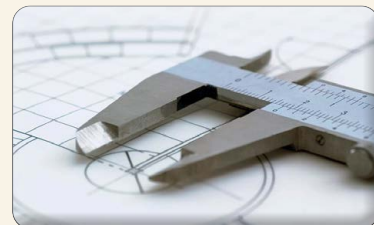


## کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری در زمینه توسعه، تحلیل و تشخیص نقایص دستگاه‌ها و قطعات صنعت نیمه‌هادی

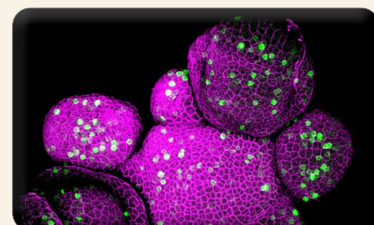
توسعه شبکه‌سازی آزمایشگاه‌ها



تعیین خلوص مواد با استفاده از دستگاه  
گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)



تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در  
آزمون ضربه شارپی



انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی  
لیزری هم‌کانون (بخش دوم)



عدم قطعیت در فرآیند نمونه‌برداری

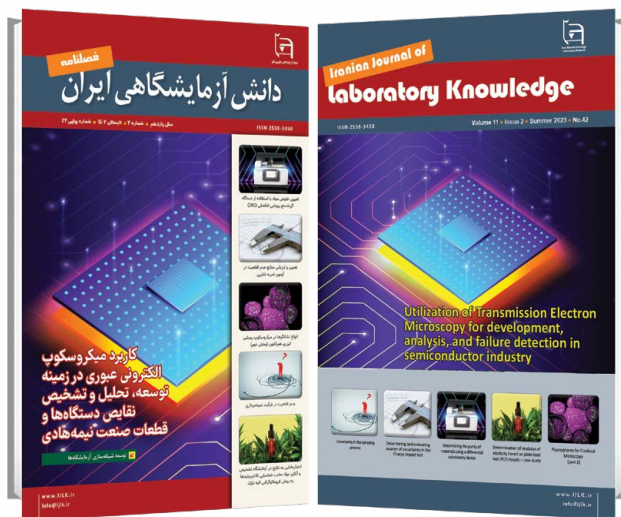


اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص  
و آنالیز مواد مخدر؛ شناسایی کانابینوئیدها  
به روش کروماتوگرافی لایه نازک





محمد بن علی علیہ السلام  
رسول الله  
رضی اللہ عنہ  
علی بن موسی



# فصلنامه دانش آزمایشگاهی ایران

سال یازدهم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۲

ISSN 2538-3450

صاحب امتیاز: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

سر دبیر: رضا اسدی فرد

مدیر مسئول: مجتبی نسب

مدیریت اجرایی: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

دبیر مقالات: داود قزایلو

همکاران این شماره: الهه اسلامی پور، افسون نارویی  
سیداحمد ظهیرمیردامادی، فهیمه نوری کوهانی  
سحر صالحی، پروین هادیان، اصغر افتخاری، ابراهیم قربانی  
رضا ساقی، ساناز شبیکه

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](http://www.IJLK.ir)

پست الکترونیکی: [info@ijlk.ir](mailto:info@ijlk.ir)

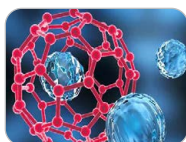


شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

## فهرست مطالب

توسعه شبکه سازی آزمایشگاه ها

۳ <



ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین هنگام برهم کنش  
با نانومواد با استفاده از رنگ تابی دورانی فرابنفش

۷ <



عدم قطعیت در فرآیند نمونه برداری

۹ <



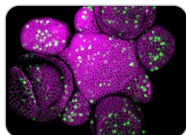
تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در آزمون  
ضربه شارپی

۱۳ <



تعیین خلوص مواد با استفاده از دستگاه  
گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)

۱۹ <



انواع نشانگرها در  
میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون (بخش دوم)

۲۵ <



اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص و  
آنالیز مواد مخدر؛ شناسایی کاناบินوئیدها به روش  
کروماتوگرافی لایه نازک

۳۲ <



کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری در  
زمینه توسعه، تحلیل و تشخیص نقایص  
دستگاه ها و قطعات صنعت نیمه هادی

۴۱ <

اخبار

استاندارد

مقالات





## توسعه شبکه‌سازی آزمایشگاه‌ها

شکل‌دهی ارتباطات بین مراکز آزمایشگاهی، یکی از فعالیت‌های مستمر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی ایران است. برای این منظور، شبکه آزمایشگاهی از ابزارهای متنوعی استفاده می‌کند. برگزاری برنامه‌های جمعی حضوری و اینترنتی بین مدیران و کارشناسان آزمایشگاه‌ها در قالب نشست‌های ملی و استانی، بازدیدهای جمعی از مراکز آزمایشگاهی و مشارکت در برنامه‌های جمعی بین‌المللی، فرصت‌هایی را به‌منظور مطرح شدن چالش‌های پیش روی آزمایشگاه‌ها در ارائه خدمات و توسعه فعالیت‌های آنها ارائه می‌کند. همچنین این برنامه‌ها علاوه بر معرفی توانمندی‌های آزمایشگاهی مراکز به یکدیگر و شکل‌دهی همکاری‌ها، تبادل تجربه و ایجاد جریان دانش بین مدیران و کارشناسان را به همراه دارد. در ادامه، گزارشی از برنامه‌های برگزار شده در این راستا در تابستان ۱۴۰۲ ارائه شده است.

### ○ نشست مدیران آزمایشگاه‌های استان قزوین



دانشگاه آزاد اسلامی واحد قزوین برگزار شد. در این برنامه، بیش از ۳۰ نفر از مدیران آزمایشگاه‌های دانشگاه‌ها و مراکز آزمایشگاهی خصوصی (شرکت‌ها) مستقر در شهرهای مختلف استان قزوین و نمایندگان سازمان‌های محیط‌زیست و دامپزشکی

سه‌شنبه ۲۰ تیر ماه سال ۱۴۰۲، نشستی با حضور مدیران آزمایشگاه‌های استان قزوین، نمایندگان شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و شبکه آزمایشگاهی دانشگاه آزاد و همچنین نمایندگان سازمان‌های نظارتی استان، به میزبانی



و قیر و آسفالت بازدید کرده و با انواع نمونه‌های مورد آنالیز و پژوهش‌های انجام شده در این آزمایشگاه‌ها آشنا شدند و به بحث و تبادل نظر با کارشناسان آزمایشگاه‌های مربوطه پرداختند.

شایان ذکر است چهارشنبه ۲۱ تیر ماه جاری نیز نمایندگان شبکه آزمایشگاهی و تعدادی از مراکز عضو شبکه، از توانمندی‌های آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین (آزمایشگاه‌های عمومی، آنالیز دستگاهی، PCR، کشت سلول، الکتروفورز و فلوسایتومتری)، آزمایشگاه شرکت دانش محور البرز (آزمایشگاه‌های تخصصی مواد غذایی و شیمیایی) و شرکت سایپا شیشه (خط تولید و فرمدهی و آزمایشگاه تخصصی) بازدید و با فعالیت‌ها و تحقیقات آن‌ها آشنا شدند.

استان قزوین حضور داشتند.

در این برنامه، دکتر احمد فخاریان، معاون پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی قزوین، ضمن خوش آمدگویی به مهمانان، به معرفی توانمندی‌های دانشگاه پرداخت. وی با اشاره به اینکه دانشگاه آزاد قزوین بیش از ۱۴۰۰۰ دانشجو در رشته‌های مختلف فنی و مهندسی، علوم انسانی، هنر و معماری دارد گفت: «این دانشگاه در حوزه فناوری هوش مصنوعی و رباتیک چندین سال سرمایه‌گذاری خوبی انجام داده و به نتایج خوبی نیز دست پیدا کرده است».

وی، یکی از فعالیت‌های دانشگاه را حل مسائل موجود در صنعت و شکل‌دهی اعتماد برای بخش صنعت به انجام پژوهش در دانشگاه دانست. به گفته وی، دانشگاه آزاد واحد قزوین توانسته است با صنایع مختلف در استان‌های دیگر نیز قراردادهایی را امضا و اجرا کند.

دکتر فخاریان افزود: «یکی از اهداف اولویت‌دار در دانشگاه، استقرار استاندارد ISO/IEC17025 در آزمایشگاه‌ها است. امیدواریم با دریافت اعتبارنامه این استاندارد، مجوز همکاری آزمایشگاه‌های دانشگاه با سازمان‌های نظارتی همچون گمرک، سازمان دامپزشکی و سازمان استاندارد را دریافت کنیم و درآمد دانشگاه را از این طریق افزایش دهیم».

مهندس مجتبی نسب، دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، دیگر سخنران این نشست، شروع شکل‌گیری شبکه آزمایشگاهی را سال ۱۳۸۳ در حوزه نانو ذکر نمود و افزود: «هدف از ایجاد شبکه آزمایشگاهی، ارتقای بهره‌وری زیرساخت‌های آزمایشگاهی کشور است. این شبکه پس از ۱۰ سال فعالیت در حوزه فناوری نانو، با افزایش دامنه پوشش آزمایشگاه‌ها به همه حوزه‌های فناوری، از سال ۱۳۹۳ با عنوان شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی ایران فعالیت می‌کند».

مهندس نسب، ارائه خدمات توانمندسازی به آزمایشگاه‌ها را یک دسته از خدمات شبکه آزمایشگاهی بیان کرد و گفت: «علاوه بر این، شبکه از تعمیر و نگهداری تجهیزات آزمایشگاهی، آموزش کارشناسان، استقرار استانداردهای آزمایشگاهی و افزایش دامنه خدمات‌دهی آزمایشگاه‌ها، حمایت می‌کند».

برقراری و تقویت ارتباط بین آزمایشگاه‌های عضو شبکه و همچنین بین آزمایشگاه‌ها و سازمان‌های نظارتی و جذب و تشویق آزمایشگاه‌های سازمان‌ها برای عضویت در شبکه آزمایشگاهی از جمله موارد مطرح شده در این نشست بود. در بخش دوم نشست، حاضرین، از توانمندی‌های آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد قزوین همچون آزمایشگاه‌های صنایع غذایی، میکروبیولوژی مواد غذایی، میکروبیولوژی عمومی، غلات، شکلات، لبنیات، قند، روغن، کنسرو، عوامل شیمیایی، تجزیه مواد، عمران، دستگاه‌های CNC



کمک‌هایی که معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش‌بنیان از رهگذر عضویت در این شبکه ارائه می‌کند، اشاره کرد و گفت: «اگر سازمانی تجهیزات و آزمایشگاه خود را به عضویت این شبکه در بیاورد، به آن سازمان یک زیر شبکه تخصیص داده می‌شود تا بتواند تجهیزات خود را مدیریت کند؛ بنابراین، اولین آورده معاونت علمی در این زمینه برای سازمان‌ها، یک ابزار مدیریتی و اطلاعاتی است.

وی افزود: معاونت علمی و فناوری یارانه‌هایی را به پژوهشگران و شرکت‌های دانش‌بنیان ارائه می‌کند تا معاونت علمی بخشی از هزینه خدماتی که پژوهشگران و شرکت‌های دانش‌بنیان نیاز دارند را تامین کند. این در واقع نوعی تحریک بازار و جذب مشتریان برای عضویت در شبکه آزمایشگاهی است. بندهای (ب) و (ت) ماده ۱۱ قانون جهش دانش‌بنیان مفهومی را با عنوان اعتبار مالیاتی تعریف کرده و معافیت مالیاتی، مشروط به انجام یک فعالیت خاص است؛ به‌عنوان مثال: سرمایه‌گذاری در حوزه دانش‌بنیان. بدین معنا که اگر کسی آزمایشگاهی بسازد، چه خود او استفاده کند چه اینکه به دولت هدیه کند، مشمول این معافیت مالیاتی خواهد شد.

### ● از تعمیر و نگهداری تجهیزات تا به اشتراک‌گذاری خدمات آزمایشگاهی

مجتبی نسب، دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی در این نشست عنوان کرد: «نگرانی که سازمان‌ها در خصوص تعامل با سازمان استاندارد، غذا و دارو، محیط‌زیست، گمرک و دیگر سازمان‌های نظارتی دارند، با ارتباطی که بین شبکه آزمایشگاهی و این سازمان‌ها برقرار است، رفع می‌شود.

وی همچنین در مورد تعمیر و نگهداری تجهیزات آزمایشگاهی افزود: «مرکز نوسازی و تعمیر دستگاه‌های آزمایشگاهی ایران (نوتا) خدمات تعمیر و نگهداری و نوسازی تجهیزات آزمایشگاهی را برعهده دارد و قرار است این موضوع را مدیریت کند.

دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی تاکید کرد: «معاونت علمی و فناوری در انجام فرآیندهایی همچون خرید، تعمیر تجهیزات و به اشتراک‌گذاری خدمات، به سازمان‌های عضو شبکه خدمات ارائه کند. از این رو، کارگزاری برای انجام فعالیت‌های مختلف در شبکه مشخص شده‌است تا اطلاعات با صحت و دقت لازم در سامانه ثبت شود.» نسب افزود: «معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش‌بنیان با توجه به ارتباطات بین‌المللی که دارد می‌تواند تعامل سازمان‌ها با عرصه بین‌الملل اعم از کشورهای اروپایی، آمریکایی و آسیایی را نیز تسهیل کند.

### ● توسعه جریان دانش در شبکه آزمایشگاهی

فعالیت تعداد قابل توجهی از کارشناسان در آزمایشگاه‌های عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی که تجربه کاربری تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی را دارند، موجب شده‌است شبکه آزمایشگاهی



### ● نشست نمایندگان سازمان‌ها و دستگاه‌های دولتی با دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، برگزار شد.

در نشست دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و نمایندگان نهادها و سازمان‌ها، امکان برخورداری از معافیت مالیاتی براساس بندهای (ب) و (ت) ماده ۱۱ قانون جهش تولید دانش‌بنیان، برای مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی مطرح و مقرر شد که سازمان‌هایی که سرمایه‌گذاری در حوزه دانش‌بنیان دارند از این معافیت برخوردار شوند.

هدف از برگزاری نشست «نمایندگان سازمان‌ها و دستگاه‌های دولتی با دبیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی»، آشنایی سازمان‌های دارای مراکز آزمایشگاهی با خدمات و ویژگی‌های شبکه آزمایشگاهی و پیوستن به این شبکه برای تنوع و گسترش خدمات آزمایشگاهی است.

یکی از حمایت‌های معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش‌بنیان ریاست جمهوری از شرکت‌های دانش‌بنیان، پژوهشگران و فعالان فناوری، ارائه تسهیلاتی برای دریافت طیف گسترده خدمات آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است که ذیل شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و توسط صدها مرکز آزمایشگاهی عضو ارائه می‌شود. شبکه آزمایشگاهی با هدف افزایش بهره‌وری زیرساخت‌های آزمایشگاهی کشور و حمایت از توسعه کمی و بهبود کیفی خدمات آزمایشگاهی راه‌اندازی شده‌است.

در این شبکه، خدمات آزمایشگاهی متنوعی مانند حوزه‌های فنی و مهندسی همچون مکانیک، مواد و متالورژی، برق و الکترونیک، شیمی، هوا فضا، معدن، حوزه محیط‌زیست، کشاورزی و گیاهان دارویی، حوزه‌های زیست فناوری و پزشکی مانند داروسازی، سلول‌های بنیادی، مهندسی بافت، حوزه‌های علوم شناختی و مغز، صنایع دستی، مواد غذایی و غیره ارائه می‌شود.

### ● شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی به مثابه یک ابزار مدیریتی و اطلاعاتی

محمد مهدی کرامتی، سرپرست دبیرخانه شورای راهبردی فناوری‌ها و تولیدات دانش‌بنیان، طی سخنانی در این نشست به

آموزشی در این حوزه، با ایجاد بستری مناسب، روابط سازنده‌ای با پژوهشگران و مراکز علمی دیگر کشورها برقرار کرده است. شایان ذکر است که فعالیت‌های بین‌المللی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی با همکاری شبکه آزمایشگاهی بین‌المللی با نشانی اینترنتی [www.IntLabsNet.com](http://www.IntLabsNet.com) انجام می‌شود.

برنامه‌های آموزشی متنوعی را برای ارتقای دانش فنی کارشناسان آزمایشگاه‌ها و پیشبرد جریان دانش در شبکه، در قالب آموزش‌های نظری و کارگاه‌های عملی و نیز دوره‌های آموزش مجازی طرح‌ریزی و اجرا نماید.

## ● کارگاه مدیریت کیفیت و ایمنی در آزمایشگاه در استان آذربایجان غربی برگزار شد

شبکه آزمایشگاهی با هدف آشنایی هر چه بیشتر مدیران کیفیت و کارشناسان آزمایشگاه‌های عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی در سراسر کشور، کارگاه آموزشی «آشنایی با سیستم‌های مدیریت کیفیت و ایمنی در آزمایشگاه‌های آزمون و نمونه‌برداری» را به تفکیک مراکز عضو شبکه در هر استان، در سال ۱۴۰۲ برگزار می‌کند. آشنایی با مفاهیم اصلی استاندارد، ایمنی در آزمایشگاه، عدم قطعیت، صحه‌گذاری، کالیبراسیون، ممیزی داخلی، قواعد تصمیم‌گیری و خطر و مقایسات بین آزمایشگاهی، موضوعات مهمی است که در انجام بهتر آزمون‌های آزمایشگاهی و حصول نتایج دقیق‌تر و نیز در فرآیند استقرار استانداردهای آزمایشگاهی نقش مهمی ایفا می‌کند.

سومین استان میزبان برگزاری این کارگاه در سال ۱۴۰۲، استان آذربایجان غربی است که کارگاه آموزشی مذکور از سوی کارگروه استاندارد و ایمنی شبکه آزمایشگاهی برای آزمایشگاه‌های عضو این شبکه در آن استان، سیزدهم تیرماه به‌صورت مجازی و با حضور ۳۳ نفر از مدیران آزمایشگاه‌ها، مدیران کیفیت و کارشناسان مراکز عضو در آن استان برگزار شد.

در این کارگاه یک روزه، ضمن معرفی استانداردهای ISO/IEC 17043، ISO/IEC 17034، به مبحث ایمنی در آزمایشگاه نیز پرداخته شد. همچنین الزامات استاندارد ISO/IEC 17025 برای حاضرین در جلسه آموزشی تشریح شد و با مفاهیمی همچون محاسبه عدم قطعیت، صحه‌گذاری، کالیبراسیون، مقایسات بین آزمایشگاهی، ممیزی داخلی، قواعد تصمیم‌گیری و خطر در آزمایشگاه آشنا شدند. شایان ذکر است تعداد ۱۷ آزمایشگاه عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی در استان آذربایجان غربی مستقر هستند و در زمینه صنایع غذایی، شیمیایی و معدنی، فناوری‌نانو، پلیمر، محیط‌زیست و کشاورزی، زیست فناوری و علوم شایلاتی خدمات آزمایشگاهی به متقاضیان خدمات ارائه می‌دهند.

کارگاه آموزشی مذکور، ویژه مراکز عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی و به‌صورت جمعی برای آزمایشگاه‌های یک یا چند استان مجاور برگزار خواهد شد.

## ● فعالیت‌های بین‌المللی شبکه آزمایشگاهی

بخش بین‌الملل شبکه آزمایشگاهی با هدف معرفی توانمندی‌های کشور در عرصه جهانی و گسترش همکاری‌های علمی، پژوهشی و

## ● همکاری‌های بین‌المللی شبکه آزمایشگاهی با مالزی توسعه می‌یابد



پنجشنبه ۱۲ مرداد ماه سال ۱۴۰۲، دکتر عبدالرزاق احمد، دستیار وزیر علوم مالزی، طی جلسه‌ای با فعالیت‌ها و برنامه‌های شبکه آزمایشگاهی در ایران آشنا شد. در این جلسه، دکتر اسدی‌فرد، مدیر شبکه آزمایشگاهی، با بیان تاریخچه‌ای از تشکیل شبکه آزمایشگاهی، سیاست‌ها و مدل فعالیت شبکه آزمایشگاهی را تشریح کرد.

همچنین مهندس مجتبی نسب، دبیر شبکه آزمایشگاهی، گزارشی از فعالیت‌ها و برنامه‌های شبکه آزمایشگاهی، چگونگی تعامل بین دبیرخانه شبکه و آزمایشگاه‌های عضو، سازوکار حمایت شبکه آزمایشگاهی از آزمایشگاه‌ها و همچنین حمایت‌های شبکه از دریافت کنندگان خدمات در قالب باشگاه مشتریان را ارائه کرد.

چگونگی سیاست‌گذاری و سازوکارهای حمایت معاونت علمی، فناوری و اقتصاد دانش‌بنیان ریاست جمهوری از شرکت‌های دانش بنیان، از دیگر موضوعات مورد بحث در این جلسه بود.

دکتر عبدالرزاق احمد، دستیار وزیر علوم مالزی، نیز در این جلسه، به اشتراک‌گذاری زیرساخت‌های آزمایشگاهی کشور و تسهیل دسترسی آنها برای پژوهشگران و صنعت و همچنین روش مدیریت انتقال دانش از مراکز دانشگاهی و تحقیقاتی به صنعت و فعالیت شرکت‌های دانش‌بنیان را موفقیتی بزرگ برای ایران دانست و گفت: «برای برقراری ارتباط مستمر و فراهم‌سازی زمینه برای انتقال تجربه ایران به مالزی تلاش خواهیم نمود و پیگیری‌های لازم را به‌منظور برقراری همکاری‌های تخصصی در حوزه آزمایشگاهی بین دو کشور انجام خواهیم داد.»

پس از این جلسه، دکتر عبدالرزاق به همراه دبیر شبکه آزمایشگاهی از نمایشگاه محصولات فناوری‌نانو ایران در محل ستاد فناوری‌نانو بازدید کرد.

