‌شود. این سازوکار سبب تغییر در ارتفاع پله می‌شود که با سوزن اسپین - پلاریزه مشاهده شد. به هر حال، در این حالت تهیه تصویر، هیچ تفکیکی در اطلاعات توپوگرافی و اسپین نمی‌تواند به‌دست آید و اندازه‌گیری‌های مرجع باید با سوزن‌های غیرمغناطیسی به‌دست آیند [۲].

برای تعیین هدایت یک مولکول، باید مولکول حداقل در تماس با دو الکتروود خارجی قرار گیرد و این اتصال باید قوی و تکرارپذیر باشد که بتواند یک تماس الکترونی مناسب بین مولکول و الکتروودها ایجاد کند. G در حالت جهت‌گیری موازی (منظور از جهت‌گیری موازی، حالت مغناطیسی در مولکول و الکتروود است) بزرگتر از حالت جهت‌گیری ضد موازی است. این یافته را می‌توان براساس یک مدل ساده شرح داد. در این مدل تنها روی چگالی حالت‌های دو الکتروود تمرکز می‌نماییم. با فرض اعمال یک ولتاژ بایاس کوچک در سراسر اتصال و در غیاب پراکندگی اسپین، الکترون‌های فرومغناطیس در نزدیکی انرژی فرمی، هدایت تونل‌زنی را تعیین می‌کنند. برای جهت‌گیری موازی، چنانچه یک ولتاژ بایاس محدود برقرار شود، همه حالت‌های بین سطوح فرمی در تونل‌زنی درگیر می‌شوند که هر یک مطابق با احتمال تونل‌زنی خود که وابسته به انرژی است، وزن می‌گیرند. در این حالت، الکترون‌های بیشینه/کمینه نخستین الکتروود، به‌ترتیب به‌سوی حالت‌های بیشینه/کمینه در الکتروود دوم تونل می‌زنند. با استفاده از قانون فرمی، هدایت G با چگالی N حالت اولیه i (قبل از انجام هدایت) و حالت نهایی f (بعد از انجام هدایت) در لبه فرمی متناسب است. بنابراین، هدایت برای مغناطیس با جهت‌گیری موازی با استفاده از رابطه (۱) نشان داده می‌شود:

$$G_{\uparrow\uparrow} \propto N_{\uparrow}^i N_{\uparrow}^f + N_{\downarrow}^i N_{\downarrow}^f \quad (1)$$

برای جهت‌گیری ضد موازی الکترون‌های بیشینه در یک تونل‌زنی از الکتروود به سوی حالت کمینه با استفاده از رابطه (۲) هدایت داده می‌شود:

$$G_{\uparrow\downarrow} \propto N_{\uparrow}^i N_{\downarrow}^f + N_{\downarrow}^i N_{\uparrow}^f \quad (2)$$

به‌طور کلی، این دو هدایت متفاوت هستند که به تغییر جریان تونلی با جهت‌گیری نسبی مغناطیس الکتروودها منجر می‌شود. در حقیقت هدایت با ترکیب حالت‌های مختلفی از اسپین‌های موازی و ضد موازی انجام می‌شود که رابطه (۱) هدایت ناشی از ترکیب حالت‌های موازی و رابطه (۲) هدایت ناشی از ترکیب اسپین‌های ضد موازی را نشان می‌دهد.

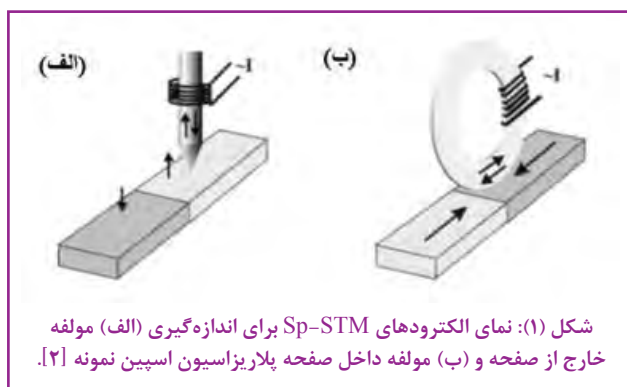
#### اصول میکروسکوپی تونل‌زنی روبشی اسپین - پلاریزه

با اختراع STM، بینینگ<sup>۱۲</sup> و همکارانش تهیه تصویر با توان تفکیک مطلوب که قادر به تشخیص یک اتم منفرد بود را تحقق بخشیدند [۷] و [۸]. در روش STM، نوک سوزن رسانا در نزدیکی سطح رسانای نمونه قرار داده می‌شود. بین نمونه و سوزن یک ولتاژ بایاس برقرار شده و یک جریان تونل‌زنی کوچک به‌وجود می‌آید که با فاصله بین سوزن و نمونه به‌صورت توانی یا نمایی کاهش می‌یابد. در حالت جریان ثابت STM، فاصله سوزن و نمونه به‌گونه‌ای تنظیم می‌شود که یک جریان تونل‌زنی ثابت به‌دست آید. هنگامی که

توسط جانسون<sup>۱۸</sup> و همکارانش انجام شد، با الاستیسیته مغناطیسی بزرگ سوزن Ni مواجه بود، به طوری که تهیه تصویر توپوگرافی یا مغناطیسی پایدار امکان پذیر نبود [۱۴].

## دستگاهوری

مغناطیسی کردن الکتروود فرومغناطیس با برقراری یک جریان متناوب کوچک در سیم پیچی که دور الکتروود پیچیده است، انجام می شود. جهت مغناطیس الکتروود STM بیشتر با استفاده از شکل الکتروود تعیین می شود. برای تهیه تصویر مؤلفه خارج از سطح پلاریزاسیون اسپین، یک سوزن نوک تیز استفاده می شود. نمای این حالت در شکل (۱-الف) نشان داده شده است. میدان مغناطیسی تناوبی که با سیم پیچ القاء می شود، برای معکوس کردن کامل مغناطیس سوزن به اندازه کافی بزرگ است. در سوزن، جهت مغناطیس به علت ناهمسانگردی<sup>۱۹</sup> بزرگ همواره در طول محور سوزن قرار دارد. بنابراین، در نوک سوزن جایی که تونل زنی روی می دهد، مغناطیس عمود بر سطح نمونه است. برای تهیه تصویر از مؤلفه درون سطح پلاریزاسیون اسپین نمونه، از یک حلقه که نمای آن در شکل (۱-ب) نشان داده شده است، به عنوان الکتروود STM استفاده می شود. میدان مغناطیسی سیم پیچ جریان را در حلقه ای که بین دو ساختار مغناطیسی دایره ای قرار دارد، عوض می کند. در پایین حلقه، مغناطیس مماس بر حلقه یعنی در سطح صفحه قرار دارد. با انتخاب صفحه ای که حلقه در آن جهت گیری می کند، جهت مغناطیس حلقه تعیین می شود؛ بنابراین، جهت حساسیت در سطح صفحه برای سیگنال اسپین اندازه گیری شده، معلوم می شود [۲].



شکل (۱): نمای الکتروودهای Sp-STM برای اندازه گیری (الف) مؤلفه خارج از صفحه و (ب) مؤلفه داخل صفحه پلاریزاسیون اسپین نمونه [۲].

شکل (۲) چگونگی ساخت آزمایشگاهی الکتروودهای STM را نشان می دهد. سوزن های STM برای ثبت مؤلفه خارج از سطح پلاریزاسیون اسپین (شکل (۲-الف)) با اسیدشویی الکتروشیمیایی سیم های CoFeSiB نازک با قطر  $130 \mu\text{m}$ ، تهیه می شوند. مخلوط رقیقی از HCl و HF به عنوان معرف اسیدشویی استفاده می شود که در طول فرآیند اسیدشویی با استفاده از کشش سطحی به صورت یک غشاء نازک در حلقه Pt پخش می شود. مقدار pH به گونه ای تنظیم

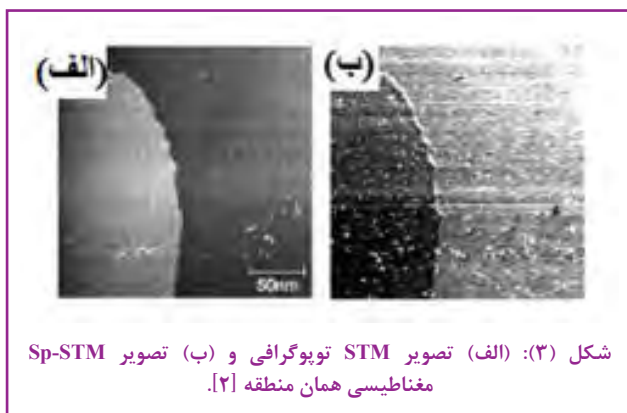
**حالت طیفسنجی:** حالت میکروسکوپی Sp-STM در شرایط خاصی، تفکیک اطلاعات توپوگرافی را از اطلاعات اسپینی امکان پذیر می سازد. این حالت طیفسنجی تونل زنی روبشی اسپین - قطبیده نامیده می شود. در این حالت از این واقعیت استفاده می شود که پلاریزاسیون اسپین جریان تونل زنی تابعی از انرژی است و پلاریزاسیون اسپین حالت های سوزن و نمونه هر دو در تونل زنی شرکت می کنند. بنابراین، به طور کلی پلاریزاسیون اسپین جریان تونل زنی با بایاس نمونه تغییر می کند. در حالت طیفسنجی، ولتاژ بین سوزن و نمونه تغییر می کند تا اطلاعاتی از ساختار الکترونی سطح به دست آید. در این حالت هدایت تونلی دیفرانسیلی ( $dI/dU$ ) به عنوان تابعی از ولتاژ بایاس و مختصات فیزیکی نوک سوزن اندازه گرفته می شود. این حالت می تواند در شرایط حالت جریان ثابت نیز استفاده شود به گونه ای که در آن جداسازی نمونه و سوزن منجر به تغییر نتایج در اطلاعات توپوگرافی و الکترونی خواهد شد.

**حالت تهیه تصویر مغناطیسی دیفرانسیلی:** Sp-STM می تواند در حالت مغناطیسی مدولاسیون استفاده شود که در آن سوزن مغناطیسی به صورت دوره ای تغییر می کند و موجب جریان تونلی می شود که متناسب با مغناطس<sup>۱۶</sup> (چگالی گشتاورهای مغناطیسی دائم یا القایی در یک ماده مغناطیسی) موضعی نمونه است. این حالت قادر است که ویژگی های مغناطیسی را از ویژگی های توپوگرافی و الکترونی جدا کند. در حالت تهیه تصویر مغناطیسی دیفرانسیلی، یک سوزن با بدنه فرومغناطیسی که مغناطیس آن تنظیم شده است، مورد استفاده قرار می گیرد. به دلیل اثر TMR، این تنظیم منجر به مدولاسیون جریان تونل زنی می شود که با پلاریزاسیون اسپین نمونه مرتبط است. در آزمایش، یک سوزن قابل تنظیم مغناطیسی، استفاده می شود. مغناطیس سوزن به صورت متناوب بین دو وضعیت پایدار مغناطیس متضاد تغییر می کند. این وضعیت معادل تغییر علامت پلاریزاسیون اسپین نوک سوزن است. در یک دستگاه آزمایشگاهی، مغناطیس سوزن با تغییر جریان در یک سیم پیچ کوچک که روی سوزن نصب شده است، معکوس می شود. تناوب تغییر جریان باعث تناوب در قطع حلقه بازخورد STM می شود [۱۳]. بنابراین، حلقه بازخورد تنها می تواند متوسط جریان تونل زنی را برای دو پلاریزاسیون (مثبت و منفی) اسپین در نوک سوزن نمایان کند به طوری که تصویر جریان ثابت شامل هیچ اطلاعات مغناطیسی نمی شود. با یک تقویت کننده قفل شونده حساس به فاز، تغییر بخشی از جریان تونل زنی  $\Delta I$  تشخیص داده می شود. این بخش شامل همه اطلاعات مربوط به اسپین است. با این روش، اطلاعات توپوگرافی و اسپین قویاً از هم جدا شده و تصویر مؤلفه اسپین در طول محور مغناطیس سوزن به صورت هم زمان با توپوگرافی ثبت می شود [۱۳]. تغییر میدان مغناطیسی که در داخل سیم پیچ القا می شود برای معکوس کردن کامل مغناطیس سوزن به اندازه کافی بزرگ است. ولی به هر حال، تغییر میدان جریان های القایی را نیز در حلقه تونل زنی ایجاد می کند. بدین دلیل، تنها ترکیبات مغناطیسی نرم می توانند به عنوان سوزن استفاده شوند. علاوه بر این، باید از الاستیسیته مغناطیسی<sup>۱۷</sup> سوزن نیز در طول فرآیند معکوس سازی جلوگیری شود. آزمایش های اولیه ای که