## مترجم

الهه اسلامی پور<sup>۱\*</sup>

\*e.eslamipour@gmail.com

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی،  
کارشناس مسئول گروه استاندارد و ایمنی  
ستاد فناوری‌نانو و میکرو

## ارزیابی ساختار ثانویه پروتئین هنگام برهم‌کنش با نانومواد با استفاده از رنگ‌تابی دورانی فراننفش

در حال حاضر در جهان، نانوآشیا و انبوه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها (NOAA)<sup>۱</sup> در مقادیر بالا تولید می‌شوند که کاربردهای متنوعی دارند. هر چند، برهم‌کنش این مواد با سیستم‌های زیستی از جمله پروتئین‌ها می‌تواند نگران‌کننده باشد که منجر به تغییرات برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر در ساختار ثانویه پروتئین‌ها می‌شوند. بروز تغییرات برگشت‌ناپذیر در ساختار پروتئین می‌تواند بر کارکرد و صورت‌بندی پروتئین تأثیرگذار باشد که این تغییرات، به‌نوبه خود ممکن است بر واکنش‌پذیری زیستی کلی پروتئین‌ها نیز تأثیرگذار باشد. بنابراین، پایش بروز چنین تغییراتی می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد برهم‌کنش NOAA با سیستم‌های زیستی فراهم کند.

در یک محیط زیستی، NOAA می‌تواند به‌راحتی با پروتئین‌هایی مانند آپولیپوپروتئین‌ها<sup>۲</sup>، فیبرونکتین<sup>۳</sup>، سرم آلبومین انسانی<sup>۴</sup>، ویترونکتین<sup>۵</sup> و غیره برهم‌کنش ایجاد کند. لایه‌های پروتئینی که به NOAA متصل شده و یا اطراف آن جذب شده باشند، تاج پروتئین<sup>۶</sup> نامیده می‌شود. مشخصات فیزیکی و شیمیایی نانومواد (به‌عنوان مثال، اندازه، مساحت سطح، آب‌گریزی، چگالی بار، شیمی سطح و ریخت‌شناسی) می‌تواند بر برهم‌کنش آن با ترکیبات زیستی محیط اطراف، تأثیر بگذارد. برهم‌کنش احتمالی بین نانومواد و ترکیبات زیستی به کینتیک<sup>۷</sup> کلوخگی و تفکیک پروتئین بستگی دارد. طول عمر کمپلکس‌های ایجاد شده از نانومواد و لیگاند از میکروثانیه تا روز متغیر است. فرآیند تاخوردن پلی‌پتیدها در محیط‌های زیستی، ساختار ثانویه پروتئین‌ها را تولید می‌کند که تعیین‌کننده فعالیت زیستی پروتئین‌ها است. از خصیصه‌های مهم این ساختار می‌توان به وجود پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های هیدروژن آمینی و اکسیژن کربونیل در ساختار پایه پپتیدی و پیوندهای دی‌سولفیدی بین دو واحد سیستئین<sup>۸</sup> اشاره کرد.

زمانی که پروتئین در معرض یون‌های فلزی خاص و ترکیبات فعال زیستی باشد، ساختار ثانویه آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد. علاوه بر این، ساختار ثانویه پروتئین در اثر عواملی مانند بافرهای مختلف با قدرت یونی، مقادیر pH و دما نیز قرار دارد. تغییرات ایجاد شده در کارکرد و صورت‌بندی پروتئین‌ها را می‌توان به ساماندهی مجدد پروتئین (به اصطلاح کژتاب<sup>۹</sup>) و تغییرات در ابعاد کلی مولکولی که با فرآیند تاخوردن ایجاد می‌شود، نسبت داد. برخی

1. Nano-objects and their Aggregates and Agglomerates (NOAA)
2. Apolipoproteins
3. Fibronectin
4. Human Serum Albumin (HAS)
5. Vitronectin

6. Protein corona
7. Kinetic
8. Cysteine
9. Misfolding



بیماری‌ها، مانند اسکروز جانبی آمیوتروفیک<sup>۱۰</sup>، آلزایمر و پارکینسون، نتیجه پروتئین‌های کژتاب هستند. برهم‌کنش نانومواد و پروتئین می‌تواند منجر به تغییرات صورت‌بندی برگشت‌پذیر یا برگشت‌ناپذیر در ساختارهای ثانویه پروتئین‌ها شود. تغییرات جزئی ایجاد شده در ساختار ثانویه پروتئین‌ها پس از برهم‌کنش با نانومواد به‌طور بالقوه برگشت‌پذیر هستند، درحالی‌که تغییرات پایدار می‌توانند برگشت‌ناپذیر باشند. با ثبت طیف رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش<sup>۱۱</sup> می‌توان این تغییرات را پایش کرد.

چندین روش استاندارد برای تعیین ساختارها / صورت‌بندی مولکولی و فرآیند تاخوردن پروتئین و برهم‌کنش آن‌ها با NOAA وجود دارد. این روش‌ها شامل طیف‌سنجی‌های تشدید مغناطیسی هسته‌ای<sup>۱۲</sup>، تبدیل فوریه فروسرخ<sup>۱۳</sup>، طیف‌سنجی رامان و رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش (UV-CD) هستند.

رنگ‌تابی دورانی، روشی مبتنی بر طیف‌سنجی است که براساس تفاوت در میزان جذب نور قطبیده راست‌دوران‌کننده و نور قطبیده چپ‌دوران‌کننده به وسیله مولکول فعال از لحاظ نوری استوار است. منشاء روش طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی، پرتو فرابنفش از یک فرآیند نورفیزیکی با برانگیخته شدن الکترون از حالت پایه به حالت برانگیخته الکترونی است. از طیف‌سنجی UV-CD به‌طور گسترده‌ای در مشخصه‌یابی ساختار ثانویه، ویژگی‌های تاخوردن و اتصال پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در این روش از نور قطبیده استفاده شده و اختلاف بین جذب نور قطبیده دورانی چپ‌گرد و راست‌گرد منجر به ایجاد یک سیگنال UV-CD می‌شود.

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین پروتکل‌های اندازه‌گیری و شرایط آزمون برای تعیین تغییرات ایجاد شده در ساختار ثانویه پروتئین در نتیجه برهم‌کنش با نانومواد با استفاده از طیف‌سنجی رنگ‌تابی دورانی پرتو فرابنفش (UV-CD) است.

این استاندارد برای مشخصه‌یابی تغییرات ایجادشده در صورت‌بندی پروتئین‌های بی‌نظم‌شده، کاربرد ندارد.

این استاندارد ملی با شماره ۲۳۱۰۹ بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی است و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TS 23459: 2021, Nanotechnologies — Assessment of protein secondary structure during an interaction with nanomaterials using ultraviolet circular dichroism.

10. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

11. Ultraviolet-Circular Dichroism (UV-CD)

12. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Fourier-transform infrared (FT-IR)

## نویسندگان

افسون نارویی<sup>۱،۲\*</sup>سیداحمد ظهیرمیردامادی<sup>۲،۳</sup>

۱. کارشناس ارشد شیمی معدنی، مجموعه آزمایشگاه‌های سازمان زمین‌شناسی و اکتشافات معدنی کشور، مرکز زاهدان
۲. کارشناس ارشد مدیریت دولتی، پژوهشگاه مواد و انرژی
۳. عضو کارگروه استاندارد و کالیبراسیون

\*aanarooie7792@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

## عدم قطعیت در فرآیند نمونه‌برداری

### واژه‌های کلیدی

نمونه‌برداری، عدم قطعیت، روش‌ها.

### چکیده

عدم قطعیت در فرآیند نمونه‌برداری، چالشی مهم در علوم آماری و مطالعات تحقیقاتی است. در این مقاله به عوامل مسبب ایجاد خطا و عدم قطعیت در نمونه‌برداری‌ها، تحقیقات و همچنین روش‌های مختلف کاهش عدم قطعیت در آنها بررسی شده است.

### مقدمه

نمونه‌برداری، مرحله‌ای حیاتی و پیش نیاز انجام آزمایش‌های مربوطه بوده که شامل به‌دست آوردن نمونه نماینده از کل مجموعه است و نمونه مورد آنالیز باید نشان دهنده ویژگی‌های کل مجموعه باشد؛ لذا نمونه‌برداری نادرست و یا گرایش‌دار می‌تواند منجر به نتایج و استنتاج‌های نادرست شود. بنابراین، مرحله حیاتی در اطمینان از کیفیت نتایج تجزیه و تحلیلی، مرحله نمونه‌برداری است.

نمونه‌برداری می‌تواند در زمینه‌های مختلف از جمله: محیط‌زیست، خاک، آب، غذا و غیره انجام شود و به خوبی می‌تواند نتایج تحلیلی را تحت تاثیر قرار دهد؛ بنابراین، اطمینان از صحت و دقت نتایج تجزیه و تحلیل به چگونگی نمونه‌برداری بستگی دارد و لازم است که در هر مرحله از فرآیند نمونه‌برداری دقت خاصی لحاظ شود تا عدم قطعیت کاهش یابد.

### نمونه‌برداری در شیمی تجزیه

نمونه‌برداری شیمی تجزیه‌ای، فرآیندی است که در آن نمونه‌هایی از یک ماده به‌منظور آزمایش جمع‌آوری می‌شوند و مرحله‌ای پیشینه و حائز اهمیت در فرآیند تجزیه و تحلیل شیمیایی است؛ بنابراین، این مرحله، فرآیند مهمی در تحقیقات و آزمایش‌ها بوده که انجام

### بیان مساله

زمینه‌های مختلف تحقیقات شامل، نمونه‌برداری در حوزه شیمی تجزیه، محیط‌زیست، خاک، آب و غذا از جمله بررسی‌های این مقاله هستند که به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته‌اند.



## ◆ روش‌های کاهش عدم قطعیت در نمونه‌برداری شیمی تجزیه

چندین روش برای کاهش عدم قطعیت در نمونه‌برداری ذکر شده‌است که از مهم‌ترین آنها می‌توان به موارد زیر توجه نمود:

- ◆ استفاده از نمونه‌های خالی؛
  - ◆ روش‌های نمونه‌برداری آماری؛
  - ◆ سیستم‌های نمونه‌برداری خودکار.
- این روش‌ها می‌توانند به کاهش منابع عدم قطعیت و بهبود دقت و صحت نتایج تجزیه و تحلیلی کمک کنند [۱].

## ◆ کاربردهای نمونه‌برداری در شیمی تجزیه

نمونه‌برداری در حوزه‌های مختلف شیمی تجزیه‌ای، از جمله حوزه‌های آنالیز آب، آنالیز خاک، آنالیز غذا و مطالعات محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این حوزه‌ها، به‌دست آوردن نمونه‌های دقیق و نماینده بسیار مهم است تا کیفیت نتایج تجزیه و تحلیل تضمین شود [۱].

## نمونه‌برداری در حوزه محیط‌زیست

هدف اصلی تحلیل محیط‌زیست، تعیین وضعیت و شرایط محیطی است که در آن نمونه‌برداری انجام می‌شود. برای دستیابی به این هدف، نمونه‌برداری محیط‌زیست بسیار مهم است و در صورت صحیح و دقیق بودن می‌تواند نتایج دقیق و قابل قبولی را تامین کند.

با توجه به اهمیت نمونه‌برداری در تحلیل محیط‌زیست و تاثیر آن بر کیفیت نتایج تحلیلی، لازم است که در هر مرحله از فرآیند نمونه‌برداری به دقت خاصی توجه شود تا عدم قطعیت کاهش یابد. استفاده از روش‌های مناسب نمونه‌برداری و ابزارهای خودکار کنترل کیفیت می‌تواند بهبود قابل توجهی در دقت و صحت نتایج تحلیلی داشته باشد.

## ◆ منابع عدم قطعیت در نمونه‌برداری حوزه محیط‌زیست

- منابع عدم قطعیت در نمونه‌برداری محیط‌زیست می‌تواند شامل موارد زیر باشد:
- ◆ سازوکار نمونه‌برداری؛
  - ◆ میزان نمونه‌برداری (در صورتی که تعداد نمونه‌ها کم باشند احتمال اینکه نمونه‌ها نماینده واقعی محیط‌زیست نباشند، بیشتر است)؛
  - ◆ زمان نمونه‌برداری؛

دقیق آن از اهمیت بسزایی برخوردار است؛ زیرا نمونه‌برداری نادرست می‌تواند منجر به نتایج نادرست شود. بنابراین، نمونه‌برداری یک مرحله حیاتی در اطمینان از کیفیت نتایج تجزیه و تحلیلی است [۱].

## ◆ انواع نمونه‌برداری در شیمی تجزیه

در نمونه‌برداری‌های شیمیایی، نمونه‌برداری به‌صورت نقطه‌ای یعنی جمع‌آوری نمونه از یک نقطه مشخص یا تهیه نمونه‌های توالی از مواد با تغییر شرایط انجام می‌شود.

روش‌های نمونه‌برداری مختلف در شیمی تجزیه شامل نمونه‌برداری تصادفی، نمونه‌برداری قطعی، نمونه‌برداری گروهی و نمونه‌برداری واحد هستند که در ذیل به آنها پرداخته شده‌است:

- ◆ نمونه‌برداری تصادفی: در این روش به‌طور معمول به انتخاب نمونه‌ها به‌طور تصادفی از جمعیت هدف می‌پردازند.
- ◆ نمونه‌برداری غیرتصادفی: شامل انتخاب نمونه‌ها براساس قوانین مشخص هستند، مانند انتخاب نمونه‌ها از مناطق خاص یا انتخاب نمونه‌هایی که نماینده‌های مشخصی از جمعیت هستند.

- ◆ نمونه‌برداری واحد: در این روش، یک نمونه تصادفی از جامعه اولیه انتخاب می‌شود، هر عضو در جامعه فرصت مساوی برای انتخاب دارد و احتمال انتخاب هر عضو برابر است.

- ◆ نمونه‌برداری گروهی: در این روش، جامعه اولیه به چند گروه تقسیم و از هر گروه یک نمونه تصادفی انتخاب می‌شود.
- ◆ نمونه‌برداری قطعی: روشی است که نمونه‌ها به‌طور مستقیم و بدون استفاده از روش‌های تصادفی انتخاب می‌شوند؛ به عبارتی، نمونه‌ها با دقت و استدلال مشخص بدون در نظر گرفتن احتمال انتخاب هر نمونه انتخاب می‌شوند.

هر یک از این روش‌ها بسته به نوع ماده نمونه‌برداری و هدف آنالیز، مزایا و معایب خود را دارند [۲].

## ◆ منابع عدم قطعیت در نمونه‌برداری شیمی تجزیه

منابع عدم قطعیت در نمونه‌برداری می‌توانند شامل موارد ذیل باشند:

- ◆ ناهمگنی ماده مورد نمونه‌برداری؛
  - ◆ سازوکار نمونه‌برداری؛
  - ◆ اندازه و توزیع نمونه؛
  - ◆ شرایط محیطی در هنگام نمونه‌برداری.
- بزرگی این نوع عدم قطعیت بسته به نوع ماده مورد نمونه‌برداری و روش نمونه‌برداری به کار رفته متفاوت است [۱].

تأثیر زیادی خواهد گذاشت.

### ◆ دلایل عدم قطعیت در نمونه برداری خاک

از جمله دلایل عدم قطعیت در نمونه برداری خاک می توان به موارد زیر اشاره نمود:

- ◆ تنوع ویژگی های خاک: (تنوع ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی در هر نقطه از محیط)؛
- ◆ اندازه و تنظیمات نمونه برداری؛
- ◆ تغییر خواص خاک: (تغییر پلاستیسیته و تراکم)؛
- ◆ تنظیمات فنی: (عمق نمونه برداری و تعداد نمونه های برداشته شده)؛
- ◆ روش های نمونه برداری نادرست (به عنوان مثال: استفاده از ابزارهای نامناسب، عدم رعایت قوانین نمونه برداری و انتخاب نقاط نمونه برداری)؛
- ◆ تأثیر محیط زیست: (تأثیر تغییرات دما، رطوبت و فعالیت زندگی جانوری و گیاهی بر ویژگی های خاک)؛
- ◆ عوامل انسانی: (خطاهای انسانی از جمله: تجربه کاری ناکافی، عدم آشنایی کافی با روش های نمونه برداری، عدم دقت در اجرای مراحل نمونه برداری و عدم استفاده از وسایل و تجهیزات مناسب) [۵ و ۶].

### ◆ روش های کاهش عدم قطعیت در نمونه برداری خاک

- راه کارهایی به منظور کاهش عدم قطعیت در نمونه برداری خاک وجود دارند که می توانند شامل موارد زیر باشند:
- ◆ استفاده از روش های استاندارد نمونه برداری (شامل انتخاب نقاط نمونه برداری، تعیین عمق، تعداد نمونه ها و استفاده از ابزارها و تجهیزات مناسب)؛
- ◆ استفاده از فناوری و ابزارهای پیشرفته: (مانند استفاده از روبات ها یا سامانه های خودکار نمونه برداری)؛
- ◆ افزایش تعداد نمونه ها (تکرار نمونه برداری و افزایش تعداد نمونه ها، بیانگر تغییرات مکانی و تنوع ویژگی های خاک در نتایج)؛
- ◆ کنترل عوامل زیست محیطی (نمونه برداری در زمان های مناسب و شرایط ثابت برای کاهش تأثیر عوامل زیست محیطی) [۵ و ۶].

### نمونه برداری حوزه آب

نمونه برداری آب یک فرآیند بسیار مهم و حیاتی در تحلیل و بررسی ویژگی های آب است که نمونه های آب از

ناهماهنگی ماده مورد نمونه برداری؛

- ◆ انتخاب نقاط نمونه برداری (اگر نقاط نمونه برداری به صورت تصادفی انتخاب نشوند، احتمال اینکه نمونه ها نماینده واقعی محیط زیست نباشند، بیشتر است)؛
- ◆ شرایط محیطی و ویژگی های فیزیکی و شیمیایی ماده؛
- ◆ نوع ابزار نمونه برداری؛
- ◆ روش نمونه برداری [۳ و ۴].

### ◆ روش های کاهش عدم قطعیت نمونه برداری در حوزه محیط زیست

- روش های کاهش عدم قطعیت در این نمونه برداری شامل موارد زیر هستند:
- ◆ نمونه برداری تصادفی؛
- ◆ نمونه برداری قانونمند؛
- ◆ نمونه برداری خوشه ای؛
- ◆ نمونه برداری تعدادی؛
- ◆ میزان نمونه برداری مناسب؛
- ◆ استفاده از روش های خودکار نمونه برداری؛
- ◆ استفاده از روش های کنترل کیفیت؛
- ◆ استفاده از ابزارهای نمونه برداری و تجهیزات معتبر [۳ و ۴].

### ◆ کاربردهای نمونه برداری در آنالیز محیط زیست

نمونه برداری در کاربردهای مختلفی در آنالیز محیط زیست مورد استفاده قرار می گیرد از جمله آنالیز آب، خاک، هوا، بررسی اثرات زیست محیطی و تعیین ارزش واقعی زمین ها. در هر یک از این حوزه ها، به دست آوردن نمونه های دقیق و نماینده از مواد مورد آنالیز بسیار مهم است تا کیفیت نتایج تجزیه و تحلیل تضمین شود [۳ و ۴].

### نمونه برداری حوزه خاک

برای بررسی ویژگی های خاک به نمونه برداری خاک به منظور انجام آزمایش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی نیاز داریم. مراحل عمده در نمونه برداری خاک شامل: بررسی موقعیت، آماده سازی ابزارها، تعیین نقاط نمونه برداری، برداشت نمونه ها و نگهداری نمونه ها هستند.

نمونه برداری در این حوزه، فرآیندی بسیار مهم و نیازمند به دقت کافی است زیرا دقت ناکافی منجر به عدم قطعیت می شود که بر نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل نمونه ها



توازن بین سرعت و دقت در نمونه‌برداری [۷].

### نمونه‌برداری حوزه غذا

عدم قطعیت در حوزه نمونه‌برداری برای آنالیز غذا مسئله‌ای مهم است که در فرآیند تجزیه و تحلیل غذا و تعیین میزان مواد مختلف در آن تاثیرگذار است. نمونه‌برداری صحیح و دقیق از غذاها ضروری است تا نتایج آزمایش‌ها معتبر و قابل اطمینان باشند و تصمیم‌گیری‌های صحیحی در مورد کیفیت و ایمنی غذا اتخاذ شود.

#### عوامل عدم قطعیت در نمونه‌برداری غذا

عوامل عدم قطعیت در نمونه‌برداری غذا شامل موارد زیر هستند:

- ♦ انتخاب نقاط نمونه‌برداری؛
  - ♦ تعداد نمونه‌ها؛
  - ♦ روش‌های نمونه‌برداری (تصادفی و غیرتصادفی)؛
  - ♦ شرایط حفظ و نگهداری نمونه‌ها؛
  - ♦ تنوع غذاها؛
  - ♦ تغییرات طبیعی در غذاها؛
  - ♦ مقدار مورد نیاز نمونه‌ها برای آنالیز.
- روش‌های نمونه‌برداری صحیح می‌توانند به کاهش عدم قطعیت در نتایج آزمایش‌ها و تجزیه و تحلیل‌های غذایی کمک کنند. همچنین استفاده از استانداردها و راهنماهای مربوطه، همچون دستورالعمل‌های رسمی نمونه‌برداری غذاها، می‌تواند به بهبود دقت و قابلیت تکرار نتایج کمک کند [۸ تا ۱۱].

#### روش‌های کاهش عدم قطعیت در نمونه‌برداری غذا

- از راهکارهای کاهش عدم قطعیت در نمونه‌برداری غذا می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:
- ♦ استفاده از روش‌های استاندارد نمونه‌برداری؛
  - ♦ تعیین حجم و تعداد نمونه‌ها؛
  - ♦ انتخاب نقاط نمونه‌برداری مناسب؛
  - ♦ استفاده از تجهیزات مناسب؛
  - ♦ روش‌های تقسیم نمونه؛
  - ♦ تجزیه و تحلیل آماری: (محاسبه انحراف معیار، بازه اطمینان و سایر عوامل آماری)؛
  - ♦ انجام آزمایش‌های مکرر: (کمک به تایید قابلیت تکرارپذیری و قابل اعتماد بودن نتایج) [۸ تا ۱۱].

منابع مختلف مانند رودخانه، دریاچه، چاه و یا سایر منابع آبی جمع‌آوری می‌شود. در طول این فرآیند، نمونه‌های آب به‌منظور آزمایش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی جمع‌آوری می‌شوند. با این حال، عدم قطعیت‌های مختلف می‌توانند بر نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل نمونه‌های آب تاثیرگذار باشند.