## کاربردهای میکروسکوپ الکترونی روبشی اسپین پلاریزه

یکی از کاربردهای میکروسکوپ SP-STM بررسی سطوح ترکیبات آنتی فرومغناطیس است. در این جا بیشتر، ویژگی‌های توپوگرافی آنتی فرومغناطیس‌ها مورد توجه است. ترکیب در یک ماده آنتی فرومغناطیس به صورت لایه‌ای است. Cr(001) نمونه‌ای از یک ماده آنتی فرومغناطیس لایه است که روی Fe(001) به عنوان پایه رشد یافته و هر دو پلاریزاسیون اسپین در صفحه را نشان می‌دهند.

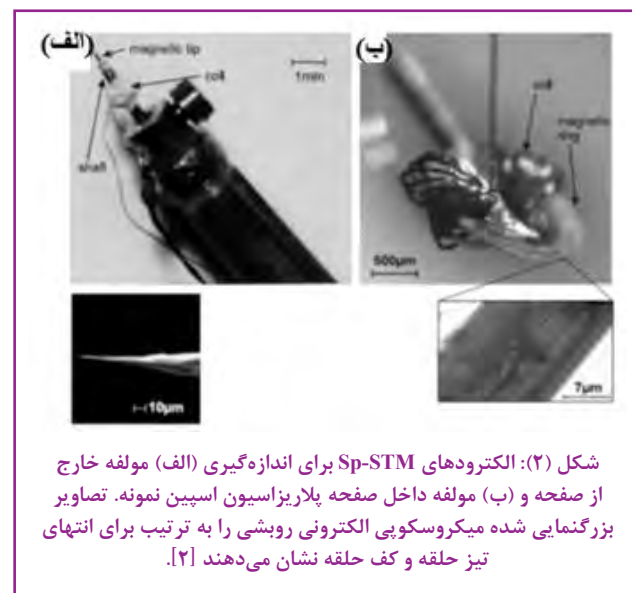
Cr(001) یک آنتی فرومغناطیس است. Cr می‌تواند به طور پراکنده روی Fe(001) رشد کند و یک پلاریزاسیون اسپین در صفحه همراستا با پایه زیرین را به وجود آورد [۱۵]. در این مطالعه از الکترودهای حلقه‌ای که در راستای محور رشد جهت‌گیری کرده‌اند برای تهیه تصویر سطح آنتی فرومغناطیس استفاده شده‌است. شکل (۳-الف) توپوگرافی لایه نازک Cr را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رود، تصویر Sp-STM که به صورت هم‌زمان ثبت شده‌است نظم آنتی فرومغناطیسی ترانس‌ها را نشان می‌دهد (شکل (۳-ب)) [۲].