#### عوامل عدم قطعیت در نمونه‌برداری آب

از جمله عوامل عدم قطعیت در نمونه‌برداری آب می‌تواند موارد زیر باشند:

- ♦ محدودیت‌های مربوط به تجهیزات نمونه‌برداری؛
  - ♦ ناهمگنی طبیعی آب؛
  - ♦ تغییرات زمانی و مکانی ویژگی‌های آب؛
  - ♦ عوامل انسانی مانند تجربه و مهارت نمونه‌برداران.
- این عدم قطعیت‌ها می‌توانند منجر به خطاها و نتایج نادرست در تجزیه و تحلیل نمونه‌های آب شوند [۷].

#### روش‌های کاهش عدم قطعیت در نمونه‌برداری آب

- راهکارهای کاهش عدم قطعیت در نمونه‌برداری آب شامل موارد زیر هستند:
- ♦ استفاده از استانداردهای نمونه‌برداری: (روش‌های استاندارد در خصوص نمونه‌برداری، فرآیندهای تهیه نمونه، چگونگی نگهداری و حمل نمونه)؛
  - ♦ بهینه‌سازی روش نمونه‌برداری: (استفاده از روش‌های نمونه‌برداری تصادفی و منظم، نمونه‌برداری زمانی یا مکانی، تعیین تعداد نمونه‌ها و محل‌های نمونه‌برداری بهینه، استفاده از روش‌های آماری و روش‌های مدل‌سازی مناسب)؛
  - ♦ استفاده از روش‌های تحلیلی پیشرفته: (استفاده از مدل‌های آماری، روش‌های محاسباتی پیشرفته و استفاده از روش‌های پایش)؛
  - ♦ اعتبارسنجی و تحلیل داده‌ها: (شامل بررسی توزیع داده‌ها، تحلیل تغییرات زمانی و مکانی، استفاده از تحلیل خطا، روش‌های رگرسیون و تحلیل عاملی)؛
  - ♦ کنترل کیفیت دقیق‌تر: (شامل استفاده از تجهیزات نمونه‌برداری معتبر، کالیبراسیون دوره‌ای تجهیزات، پایش و ثبت دقیق عوامل نمونه‌برداری)؛
  - ♦ بررسی و کاهش فرآیندهای خطا: (بررسی دقیق تجهیزات استفاده شده، کنترل دمای محیط، استفاده از روش‌های صحیح برای پیش آماده‌سازی نمونه‌ها و حفظ شرایط حمل و نقل مناسب)؛
  - ♦ بهبود مهارت‌های نمونه‌برداران: (آموزش روش‌های مناسب نمونه‌برداری، استفاده از تجهیزات و ابزارهای مورد نیاز،

## نتیجه‌گیری

نمونه‌برداری مرحله‌ای حیاتی در تجزیه و تحلیل است که در اطمینان از کیفیت نتایج بسیار مهم است. با درک روش‌های مختلف نمونه‌برداری، منابع عدم قطعیت در نمونه‌برداری، روش‌های استفاده شده و ابزارهای خودکار کنترل کیفیت برای کاهش این عدم قطعیت، تحلیل‌گران می‌توانند نمونه‌های دقیق و نماینده برای آنالیز بعدی و بهبود قابل توجهی در دقت و صحت نتایج تحلیلی به‌دست آورند.

## مراجع

- [1] Uncertainty in analytical chemistry: A review, Paul De Bievre, Claude M. V. Cremers, Marianne H. M. Emons, Joze Stupar, Pure and applied chemistry, 2006, Doi: 10.1351/pac200678040673.
- [2] A survey of sampling techniques in machine learning, John Doe, Jane Smith, Machine learning review, 2020.
- [3] Uncertainty in environmental sampling: Concepts, Methods, and Applications, Jianrong Li, Daniel A. Valero, Environmental Science & Technology, 2018, DOI: 10.1021/acs.est.7b05197.
- [4] Uncertainty in environmental sampling and analysis, David B. Chambers, Brian G. Miller. CRC press, 2012, ISBN: 978-1-4398-0480-0.
- [5] Uncertainty in soil sampling: A review and analysis, John. Smith, Emily. Johnson, journal of soil science, 2022.
- [6] Uncertainty analysis in soil sampling: A review, V. Viscarra Rossel, A. B. McBratney, Geoderma journal, 2010, 340-329.
- [7] Uncertainty in water sampling: Challenges and mitigation strategies, Sarah, Anderson, Michael, Wilson, Environmental science and technology, 2021.
- [8] Uncertainty in food sampling: Strategies and challenges, Efsthios Z. Panagou, Maria G. Katsikogianni, Trends in food science & technology, 62, 2017.
- [9] Sampling and sample preparation for food analysis, Ronald E. Wrolstad, S. Suzanne Nielsen, Food analysis, 3, 2010.
- [10] Uncertainty of measurement in food microbiology, John N. Sofos, George-John E. Nychas, International journal of food microbiology, 67, 2001.
- [11] Sampling in food safety and quality: The importance of sample size, Martin D. Smith, Daniel L. Gallagher, Trends in food science & technology, 32, 2013.



## نویسنده

فهمیه نوری کوهانی<sup>۱</sup>\*

۱. دکتری فیزیک، گروه فیزیک دانشگاه قم

\*aanarooie7792@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲

## تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در آزمون ضربه شارپی

## واژه‌های کلیدی

عدم قطعیت، آزمون ضربه، شارپی، تکرارپذیری، عدم قطعیت نوع A و B.

## چکیده

همیشه در اندازه‌گیری یک کمیت، خطاها و عدم قطعیت‌هایی در گزارش اندازه نهایی وجود دارد به خصوص اگر این اندازه‌گیری با تجهیزات آزمایشگاهی انجام شود. به این منظور، بررسی و ارزیابی عوامل ایجاد عدم قطعیت در مقدار نهایی، همیشه می‌تواند به مقدار دقیق‌تری منجر شوند. از این رو، در این مقاله پژوهشی-میدانی به بررسی عوامل ایجاد کننده خطا و عدم قطعیت در مقدار نهایی، در آزمون ضربه شارپی که آزمونی پرکاربرد در اندازه‌گیری انرژی جذب‌شده توسط مواد مختلف به‌عنوان مثال: فولاد در ساخت لوله‌های فولادی به‌منظور استفاده در انتقال آب، گاز و نفت است، پرداخته شده‌است. عدم قطعیت دستگاه به همراه عدم قطعیت حاصل از تکرارپذیری، محاسبه و در نهایت، برای یک دستگاه آزمون شارپی نتایج عددی به مقدار انرژی جذب‌شده ۲/۱۸۵ ژول، با عدم قطعیت بسط‌یافته ۴/۰۷۸ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، با در نظر گرفتن درجه آزادی آزمون محاسبه شد. با توجه به محاسبات انجام شده، سهم عدم قطعیت تکرارپذیری نسبت به دیگر عوامل عدم قطعیت بیشتر است.

## مقدمه

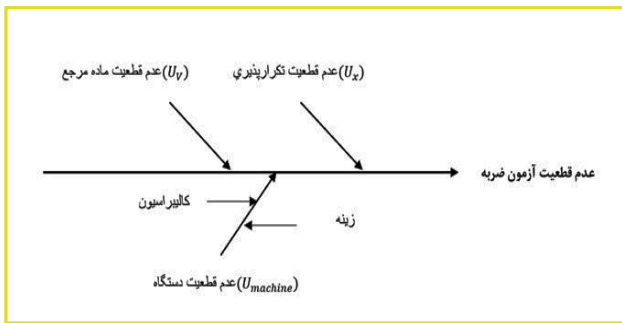
به‌طور معمول، چند دستگاه آزمایشگر مهم در صنایع فولاد وجود دارد. از جمله این آزمون‌ها می‌توان به آزمون ضربه، کشش و خمش اشاره کرد. رویکرد این مقاله، بررسی علت‌های مختلف بروز عدم قطعیت در آزمون ضربه است. آزمون ضربه به بررسی چقرمگی<sup>۱</sup> یا همان قابلیت جذب انرژی ضربه در نمونه لوله فلزی یا نمونه لوله جوش کاری شده می‌پردازد [۱]. این مقاله به پژوهشگران و مهندسين در آزمایشگاه کمک خواهد کرد تا بتوانند در انجام آزمون ضربه شارپی، عوامل ایجاد خطا و عدم قطعیت را بهتر ردیابی و شناسایی کرده و گزارش‌های دقیق‌تری تهیه کنند.

هستند. در آزمون ضربه شارپی، نمونه به‌صورت یک تیر با تکیه‌گاه ساده تعبیه شده و ضربه در میانه دهانه تیر، درست پشت محل شیار وارد می‌شود. نمونه‌های آزمون شارپی را می‌توان با شیار (V) شکل و یا (U) شکل تهیه کرد. آزمون ضربه شارپی برای ارزیابی خواص ضربه‌ای در دماهایی غیر از دمای محیط نیز مناسب است؛ زیرا لازم نیست نمونه آزمایش در گیره بسته شود [۲].

موارد دیگری که از آزمون ضربه شارپی می‌توان به‌دست

## اصول کلی و روش اجرایی آزمون

آزمون ضربه روشی برای به‌دست آوردن انرژی جذب‌شده مواد در اثر تنش دینامیکی است. اطلاعاتی که از این آزمون به‌دست می‌آید، در درک چگونگی رفتار ماده در موقعیت‌های کاربردی واقعی بسیار کمک کننده است. مهم‌ترین و متداول‌ترین روش‌های آزمون ضربه، دو روش آیزود<sup>۲</sup> و شارپی<sup>۳</sup>



شکل (۱): نمودار استخوان ماهی عدم قطعیت آزمون ضربه شاری براساس تحلیل عوامل ایجاد عدم قطعیت در این آزمون.

مقدار متوسط انرژی جذب شده ( $KV$ ) با رابطه (۱) تعریف می‌شود که اندیس ( $V$ ) نشانگر ناچ یا شکاف ( $V$ ) شکل روی نمونه، قبل از آزمون و در مرحله آماده‌سازی ضربه است [۷]:

#### رابطه (۱)

$$KV = \bar{x} - B_V - T$$

که در آن:

( $\bar{x}$ ): متوسط انرژی جذب شده ( $n$ ) نمونه آزمایش، ( $B_V$ ): گرایش ماشین براساس تأیید غیرمستقیم و ( $T$ ): گرایش دما است که در این مقاله به دلیل اینکه مقدار گرایش دما مربوط به آماده‌سازی نمونه است و رویکرد این مقاله، بررسی عدم قطعیت‌های خود آزمون شاری است، به آن پرداخته نمی‌شود [۳].

#### تکرارپذیری

به‌طور معمول، عمده‌ترین عامل عدم قطعیت، تکرارپذیری است که از طریق انحراف استاندارد و تکرارپذیری نتایج یک سری اندازه‌گیری مشخص می‌شود؛ در نتیجه، عدم قطعیت تکرارپذیری ماشین  $U(\bar{x})$  با استفاده از رابطه (۲) تعیین می‌گردد:

#### رابطه (۲)

$$U(\bar{x}) = \frac{S_X}{\sqrt{n}}$$

که در آن:

( $n$ ): تعداد نمونه‌های آزمایش شده در تکرار و ( $S_X$ ): انحراف استاندارد است که با استفاده از رابطه (۳) به‌دست می‌آید:

#### رابطه (۳)

$$S_X = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

که در آن:

( $x_i$ ): مقدار انرژی جذب شده نمونه آزمایش شده و ( $\bar{x}$ ):

آورد، سطح شکست و شکل‌پذیری است. در سطح شکست، نوع شکست به‌صورت رشته‌ای (شکست برشی)، دانه‌ای (شکست رخ برگری) و یا مخلوطی از هر دو تعیین می‌شود و در شکل‌پذیری، درصد انقباض نمونه در محل شیار نشان داده می‌شود [۳]. در این مقاله، آزمون ضربه و عواملی که در این آزمون موجب ایجاد عدم قطعیت می‌شوند مورد ارزیابی قرار گرفته است.

### ارزیابی عدم قطعیت

عدم قطعیت در اندازه‌گیری، از عوامل و مولفه‌های زیادی ناشی می‌شود. در بیشتر موارد، این مولفه‌ها را می‌توان از توزیع آماری یا تکرارپذیری نتایج یک سری اندازه‌گیری، تخمین و از طریق انحراف استاندارد مشخص کرد ولی از روش‌های دیگر به غیر از توزیع آماری مانند توزیع‌های فرضی احتمال بر پایه تجربه یا دیگر اطلاعات نیز تخمین زده می‌شوند که روش اول نوع  $A$  و روش دوم نوع  $B$  محاسبه عدم قطعیت هستند [۴].

### منابع عدم قطعیت

عدم قطعیت در یک آزمون، از منابع احتمالی زیادی ناشی می‌شود به‌عنوان مثال، خطاهای کاربر، اندازه‌گیری اندازه‌ده، شرایط اندازه‌گیری، تجهیزات حجم‌سنجی و جرم‌سنجی، تخمین‌ها و فرض‌های به‌کار گرفته شده همگی باعث ایجاد عدم قطعیت در گزارش مقدار اندازه‌ده می‌شوند. آزمون شاری به دلیل در نظر گرفتن مقدار انرژی جذب نمونه در اثر ضربه، مقدار عدم قطعیت متفاوتی نسبت به آزمون‌های مورد استفاده در آزمایشگاه دارد. عدم قطعیت در اندازه‌گیری انرژی جذب به‌صورت مستقیم با ضربه زدن یا در اصطلاح شکاندن نمونه‌های مورد نظر به‌عنوان تکرارپذیری و غیرمستقیم با نمونه‌های مرجع و گواهی کالیبراسیون محاسبه می‌شود.

استانداردهای مربوط به این آزمون را براساس مقدار انرژی جذب‌شده به دسته‌های متفاوت تقسیم‌بندی می‌کنند. در استاندارد ISO148-1 مقداری بیشتر از ۴۰ ژول و کمتر از ۴۰ ژول و در استاندارد ASTM A370 درجه‌بندی به‌صورت کمتر از (۱۳-۲۰ ژول)، بیشتر از (۸۸-۱۳۶) و فوق‌العاده بالا (۱۷۶-۲۴۰) تقسیم‌بندی شده‌است. بر این اساس، عوامل موثری که در عدم قطعیت اندازه‌گیری بایاس و قدرت تفکیک ماشین به‌دست آمده از تأیید غیر مستقیم و همگن مواد مرجع آزمایش و تکرارپذیری ماشین است. همان‌گونه که در نمودار استخوان ماهی شکل (۱) مشاهده می‌شود، عوامل عمده در عدم قطعیت آزمون ضربه شاری، از عدم قطعیت نمونه مرجع دارای گواهی‌نامه کالیبراسیون<sup>۴</sup>، ماشین آزمون شاری که دارای گواهی کالیبراسیون است و در نهایت، تکرارپذیری، ناشی می‌شود [۵ و ۶].

میانگین مقدار انرژی جذب شده ( $n$ ) نمونه است [۸].

#### ● عدم قطعیت غیرمستقیم ماشین

مقدار بایاس ماشین که به طور غیرمستقیم از دستگاه به دست می آید، از عوامل موثری است که به ایجاد عدم قطعیت در اندازه گیری کمک می کند و این عدم قطعیت در آزمون ضربه شاری، با تأیید غیرمستقیم تعیین می شود. بایاس غیرمستقیم ماشین براساس استاندارد ISO 148-2 و مطابق با رابطه (۴) تعریف شده است [۹]:

#### رابطه (۴)

$$B_V = KV_v - KV_R$$

که در آن:

$(KV_v)$ : مقدار میانگین نمونه های آزمایش مرجع شکسته شده در طی تأیید غیرمستقیم و  $(KV_R)$ : مقدار تأیید شده از ماده مرجع است. مقدار عدم قطعیت گرایش دستگاه با استفاده از رابطه (۵) محاسبه می شود:

#### رابطه (۵)

$$U(B_V) = \sqrt{U_v^2(x) + U_{CRM}^2}$$

که در آن:

$(U_v(\bar{X}))$ : عدم قطعیت استاندارد نتایج تأیید غیرمستقیم و  $(U_{CRM})$ : عدم قطعیت گواهی کالیبراسیون ماده مرجع است که به کمک رابطه (۶) بدست می آید:

#### رابطه (۶)

$$U_v = \sqrt{U^2(B_V) + B_V^2}$$

که در آن:

$(B_V)$ : گرایش ماشین براساس تأیید غیرمستقیم و  $(U_v)$ : عدم قطعیت استاندارد نتایج تأیید غیرمستقیم است [۵].

#### ● عدم قطعیت مستقیم ماشین

تأثیر عدم قطعیت مستقیم ماشین در بیشتر موارد در مقایسه با سایر مشارکت های عدم قطعیت ناچیز است. در این حالت، سهم عدم قطعیت مربوط به ماشین  $u(r)$  با استفاده از رابطه (۷) محاسبه می شود:

#### رابطه (۷)

$$u(r) = \sqrt{\left(\frac{U_r}{k\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{U_{cal}}{k}\right)^2}$$

که در آن:

$u(r)$ : قدرت تفکیک و  $(U_{cal})$ : عدم قطعیت کالیبراسیون ماشین ذکر شده در گواهی کالیبراسیون است.

مقدار عدم قطعیت قدرت تفکیک و کالیبراسیون بر عدد ( $k$ ) که ضریب اطمینان نام دارد تقسیم می شود. به طور معمول، به دلیل اینکه در گواهی کالیبراسیون مقدار عدم قطعیت بسط یافته با ضریب اطمینان ( $k$ ) گزارش می شود، در نتیجه این ضریب در محاسبات در نظر گرفته می شود. همچنین توزیع عدم قطعیت کالیبراسیون نرمال بوده و توزیع عدم قطعیت قدرت تفکیک مستطیلی است [۵].

#### ● عدم قطعیت ترکیبی و گسترش یافته

به منظور محاسبه مقدار عدم قطعیت ترکیبی اندازه گیری آزمون ضربه شاری  $U_{combined}(KV)$  عوامل مؤثر در عدم قطعیت آزمون باید با رابطه (۸) ترکیب شوند:

#### رابطه (۸)

$$U_{combined}(KV) = \sqrt{u^2(\bar{x}) + u_v^2 + u^2(r)}$$

در نهایت، مقدار عدم قطعیت گسترش یافته  $U_{combined}(KV)$ ، اندازه گیری آزمون ضربه شاری با استفاده از رابطه (۹) محاسبه می شود:

#### رابطه (۹)

$$U_{expanded}(KV) = k U_{combined}(KV) \\ = t_{95}(v_{KV}) U_{combined}(KV)$$

عبارت  $t_{95}(v_{KV})$  مقدار کسری با سطح اطمینان حدود ۹۵ درصد مربوط به درجه آزادی آزمون شاری است. درجه اندازه گیری مقدار آزادی  $(KV_v)$  باید با استفاده از رابطه (۱۰) محاسبه شود:

#### رابطه (۱۰)

$$v_{KV} = \frac{u^4(\bar{KV})}{\frac{u^4(\bar{x})}{v_{\bar{x}}} + \frac{u_v^4}{v_v}}$$

که در آن:

$(V_v)$ : درجات آزادی مربوط به  $u_v(u_v)$  و  $u_{\bar{x}}$ : درجه آزادی مربوط به  $u(\bar{x})$  است [۵ و ۱۰].

سپس مقدار کسری مربوط به درجات آزادی محاسبه شده با رابطه (۱۰) و دارای سطح اطمینان ۹۵ درصد تعیین می شود. در جدول (۱) مقادیر کسر  $t_{p(v)}$  مربوط به درجات اندازه گیری آزادی ذکر شده است [۵].



جدول (۱): تعیین مقدار  $t_p(V)$  با توجه به درجه آزادی [۵].

درجه آزادی، $v$	$t_p(V)$ برای ۹۵ درصد $P$
۱	۱۲/۷۱
۲	۴/۳۰
۳	۳/۱۸
۴	۲/۷۸
۵	۲/۵۷
۶	۲/۴۵
۷	۲/۳۷
۸	۲/۳۱
۹	۲/۲۶
۱۰	۲/۲۳
۱۱	۲/۲۰
۱۲	۲/۱۸
۱۳	۲/۱۶
۱۴	۲/۱۴
۱۵	۲/۱۳
۱۶	۲/۱۲
۱۷	۲/۱۱
۱۸	۲/۱۰
۱۹	۲/۰۹
۲۰	۲/۰۹
۲۵	۲/۰۶
۳۰	۲/۰۴
۳۵	۲/۰۳
۴۰	۲/۰۲۲
۴۵	۲/۰۱
۵۰	۲/۰۱
۱۰۰	۱/۰۹۸
$\infty$	۱/۰۹۶

ارزیابی فولاد مورد استفاده در زمینه تولید لوله‌های انتقال آب، نفت و گاز از آزمون ضربه شاری استفاده می‌شود. طبق استاندارد AWWA C200، فولاد مورد استفاده در آزمون شاری باید دارای ضخامت و ابعادی مشخص برابر با  $10 \times 5 \times 5$  mm باشد و به‌طور معمول در این کارخانه، از نمونه‌هایی با فولادهایی براساس استاندارد ASTM A570 با گرید ۴۵ و ۵۰ با ابعادی مطابق با استاندارد استفاده می‌شود [۱۱].

### تکرارپذیری

تکرارپذیری شامل عدم قطعیت آماری نوع A است. در شرایط یکسان به تعداد ۱۰ بار، نمونه‌های آماده شده مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج به‌دست آمده از انرژی جذب‌شده در جدول (۲) آورده شده‌است. با تجزیه و تحلیل نتایج بعد از انجام محاسبات مربوط به انحراف استاندارد نتایج، عدم قطعیت تکرارپذیری را محاسبه و داده‌های مورد نظر در این جدول ثبت شده‌است.

جدول (۲): نتایج تکرارپذیری آزمون ضربه شاری براساس آزمون‌هایی که با استفاده از دستگاه آزمون انجام شده‌است.

آزمون	آزمون (J, $k_v$ )	میانگین	انحراف استاندارد	عدم قطعیت آماری / نوع A
۱	۱۸۰/۱			
۲	۱۸۸/۲			
۳	۱۸۹			
۴	۱۸۵/۳			
۵	۱۸۳/۸	۱۸۵/۲۸	۳/۳۵	۱/۶۹
۶	۱۸۰/۱			
۷	۱۸۹			
۸	۱۸۵/۳			
۹	۱۸۸/۲			
۱۰	۱۸۳/۸			

### عدم قطعیت غیرمستقیم ماشین

به‌منظور محاسبه مقدار عدم قطعیت ماشین به‌صورت غیرمستقیم از تکرارپذیری و گواهی کالیبراسیون ماده مرجع استفاده می‌شود. برای محاسبه تکرارپذیری ماده مرجع، ۵ ماده مرجع را به‌عنوان نمونه در معرض ضربه قرار داده و می‌شکنند و انرژی جذب شده آنها یادداشت می‌شود که نتایج آن در جدول (۳) آورده شده‌است.

### نتایج و بحث

داده‌ها و نتایج استفاده شده در این مقاله براساس نتایج آزمون یک دستگاه ضربه شاری به‌دست آمده است. به‌منظور

جدول (۳): نتایج به دست آمده از عدم قطعیت غیرمستقیم ماشین که اندازه گیری شده است.

منابع ایجاد عدم قطعیت غیرمستقیم	مقادیر استخراج شده	میانگین	نوع توزیع	انحراف از استاندارد	عدم قطعیت	بی بعدسازی
گواهی کالیبراسیون ماده مرجع، مقدار ۱۴۸ ژول	۵	-	۲/نرمال	-	۲/۵	$\frac{148}{2/5} = 0.017$
-	۱۴۸/۵	-	-	-	-	-
-	۱۴۹	-	-	-	-	-
تکرارپذیری ماده مرجع	۱۵۰/۱	۱۵۰/۲۳	نرمال ( $U_{Repet-CRM} = \frac{s}{n}$ )	۱/۸۱	۰/۸۱	-
-	۱۵۳/۱	-	-	-	-	-
-	۱۵۰/۹	-	-	-	-	-

#### رابطه (۱۴)

$$u(r) = \sqrt{\left(\frac{U_r}{k\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{U_{cal}}{k}\right)^2}$$

$$= \sqrt{0.0288^2 + 0.05^2} = 0.06$$

تمامی اعداد در این مقاله براساس استاندارد ASTM E29 گرد شده اند. به منظور محاسبه مقدار عدم قطعیت ترکیبی اندازه گیری آزمون ضربه شاری  $U_{combined}(KV)$ ، عوامل مؤثر در عدم قطعیت آزمون با استفاده از رابطه (۱۵) به دست می آید:

#### رابطه (۱۵)

$$U_{combined}(K_V) = \sqrt{u^2(\bar{x}) + u_V^2 + u^2(r)}$$

$$= \sqrt{1.69^2 + 0.8^2 + 0.06^2} = 1.871$$

درجه اندازه گیری مقدار آزادی  $KV_V$  با استفاده از رابطه (۱۶) محاسبه می شود که در آن  $V(\bar{x}) = 9$  درجه آزادی تکرارپذیری و  $V_V = 3$  براساس گواهی کالیبراسیون است:

#### رابطه (۱۶)

$$v_{\bar{K}_V} = \frac{u^4(\bar{K}_V)}{\frac{u^4(\bar{x})}{v_{\bar{x}}} + \frac{u_V^4}{v_V}} = 11.75$$

براساس جدول (۱) مقادیر کسر  $t_{p(V)}$  مربوط به درجات آزادی اندازه گیری شده برابر با ۲/۱۸ است؛ بنابراین، مقدار عدم قطعیت گسترش یافته  $U_{combined}(K_V)$ ، اندازه گیری آزمون ضربه شاری با استفاده از رابطه (۱۷) محاسبه می شود:

#### رابطه (۱۷)

$$U_{expended}(K_V) = t_{95}(v_{\bar{K}_V})U_{combined}(K_V) = 4.078$$

با توجه به اطلاعات جدول (۳)، عدم قطعیت گرایش ماشین با استفاده از رابطه (۱۱) که برای جمع دو مقدار عدم قطعیت از دو منبع متفاوت است، به دست می آید:

#### رابطه (۱۱)

$$U_{B_V} = \sqrt{U_{CRM}^2 + U_{Repe-CRM}^2} = 0.016$$

و برای محاسبه گرایش ماشین براساس تایید غیرمستقیم با تفاضل مقدار انرژی جذب ماده مرجع در گواهی کالیبراسیون و میانگین انرژی جذب از طریق تکرارپذیری می توان از رابطه (۱۲) استفاده نمود:

#### رابطه (۱۲)

$$B_V = 2.32 J$$

همچنین با بی بعدسازی آن در نهایت، مقدار عدم قطعیت غیرمستقیم ماشین به کمک رابطه (۱۳) به این صورت به دست می آید:

#### رابطه (۱۳)

$$U_V = \sqrt{U^2(B_V) + B_V^2} = 0.8$$

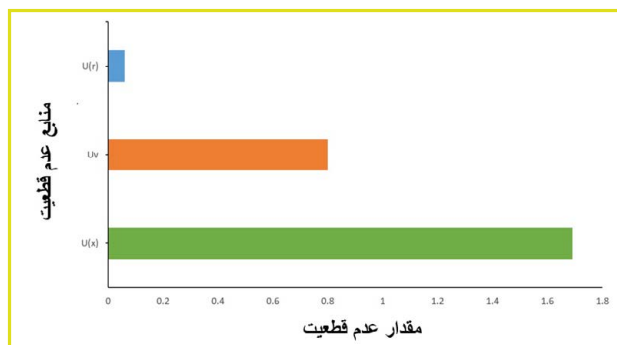
### عدم قطعیت مستقیم ماشین

آخرین منبع ایجاد عدم قطعیت در این آزمون که به آن پرداخته می شود، عدم قطعیت مستقیم ماشین از روی گواهی کالیبراسیون است. براساس گواهی کالیبراسیون مقدار قدرت تفکیک ماشین ۰/۱ ژول با توزیع مستطیلی و مقدار عدم قطعیت کالیبراسیون آن ۰/۱ با توزیع نرمال با ضریب اطمینان  $k=2$  گزارش شده است که با استفاده از رابطه (۱۴)، به این صورت به دست می آید:

## پیش‌گزینی

در این مقاله به بررسی منابع عدم قطعیت آزمون ضربه شارپی که آزمونی پرکاربرد در کارخانه‌هایی همچون کارخانه‌های لوله‌سازی به‌منظور انتقال آب و فاضلاب که با صنعت فولاد در ارتباط هستند، پرداخته شد و به‌طور دقیق به معرفی عوامل ایجاد عدم قطعیت در این آزمون خاص که عدم قطعیت ماشین آن از دو روش مستقیم و غیرمستقیم به‌دست می‌آید، بررسی شد و در نهایت، برای آزمون انجام شده نتایج عددی به مقدار انرژی جذب‌شده ۱۸۵/۲، با عدم قطعیت بسط یافته ۴/۰۷۸ و با ضریب اطمینان ۹۵ درصد گزارش شد. همچنین با توجه به اطلاعات به‌دست آمده، سهم عدم قطعیت تکرارپذیری نسبت به دیگر عوامل عدم قطعیت بیشتر است.

در انتها پس از بررسی عوامل عدم قطعیت، مقدار عدم قطعیت انرژی جذب‌شده آزمون ضربه شارپی با مقدار میانگین ۱۸۵/۲ ژول با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، ۴/۰۷۸ به‌دست آمده است. در شکل (۲) به کمک نمودار، سهم عوامل ایجاد عدم قطعیت بررسی شده‌است و همان‌گونه که انتظار می‌رفت، سهم عدم قطعیت تکرارپذیری نسبت به بقیه بیشتر است.



شکل (۲): نمودار سهم عوامل ایجاد عدم قطعیت در آزمون ضربه شارپی براساس نتایج محاسبه شده در این مقاله.

## پی‌نوشت

1. Toughness
2. Izod
3. Charpy
4. Certificate reference materials (CRM)

## مراجع

- [1] Yasa E, Deckers J, Kruth JP, Rombouts M, Luyten J. Charpy impact testing of metallic selective laser melting parts. Virtual and physical prototyping. 2010 Jun 1;5 (2):89-98.
- [2] Abidin NM, Sultan MT, Shah AU, Safri SN. Charpy and Izod impact properties of natural fibre composites. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 2019 Nov 1 (Vol. 670, No. 1, p. 012031). IOP Publishing.
- [3] John V. Testing of materials. Macmillan; 1992.
- [4] ASTM International. Standard practice for using significant digits in test data to determine conformance with specifications. ASTM International; 2013.
- [5] ISO 148-1: 2016. Metallic Materials—Charpy Pendulum Impact Test—Part 1: Test Method. BSI Standards Limited, UK. 2016.
- [6] American Society for Testing and Materials. Committee A-01 on Steel, Stainless Steel and Related Alloys. Standard test methods and definitions for mechanical testing of steel products. ASTM International; 2017.
- [7] STANDARD S. Metallic Materials—Charpy Pendulum Impact Test—Part 3: Preparation and Characterization of Charpy V-Notch Test Pieces for Indirect Verification of Pendulum Impact Machines (SS-EN ISO 148-3: 2008).
- [8] Ellison SL, Williams A. Quantifying uncertainty in analytical measurement.
- [9] Varma RK, Loveday MS. The validation of the draft standard for instrumented impact testing (IIT) of metallic materials version 10: 1994. In European Structural Integrity Society 2002 Jan 1 (Vol. 30, pp. 181-188). Elsevier, 148-2
- [10] Aydemir B. Uncertainty Analysis in the Notch Impact Test, for Materials with Different Energy Levels. Acta Polytechnica Hungarica. 2021 Jan 1;18 (7).
- [11] Bambei, Jr JH, Keil B. Revision of the AWWA C200 Steel Water Pipe Manufacturing Standard: Consensus-Based Changes Mark Significant Improvements. In Pipelines 2013: Pipelines and Trenchless Construction and Renewals—A Global Perspective (pp. 398-410).



## نویسنده

سحر صالحی<sup>۱\*</sup>

۱. دکتری مهندسی مواد، آزمایشگاه مرکزی  
مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی  
۲. دبیر کارگروه آنالیز حرارتی

\*Sah.salehi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸



## تعیین خلوص مواد با استفاده از دستگاه گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)

## واژه‌های کلیدی

آنالیز حرارتی، معادله وانت هوف، خلوص.

## چکیده

محققان و پژوهشگران به منظور آنالیز حرارتی و بررسی رفتار مواد مختلف در هنگام مواجهه با تغییرات دمایی، بیشتر از روش آنالیز گرماسنج روبشی تفاضلی (DSC)<sup>۱</sup> استفاده می‌کنند؛ در حالی که این روش، جنبه‌های کاربردی دیگری را هم دارد. یکی از این کاربردها، تعیین خلوص مواد بوده که در تهیه مواد مرجع و یا صنعت دارویی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مقاله، به بررسی روش تعیین خلوص مواد از طریق دستگاه گرماسنجی پرداخته می‌شود. این روش در مقایسه با سایر روش‌ها، ارزان قیمت‌تر و سریع‌تر بوده و دقت قابل قبولی نیز دارد.

## مقدمه

توسعه و تولید محصولات دارویی کاری چالش برانگیز و دشوار است که فن‌آوران دارویی در حوزه‌های مختلف را درگیر می‌کند. توسعه و ساخت فرآورده‌های دارویی، فرآیندی پیچیده است. فرمولاسیون‌های دارو که به عنوان یک دوز کامل تعریف می‌شوند و مواد فعال دارویی<sup>۲</sup> هستند برای استفاده انسانی یا دامپزشکی در نظر گرفته شده‌است. ماده فعال یا ترکیبی از مواد فعال دارویی برای تسهیل فعالیت دارویی یا استفاده در تشخیص پزشکی، درمان و یا پیشگیری از بیماری طراحی شده‌اند [۱].

علاوه بر مواد فعال دارویی، محصولات دارویی، حاوی مواد کمکی به نام اکسپینت<sup>۳</sup> هستند که باعث افزایش پایداری و فراهمی زیستی داروی تولید شده می‌شوند. اکسپینت همچنین ممکن است مزه‌ها یا بوهای ناخوشایند را در مواد فعال دارویی بپوشاند یا ظاهری زیباتر به دارو بدهد. جایجایی مناسب مواد کمکی، از استفراغ و حالت تهوع جلوگیری می‌کند و تهیه محصولات دارویی که در برابر مایعات معده مقاوم هستند را امکان‌پذیر می‌سازد. بیشتر فرآورده‌های دارویی در شکل‌های جامد مانند قرص‌های کلاسیک (پوشش‌دار یا بدون پوشش)، قرص‌هایی با اثر طولانی مدت (رهش کنترل شده)، کپسول‌های حاوی پودر یا گرانول با رهش طولانی مدت یا شیاف‌ها در بازار دارویی موجود هستند.

توسعه و تولید محصولات دارویی نهایی کارآمد، ایمن و پایدار که برای مصرف بیماران راحت باشد، نیاز به

## مقدمه

دانش حرفه‌ای آنالیز و فناوری دارویی دارد. در مرحله اول توسعه، شکل دوز دارو (پیش فرمولاسیون)، مهم‌ترین موضوعی که باید به آن پرداخته شود، توصیف ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مواد فعال دارویی است [۲].

علاوه‌بر عواملی که برای ارزیابی رایج است، به‌عنوان مثال: حلالیت، انحلال، پایداری، ضریب تقسیم و ثابت یونیزاسیون، بررسی‌های دیگری باید روی ویژگی‌های حالت جامد مواد دارویی از جمله اشکال بلوری (پلی مورف‌ها)، میزان جذب آب، خواص سطحی، اندازه و شکل ذرات و خواص مکانیکی انجام شود. یکی از روش‌های مفید برای بررسی ویژگی‌های حالت جامد مواد فعال دارویی، استفاده از آنالیز حرارتی است [۳].

آنالیز حرارتی برای مطالعه ویژگی‌های نمونه به‌عنوان تابعی از دما، هنگام گرم یا سرد شدن در یک برنامه دمایی کنترل‌شده استفاده می‌شود.

برای تجزیه و تحلیل به روش آنالیز حرارتی، مقدار کمی از نمونه در حدود چند میلی‌گرم مورد نیاز است. در میان روش‌های مختلف آنالیز حرارتی، گرماسنج روشی تفاضلی (DSC) روشی است که در مطالعه نمونه‌های حالت جامد از اهمیت بالایی برخوردار است.

DSC کاربرد وسیعی در صنایع دارویی دارد که از جمله آنها می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

- مطالعه خواص فیزیکوشیمیایی مواد فعال داروهای حالت جامد؛
- درک اثرات فرآیندهای فیزیکی (نظیر اختلاط، آسیاب و دانه‌بندی) و روش‌های تولید شده با حرارت (مانند خشک کردن به روش اسپری، خشک کردن به روش انجمادی)، فشردن سازی قرص تحولات بلوری و فراهمی زیستی استفاده می‌شود [۴].

## ● رایج‌ترین روش‌های مورد استفاده از DSC

۱. تعیین میزان انتقال فاز در سیستم‌های یک جزئی با تغییرات هم‌زمان در وضعیت فیزیکی مواد فعال دارویی (مانند ذوب، تبخیر، تصعید، تبلور، انتقال جامد به جامد و شیشه و تبدیل از حالت آمورف به حالت بلوری)؛

۲. تعیین میزان تغییرات در ساختار شیمیایی مواد فعال دارویی، مانند هیدراتاسیون، رهایدراتاسیون، انحلال و تجزیه؛

۳. مطالعه فرآیندهای پیچیده‌تر در سیستم‌های دو یا چند جزئی: به‌عنوان مثال: یوتکتیک، محلول‌های جامد، پراکندگی جامد و بلورها که در آنها اندازه‌گیری سازگاری و امتزاج‌پذیری اهمیت دارد؛

۴. امکان شناسایی دماهای مشخصه در انتقال فاز مانند ذوب، تبلور، بلورینگی و همچنین انتقال شیشه؛

۵. تعیین تغییرات ساختاری مانند ایزومریزاسیون، جذب یا دفع آب

۶. تعیین تغییرات ناشی از فرآیندهای شیمیایی مانند تخریب یا تجزیه یک مواد فعال دارویی؛

۷. اندازه‌گیری ظرفیت گرمایی ویژه و تغییرات آنتالپی: تغییر آنتالپی یک ویژگی مهم در هر ماده دارویی است، زیرا ارزش آن برای طراحی فرآیندهای شیمیایی اساسی است.

۸. تعیین پایداری مواد فعال دارویی: پایداری مواد فعال دارویی به فرآیندهایی مانند جانشینی، اکسیداسیون، فوتولیز و یا پیرولیز بستگی دارد.

با توجه به کاربردهای ذکر شده، استفاده از DSC در بررسی مواد فعال داروهای تازه کشف شده و برای توسعه محصولات دارویی جدید ضروری است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که نتایج

DSC به‌طور معمول با هر روش حرارتی نظیر آنالیز وزن‌سنجی حرارتی<sup>۴</sup>، آنالیز حرارتی تفاضلی<sup>۵</sup> و آنالیز میکرو حرارتی<sup>۶</sup> و روش‌های غیرحرارتی شامل طیف‌سنجی‌های مختلفی مانند تبدیل فوریه مادون قرمز<sup>۷</sup>، طیف‌سنجی رامان تبدیل فوریه<sup>۸</sup>، طیف‌سنجی تشدید مغناطیسی هسته‌ای<sup>۹</sup>، طیف‌سنجی پراش پودر اشعه ایکس<sup>۱۰</sup>، روش‌های میکروسکوپی مانند میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱۱</sup>، میکروسکوپ نور قطبی<sup>۱۲</sup>، میکروسکوپ نوری<sup>۱۳</sup> و روش‌های کروماتوگرافی به‌عنوان مثال: کروماتوگرافی گازی<sup>۱۴</sup> و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا<sup>۱۵</sup> پشتیبانی می‌شوند [۵].

بررسی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که علاقه فزاینده‌ای برای استفاده از DSC در مطالعه مواد فعال و محصولات دارویی تجاری وجود دارد. این روش، فرآیندی قابل اعتماد در تشخیص ناخالصی، ابزار تحلیلی مناسب برای بررسی سازگاری ماده فعال با مواد جانبی و روشی مناسب برای مطالعات سازگاری/ناسازگاری در مرحله پیش فرمولاسیون است.

از آنجایی که رفتار حرارتی اجزای فعال می‌تواند بر فراهمی زیستی، پایداری، سهولت فرمولاسیون و یا جذابیت زیبایی شناختی فرآورده‌های دارویی تاثیرگذار باشد، آگاهی از رفتار APIها در طول گرمایش می‌تواند برای توسعه فرمولاسیون‌های دارویی ایمن و موثر ضروری باشد. در این مقاله، هدف ما ارائه توضیحاتی درباره کاربرد گرماسنج روشی تفاضلی (DSC) در تحقیقات و تولید دارو است و توجه ویژه‌ای به ارائه تخریب حرارتی و اکسیداتیو حرارتی APIها می‌شود.

## ● آنالیز حرارتی به‌منظور ارزیابی خلوص

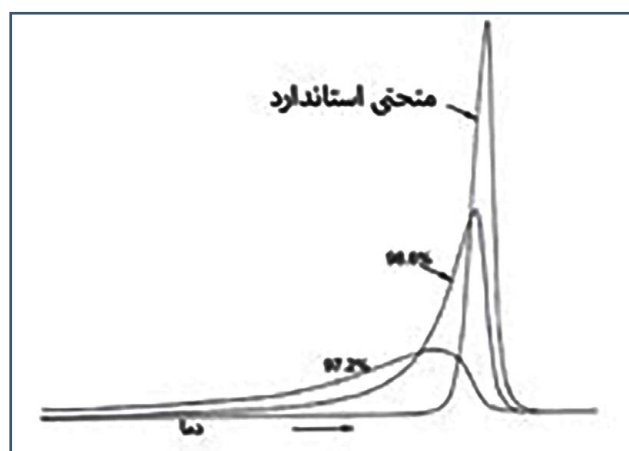
به‌طور معمول، مواد فعال دارویی، مواد آلی با جرم مولکولی کم

می‌دهند و ناحیه زیر پیک ذوب مخلوط با افزایش غلظت اُتولون سولفونامید در محدوده غلظت ۰/۲۵ تا ۵/۰۰ درصد جرمی، یک مخلوط یوتکتیک تشکیل می‌شود. در این حالت، نمونه ابتدا باید ذوب و سپس به آرامی خنک شود تا از تأثیر مخرب انتقال‌های چند شکلی، کم آبی و غیره که در محدوده دمایی نزدیک به ذوب رخ می‌دهد، جلوگیری شود.

همچنین شکل پیک‌های DSC/DTA نیز به عوامل دستگاهی و ویژگی‌های نمونه بستگی دارد. عوامل دستگاهی شامل حد تشخیص، نرخ گرمایش، اتمسفر، جنس و شکل پن است و مشخصات نمونه شامل جرم نمونه، اندازه ذرات، درجه تراکم، رسانایی و ظرفیت حرارتی و همچنین رقت و بلورینگی آن است [۷]. در بین روش‌های مختلف تعیین خلوص، معادله وانت هوف<sup>۱۸</sup> (معادله (۱)) یکی از قابل اعتمادترین روش‌ها است. این معادله نشان دهنده این نکته است که وجود ناخالصی‌ها سبب کاهش و گسترش دامنه ذوب می‌شود.

$$T_s = T_0 - \frac{RT^2 X_2}{\Delta H_f^0 F} \quad \text{معادله (۱)}$$

در این معادله ( $T_s$ ) در مقابل ( $1/F$ ) باید یک خط مستقیم با شیب  $RT_0^2 X_2^2 / \Delta H_f^0$  ایجاد کند. در حالی که تماس با محور  $Y$ ، نقطه ذوب ماده خالص،  $T_0$  را تعیین می‌کند. منحنی‌های DSC نمونه‌های اسید بنزوئیک با خلوص‌های مختلف در شکل (۲) نشان داده شده‌است. پیک‌های DSC با توجه به دمای شروع، ارتفاع و عرض آنها، به‌طور قابل توجهی متفاوت است. بنابراین، با مقایسه پیک‌های DSC دسته‌های مختلف یک API، می‌توان از ارزیابی کیفی سریع یک محصول اطمینان حاصل کرد.

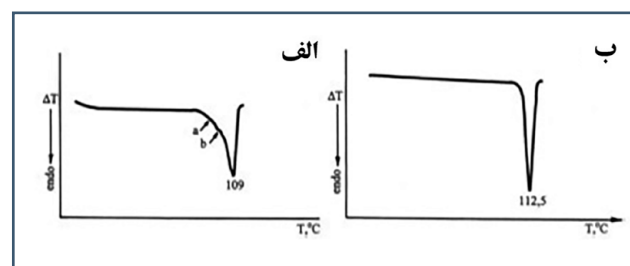


شکل (۲): منحنی‌های DSC بنزوئیک اسید با خلوص‌های مختلف در مقایسه با منحنی ذوب نمونه با خلوص بالا [۱].