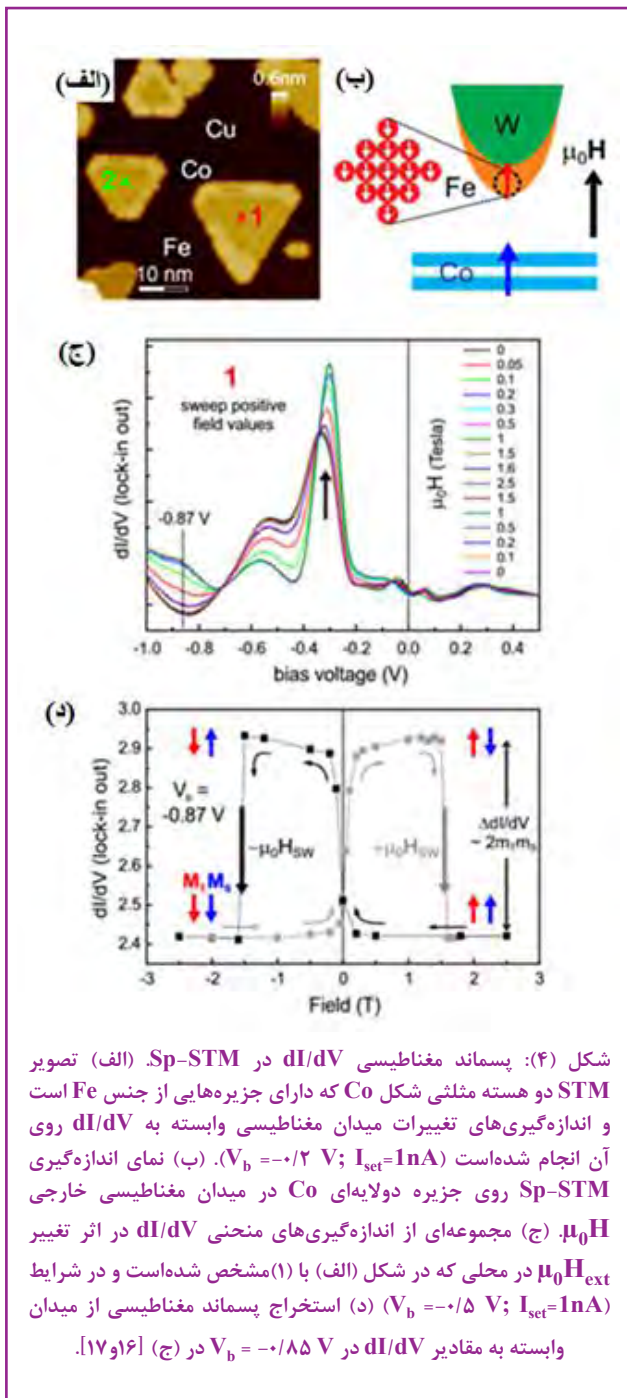
یکی از کاربردهای میکروسکوپ تونل زنی روبشی اسپین پلاریزه، بررسی نانوساختارهای مغناطیسی است. در بخش زیر نانوساختارهای Fe و Co روی Cu(111) شرح داده شده‌است. در این مطالعه لایه‌ای با ارتفاع دو اتم  $2 \times \text{Co(BLH)}$  Fe، جزیره‌هایی که از Co تشکیل شده و جزیره‌هایی از کروم که دارای اثراتی از Fe است (Fe/Co) و روی Cu(111) نشانده شده‌است، مورد بررسی قرار گرفتند. شکل (۴-الف) نمای فرآیند آماده‌سازی نمونه را نشان می‌دهد. این فرآیند (۳) نوع جزیره BLH را ایجاد می‌کند که نمای آن در شکل (۴-ب) نشان داده شده‌است: همان‌طور که در شکل (۴-ج) نشان داده شده‌است، ابتدا رسوب‌دهی یک لایه تکی Co در دمای اتاق باعث به وجود آمدن جزیره‌های Co می‌شود. سپس این جزیره‌های Co با ارتفاع  $4 \text{ \AA}$  به کمک تصویر STM در حالت جریان ثابت، مشخص می‌شوند.

می‌شود که از تشکیل سیلیکا از Si موجود در سیم آمورف جلوگیری شود. استفاده از جریان‌های ضعیف اسیدشویی در حد  $250 \mu\text{A}$ ، باعث به وجود آمدن سوزن‌های نوک‌تیزی با زاویه مخروطی بین  $8^\circ$  تا  $15^\circ$  می‌شود (پایین، شکل (۲-الف)). به دلیل ناهمسانگردی بزرگ، مغناطیس سوزن در راستای محور سوزن است. سوزن‌های مغناطیسی در یک محور غیرمغناطیسی که دور آن یک سیم‌پیچ پیچیده شده، نصب می‌شود. در طول عوض شدن جریان در سوزن، الاستیسیته مغناطیسی ایجاد شده در دیواره‌های محدوده، به اندازه کافی کوچک است و این اطمینان را حاصل می‌کند که تقریباً تمام ارتعاشات مکانیکی متوقف شده‌اند. با شبیه‌سازی میکرومغناطیسی دقیق فرآیند عوض شدن جریان سوزن، الاستیسیته مغناطیسی مورد انتظار کمتر از  $14-10 \text{ m}$  برآورد می‌شود، بدین معنی که این مقدار به آزمایش ارتباط نمی‌یابد.

برای تهیه تصویر از یک مؤلفه درون سطح پلاریزاسیون اسپین، الکترودهای حلقه‌ای شکل STM از جنس CoFeSiB استفاده می‌شود. شکل (۲-ب) تصویر حلقه‌ای با قطر خارجی در حدود  $2 \text{ mm}$  و ضخامت  $25 \mu\text{m}$  را نشان می‌دهد. حلقه‌ها از ورق نازک CoFeSiB به صورت الکتروشیمیایی اسیدشویی شدند. سیم‌پیچی پیچیده شده دور حلقه در شکل (۲-ب) قابل مشاهده است. با انتخاب جهت حلقه، جهت حساسیت در سطح صفحه تعیین می‌شود. محیط بیرونی حلقه‌ها جلا داده می‌شوند تا حتی زبری که با اسیدشویی ایجاد شده‌است نیز برطرف شود. بعد از جلا دادن، محیط بیرونی نرم و دارای حداقل ترانس‌های بر جای مانده از جلادهی است (پایین، شکل (۲-ب)). با وجودی که الکترودهای حلقه‌ای استفاده شده در STM تیز نیستند ولی توان تفکیک جانبی زیر  $1 \text{ nm}$  به دست می‌آید. به احتمال زیاد نانوسوزن‌هایی در نوک آن وجود دارد که چنین توان تفکیک جانبی بالایی را به وجود آورده است. برای به دست آوردن کنتراست اسپین، لازم است الکترودهای STM به صورت هم‌زمان به وسیله اسپری کردن Ar تمیز شوند. این کنتراست می‌تواند با روکش کردن الکترودهای CoFeSiB با چندین لایه از Fe افزایش یابد [۲].



این نکته دلالت می‌کند که مؤلفه خارج از سطح مغناطیس سوزن با میدان خارجی تغییر می‌کند [۱۶].



این جزیره‌ها دارای ابعاد جانبی ۵ تا ۳۰ نانومتر هستند. رسوب‌گذاری پی‌درپی نخستین تک‌لایه‌های  $Co$  (۰/۲۴ ML) و سپس  $Fe$  (۰/۲۸ ML) در دمای اتاق، دو نوع جزیره را به وجود می‌آورد که در شکل (۴-د) نشان داده شده است:

• جزیره خالص BLH Fe

• جزیره BLH Fe/Co که در آن  $Co$  حفره را تشکیل داده و  $Fe$  پیرامون  $Co$  را احاطه کرده است. در این بررسی  $Sp$ -STM و نیز  $STS$  برای هر سه نوع جزیره و روی جزیره‌های تکی اجرا شد [۳۲].