کسر ذوب شده ( $F$ ) به‌عنوان مساحت جزئی قله در سطح کامل محاسبه می‌شود (شکل (۳)). اندازه‌گیری بین ۵ تا ۱۰ درصد و ۵۰ تا ۶۰ درصد از منطقه پیک ذوب انجام می‌شود. هنگام محاسبه

هستند که خلوص صد در صد ندارند. پاسخ بدن انسان به مواد فعال دارویی ممکن است به خلوص آنها بستگی داشته باشد، زیرا ممکن است مواد نامطلوب در بین آلاینده‌ها وجود داشته باشد. ارزیابی خلوص مواد فعال دارویی و محصولات دارویی، چالشی مهم از نظر ایمنی و اثربخشی درمانی آنها است. بنابراین، سطح ناخالصی‌ها در یک ماده دارویی و فرمولاسیون آن باید ابتدا غربالگری شود تا از کاهش اثربخشی دارویی مواد فعال دارویی و همچنین از اثرات سمی و نامطلوب ناخالصی‌ها جلوگیری شود. ناخالصی‌ها را می‌توان با سنتز و یا فرمولاسیون مرتبط دانست و به دو گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل ناخالصی‌های آلی (مواد اولیه یا واسطه‌ها، محصولات جانبی و محصولات تخریب)، ناخالصی‌های معدنی (واگرها، لیگاندها، کاتالیزورها و آثار فلزات سنگین) و حلال‌های باقیمانده (مواد شیمیایی آلی فرار مورد استفاده یا تولید شده در طی فرآیند تولید) است، در حالی که گروه دوم را می‌توان شامل اشکال دوز، روش‌ها، محیط و ناخالصی‌های مربوط به پیرسازی دانست.

روش‌های آنالیز حرارتی به‌ویژه DSC، روش مناسبی برای ارزیابی ناخالصی دارویی است. تجزیه و تحلیل شکل، عرض و مساحت پیک‌های ذوب DSC ترکیبات آلی نشان داده است که وجود ناخالصی‌ها در واقع بر عوامل پیک‌ها تأثیر می‌گذارد به طوری که در حضور ناخالصی‌ها پیک ذوب گسترش می‌یابد و دمای شروع ذوب کاهش می‌یابد. DSC قادر به تعیین کمی خلوص ترکیبات آلی است. شکل (۱) منحنی‌های گرماسنجی دو نمونه از مواد فعال دارویی یکسان را نشان می‌دهد. شکل (۱-ب) متعلق به یک ماده استاندارد با خلوص بالا است به طوری که پیک ذوب تیزتر است و بیشینه دمای ذوب را در ۱۱۲/۵ درجه سانتیگراد نشان می‌دهد. شکل (۱-الف) متعلق به یک ماده فعال دارویی دارای ناخالصی است که تغییر قابل توجهی از فرآیند ذوب به سمت مقادیر پایین‌تر (۱۰۹ درجه سانتیگراد) را نشان می‌دهد. این آنالیز یک ارزیابی کیفی از خلوص است. در شکل (۱-الف)، شکستگی در منحنی ذوب مربوط به وجود حداقل دو آلاینده است.



شکل (۱): منحنی‌های گرماسنجی یک ماده فعال. (الف): نمونه‌ای با پیک ذوب گسترده با دمای بیشینه مقدار ۱۰۹ درجه سانتیگراد آلوده به حداقل دو ناخالصی (a و b)؛ (ب): نمونه‌ای با تک پیک ذوب با بیشینه مقدار درجه حرارت ۱۱۲/۵ درجه سانتیگراد و خلوص بالا [۶].

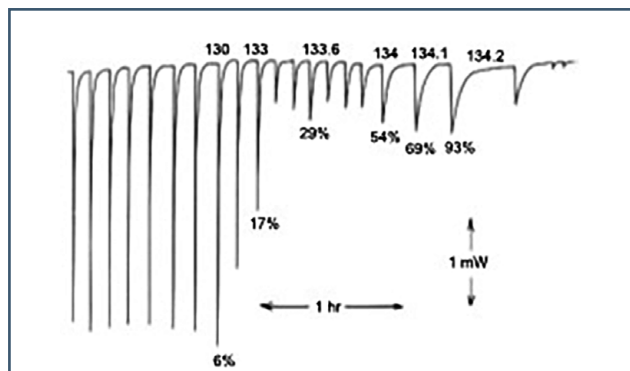
DSC یکی از مفیدترین روش‌های تحلیلی برای تخمین خلوص مواد آلی است؛ به‌عنوان مثال: اُتولون سولفونامید<sup>۱۶</sup> و پی‌تولون سولفونامید<sup>۱۷</sup> یک مخلوط یوتکتیک را تشکیل



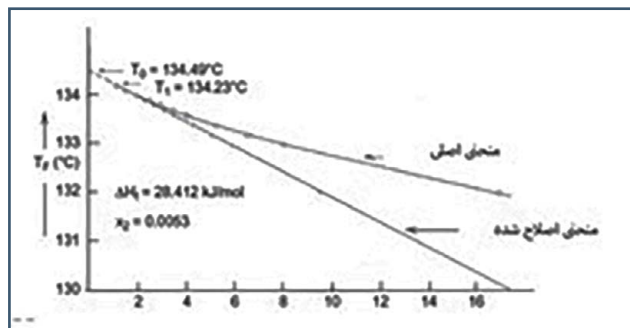
بیشتر موارد، خطی سازی منجر به ایجاد نتایج صحیحی برای سطوح ناخالصی می شود [۸].

تعیین خلوص API ها نیز می تواند با استفاده از روش همدمای گام به گام انجام شود. این روش براساس افزایش سریع دمای نمونه و نگه داشتن نمونه به صورت همدمای برای مدت زمان معین است. این روش در محدوده دمایی ذوب انجام می شود. توقف بین افزایش های متوالی دما موجب نگه داشته شدن نمونه به صورت همدمای می شود؛ بنابراین، جذب گرما در اصل، در این مراحل همدمای اندازه گیری می شود. به این ترتیب منحنی DSC حاوی تعداد زیادی پیک گرماگیر بسیار باریک است.

شکل های (۵) و (۶) داده های مرحله ایزوترمال را برای فناسستین و نمودار وانت هوف محاسبه شده نشان می دهد. نمونه با ۰/۵ درصد مول بنزامید دپ شده بود. پیک های منفرد از دو بخش افزایش سیگنال، ناشی از شروع گرمایش و سهم ذوب تشکیل شده اند. هر مرحله بعد از بازگشت سیگنال به خط پایه در مرحله قبل شروع می شود. مراحل بسیار باریک است به طوری که در شکل (۵) اختلاف بین پیک های دو دمای ۱۳۳ و ۱۳۴ درجه سانتیگراد، ۰/۲ درجه است. ارزیابی وانت هوف در شکل (۶) مشاهده می شود.



شکل (۵): تعیین خلوص فناسستین حاوی ۰/۵ درصد بنزامید دپ به روش پله ایزوترمال [۱].

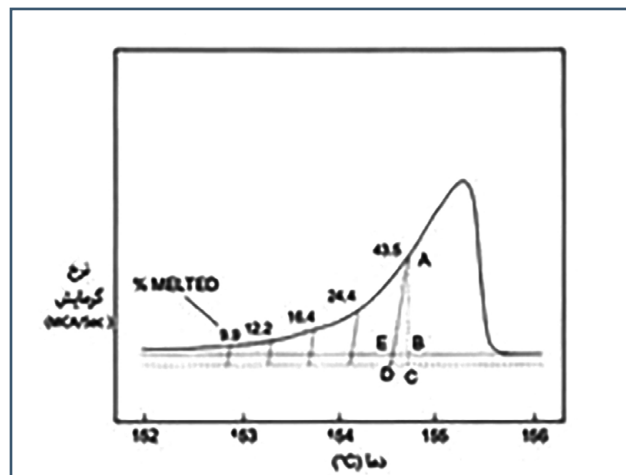


شکل (۶): نمودار وانت هوف فناسستین با ۰/۵ درصد بنزامید دپ شده با روش گام همدمای [۱].

### ○ محدودیت های معادله وانت هوف

روش وانت هوف یکی از بهترین روش ها برای تعیین خلوص مواد با جرم مولکولی کم است؛ اما برای استفاده از این روش

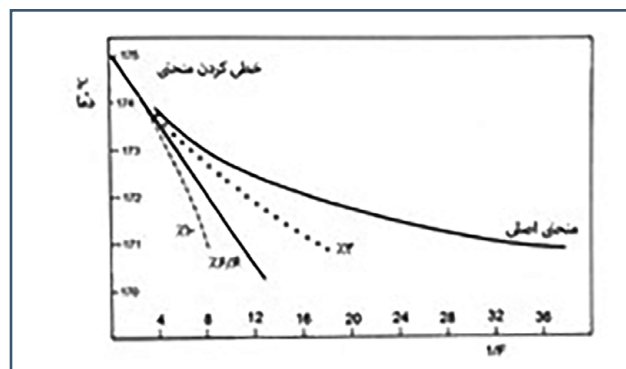
دماها باید با توجه به مقاومت حرارتی، ضریب تصحیح اعمال شود. این کار با انداختن یک خط مستقیم از نقطه روی منحنی به خط مبدا در زاویه لبه جلویی پیک ذوب ایندیم انجام می شود. البته ( $\Delta H_f$ ) از کل مساحت پیک تعیین می شود.



شکل (۷): روش تصحیح دما و محاسبه مساحت های جزئی، زاویه افت دما و زاویه لبه جلویی ذوب ایندیم است [۱].

معادله وانت هوف برای شرایط تعادل به دست می آید. بنابراین، آزمایش های ذوب باید در شرایط نزدیک به تعادل انجام شود. کوچکترین مقدار نمونه (۱ تا ۲ میلی گرم) استفاده شود تا رسانایی گرما در تعیین دما تداخل نداشته باشد. نرخ گرمایش نباید بیش از ۲ درجه سانتیگراد در دقیقه (ترجیحاً ۱ درجه سانتیگراد در دقیقه) باشد.

کاهش نقطه ذوب یک ماده خالص به صورت خطی به غلظت ناخالصی ها بستگی دارد، اما معادله وانت هوف در بیشتر موارد یک خط مستقیم را همان طور که با معادله (۱) پیش بینی می شود، نشان نمی دهد. علاوه بر این، با افزایش غلظت ناخالصی، پیک ذوب گسترش می یابد و انحراف از خطی بودن به دلیل دست کم گرفتن ذوب در دماهای پایین تر از پیک ذوب رخ می دهد. این انحراف از خطی بودن با افزایش سطح ناخالصی افزایش می یابد. بنابراین، نمودار وانت هوف را می توان با تنظیم مقدار ذوب کشف نشده خطی کرد (شکل (۴)).



شکل (۴): خطی سازی منحنی وانت هوف [۱].

هیچ دلیل مستقیمی برای این پیشنهاد وجود ندارد، اما در

باید موارد ذیل مورد توجه قرار گیرد [۹]:

- نمونه باید یک ماده بلوری با جرم مولکولی کم با سطح خلوص بالاتر از ۹۵ درصد مول و ترجیحاً بالاتر از ۹۷ درصد مول باشد. این روش برای مواد آمورف به دلیل عدم ذوب کارایی ندارد.
- ناخالصی باید در مذاب، محلول باشد، اما هیچ محلول جامدی نباید تشکیل شود، یعنی ناخالصی نباید در بلورها محلول باشد.

- موادی که در طول ذوب تجزیه می‌شوند نباید با این روش تجزیه و تحلیل شوند، زیرا گرمای همجوشی را نمی‌توان به‌طور قابل اعتماد تعیین کرد.

- از آنجایی که این معادله برای شرایط تعادل به‌دست آمده است، در آزمایش‌های تعیین خلوص باید جرم نمونه کم (۱ تا ۲ میلی‌گرم) و نرخ گرمایش آهسته (ترجیحاً ۱ درجه سانتی‌گراد در دقیقه) استفاده شود. در صورت امکان باید از پن‌های استاندارد دستگاه به‌منظور افزایش سطح زیرین و کاهش ضخامت نمونه و در نتیجه کاهش مقاومت حرارتی استفاده شود.
- تا حد امکان باید از تصعید جلوگیری کرد.

## ○ کاربرد معادله وانت هوف

روش‌های مبتنی بر DSC با استفاده از معادله وانت هوف برای تعیین خلوص ترکیبات آلی متعدد نظیر APIها، مواد کمکی و سایر مواد خام مورد استفاده در صنایع شیمیایی و دارویی توسعه داده شد که نتایج قابل اعتمادی را می‌توان از این طریق به‌دست آورد.

علاوه بر DSC، روش‌های دیگری که برای تعیین خلوص مواد فعال دارویی استفاده می‌شوند، آنالیز فاز حلالیت، کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۱۹</sup>، GC و HPLC هستند. با این حال، مزایای عمده روش‌های مبتنی بر DSC عبارتند از:

- سادگی آزمایش‌ها؛
- سادگی و مدت زمان کوتاه اندازه‌گیری؛
- ارائه نتایج قابل اعتماد در حدود یک ساعت.

DSC با روش معادله وانت هوف برای تعیین خلوص موادی نظیر اسیدها و استرها، کربوکسیلیک آلیفاتیک و آروماتیک، آمیدها، ایمیدها و انیدریدها، استامید، استانیلید، آمینوفنازون، بنزامید، بنزوکائین، بنزوئیک اسید، کافئین، سیناریزین، دی آلایل باربیتوریک اسید، دوکسازوسین مسیلات، اتیل پی-آمینوبنزوات، فلوفنامیک اسید، گلوکز، هروئین، ایندومتاسین، میپروپامات، مورفین، پاراستامول، پاروکسیب سدیم، فناسستین و پروکائین هیدروکلراید استفاده می‌شود.

یکی از چالش‌های مهم در استفاده از DSC با روش وانت هوف، تعیین خلوص قسمت خاصی از ترکیبات مورد نظر برای استفاده به‌عنوان مواد مرجع گواهی شده<sup>۲۰</sup> است. CRMها نقش مهمی در علم، فناوری و صنعت داروسازی ایفا می‌کنند،

زیرا به‌طور معمول برای کالیبراسیون ابزارها و اعتبارسنجی روش‌های کمی‌سازی مواد دارویی استفاده می‌شوند. آنها همچنین برای تایید هویت و ارزیابی کیفیت مواد دارویی و محصولات دارویی مفید هستند. با توجه به نوع کاربرد CRM، آنها باید تعدادی از الزامات، از جمله همگنی و پایداری کافی ترکیب شیمیایی شناخته شده و سطح خلوص را برآورده کنند. برای ارزیابی این عوامل از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که به‌طور عمده HPLC و یا GC مجهز به آشکارسازهای جرمی است. با این حال، از آنجایی که این روش‌ها زمان‌بر هستند، روش‌های دیگری با زمان تحلیل کوتاه‌تر جستجو می‌شود. در سال‌های اخیر، تحقیقاتی انجام شده‌است که نشان دهنده امکان استفاده از DSC به‌عنوان یک روش جایگزین یا روش پشتیبانی در تعیین خلوص نامزدهای CRM است.

DSC برای تعیین خلوص ۱۶ استاندارد مرجع از جمله مواد فعال دارویی، مانند استامینوفن، آسپرین، کافئین، هیدروکلراید لابلالول، اسید سالیسیلیک و همچنین مواد کمکی مانند متیل پارابن و پروپیل پارابن استفاده می‌شود. داده‌های گردآوری شده تکرارپذیری بالایی را برای اندازه‌گیری‌های DSC نشان می‌دهد، به خصوص زمانی که استانداردهای مرجع دارای خلوص بالایی هستند. ارزیابی آماری دقت و عدم قطعیت نتایج به‌دست‌آمده با DSC و HPLC، تفاوت معنی‌داری را بین این روش‌ها برای سطوح خلوص حداقل ۹۸ مول نشان نمی‌دهد. هنگامی که خلوص ماده کمتر از ۹۸ درصد مول باشد یا نقطه ذوب، نزدیک به محدوده تجزیه باشد، مانند کافئین یا اسید سالیسیلیک، انحراف استاندارد<sup>۲۱</sup> و انحراف استاندارد نسبی<sup>۲۲</sup> خلوص تعیین شده بالا است.

## نتیجه‌گیری

آگاهی از درصد خلوص مواد دارویی بسیار اهمیت دارد؛ زیرا در نتیجه، تاثیرگذار خواهد بود و ممکن است ماده مورد نظر در محصول به وجود نیاید و یا درصد خلوص آن نیز متفاوت باشد. در کنار روش‌های گران‌قیمت و پیچیده که زمان‌بر هم هستند، استفاده از روش‌های نوین دستگاهی با تکیه بر محاسبات هم در زمان و هم در هزینه صرفه‌جویی شده و منجر به مدیریت بهتر می‌شود، بسیار اهمیت دارد. در این میان، استفاده از دستگاه DSC و تکیه بر معادله وانت هوف جذابیت‌های خود را دارد. وانت هوف معادله‌ای در زمینه ترمودینامیک شیمیایی است که رابطه‌ای بین تغییرات دما، تغییرات ثابت تعادل و تغییرات آنتالپی استاندارد را می‌دهد که منجر به درصد خلوص ترکیبات خواهد شد.

## پی‌نوشت

1. Differential Scanning Calorimetry (DSC)
2. Active Pharmaceutical Ingredients (API)
3. Excipients
4. Thermogravimetric analysis (TGA)
5. Differential Thermal Analysis (DTA)
6. Micro-Thermal Analysis ( $\mu$ TA)
7. Fourier-Transform Infrared (FTIR)
8. Fourier-Transform Raman (FT-Raman)
9. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)
10. Diffractometry – X-Ray Powder Diffraction (XRPD)
11. Scanning Electron Microscopy (SEM)
12. Polarized Light Microscopy (PLM)
13. Optical Microscopy (OM)
14. Gas Chromatography (GC)
15. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)
16. O-toluenesulfonamide
17. p-toluenesulfonamide
18. van't Hoff
19. Thin-layer chromatography (TLC)
20. Certified Reference Materials (CRMS)
21. Standard Deviation (SD)
22. Relative Standard Deviation (RSD)

## مراجع

- [1] W.H. Organization, Definition of active pharmaceutical ingredient, Geneva: WHO. (2011).
- [2] K. V Vilegave, G. Vidyasagar, Preformulation Studies of Pharmaceutical New Drug Molecule & Products : An Preformulation Studies of Pharmaceutical New Drug Molecule & Products : An Overview ., (2015).
- [3] K. Ma, H. Wang, M. Zhao, J. Xing, Purity determination and uncertainty evaluation of theophylline by mass balance method, high performance liquid chromatography and differential scanning calorimetry, *Analytica Chimica Acta*. 650 (2009) 227–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.046>.
- [4] A. Gabbott, Thermal Analysis of Pharmaceuticals, in: Principles and Applications of Thermal Analysis, 2008.
- [5] M. Łaszcz, A. Witkowska, Studies of phase transitions in the aripiprazole solid dosage form, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 117 (2016) 298–303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.09.004>.
- [6] H.J. Ferrari, N.J. Passarello, The Detection of Impurities by Thermal Analysis BT - Analytical Calorimetry: Volume 3, in: R.S. Porter, J.F. Johnson (Eds.), Springer US, Boston, MA, 1974: pp. 321–347. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4509-2\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4509-2_24).
- [7] D. Giron, Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates, *Thermochimica Acta*. 248 (1995) 1–59. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01953-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01953-E).
- [8] M.T. Agler, B.A. Wrenn, S.H. Zinder, L.T. Angenent, Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform, *Trends in Biotechnology*. 29 (2011) 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006>.
- [9] K. Vilegave, G. Vidyasagar, P. Chandankar, Preformulation Studies of Pharmaceutical New Drug Molecule & Products: An Overview, *Am. J. Pharmacy & Health Res.* 1 (2013). [www.ajphr.com](http://www.ajphr.com).



## نویسنده

پروین هادیان<sup>۱،۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ پروبی روبشی

\*parvinhadian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۹

## بخش دوم

## انواع نشانگرها در میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون

## چکیده

میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون به شدت به فلورسانس، به عنوان پایه تصویربرداری متکی است؛ حساسیت بالای این روش و قابلیت هدف قرار دادن اجزای ساختاری و فرآیندهای دینامیکی نمونه به عنوان مثال: سلولها و بافت های زنده تثبیت شده، نشان دهنده اهمیت بالای این موضوع است. بسیاری از نشانگرهای فلورسنت با مواد شیمیایی آلی آروماتیک سنتز می شوند که برای اتصال به یک ماکرومولکول زیستی (مانند پروتئین یا اسید نوکلئیک) یا برای قرار گرفتن در یک منطقه ساختاری خاص مثل اسکلت سلولی، میتوکندری، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی و یا هسته طراحی می شوند. همچنین نشانگرهای دیگر برای نظارت بر فرآیندهای دینامیکی و متغیرهای محیطی محلی، از جمله غلظت یون های فلزی، pH، گونه های اکسیژن فعال و پتانسیل غشایی استفاده می شوند. رنگ های فلورسنت در نظارت بر یکپارچگی سلولی (زنده در مقابل مرده یا آپوپتوز)، اندوسیتوز، اگزوسیتوز، سیالیت غشاء، انتقال پروتئین، انتقال سیگنال و فعالیت آنزیمی مفید هستند. علاوه بر این، نشانگرهای فلورسنت به طور گسترده برای نقشه برداری ژنتیکی و تجزیه و تحلیل کروموزوم در زمینه ژنتیک مولکولی استفاده می شوند.

## واژه های کلیدی

میکروسکوپ روبشی لیزری هم کانون،  
فلورسنت، نشانگرهای فلورسنت.

## مقدمه

در بخش اول این مقاله، به تاریخچه نشانگرهای فلورسنت پرداخته شد. رنگ‌های فلورسنت در اوایل قرن بیستم به عنوان رنگ‌های حیاتی برای تصویربرداری از باکتری‌ها، تک یاخته‌ها و تریپانوزوم‌ها با میکروسکوپ فلورسنت معرفی شدند، اما تا سال ۱۹۲۰ که این میکروسکوپ برای اولین بار برای مطالعه اتصال رنگ در بافت‌های ثابت و سلول‌های زنده مورد استفاده قرار گرفت، استفاده گسترده‌ای از آن مشاهده نشد. در طول ۶۰ سال گذشته، پیشرفت‌ها در ایمونولوژی و زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌های ثانویه را تولید کرده و بینشی را در مورد طراحی مولکولی ردیاب‌های فلورسنت که در مناطق خاصی از کمپلکس‌های ماکرومولکولی هدف قرار می‌گیرند، ارائه کرده است [۱].

نشانگرها با توجه به ویژگی‌های جذب و فلورسانس، از جمله پروفایل‌های طیفی، طول موج‌های بیشینه جذب، نشر و شدت فلورسانس ساطع شده، فهرست‌بندی و توصیف می‌شوند [۲]. انتخاب نشانگر، یکی از حیاتی‌ترین جنبه‌های کار با میکروسکوپ هم‌کانون است و کارایی ابزار نیز باید به دقت در نظر گرفته شود تا تصاویر با کیفیت بالا تهیه شود. در بخش اول، به انواع رنگ‌های فلورسنت سنتی به عنوان مثال، فلورسین، مشتقات رودامین، ۴ و ۶ دیامیدینو-۲ فنیلیندول<sup>۱</sup> و غیره، رنگ‌های الکسافلور و رنگ‌های سیانین پرداخته شد. در ادامه، به سایر نشانگرهای مورد استفاده در ردیابی هدف با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون می‌پردازیم.

## ردیاب‌های فلورسانس کننده محیطی

نشانگرهای طراحی شده برای بررسی محیط داخلی سلول‌های زنده به طور گسترده توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و صدها مورد برای بررسی اثراتی همچون غلظت موضعی فلزات قلیایی و قلیایی خاکی، فلزات سنگین (از نظر بیوشیمیایی به عنوان کوفاکتورهای آنزیمی) یون‌های معدنی، تیول‌ها و سولفیدها، نیتريت، pH، قطبیت حلال و پتانسیل غشاء توسعه یافته‌اند [۳ تا ۵]. در واقع، آزمایش‌ها در این عرصه بر تغییرات طول موج و یا شدت طیف‌های جذب و انتشار، که با استفاده از نشانگرهایی که به یون‌های کلسیم متصل می‌شوند، به منظور اندازه‌گیری چگالی شار درون سلولی متمرکز بودند. این ردیاب‌ها با درجه خاصی از گزینش‌پذیری به یون هدف متصل می‌شوند تا پاسخ اندازه‌گیری شده را ایجاد کنند. کلسیم یک یون مهم متابولیکی است که نقش حیاتی را در پاسخ سلولی به انواع بسیاری از محرک‌های خارجی ایفا می‌کند. نوسانات گذرا در غلظت یون کلسیم، باعث ایجاد پاسخ در سلول‌ها می‌شود. نشانگرها باید طوری طراحی شوند که نه تنها غلظت‌های موضعی کلسیم را اندازه‌گیری کنند، بلکه باید تغییرات کمی در هنگام پیشرفت چگالی امواج شار در کل سیتوپلاسم را نیز گزارش کنند. بسیاری از مولکول‌هایی که برای اندازه‌گیری سطح کلسیم طراحی شده‌اند، بر پایه عوامل کیلیت‌کننده غیرفلورسنت اتیلن گلیکول اسید تتراستیک<sup>۲</sup> و BAPTA<sup>۳</sup> هستند که سال‌ها برای جداسازی یون‌های کلسیم در محلول‌های بافر استفاده می‌شوند. دو مورد از رایج‌ترین ردیاب‌های کلسیمی، شاخص‌های نسبت‌سنجی فوراً-۴<sup>۴</sup> و ایندو-۱<sup>۵</sup> هستند، اما این نشانگرها به خصوص در میکروسکوپ هم‌کانون مناسب نیستند [۳]. لذا از تعداد محدودی از این رنگ‌ها، بیشتر به صورت ترکیبی برای اندازه‌گیری کلسیم با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون استفاده می‌شود [۶]. فوراً قرمز، یک هتروسیکل چند هسته‌ای ایمیدازول و بنزوفوران است که کاهش فلورسانس را در ۶۵۰ نانومتر، هنگام اتصال کلسیم نشان می‌دهد.

هنگامی که مخلوطی از نشانگرهای فلو-۳ و فوراً قرمز در ۴۸۸ نانومتر برانگیخته شود و فلورسانس در بیشینه مقدار انتشار (به ترتیب ۵۲۵ و ۶۵۰ نانومتر) از هر دو نشانگر اندازه‌گیری شود، پاسخ نسبی به شار یون کلسیم به دست می‌آید. از آنجایی که شدت انتشار فلو-۳ به طور یکنواخت افزایش و فوراً قرمز کاهش می‌یابد، زمانی که غلظت رنگ در ناحیه مورد بررسی ثابت شود، یک نقطه ایزوبستیک به دست می‌آید.

اندازه‌گیری کمی یون‌هایی غیر از کلسیم، همچون منیزیم، سدیم، پتاسیم و روی، به روشی مشابه، با استفاده از نشانگرهای مشابه انجام می‌شود [۳ و ۴]. یکی از پر طرفدارترین کاوشگرها برای منیزیم، mag-fura-2 است که از لحاظ ساختاری شبیه فوراً قرمز است، همچنین در محدوده اشعه فرابنفش برانگیخته می‌شود و مشکلات مشابهی همانند فوراً-۲ و ایندو-۱ را در میکروسکوپ هم‌کانون ارائه می‌دهد. نشانگرهای برانگیخته شده در ناحیه نور مرئی برای تجزیه و تحلیل بسیاری از کاتیون‌های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی که در غلظت‌های مختلف در ماتریکس سلولی وجود دارند، در دسترس هستند. نشانگرهای فلورسانس مهم برای pH داخل سلولی شامل یک مشتق پیرن معروف به HPTS<sup>۶</sup> یا پیرانین، مشتق فلورسین BCECF<sup>۷</sup> و یک گزانتین جایگزین دیگر به نام کربوکسی سنارف-وان<sup>۸</sup> است [۷]. از آنجا که بسیاری از نشانگرهای معمولی به pH محیط اطراف حساس هستند، تغییرات در شدت فلورسانس که بیشتر به برهم‌کنش‌های زیستی نسبت داده می‌شود، ممکن است در واقع در نتیجه پروتونه شدن نشانگر رخ دهد. بنابراین، در اندازه‌گیری هم‌زمان غلظت یون کلسیم و pH، بیشتر با ترکیب یک نشانگر pH، مانند اسنارف-وان، با یک شاخص یون کلسیم (مانند فوراً-۲) انجام می‌شود.

## نشانگرهای اندامک

نشانگرهایی که اندامک‌های درون سلولی، به عنوان مثال: میتوکندری، لیزوزوم، دستگاه گلژی و شبکه آندوپلاسمی را

اسفنگولیپیدها رنگ آمیزی می‌شوند [۱۰]. این عوامل، بسیار چربی دوست بوده و بنابراین، به عنوان نشانگر برای مطالعه انتقال و متابولیسم لیپید در سلول‌های زنده مفید هستند. چندین مورد از مفیدترین فلوروفورها برای دستگاه گلژی حاوی هسته پیچیده هتروسیکلیک، BODIPY هستند [۴ و ۹]. هنگامی که نشانگر BODIPY با اسفنگولیپیدها جفت می‌شود، بسیار انتخابی عمل کرده و در مقابل نور رنگ‌بری<sup>۱۴</sup> مقاومت می‌کنند به طوری که بسیار برتر از بسیاری از رنگ‌های دیگر است. علاوه بر این، طیف انتشار این نشانگرها به غلظت (تغییر از سبز به قرمز در غلظت‌های بالاتر) وابسته است و آنها را برای مکان‌یابی و شناسایی ساختارهای درون سلولی که مقادیر زیادی لیپید را انباشته می‌کنند، مفید می‌سازد.

محبوب‌ترین پروب‌های سنتی برای آنالیز فلورسانس شبکه آندوپلاسمی به ترتیب رنگ‌های کربوسیانیل و زانتن، DiOC<sub>6</sub><sup>۱۵</sup> و چندین مشتق رودامین هستند [۴ و ۹]. با این حال، این رنگ‌ها باید با احتیاط استفاده شوند، زیرا می‌توانند در میتوکندری، دستگاه گلژی و سایر نواحی چربی دوست درون سلولی تجمع پیدا کنند. کاوشگرهای جدیدتر و پایدارتر برای رنگ آمیزی انتخابی شبکه آندوپلاسمی توسط چندین سازنده توسعه داده شده‌اند. به ویژه، اعضای اگزازول از خانواده داپوکسیل تولید شده با پروب‌های مولکولی، عوامل بسیار خوبی برای نشان گذاری انتخابی شبکه آندوپلاسمی در سلول‌های زنده، به تنهایی یا در ترکیب با رنگ‌های دیگر هستند. این پروب‌ها پس از تثبیت با فرمالدئید باقی می‌مانند، اما می‌توانند با مواد شوینده نفوذپذیر، از بین بروند. یکی دیگر از کاوشگرهای مفید، برفلدین ای<sup>۱۶</sup> است، یک متابولیت قارچی پیچیده استریوشیمیایی که به عنوان یک مهار کننده انتقال پروتئین به خارج از شبکه آندوپلاسمی عمل می‌کند.

### نقاط کوانتومی

بلورهای نانومتری از نیمه‌هادی‌های خالص به عنوان نقاط کوانتومی شناخته می‌شوند که مانند یک عامل نشان گذاری فلورسنت مفید برای سلول‌های زنده و ثابت در هر دو میکروسکوپ فلورسانس و هم‌کانون مورد استفاده قرار می‌گیرند. به منظور اتصال نقاط کوانتومی به ترکیبات زیستی همچون پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها و غیره، این بلورهای نیمه‌هادی ریز خالص شده را با یک پوسته پلیمری آبدوست می‌پوشانند (شکل ۱). این پروب‌ها مزایای قابل توجهی نسبت به رنگ‌های آلی و پروتئین‌های فلورسنت دارند؛ به عنوان مثال، پایداری طولانی مدت در برابر نور، شدت فلورسانس بالا و رنگ‌های متعدد با قابلیت تحریک تک طول موج [۱۱].

نقاط کوانتومی به روشی شبیه به دیودهای نیمه‌هادی ساطع کننده نور<sup>۱۷</sup>، روشنایی ایجاد می‌کنند، اما به جای یک محرک الکتریکی، با جذب فوتون فعال می‌شوند. فوتون جذب شده یک جفت الکترون-حفره ایجاد می‌کند که به سرعت با

هدف قرار می‌دهند، برای نظارت بر انواع فرآیندهای زیستی در سلول‌های زنده با استفاده از میکروسکوپ هم‌کانون مفید هستند [۳ و ۴]. به طور کلی، نشانگر اندامک، از یک هسته فلئوئورو کروم متصل به یک نیمه گزینش پذیر تشکیل شده است که از طریق پیوندهای کووالانسی، الکترواستاتیک، آبگریز و یا غیره به اندامک مورد نظر متصل می‌شود. بسیاری از نشانگرهای فلورسنت که برای انتخاب اندامک‌ها طراحی شده‌اند، می‌توانند در غشای سلولی نفوذ کنند (بنابراین، در سلول‌های زنده مفید هستند)؛ پروب‌های اندامک برای بررسی انتقال، تنفس، میتوز، مرگ، تجزیه پروتئین، پدیده‌های غشایی و غیره در سلول‌های زنده مفید هستند.

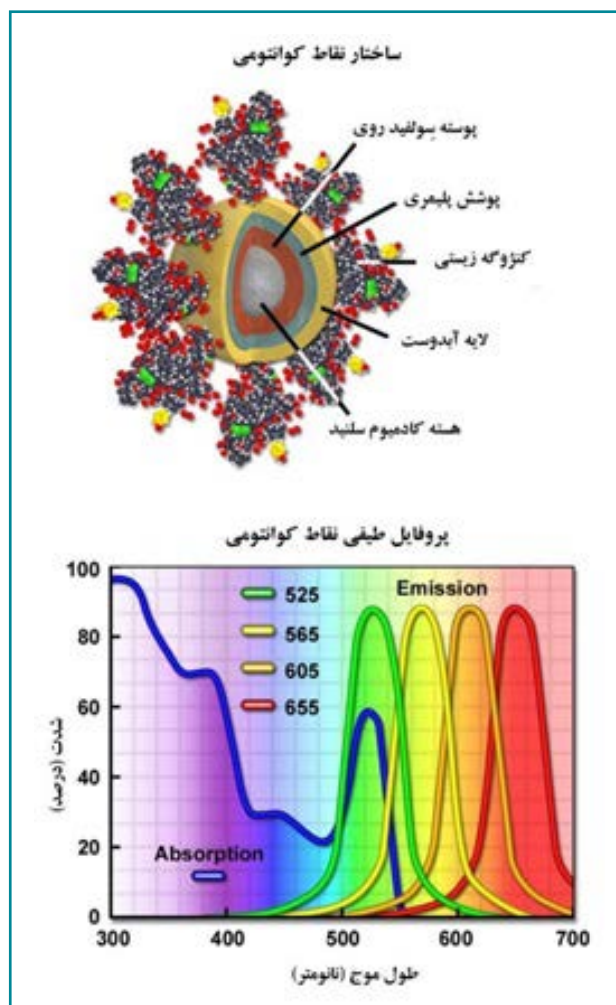
ردیاب‌های میتوکندری، از جمله مفیدترین نشانگرها برای بررسی تنفس سلولی هستند و بیشتر همراه با رنگ‌های دیگر در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند. نشانگرهای سنتی به عنوان مثال رودامین ۱۲۳ و تترامیل روزامین، هنگامی که سلول‌ها تثبیت می‌شوند، به سرعت از بین می‌روند؛ بنابراین، تا حد زیادی با استفاده از نشانگرهای جدیدتر و خاص تر که با ردیاب‌های مولکولی ساخته شده‌اند، جایگزین می‌شوند [۴]. این موارد، شامل سری محبوب میتوتراکر<sup>۹</sup> و میتوفلور<sup>۱۰</sup> از هتروسیکل‌های گزانتن، بنزوکسازول، ایندول و بنزیمیدازول است که از نظر ساختاری متنوع بوده و در انواع پروفایل‌های طیفی تحریک و انتشار موجود هستند. رنگ‌های میتوتراکر پس از تثبیت سلولی در فرمالدئید به خوبی حفظ می‌شوند و بیشتر می‌توانند در برابر عوامل نفوذپذیر چربی دوست مقاومت کنند [۸]. در مقابل، پروب‌های میتوفلور به طور خاص، برای سلول‌هایی که به صورت فعال تنفس می‌کنند، طراحی شده‌اند و برای روش‌های تثبیت و رنگ آمیزی مناسب نیستند [۴]. یکی دیگر از نشانگرهای محبوب میتوکندری، با عنوان جی-سی-وان<sup>۱۱</sup>، به عنوان نشانگر پتانسیل غشا و در آزمایش‌های رنگ آمیزی متعدد با سلول‌های ثابت مفید است. به طور کلی، آمین‌های بازی ضعیف که قادرند از غشاها عبور کنند، کاندیدای ایده آلی برای بررسی سنتر زیستی و پاتوژن در لیزوزوم‌ها هستند [۴ و ۵]. ردیاب‌های لیزوزومی سنتی شامل مشتقات غیراختصاصی فنازین و آکریدین قرمز و آکریدین نارنجی هستند که پس از پروتونه شدن، در وزیکول‌های اسیدی تجمع می‌یابند [۵ و ۹]. دانه‌ها و ماکرومولکول‌های لاتکس نشاندار شده با فلورسنت همچون دکستران نیز می‌توانند در لیزوزوم‌ها با اندوسیتوز تجمع کنند. با این حال، مفیدترین ابزار برای بررسی خواص لیزوزومی با میکروسکوپ هم‌کانون، رنگ‌های ردیاب لیزو<sup>۱۲</sup> و حسگر لیزو<sup>۱۳</sup> هستند که با استفاده از پروب‌های مولکولی توسعه یافته‌اند [۴ و ۹]. ردیاب‌های لیزو که در انواع طول موج‌های تحریک و انتشار وجود دارند، دارای گزینش پذیری بالایی برای اندام‌های اسیدی بوده و قادر به نشان دار کردن سلول‌ها در غلظت‌های نانومولاری هستند. شدت فلورسانس به طور چشمگیری در سری حسگر لیزو پس از پروتونه شدن افزایش می‌یابد و این رنگ‌ها را به عنوان شاخص pH مفید می‌کند [۴].

پروتئین‌ها و لیپیدها در دستگاه گلژی طبقه‌بندی و پردازش می‌شوند و به طور معمول با مشتقات فلورسنت سرامیدها و



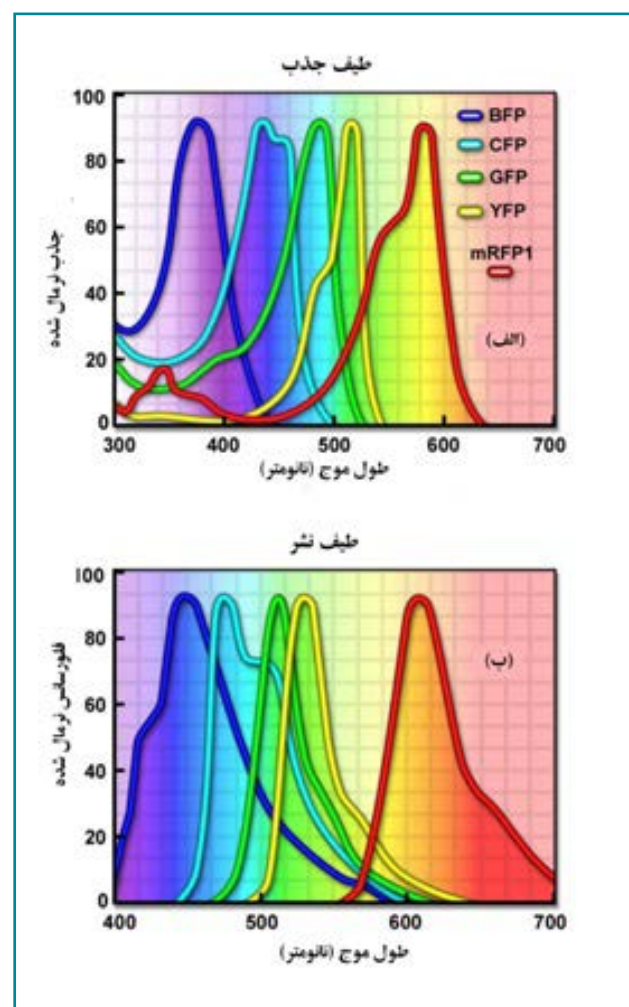
مشخصات پروفایل انتشار برای نقاط کوانتومی که در ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ یا ۶۰۰ نانومتر برانگیخته می‌شوند، مشابه است؛ با این تفاوت که شدت فلورسانس در طول موج‌های تحریک کوتاه‌تر به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. عرض، در نیمه ارتفاع پروفایل انتشار یک نقطه کوانتومی معمولی حدود ۳۰ نانومتر است و نیمرخ طیفی به سمت طول موج‌های بلندتر (دارای «دم» با شدت بالاتر) منحرف نمی‌شود، این مورد در بیشتر فلوروکروم‌های آلی مشاهده می‌شود. این ویژگی باعث می‌شود بدون تداخل طیف‌های نشری بتوان از نقاط کوانتومی متفاوتی برای نشان‌گذاری نمونه استفاده کرد. برای کاربردهای زیستی، بلورهای کادمیوم سلنید با یک پوسته متشکل از سولفید روی پوشانده شده‌است تا خواص نوری را بهبود بخشد. سپس، هسته با یک فیلم پلیمری و لیگاندهای دیگر پوشانده می‌شود تا آب‌گریزی را کاهش دهد و کارایی اتصال ماکرو مولکول‌های مزدوج را بهبود دهد. محصول نهایی یک ذره فعال زیستی است که اندازه آن از ۱۰ تا ۱۵ نانومتر است [۱۳] و در فرایندهای نشان‌گذاری، به جای معرف‌های رنگ‌آمیزی کلاسیک استفاده می‌شود.

تابش هم‌زمان یک فوتون که انرژی کمتری دارد، به حالت اولیه باز می‌گردد. مفیدترین نیمه‌هادی که تاکنون برای تولید نقاط کوانتومی زیستی کشف شده، کادمیوم سلنید<sup>۱۸</sup> است؛ ماده‌ای که در آن انرژی فوتون‌های ساطع شده تابعی از اندازه فیزیکی ذرات نانوبلور است. بنابراین، نقاط کوانتومی با اندازه‌هایی که تنها به اندازه یک دهم نانومتر با هم تفاوت دارند، طول موج‌های متفاوتی از نور ساطع می‌کنند، در حالی که اندازه‌های کوچک‌تر، طول موج‌های کوتاه‌تری ساطع می‌کنند و بالعکس.



شکل (۱): ساختار و پروفایل طیفی نقاط کوانتومی. هسته کادمیوم سلنید با پوسته سولفید روی محصور شده‌است، سپس یک پوشش پلیمری و در نهایت یک لایه بیرونی آبدوست که کنژوگه زیستی به آن متصل شده‌است، روی آن قرار گرفته است. پروفایل جذب، یک افتادگی را در ۴۰۰ نانومتر نشان می‌دهد، در حالی که طیف‌های انتشار همگی دارای پروفایل‌های متقارن مشابه هستند [۱].

برخلاف نشانگرهای آلی معمولی یا پروتئین‌های فلورسنت که پروفایل‌های طیفی بسیار مشخصی را نشان می‌دهند، نقاط کوانتومی طیف جذبی دارند که با کاهش طول موج به‌طور پیوسته افزایش می‌یابد (شکل (۲)). همچنین در مقابل، شدت انتشار فلورسانس محدود به یک پیک متقارن با بیشینه مقدار طول موج است که به اندازه نقطه بستگی دارد، اما مستقل از طول موج تحریک [۱۲] است. بنابراین،



شکل (۲): پروفیل‌های طیفی فلورسنت، برای پروتئین‌های فلورسنت که در نواحی آبی تا نارنجی-قرمز، طیف مرئی ساطع می‌کنند (تابع جذب یا انتشار نرمال شده به‌عنوان تابعی از طول موج رسم شده‌است). (الف): طیف جذب و (ب): طیف نشری پروتئین‌های فلورسنت قسمت (الف) [۱].