شکل (۴-الف) به بررسی نانوجزیره‌های  $Co$  روی  $Cu(111)$  به روش میکروسکوپ تونل‌زنی روبشی اسپین قطبیده پرداخته است. مطابق این شکل، تصویر  $STM$  جزیره‌های BLH از جنس  $Fe/Co$  روی  $Cu(111)$  مشاهده می‌شوند. بخش هسته جزیره‌ها که از جنس کبالت است، به وسیله خطوط نقطه‌چین محصور شده و با شماره‌های (۱) و (۲) مشخص شده است. بخش‌هایی که با خطوط متقاطع مشخص شده‌اند، نواحی را که در آنها اندازه‌گیری  $dI/dV$  انجام شده است را مشخص می‌کند. بررسی‌های  $Sp$ -STM با استفاده از سوزن‌هایی از جنس تنگستن و با روکش آهن که در میدان مغناطیسی خارجی  $\mu_0 H$  تهیه شده، انجام می‌شود. نمای مراحل آماده‌سازی این سوزن‌ها در شکل (۴-ب) نشان داده شده است. دمای مناسب برای تهیه سوزن‌ها ۱۰ K است.

شکل (۴-الف) طیف  $STS$  به دست آمده در مرکز هسته  $Co$  در ناحیه (۱) را نشان می‌دهد. محدوده این اندازه‌گیری در شکل (۴-ب) و با رنگ قرمز مشخص شده است. این طیف با تغییر  $\mu_0 H$  در راستای سطح نرمال به دست می‌آید. طیف  $STS$  در همه میدان‌ها حالت تیز  $3d_{z^2}$  را نشان می‌دهد که به حالت الکترونی  $Co$  در محدوده  $V_b = -0.8$  V مربوط می‌شود که با پیکان تیره عمودی نشان داده شده است. شکل و بزرگی طیف با تغییر میدان مغناطیسی تغییر می‌کند. در این میان ولتاژ بایاس  $V_b = -0.87$  V به عنوان ولتاژی که تغییرات وابسته میدان به سیگنال  $dI/dV$  کاملاً مشهود و واضح است، معین شد. همچنین از شکل (۴-د) می‌توان دریافت که پسماند مغناطیسی  $dI/dV$  از مقدار  $dI/dV$  در  $V_b = -0.87$  V قابل دست‌یابی است. حلقه پسماند مغناطیسی شامل منحنی‌هایی به شکل پروانه است که نسبت به محور عمودی دارای حالتی است که آن را تقریباً متقارن نشان می‌دهد. افت ناگهانی سیگنال در حدود  $\pm 1/6$  T نشان‌دهنده تغییر جهت مغناطیسی در هسته  $Co$  است. تغییرات تدریجی سیگنال  $dI/dV$  در محدوده میدان  $H_{sw}$ ، بر

$STIM$  روشی جدید برای بررسی خواص الکتروشیمیایی موضعی در مقیاس نانو است که با استفاده از تصویربرداری حرارتی از کرنش و گارد ناشی از نوسانات غلظت یونی کار می‌کند که این تغییرات با نوسانات دمایی موضعی اعمال شده با استفاده از پروب حرارتی ایجاد می‌شود. این ابزار از حساسیت و توان تفکیک بالایی برخوردار بوده و برای بررسی خواص الکتروشیمیایی و ترمومکانیکی موضعی به کار برده می‌شود. پس می‌تواند برای مطالعه طیف وسیعی از مواد و سیستم‌های الکتروشیمیایی که فعالیت‌های یونی در آنها ضروری است، مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، انبساط حرارتی و سختی مکانیکی نمونه نیز قابل دستیابی خواهد بود و بینش بیشتری را در فرآیندهای الکتروشیمیایی موضعی ایجاد خواهد کرد.

## پی نوشت

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| 10. Tunneling guidance                | ۱. کارشناس ارشد شیمی فیزیک، پژوهشگاه صنعت نفت              |
| 11. Tunneling magnetoresistance (TMR) | ۲. دکتری مهندسی شیمی، پژوهشگاه صنعت نفت                    |
| 12. Binning                           | ۳. دکتری شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت                     |
| 13. Pierce                            | ۴. کارشناس ارشد مهندسی مواد، پارک علم و فناوری استان همدان |
| 14. Suzuki                            | ۵. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ پروبی روبشی                 |
| 15. Wiesendanger                      | 6. Scanning tunneling microscope (STM)                     |
| 16. Magnetization                     | 7. Spin-polarized scanning tunneling microscopy (Sp-STM)   |
| 17. magnetostriction                  | 8. Spin-polarized scanning tunneling spectroscopy (Sp-STs) |
| 18. Johnson                           | 9. Barkhausen  |
| 19. anisotropy                        |  |
| 20. biatomic-layer-high (BLH)         |  |