در میکروسکوپ هم‌کانون، نقاط کوانتومی با بیشتر خطوط طیفی تولید شده توسط سیستم‌های لیزری رایج، از جمله یون آرگون، هلیوم-کادمیم، کریپتون-آرگون و هلیوم-نئون سبز تحریک می‌شوند. به ویژه نقاط کوانتومی در مناطق فرابنفش و بنفش، لیزر دیود آبی و لیزرهای حالت جامد پمپ شده با دیود که دارای خطوط طیفی برجسته در ۴۴۲ نانومتر و زیر آن هستند، به خوبی تحریک می‌شوند [۱۱ و ۱۲]. لیزر دیود آبی با طول موج ۴۰۵ nm یک منبع تحریک اقتصادی است که به دلیل ضریب خاموشی بالای آنها در این طول موج، برای استفاده با نقاط کوانتومی بسیار موثر است. یکی دیگر از مزایای استفاده از این نشانگرها در میکروسکوپ هم‌کانون، توانایی تحریک چندین اندازه مختلف نقاط کوانتومی (و رنگ‌های طیفی) در یک نمونه با یک طول موج تکی است که این پروپ‌ها را کاندیدی عالی برای آزمایش‌های نشان‌گذاری متعدد می‌کند.

### پروتئین‌های فلورسنت

طی چند سال گذشته، کشف و توسعه پروتئین‌های فلورسنت طبیعی و مشتقات آن به سرعت در طیف وسیعی از فرآیندهای درون سلولی در موجودات زنده مورد استفاده قرار گرفت [۱۴]. این نشانگرهای زیستی، توانایی تجسم، نظارت و ردیابی تک مولکول‌ها را با وضوح زمانی و مکانی بالا در آزمایش‌های حالت ایستا و پویا در اختیار دانشمندان قرار داده‌اند. انواع موجودات دریایی، منبع بیش از ۱۰۰ پروتئین فلورسنت هستند که محققان را با پالت متعادلی از نشانگرهای زیستی غیرتجانسی برای تجزیه و تحلیل فلورسانس منفرد، دوگانه و چند طیفی مسلح می‌کنند. از جمله مزایای پروتئین‌های فلورسنت نسبت به پروپ‌های نیمه‌هادی آلی سنتی و جدید که در بالا توضیح داده شد، پاسخ آنها به طیف گسترده‌تری از رویدادها و سیگنال‌های زیستی است. این ماکرومولکول‌های زیستی همراه با توانایی هدف قرار دادن خاص اجزای داخل سلولی، عدم سمیت یا سمیت بسیار کم فوتودینامیک و سازگاری گسترده با بافت‌ها و ارگانیسم‌ها، مرز جدید و هیجان انگیزی را در تصویربرداری سلول‌های زنده ارائه می‌کنند.

اولین عضو این سری، کشف پروتئین فلورسنت سبز<sup>۱۹</sup>، از عروس دریایی اقیانوس اطلس شمالی بود و مشخص شد که درجه بالایی از فلورسانس را بدون کمک سوبستراها یا کوآنزیم‌های اضافی از خود نشان می‌دهد [۱۱ و ۱۲]. در GFP، قسمت فلورسنت، یک مشتق تری پپتیدی از سرین، تیروزین و گلیسین است که برای فعال شدن به اکسیژن مولکولی نیاز دارد، اما هیچ کوفاکتور یا آنزیم اضافی ندارد. بررسی‌های بعدی نشان داد که ژن GFP می‌تواند در سایر ارگانیسم‌ها، از جمله پستانداران، بیان شود تا آنالوگ‌های کاملاً کاربردی ایجاد کند که هیچ اثر زیستی نامطلوبی از خود نشان ندهد.

در واقع، پروتئین‌های فلورسنت را می‌توان با استفاده از فناوری شبیه‌سازی DNA تکمیلی نو ترکیب، تقریباً به هر پروتئینی در سلول‌های زنده ترکیب کرد و محصول ژن پروتئین فیوژن حاصل را در رده‌های سلولی با روش استاندارد کشت بافت، بیان نمود. عدم نیاز به کوفاکتورهای فعال‌سازی اختصاصی سلول، پروتئین‌های فلورسنت را به‌عنوان ردیاب‌های تعمیم یافته از سایر ماکرومولکول‌های زیستی همچون فیکوبیلی پروتئین‌ها بسیار مفیدتر می‌کند که برای تولید فلورسانس نیاز به درج رنگدانه‌های جانبی دارند. یکی از اولین گونه‌ها که به‌عنوان GFP تقویت شده<sup>۲۰</sup> شناخته می‌شود، حساسیت دمایی GFP را کاهش و کارایی بیان آن را در سلول‌های پستانداران افزایش می‌دهد. پروتئین‌های ترکیب شده با eGFP را می‌توان در شدت نور کم و برای مدت زمان طولانی‌تری مشاهده کرد. این ترکیب با خط طیفی ۴۸۸ نانومتری از لیزرهای آرگون و یون کریپتون-آرگون در میکروسکوپ هم‌کانون برانگیخته می‌شوند. مطالعات روی GFP جهش یافته نشان داد که قادر است ویژگی‌های جذب و انتشار را در کل منطقه طیفی مرئی نشان دهد، این مهم، محققان را قادر می‌سازد تا ترکیبات ردیاب را برای مشاهده هم‌زمان دو یا چند پروتئین فلورسنت مجزا در یک ارگانیسم منفرد ایجاد کنند (پروفایل‌های طیفی در شکل (۲)). در اولین تحقیقات، با جایگزین کردن اسید آمینه‌های GFP، انواع جهش یافته پروتئین فلورسنت آبی<sup>۲۱</sup> و پروتئین فلورسنت فیروزه‌ای<sup>۲۲</sup> را به‌دست آوردند که پروفایل‌های طیفی جذب و انتشار GFP را به مناطق با طول موج پایین‌تر تغییر داد [۱۵]. استفاده از این مشتقات در ترکیب با GFP، در آزمایش‌های انتقال انرژی تشدید فلورسانس<sup>۲۳</sup> و سایر تحقیقاتی که بر تصویربرداری فلورسانس چند رنگ تکیه دارند، مفید هستند. پروتئین فلورسنت آبی را می‌توان با خط ۳۵۴ نانومتری از یک لیزر پر قدرت آرگون تحریک کرد، در حالی که مشتق فیروزه‌ای، با تعدادی از خطوط لیزر بنفش و آبی، از جمله دیود آبی ۴۰۵ نانومتری، طول موج ۴۴۲ نانومتری لیزر هلیوم-کادمیم و خط ۴۵۷ نانومتری از لیزر استاندارد یون آرگون تحریک می‌شود.

یکی دیگر از مشتقات محبوب پروتئین فلورسنت‌ها، پروتئین فلورسنت زرد<sup>۲۴</sup> است که براساس تجزیه و تحلیل ساختاری بلوری GFP طراحی شد تا طیف جذب و انتشار را به رنگ قرمز تغییر دهد [۱۵]. پروتئین فلورسنت زرد به‌طور بهینه با خط طیفی ۵۱۴ نانومتری لیزر یون آرگون برانگیخته می‌شود و انتشار شدیدتری نسبت به پروتئین فلورسنت سبز تقویت شده ارائه می‌دهد، اما به pH پایین و غلظت یون هالوژن بالا حساس‌تر است. مشتق پروتئین فلورسنت زرد تقویت شده<sup>۲۵</sup> با خط لیزر آرگون-یون ۵۱۴ نیز مفید است؛ زیرا می‌توان آن را با کارایی به نسبت بالا، با خط ۴۸۸ نانومتری از لیزرهای آرگون و کریپتون-آرگون تحریک نمود. هر دوی این مشتقات پروتئین فلورسنت به‌طور گسترده در تحقیقات FRET در ترکیب با CFP به کار می‌روند؛ علاوه‌بر این، در مطالعات مربوط به انتقال چند

پروتئین مفید هستند.

علی‌رغم پیشرفت‌های متعدد در سنتز رنگ‌های فلورسنت در چند دهه گذشته، شواهد بسیار کمی در مورد قوانین طراحی مولکولی برای توسعه نشانگرهای جدید، به ویژه با توجه به تطبیق طیف‌های جذبی با طول‌موج‌های تحریک لیزر هم‌کانون وجود دارد؛ در نتیجه، تعداد نشانگرهایی که کاربرد گسترده‌ای در میکروسکوپ هم‌کانون پیدا کرده‌اند، زیرمجموعه محدودی از هزاران کشف انجام شده‌است.

### نتیجه‌گیری

بسیاری از نشانگرهای سنتی که سال‌ها در کاربردهای میدان وسیع مفید بوده‌اند، زمانی که با خطوط طیفی لیزری، با طول موج ثابت محدود می‌شوند، کیفیت پایینی دارند. امروزه مجموعه نشانگرهایی که در میکروسکوپ هم‌کانون سودمند هستند، به سرعت در حال رشد بوده و معرفی سیستم‌های لیزری جدید و پر قدرت نیز محدودیت‌های پیرامون این روش را کاهش داده است.

### پی‌نوشت

1. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
2. Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)
3. 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA)
4. fura-2
5. indo-1
6. 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS)
7. (2',7'-bis-(Carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF)
8. carboxy SNARF-1
9. MitoTracker
10. Mito Fluor
11. JC-1
12. LysoTracker
13. Lyso Sensor
14. Photobleaching
15. 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide
16. Brefeldin A
17. light-emitting diode (LED)
18. Cadmium selenide (CdSe)
19. Green Fluorescent Protein (GFP)
20. The enhanced green fluorescent protein (eGFP)
21. blue fluorescent protein (BFP)
22. Cyan fluorescent proteins (CFP)
23. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)
24. Yellow fluorescent protein (YFP)
25. Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP)

## مراجع

- [1] Claxton, N.S.; Fellers, T.J.; Davidson, M.W. Laser scanning confocal microscopy. In Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, 2nd ed.; Webster, J.G., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; pp. 1-37.
- [2] I. Johnson, Fluorescent Probes for Living Cells, *Histochem. J.*, 30: 123-140, 1998.
- [3] A. R. Hibbs, Confocal Microscopy for Biologists, New York: Kluwer Academic, 2004.
- [4] R. P. Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Chicago: Invitrogen Molecular Probes, 2005.
- [5] F. H. Kasten, Introduction to Fluorescent Probes: Properties, History, and Applications, in W. T. Mason (ed.), Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, New York: Academic Press, 17-39, 1999.
- [6] D. Schild, A. Jung, and H. A. Schultens, Localization of Calcium Entry through Calcium Channels in Olfactory Receptor Neurons using a Laser Scanning Microscope and the Calcium Indicator Dyes Fluo-3 and Fura-Red, *Cell Calcium*, 15: 341-348, 1994.
- [7] D. Willoughby, R. C. Thomas, and C. J. Schwieneing, Comparison of Simultaneous pH Measurements made with 8-Hydroxypyrene- 1,3,6-trisulphonic acid (HPTS) and pH-Sensitive Microelectrodes in Snail Neurons, *Pflugers Arch.*, 436: 615-622, 1998.
- [8] M. Poot, Y.-Z. Zhang, J. A. Kramer, K. S. Wells, L. J. Jones, D. K. Hanzel, A. G. Lugade, V. L. Singer, and R. P. Haugland, Analysis of Mitochondrial Morphology and Function with Novel Fixable Fluorescent Stains, *J. Histochem. Cytochem.*, 44: 1363-1372, 1996.
- [9] I. Johnson, Fluorescent Probes for Living Cells, *Histochem. J.*, 30: 123-140, 1998.
- [10] R. E. Pagano and O. C. Martin, Use of Fluorescent Analogs of Ceramide to Study the Golgi Apparatus of Animal Cells, in J. E. Celis, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Volume 2, 507-512, 1998.
- [11] X. Gao, L. Yang, J. A. Petros, F. F. Marshall, J. W. Simons, and S. Nie, In vivo Molecular and Cellular Imaging with Quantum Dots, *Curr. Opin. Biotech.*, 16: 63-72, 2005.
- [12] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss, Quantum Dots for Live Cells, in vivo Imaging, and Diagnostics, *Science*, 307: 538-544, 2005.
- [13] D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, and W. W. Webb, Water Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in vivo, *Science*, 300: 1434-1436, 2003.
- [14] E. J. G. Peterman, H. Sosa, and W. E. Moerner, Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of Biomolecular Motors, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 55: 79-96, 2004.
- [15] R. M. Wachter, M.-A. Elsliger, K. Kallio, G. T. Hanson, and S. J. Remington, Structural Basis of Spectral Shifts in the Yellow- Emission Variants of Green Fluorescent Protein, *Structure*, 6:1267-1277, 1998.

## نویسندگان

اصغر افتخاری<sup>۱\*</sup>ابراهیم قربانی<sup>۲</sup>، رضا ساقی<sup>۳</sup>

۱. دکتری شیمی، رئیس گروه مبارزه با مواد مخدر دانشگاه جامع علوم انتظامی امین فراجا
۲. کارشناسی ارشد شیمی، مدرس و عضو گروه علمی مبارزه با مواد مخدر دانشگاه جامع علوم انتظامی امین فراجا
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد مبارزه با مواد مخدر دانشگاه جامع علوم انتظامی امین فراجا

\*dr.ef.2003@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸

# اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر؛ شناسایی کانابینوئیدها به روش کروماتوگرافی لایه نازک

## واژه‌های کلیدی

اعتباربخشی، کانابینوئیدها، تترا هیدرو  
کانابینول، کروماتوگرافی لایه نازک،  
آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر.

## چکیده

کروماتوگرافی لایه نازک، روشی رایج برای جداسازی و شناسایی مواد مخدر است. چندین روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تجزیه و تحلیل کیفی و نیمه کمی کانابیس‌ها، با استفاده از انواع مختلفی از فاز ثابت و متحرک، روش‌های آماده‌سازی نمونه و روش‌های تصویرسازی/آشکارسازی لکه‌ها وجود دارد. با این حال، هر روشی که به تازگی در آزمایشگاه استفاده می‌شود، باید قبل از استفاده متداول، اعتباربخشی و تایید شود.

## مقدمه

اعتباربخشی به نتایج آزمایش، فرآیندی است که به‌منظور اطمینان از معتبر، دقیق و قاطع بودن داده‌ها و نتایج آزمایشگاه، اتخاذ می‌شود [۱]. این فرآیند، الزامی و مهم در عملیات آنالیز شیمیایی است. بیشتر شیمیدان‌های تجزیه، از اهمیت آن آگاه هستند، اما این که چرا و چه زمانی باید انجام و به‌طور دقیق، چه نیازهایی در آن برآورده شوند، همیشه برای آنها روشن نیست [۲]. انواع روش‌های آزمایشگاهی باید از نظر کیفیت بررسی شوند، به طوری که میزان صحت و درستی کار و قابل اعتماد بودن روش برای فعالیت‌های بعدی، به‌طور کامل مشخص شود؛ به این ترتیب، براساس میزان صحت و اعتبار به‌دست آمده، در زمان الگوگیری، تصمیم بر استفاده از این روش‌ها و یا عدم استفاده از آنها اتخاذ می‌شود. شاخص‌های مختلفی در این زمینه معرفی شده‌اند که هر کدام می‌تواند میزانی از اعتبار را مشخص کند [۳]. تمام



مراحل، از دریافت مواد مخدر در آزمایشگاه تا صدور نتیجه آزمایشگاهی توسط کارشناسان مربوطه، در اعتباربخشی نتایج تاثیرگذار است. دریافت و توصیف مشخصات نمونه، توزین مواد، محلول‌سازی، استفاده از محلول‌های استاندارد، به کارگیری روش‌های تشخیصی، جمع‌آوری مستندات و حتی نوع و سبک گزارش‌نویسی در اعتباربخشی نتیجه آزمایشگاهی موثر است [۴].

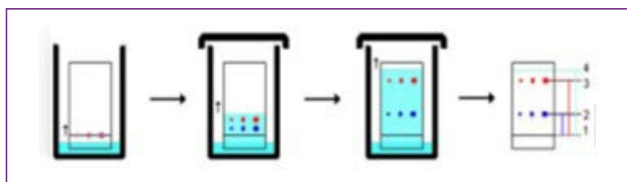
آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر منبع کلیدی اطلاعات و داده‌های علمی معتبر و قابل اعتماد در زمینه آنالیز مواد مخدر هستند. همچنین این آزمایشگاه‌ها، در سیستم قضایی، برای رسیدگی به جرایم مرتبط با مواد مخدر و اقدامات کاهش عرضه مواد مخدر، نقش بسزایی دارند. با این حال، سطح علمی کارشناسان آنالیز مواد مخدر به‌طور روز افزون به مخاطبان زیادی مرتبط و برای آنها مهم شده‌است. علم کشف جرایم، به‌منظور ارائه مدارک و شواهد دقیقی که در طراحی مداخلات موثر سیاسی، ضروری است، نیاز به تکامل و انطباق با بازار بسیار پویای مواد مخدر امروزه دارد که اهمیت آن، با ظهور جهانی مواد روانگردان جدید<sup>۱</sup> و تعدد بی‌سابقه‌ای از مواد موجود در این بازارها، بیش از پیش مشخص می‌شود. در چنین وضعیتی، اطلاعات تولید شده توسط آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر برای حمایت از سیاست‌ها و تصمیم‌گیری‌های بر پایه اسناد و حفاظت از سلامت عمومی، مهم‌تر از همیشه است [۵].

در این مقاله سعی شده‌است تا روش کروماتوگرافی لایه نازک، برای شناسایی کانابینوئیدها به‌عنوان روشی معتبر و تایید شده معرفی شود. آنالیز و تعیین ماهیت گیاه شاهدانه و مشتقات آن برای آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر پلیس مبارزه با مواد مخدر کشورهای جهان اهمیت دارد؛ زیرا برخلاف سایر مواد مخدر گیاه پایه که کشت و تولید آن تنها در چند کشور متمرکز است، شاهدانه به‌طور تقریبی در همه کشورهای جهان تولید می‌شود و محصولات شاهدانه بیشترین قاچاق را دارند. همه کشورهای جهان تحت تأثیر قاچاق کانابیس‌ها<sup>۲</sup> هستند. در سال ۲۰۱۹، بیش از ۵۰۰۰ تن کانابیس (گیاه و رزین) کشف و ضبط شد. همچنین گیاه شاهدانه، پر مصرف‌ترین ماده مخدر در سراسر جهان است، به طوری که تخمین زده می‌شود ۲۰۰ میلیون نفر در سال ۲۰۱۹، کانابیس‌ها را مصرف کرده‌اند که به‌طور تقریبی ۱۸ درصد افزایش نسبت به دهه گذشته و معادل حدود ۴ درصد از جمعیت جهانی ۱۵ تا ۶۴ ساله است.

از پایان قرن گذشته، پیشرفت‌های سریعی در روش‌های کشت گیاه شاهدانه صورت گرفته است و روش‌های تولید به‌طور فزاینده‌ای پیچیده شده‌اند. تحولات قوانین در برخی کشورها منجر به تغییراتی در پویایی کشت، تولید و بازارهای شاهدانه و محصولات شاهدانه شده‌است. این عوامل، منجر به در دسترس بودن طیف گسترده‌ای از شاهدانه در بازارهای غیرقانونی با افزایش مقدار تترا هیدرو کانابینول<sup>۳</sup> شده که به اجزای روانگردان حشیش اشاره دارد و شامل تعدادی ایزومر<sup>۴</sup> و انواع استریوشیمیایی<sup>۵</sup> (شیمی فضایی) آنها است که در کنوانسیون‌های کنترل بین‌المللی مواد مخدر نیز گنجانده شده‌است. همچنین افزایش تنوع محصولات حاوی تترا هیدرو کانابینول و وسایل استعمال آن، از جمله خوراکی‌ها، سیگار و قلیان‌های الکترونیکی و همچنین افزایش در دسترس بودن محصولات شاهدانه که به‌طور عمده، حاوی کانابیدیول<sup>۶</sup> هستند، وجود دارد.

در نتیجه، آنالیز حشیش و محصولات شاهدانه، با نیاز به انجام اقداماتی از جمله شناسایی و در بیشتر مواقع، کمی کردن سطوح پایین تترا هیدرو کانابینول، تمایز ایزومرهای آن به ویژه دلتا-۹- تترا هیدرو کانابینول<sup>۷</sup> و دلتا-۸- تترا هیدرو کانابینول<sup>۸</sup> و شناسایی سایر کانابینوئیدهای موجود، برای آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر پیچیده‌تر شده‌است. این موضوع، چالش‌های تجزیه‌ای متنوعی را ایجاد می‌کند که نیازمند روش‌های تجزیه‌ای قابل اعتماد، تکرارپذیر و حساس است. علاوه‌بر این، عدم در دسترس بودن مواد مرجع دلتا-۹- تترا هیدرو کانابینول، ایزومرهای آن و سایر کانابینوئیدها، نگرانی فزاینده‌ای برای آزمایشگاه‌های تشخیص و آنالیز مواد مخدر است [۶].

با توجه به روش‌های پیشنهادی سازمان‌های بین‌المللی مبارزه با مواد مخدر، برای آنالیز مواد مخدر باید از روش‌هایی



شکل (۲): چگونگی جداسازی اجزای نمونه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک [۱۰].

کروماتوگرافی لایه نازک روشی بسیار آسان بوده که به سرعت هم انجام می‌شود. این روش برای جداسازی اجزاء مخلوط بسیار کارآمد است و می‌توان از آن برای تعیین بهترین حلال استخراج کننده به منظور کروماتوگرافی ستونی استفاده کرد.

در کروماتوگرافی لایه نازک می‌توان از همان مواد جامدی که در کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود، به عنوان فاز ساکن استفاده کرد که در این میان، سیلیکا و آلومینا بیشترین کاربرد را دارند. به طور معمول، جسم جاذب را با مقدار کمی از ماده چسباننده مانند گچ، کلسیم سولفات و یا نشاسته مخلوط می‌کنند تا جسم جاذب، چسبندگی لازم را پیدا کند و به صفحه بچسبد. صفحه‌ها را می‌توان قبل از مصرف تهیه کرد و یا از ورقه‌های پلاستیکی آماده که در بازار موجود است، استفاده نمود [۱۰].