## مراجع

- [1] Katharina Uta Schlickum, Spin-polarized scanning tunneling microscopy studies on in-plane magnetization components of thin antiferromagnetic films on Fe (001), thesis, 2004.
- [2] Wulf Wulfhekel·Uta Schlickum·Jürgen Kirschner, Spin-polarized Scanning Tunneling Microscopy
- [3] H. Barkhausen, Phys. Z. 20, 401 (1919).
- [4] Müller N, Eckstein W, Heiland W, Zinn W Phys Rev Lett, 29:1651 (1972).
- [5] Landolt M, Yafet Y, Phys Rev Lett, 40:1401 (1978).
- [6] Jullière M, Phys Lett, 54A:225 (1975).
- [7] Binning G, Rohrer H, Gerber Ch, Weibel E (1982) Appl Phys Lett 40:178
- [8] Binning G, Rohrer H, Gerber Ch, Weibel E (1982) Phys Rev Lett 49:57
- [9] Pierce DT (1988) Physica Scripta 38:291
- [10] Suzuki Y, Nabhan W, Tanaka K (1997) Appl Phys Lett 71:3153
- [11] Wiesendanger R, Güntherodt HJ, Güntherodt G, Gambino RJ, Ruf R (1990) Phys Rev Lett 65:247
- [12] Blügel S, Pescia D, Dederichs PH (1989) Phys Rev B 39:1392
- [13] Wulfhekel W, Kirschner J (1999) Appl Phys Lett 75:1944
- [14] Johnson M, Clarke J (1990) J Appl Phys 67:6141
- [15] Pierce DT, Unguris J, Celotta RJ, Stiles MD (1999) J Magn Magn Mater 200:290
- [16] Soo-hyon Phark, Dirk Sander, Spin-polarized scanning tunneling microscopy with quantitative insights into magnetic probes, 17Phark and Sander Nano Convergence (2017) 4:8.
- [17] S.H. Phark, J.A. Fischer, M. Corbetta, D. Sander, J. Kirschner, Superparamagnetic response of Fe-coated W tips in spin-polarized scanning tunneling microscopy. Appl. Phys. Lett. 103, 032407 (2013)

## Author

Zahra Sobat<sup>1,5\*</sup>  
Maryam Daraee<sup>2</sup>  
Sedigheh Sadegh Hassani<sup>3,5</sup>,  
Neda Rahmani-nasab<sup>4,5</sup>

\*zsobat@gmail.com

1. M.Sc. Physical Chemistry, Research Institute of Petroleum Industry
2. PhD. Chemical Engineering, Research Institute of Petroleum Industry
3. PhD. Analytical Chemistry, Research Institute of Petroleum Industry
4. M. Sc. Materials Engineering, Hamedan Science and Technology Park
5. Laboratory Network SPM Experts Workgroup

## Spin-Polarized Scanning Tunneling Microscopy

### Abstract

Scanning tunneling microscope is considered as the first member in the scanning probe microscope family, which it can sense the smallest height and pitch in the surface (nanometer scale) due to the very small size of tip.

Development of nanostructured detection methods lead to increase the resolution of this microscopic method in order to investigate smaller structures and identify magnetic nanostructures. For this purpose, Spin-Polarized Scanning Tunneling Microscopy (Sp-STM) has become a powerful tool for examining magnetic nanostructures in recent years. The basis of the polarized spin scanning tunneling microscope is the improvement of magnetic studies in nanometer scale.

### Keywords

magnetic nanostructure, Spin-Polarized Scanning Tunneling Microscopy, electron density, Scanning probe microscope.

## Authors

Sanaz Shobeikeh

\* [researchers4u@yahoo.com](mailto:researchers4u@yahoo.com)

1. B.Sc. of Electronic Engineering, SHIRAZ University Transmission Electron Microscope laboratory Specialist
2. TEM Experts work group

## Abstract

A comprehensive background information concerning underlying basis of final image formation procedure inside an Energy-Filtering Transmission Electron Microscope (EFTEM) has been provided in our previous article titled "Introduction to Energy-Filtering Transmission Electron Microscope fundamental principles" (published in Iranian Journal of Laboratory knowledge; Volume 6; Issue 4; Winter 2019; No. 24). In this article, structures of two widely used commercial energy filters have been reviewed in detail, namely, In-Column Filters and Post-Column Filters.

In-Column Filters and Post-Column Filters are located inside and beneath a Conventional Transmission Electron Microscope (CTEM), respectively. It is very important that users in various fields know when to use this piece of valuable equipment to get the desired results. For this purpose, applications of Energy-Filtering Transmission Electron Microscope in various fields like: Biology, Polymer science, Semiconductors, and Carbon nanotubes has been explained with simple examples in order to obtain a better comprehension of the unique operations and advantages of this equipment.

## Introduction to Energy-Filtering Transmission Electron Microscope structure and applications

## Keywords

Energy-Filtering Transmission Electron Microscope (EFTEM), Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS), In-Column Filter, Post-Column Filter.



## Authors

Maryam KHaninour<sup>1,4\*</sup>Masoud Rasouli<sup>2,4</sup>Nafiseh Hashemian<sup>3,4</sup>

\*M.khaninour@basu.ac.ir

1. Master of Physics, Bu-Ali Sina university of Hamedan
2. Baschlar of Physics, Amirkabir University of Technology of Tehran
3. Master of Material and Metallurgical Engineering, Ferdowsi University of Mashhad
4. SEM Experts Workgroup

## Preparing of biological samples for observing with Scanning Electron Microscope (SEM)

## Abstract

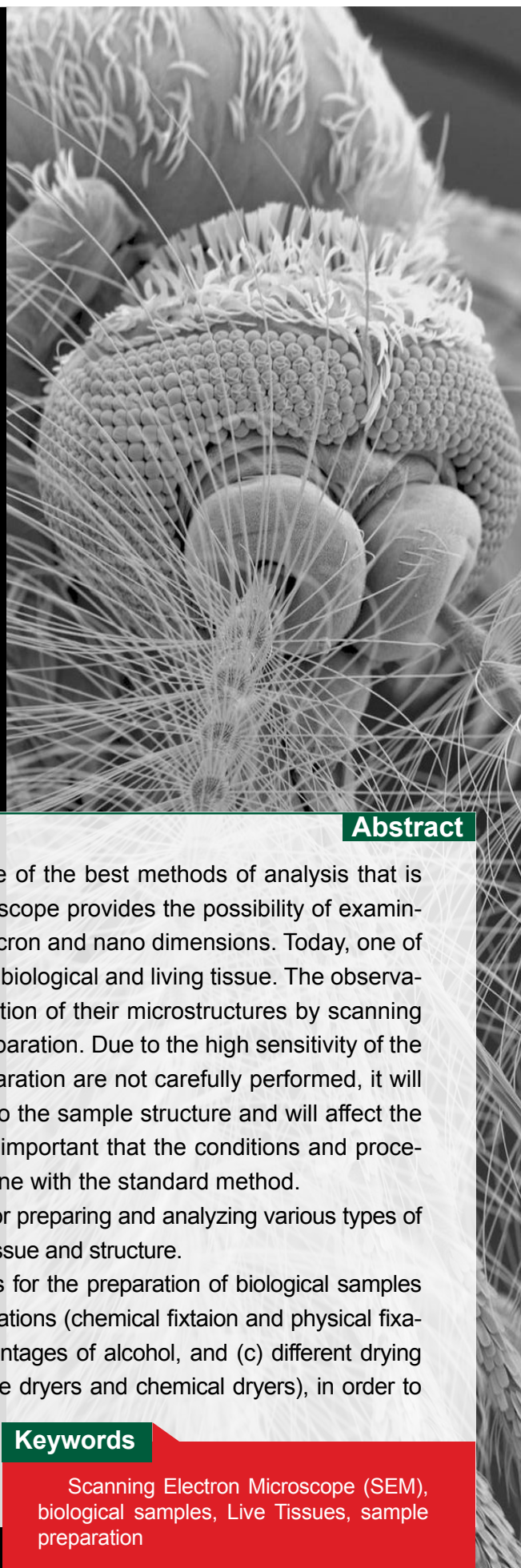
Scanning electron microscope is one of the best methods of analysis that is widely used in various fields. The microscope provides the possibility of examining the surface and microstructure in micron and nano dimensions. Today, one of the most specialized areas of interest is biological and living tissue. The observation of these samples and the investigation of their microstructures by scanning electron microscope require special preparation. Due to the high sensitivity of the samples, if any of the steps in the preparation are not carefully performed, it will cause shrinkage, collapse, or damage to the sample structure and will affect the quality of the final images, so it is very important that the conditions and procedures for tissue preparation carefully done with the standard method.

There are many different techniques for preparing and analyzing various types of tissue that vary according to the type of tissue and structure.

This paper study the general methods for the preparation of biological samples and living tissues including: a) various fixations (chemical fixaion and physical fixation), (b) dehydration with different percentages of alcohol, and (c) different drying methods In air, critical point dryers, freeze dryers and chemical dryers), in order to view the biological structures in the closest to their living structure in a high resolution SEM is discussed.

## Keywords

Scanning Electron Microscope (SEM), biological samples, Live Tissues, sample preparation



# QUALITY ASSURANCE

## Authors

Fariba Ali<sup>1,4\*</sup>, Seyed Ahmad Zahir-mirdamadi<sup>2,4</sup>, Maryam Banazade Amirkhiz<sup>3,4</sup>

\*f.ali.ars@gmail.com

1. MSc Physics, Amirkabir University of technology
2. MSc governmental management, quality management of MERC (Material and Energy Research Center)
3. MSc clinical Biochemistry, Tabriz University of medical science
4. Standard and Calibration Experts Workgroup

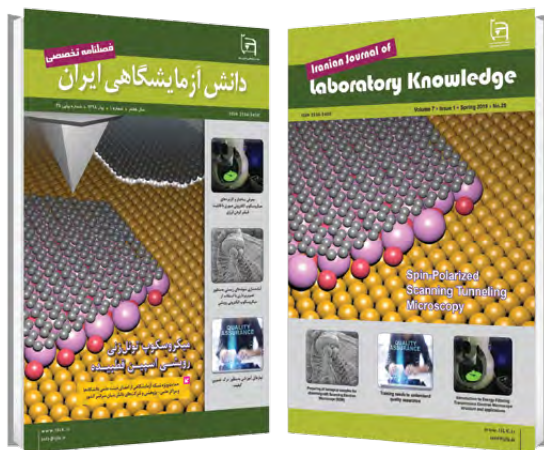
## Training needs to understand quality assurance

### Abstract

Quality assurance is defined as part of quality management focused on providing confidence that quality requirements will be fulfilled, other parts being quality planning, quality control and quality improvement. These terms are of importance to all activities of economic interest with regard to products, services and procedures including conformity assessment activities. Quality assurance is important not only for a particular activity but also for other activities linked with it; this may include supplies, manufacture, marketing, conformity assessment, accreditation, competent authorities and customers. This article is focused on some of the training needs referring to specific aspects of interest to the main parties involved in each case. Based on the experience gained within the Cyprus Accreditation Body, the article gives examples illustrating the importance of training and awareness for the understanding of various aspects of quality assurance by all parties, to the extent necessary so that they know what they are looking for, how compliance with requirements is documented and how an assessment of compliance is confirmed. The article gives emphasis to laboratories and interrelated activities with reference to the requirements of accreditation and certification standards applicable in each case. Common understanding of basic aspects of quality assurance and their use as tools in a common technical language require training and awareness at all levels so that quality assurance helps the expectations and the overall quality and economic goals of the society to be realized. This is how a quality culture is created and enhanced.

### Keywords

Quality assurance, Training and awareness, Conformity assessment, Accreditation, Certification.



**Iranian Journal of**

# laboratory Knowledge

Volume 7 ■ Issue 1 ■ Spring 2019 ■ No.25

ISSN 2538-3450

**Concessionaire:** Iran Nanotechnology Laboratory Network

**Managing Editor:** Reza Asadifard

**Editor in Chief:** Mojtaba Nasab

**Executive Management:** Iran Nanotechnology Laboratory Network (INLN)

**Article Editor:** Davoud Gharailou

**Authors:**

Zahra Sobat, Maryam Daraee  
Sedigheh Sadegh Hassani, Neda Rahmani-nasab,  
Sanaz Shobeikeh, Maryam KHaninour  
Masoud Rasouli, Nafiseh Hashemian  
Fariba Ali, Seyed AhmadZahirmirdamadi  
Maryam Banazade Amirkhiz

**Designer :** Simin Rafipour Langroudi

**Editor:** Zeinab Zarincheh

Iran, Tehran, Po.Box: 14565-344

**www.IJLK.ir**

**Email :** info@ijlk.ir

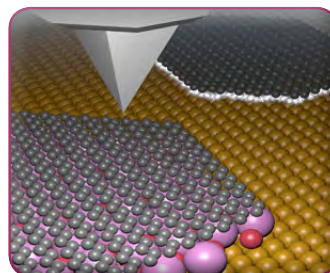


Iran Nanotechnology Laboratory Network

## Contents

**Introduction to Energy-Filtering Transmission Electron Microscope fundamental principles**

45 <

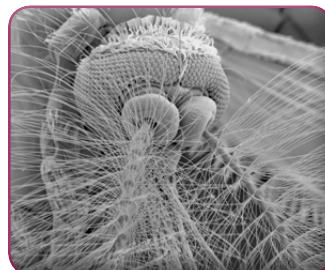


**Introduction to Energy-Filtering Transmission Electron Microscope structure and applications**

>46

**Preparing of biological samples for observing with Scanning Electron Microscope (SEM)**

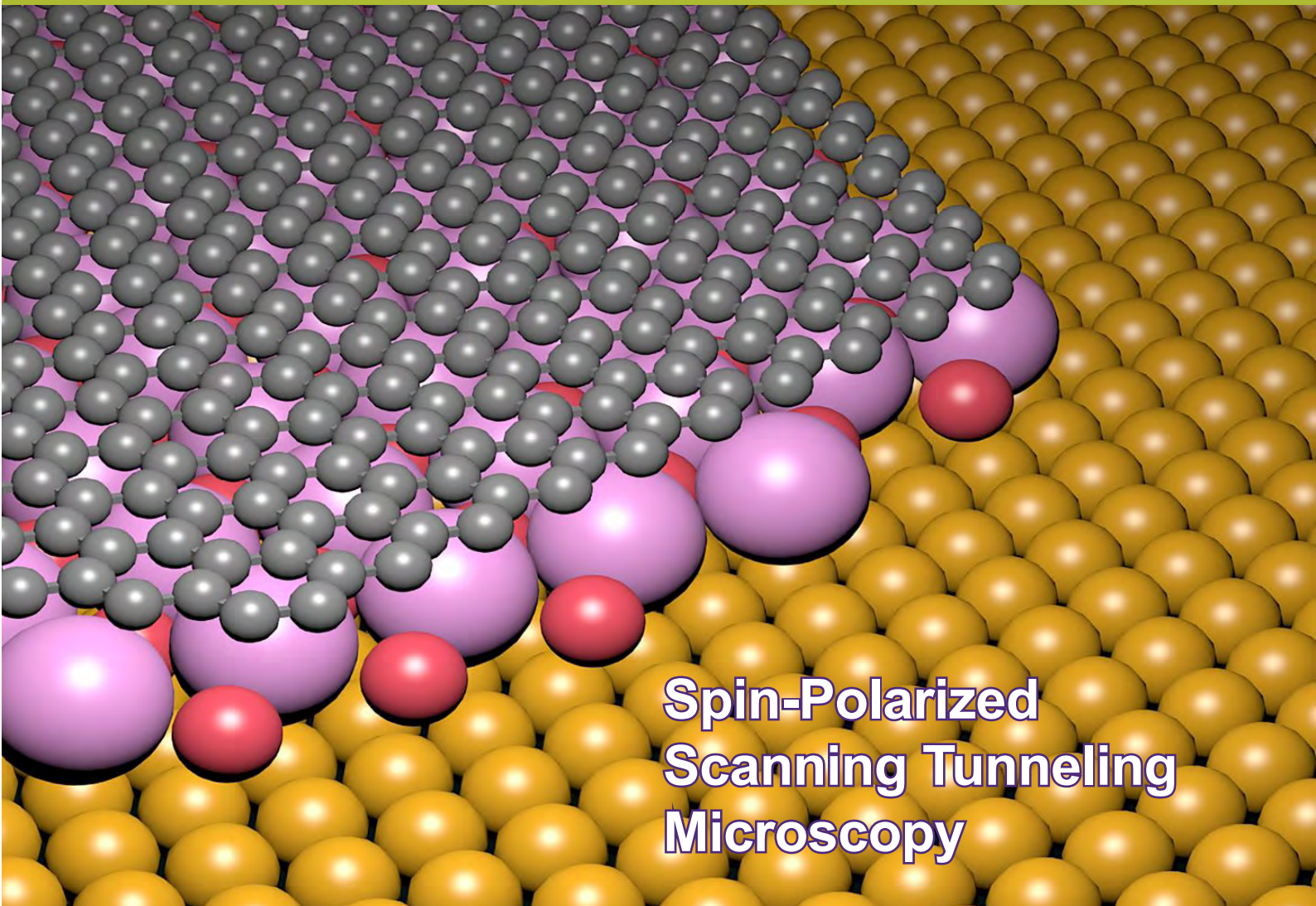
47 <



**Training needs to understand quality assurance**

>48

**Articles**



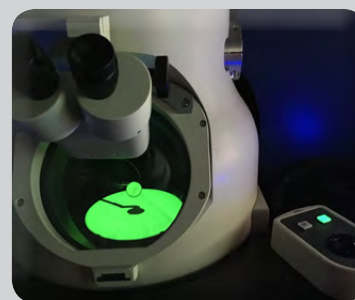
## Spin-Polarized Scanning Tunneling Microscopy



Preparing of biological samples for observing with Scanning Electron Microscope (SEM)



Training needs to understand quality assurance



Introduction to Energy-Filtering Transmission Electron Microscope structure and applications