### ■ مزایای کروماتوگرافی لایه نازک

- ♦ کاربرد ساده داشته و نیاز به تجهیزات اندک دارد؛
- ♦ قابلیت جداسازی و شناسایی مقادیر ناچیز مواد را داراست؛
- ♦ زمان انجام آزمایش کوتاه است؛
- ♦ می‌توان چندین نمونه را همزمان آزمایش کرد؛
- ♦ از فازهای ثابت و متحرک متنوع می‌توان استفاده کرد؛
- ♦ از معرف‌های ظاهر کننده متنوع می‌توان استفاده کرد.

### ■ معایب کروماتوگرافی لایه نازک

- ♦ حساسیت آن کمتر از روش‌های GC، HPLC و طیف‌سنجی جرمی-کروماتوگرافی گازی (GC-MS)؛
- ♦ دقت و صحت آن کمتر از روش‌های ذکر شده است [۹].

### ■ کاربرد کروماتوگرافی لایه نازک در شناسایی کانابینوئیدها

کروماتوگرافی لایه نازک، روشی رایج برای جداسازی و شناسایی مواد مخدر است. این روش در انتخاب هر دو فاز ثابت و متحرک، ارزان، سریع و منعطف است و در برابر طیف گسترده‌ای از مواد، از قطبی‌ترین تا غیرقطبی‌ترین مواد، قابل استفاده است. در این نوع کروماتوگرافی، پلاریته<sup>۲۰</sup> اهمیت

که بالاترین قدرت تشخیص را دارند، استفاده نمود. به عنوان مثال، اگر از روش گروه (الف) استفاده می‌شود، باید حداقل یکی از سه روش دیگر را نیز به منظور تایید به کار برد تا بتوان نتایج را با اطمینان بیشتری برای ارائه آماده کرد [۴ و ۹]؛ به عنوان مثال اگر در شناسایی کانابینوئیدها، از گروه (الف)، یکی از روش‌ها انتخاب شد، به منظور اعتباربخشی به نتایج و اطمینان از آن، می‌توان از روش کروماتوگرافی لایه نازک (از گروه (ب)) به عنوان یک روش معتبر، بهره برد.

جدول (۱): روش‌های آنالیز مواد مخدر و روانگردان [۴ و ۹].

نام گروه	روش‌های آنالیز
(الف)	طیف‌سنجی مادون قرمز، طیف‌سنجی جرمی، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای، طیف‌سنجی رامان.
(ب)	الکتروفورزهای موئین، کروماتوگرافی گازی <sup>۱۷</sup> ، طیف‌سنجی تحرک یونی، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا <sup>۱۸</sup> ، کروماتوگرافی لایه نازک، آزمون میکروسکوپی.
(ج)	آزمون‌های رنگی، آزمون‌های ایمنی‌سنجی، نقطه ذوب.

بسیاری از این روش‌ها نتایج قابل قبولی را ارائه می‌دهند. با این حال، هر روشی که به تازگی در آزمایشگاه استفاده می‌شود، باید قبل از استفاده متداول، اعتباربخشی و تایید شود [۲ و ۴].

### ■ تعریف کروماتوگرافی

کروماتوگرافی یکی از روش‌های جداسازی اجزای مخلوط است که در آن از اختلاف توزیع اجزا بین فاز ساکن و متحرک (فاز ساکن به طور معمول، سیلیس و یا آلومین) استفاده می‌شود.

### ■ کروماتوگرافی لایه نازک

کروماتوگرافی لایه نازک نوعی کروماتوگرافی جذبی جامد-مایع بوده که اصول آن همانند کروماتوگرافی ستونی است. اما در این مورد، جسم جاذب جامد، به صورت یک لایه نازک روی یک قطعه شیشه، پلاستیک و یا فلز پخش می‌شود. یک قطره از محلول نمونه معلوم و یا مجهول را در نزدیکی لبه صفحه می‌گذارند و صفحه را به همراه مقدار کافی از حلال استخراج کننده در ظرفی قرار می‌دهند. سطح حلال باید به گونه‌ای باشد که فقط به زیر لکه برسد. حلال بر اساس ویژگی موئینگی به سمت بالای صفحه حرکت می‌کند و اجزاء مخلوط را با سرعت‌های متفاوت با خود می‌برد. شکل (۲) چگونگی جداسازی اجزای نمونه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک را نشان می‌دهد.

مخزن TLC بماند تا اشباع فاز بخار قبل از آنالیز به دست آید (با مخازن با استفاده از پوشش کاغذ جاذب، به طور تقریبی ۵ دقیقه طول می کشد).

### ■ روش ها

روش های شرح داده شده در زیر به صورت میدانی در آزمایشگاه های تشخیص و آنالیز مواد مخدر، آزمایش شده و برای هدف مناسب هستند.

### روش اول:

در روش اول، از فاز ثابت صفحه سیلیکاژل HPTLC ۱۰ سانته متری، استفاده شده است و سه نوع فاز متحرک مختلف به شرح جدول (۲) پیشنهاد شده است. به عنوان مثال برای تهیه فاز متحرک (۱) به میزان ۲۰ میلی لیتر (با توجه به ظرفیت تانک) باید ۱۶ میلی لیتر پترولیوم اتر ۹۰/۱۰ و ۴ میلی لیتر از دی اتیل اتر درون تانک اضافه شود.

♦ فاز متحرک پیشنهادی (۳) فقط برای شناسایی کانابینوئید اسیدها مناسب است.

جدول (۲): فازهای متحرک پیشنهادی برای روش اول (۶ و ۱۱).

نوع صفحه TLC: صفحه سیلیکاژل HPTLC ۱۰ در ۱۰ سانته متری آنالیز		
فاز متحرک پیشنهادی (۱)	پترولیوم اتر ۹۰/۱۰	۸۰ درصد حجمی/حجمی
	دی اتیل اتر	۲۰ درصد حجمی/حجمی
فاز متحرک پیشنهادی (۲)	سیکلو هگزان	۵۲ درصد حجمی/حجمی
	دی ایزوپروپیل اتر	۴۰ درصد حجمی/حجمی
	دی اتیل آمین	۸ درصد حجمی/حجمی
فاز متحرک پیشنهادی (۳) (برای کانابینوئید اسیدها)	ان هگزان	۷۰ درصد حجمی/حجمی
	دی اکسان	۲۰ درصد حجمی/حجمی
	متانول	۱۰ درصد حجمی/حجمی

### روش دوم:

در روش دوم، فاز ثابت صفحه پلاستیکی TLC روکش شده با سیلیکاژل ۶۰ (F254)، ۱۰ در ۲۰ سانته متری، با ضخامت ۰/۲ میلی متر استفاده شده است. با توجه به جدول (۳)، یک نوع فاز متحرک برای این نوع فاز ثابت، مناسب تشخیص داده شده است.

زیادی دارد [۹ و ۱۰]. کروماتوگرافی لایه نازک، شناسایی اجزای تشکیل دهنده یک ماده مخدر را در کنار استفاده از ماده مخدر استاندارد مرجع، فراهم می کند. از این روش، برای تعیین ماهیت ماده مخدر، در ترکیب با سایر روش های آنالیز، استفاده می شود.

چندین روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تجزیه و تحلیل کیفی و نیمه کمی کانابیس ها، با استفاده از انواع مختلفی از فاز ثابت (صفحات کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۲۱</sup>)، روش های آماده سازی نمونه، فاز متحرک (سیستم های حلال) و روش های تصویرسازی و یا آشکارسازی لکه ها وجود دارد [۱۰].

موادی که به هنگام لکه گذاری روی صفحه قرار داده می شوند، پس از تفکیک شدن روی آن باقی مانده و در نهایت، در صورت به کارگیری آشکارسازهای مناسب، قابل شناسایی و مشاهده خواهند بود [۹].

### □ صفحات TLC (فاز ثابت)

♦ پوشش: سیلیکاژل جی<sup>۲۲</sup>، با ضخامت لایه ۰/۲۵ میلی متر و حاوی نشانگر بی اثر که در زیر نور UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر فلورسانس می کند (سیلیکاژل جی با نشانگر فلورسانس ۲۵۴ نانومتر<sup>۲۳</sup>).

♦ اندازه صفحات: ۲۰ در ۲۰ سانته متر (با قابلیت دو نیم شدن)، ۱۰ در ۲۰ سانته متر، ۵ در ۱۰ سانته متر (مورد دوم باید از سمت ضلع ۱۰ سانته متری عمود بر مخزن TLC استفاده شود).

☑ نکته: صفحات کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا<sup>۲۴</sup> نیز می توانند استفاده شوند. این صفحات، یک جاذب سیلیکاژل ۶۰ بهینه شده با اندازه ذرات ۵ تا ۶ میکرومتر در مقایسه با ذرات ۱۰ تا ۱۲ میکرومتری مورد استفاده در کاغذهای TLC معمولی دارند و آنالیز سریع و با حساسیت بالاتری را ارائه می دهند.

صفحات آماده شده به منظور فعال سازی، باید قبل از استفاده، توسط کارشناس آزمایشگاه، به مدت حداقل ۱۰ تا ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شوند (لازم به ذکر است، فعال سازی حرارتی برای صفحات بسته بندی شده تجاری، مورد نیاز نیست). سپس صفحات در یک دسیکاتور روی سیلیکاژل نارنجی نگهداری شوند. از سیلیکاژل آبی نیز می توان استفاده نمود.

♦ هشدار ایمنی: هنگام استفاده از سیلیکاژل آبی حاوی کلرید کبالت (II) به دلیل سرطان زا بودن، مسایل ایمنی مورد توجه قرار گیرد.

### □ فاز متحرک TLC

با استفاده از پیت ها، دیسپنسر ها و سیلندر های اندازه گیری، فاز متحرک را مطابق با دستورالعمل های زیر، تا حد امکان به صورت دقیق آماده کنید. فاز متحرک باید به مدت کافی در



## جدول (۳): فاز متحرک پیشنهادی برای روش دوم [۶].

نوع صفحه TLC؛ صفحه پلاستیکی TLC روکش شده با سیلیکاژل ۶۰ (F254)، ۱۰ در ۲۰ سانتی متری، با ضخامت ۰/۲ میلی متر.		
فاز متحرک پیشنهادی (۴)	تولون	۹۷ درصد حجمی/حجمی
	دی اتیل آمین	۳ درصد حجمی/حجمی
مدت زمان توسعه فاز: به طور تقریبی، ۱۰ دقیقه.		

هستند. با این حال، حلال های غیر قطبی مانند ان-هگزان و پترولیوم اتر، استخراج بهتری را صورت می دهند؛ اما از لحاظ کمی، فقط کانابینوئیدهای خنثی (آزاد) را استخراج می کنند، در حالی که دیگر حلال ها و حلال های ترکیبی، استخراج کانابینوئید اسیدها را به صورت کمی، بهتر انجام می دهند. به منظور تحلیل کیفی، استفاده از پترولیوم اتر برای استخراج کانابینوئیدهای اصلی کافی است، در حالی که برای اهداف کمی و تعیین میزان تترا هیدرو کانابینول، دیگر حلال ها یا حلال های ترکیبی باید استفاده شوند.

## محلول های استاندارد

محلول های استاندارد باید با غلظت به طور تقریبی ۰/۵ میلی گرم کانابینوئید در هر میلی لیتر، در متانول تهیه و در یک مکان خنک و تاریک نگهداری شوند.

## لکه گذاری و توسعه فاز متحرک

۱ تا ۵ میکرولیتر از محلول نمونه، ۲ میکرولیتر از محلول های استاندارد و ۲ میکرولیتر حلال خالی (برای انجام کنترل منفی) به عنوان نقاط جداگانه روی صفحه TLC لکه گذاری کنید. توصیه می شود که حلال خالی را هم زمان اجرا کنید تا نشان دهید که حلال مورد استفاده برای استخراج نمونه، حاوی کانابینوئید نیست. لکه گذاری نیز باید به دقت انجام شود تا از آسیب رساندن به سطح صفحه TLC جلوگیری شود.

## نکات مهم آنالیزی:

- نقطه شروع اجرا (خط لکه گذاری) باید ۲ سانتی متر از کف صفحه باشد. (به منظور آسان گیری الزامات آنالیزی، فاصله ۱ سانتی متر هم کفایت می کند و به صورت میدانی آزمایش شده و مناسب هدف است).
- فاصله بین نقاط لکه گذاری باید حداقل ۱ سانتی متر باشد و نقاط نباید به لبه کناری صفحه، نزدیک تر از ۱/۵ سانتی متر قرار گیرند.
- برای اجتناب از لکه های پراکنده در طول توسعه فاز متحرک، اندازه لکه نمونه باید تا حد ممکن کوچک باشد (شعاع حدود ۲ میلی متر).
- اجازه دهید نقاط، خشک شوند و صفحه را در یک مخزن اشباع از حلال قرار دهید. (اشباع فاز بخار با استفاده از صفحات اشباع شده با حلال یا کاغذ صافی به عنوان پوشش مخزن، حاصل می شود).
- حلال موجود در مخزن باید پایین تر از خط لکه گذاری باشد.
- هنگامی که حلال به خط توسعه (۱۰ سانتی متر از خط شروع) که از قبل مشخص شده است، رسید؛ به سرعت، صفحه را از تانک TLC خارج کنید. در غیر این صورت، لکه های پراکنده ایجاد می شود.

در واقع تفاوت اصلی روش اول و دوم در فاز ثابت است که سه فاز متحرک برای روش اول و یک فاز متحرک برای روش دوم، در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر مورد آزمایش قرار گرفته و بهینه تشخیص داده شده است.

## آماده سازی نمونه

اگر هدف از انجام آزمایش، کیفی باشد (برای تایید شواهد میکروسکوپی یا ماکروسکوپی مبنی بر وجود کانابینوئیدها در ماده مشکوک)، همگن کردن مواد گیاهی لازم نیست و فقط آن قسمت هایی از گیاه شاهدانه که دارای بالاترین میزان کانابینوئید هستند، باید برای استخراج انتخاب شوند (قسمت های گل دهنده و سرشاخه های گیاه).

مقادیر مناسب نمونه برای استخراج، به طور تقریبی به شرح زیر است:

- اگر نمونه از گیاه شاهدانه باشد، حدود ۵۰۰ میلی گرم؛
- اگر نمونه صمغ شیش باشد، حدود ۱۰۰ میلی گرم؛
- اگر نمونه از روغن گیاه شاهدانه باشد، حدود ۵۰ میلی گرم.

استخراج باید به صورتی انجام شود که غلظت تترا هیدرو کانابینول موجود در محلول نهایی، حدود ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر باشد.

نمونه با ۱۰ میلی لیتر حلال، به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای اتاق با استفاده از همزن یا در دستگاه اولتراسونیک استخراج و ماده استخراج شده قبل از کروماتوگرافی فیلتر شود. استخراج غیرفعال، با مخلوط نمونه/حلال در حالت ایستاده نیز می تواند مورد استفاده قرار گیرد. فیلتراسیون می تواند انجام شود اما ضروری نیست؛ استفاده از مایع رویی نیز می تواند نتایج معتبری را به ما ارائه دهد. به منظور تعیین ماهیت ماده مخدر، مقادیر کمتر حلال و نمونه، کافی هستند. با این حال، هر گونه اصلاح در روش توصیف شده، باید توسط کارشناس آزمایشگاه، اعتباربخشی و تایید شود.

از آنجا که کانابینوئیدها به راحتی در بیشتر حلال های آلی همچون متانول، پترولیوم اتر، ان-هگزان، تولون، کلروفرم و حلال های ترکیبی همچون متانول:کلروفرم (۹:۱ حجمی/حجمی) حل می شوند؛ بنابراین، برای استخراج آن ها مناسب

## □ تصویرسازی/آشکارسازی

♦ صفحه TLC نباید با محلول پاشی مرطوب شود؛ زیرا ممکن است موجب پخش شدن لکه‌ها شود.

♦ به دلیل سرطان‌زا بودن فست بلو سالت B، اقدامات ایمنی مناسب در هنگام استفاده، مدنظر قرار گیرد. فست بلو سالت BB و فست بلو سالت RR جایگزین‌های مناسبی برای فست بلو سالت B هستند؛ اگرچه هر دو، واکنش آهسته‌تری دارند. لازم به ذکر است، فست بلو سالت B، لکه‌های پر رنگ و واضح‌تری می‌دهد.

## □ نتایج (تفسیر)

پس از تصویرسازی، دور لکه را خط بکشید (مثلاً با مداد) و مقدار  $R_f$  هر لکه را با استفاده از رابطه (۱) محاسبه نمایید:

### رابطه (۱)

$$R_f = \frac{\text{فاصله مهاجرت از مبدا تا مرکز لکه}}{\text{فاصله توسعه از مبدا تا محل پیشروی حلال}}$$

نتایج جدول (۵) (مقادیر  $R_f \times 100$ ) برای فازهای پیشنهادی (۱)، (۲) و (۳) به استفاده از روش‌هایی که در آنها از صفحات HPTLC استفاده شده‌است، اشاره می‌کند. صفحات معمولی ۲۰ سانتی‌متر در ۲۰ سانتی‌متر با ضخامت لایه سیلیکاژل ۰/۲۵ میلی‌متر، فاصله قابل قیاس با هم دارند، اما مقادیر  $R_f$  مربوطه باید محاسبه شوند. فاز پیشنهادی (۳)، تنها برای جداسازی و شناسایی کانابینوئیک اسیدها توصیه می‌شود. این روش، جداسازی CBD، CBN، THC را به خوبی انجام نمی‌دهد.

جدول (۵): مقادیر  $R_f \times 100$  کانابینوئیدها اصلی با استفاده از روش‌های بالا [۶].

فازهای متحرک و مقادیر $R_f \times 100$				
ماده	فاز متحرک پیشنهادی (۱)	فاز متحرک پیشنهادی (۲)	فاز متحرک پیشنهادی (۳)	فاز متحرک پیشنهادی (۴)
کانابینول <sup>۲۶</sup> (CBN)	۳۳	۲۶	۴۷	۲۸
تترا هیدرو کانابینول (THC)	۳۷	۳۸	۴۹	۳۵
کانابیدول (CBD)	۴۲	۴۲	۴۷	۴۱
تترا هیدرو کانابینولیک اسید <sup>۲۷</sup> (THCA)	۶	*	۳۶	*

صفحات باید قبل از تصویرسازی خشک شوند. این کار را می‌توان در دمای اتاق و یا با استفاده از خشک کن، آون یا هوای گرم انجام داد. در موارد گفته شده، باید مراقب بود که هیچ یک از اجزاء مورد نظر، در معرض تجزیه حرارتی قرار نگیرند. در این مواقع، استفاده از هود توصیه می‌شود.

## □ روش‌های تصویرسازی/آشکارسازی

### ■ (الف): نور ماوراءبنفش با طول موج ۲۵۴ نانومتر

لکه‌های تیره در پس‌زمینه سبز، مشاهده می‌شوند. دور لکه‌ها را خط کشیده (با یک مداد) و در صورت لزوم، یک عکس دیجیتالی از آن گرفته شود.

### ■ (ب): اسپری کردن معرف

از فست بلو سالت B<sup>۲۵</sup> یا فست بلو سالت BB و همچنین فست بلو سالت RR برای تهیه اسپری معرف مطابق با جدول (۴)، استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال: برای تهیه معرف (۱) ۵۰ میلی‌گرم از فست بلو سالت B به ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال اضافه نموده و روی کاغذ TLC اسپری می‌نماییم.

### جدول (۴): دستورالعمل تهیه اسپری معرف [۶ و ۱۱].

معرف (۱)	فست بلو سالت B	۵۰ میلی‌گرم در ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال
معرف (۲)	فست بلو سالت B	۵۰ میلی‌گرم در ۱ میلی‌لیتر آب و سپس ۲۰ میلی‌لیتر متانول اضافه شود.
معرف (۳)	فست بلو سالت BB	۲۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر آب و بلافاصله اضافه کردن حدود ۳ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۲/۵ مولار
معرف (۴)	فست بلو سالت RR	۵۰ میلی‌گرم در ۲۵ میلی‌لیتر متانول (و یا متانول: آب (۱:۱))

□ نکته: زمانی که از فست بلو سالت BB و فست بلو سالت RR استفاده می‌شود، تهیه روزانه اسپری معرف، لازم نیست.

اگر نیاز است صفحه TLC، با نتایج آنالیز، در پرونده‌ای ثبت و نگهداری شوند، می‌توان از توالی محلول پاشی (به‌صورت اسپری) مانند دی اتیل آمین - محلول فست بلو سالت B - دی اتیل آمین استفاده کرد. سپس با خشک کردن صفحه TLC با هوای داغ یا نگهداری آن به مدت یک شب در دمای اتاق، می‌توان آن را در کیسه‌های پلاستیکی شفاف، مهر و موم نموده و بدون تیره شدن، برای مدت طولانی نگهداری نمود.

## □ نکات مهم آنالیزی

♦ برای ایجاد رنگ مناسب، صفحه TLC باید قلیایی باشد. بنابراین، باید قبل از استفاده از معرف (۲)، دی اتیل آمین روی صفحه اسپری شود.

## □ آنالیز نیمه کمی گیاه شاهدانه با استفاده از TLC

(به عنوان مثال) به صورت زیر برآورد نمود:

## رابطه (۲)

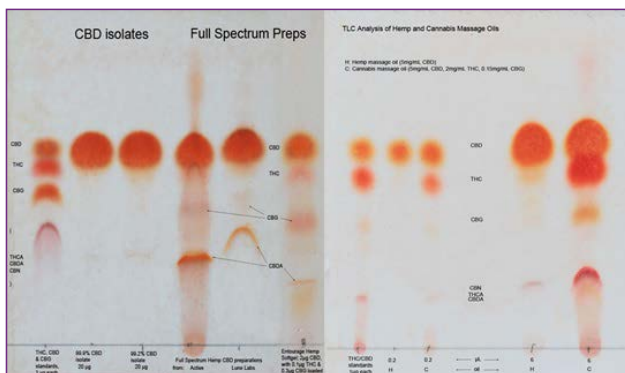
غلظت THC در لکه نمونه × حجم حلال مورد استفاده برای استخراج × 100%  
وزن گیاه شاهدانه نمونه برداری شده

## رابطه (۳)

$$3\% = \frac{0.5 \text{ میلی گرم بر میلی لیتر} \times (3 \times 10 \text{ میلی لیتر} \times 100\%)}{500 \text{ میلی گرم}}$$

## □ استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی کانابینوئیدها در صنعت

کاربرد روش های شناسایی اجزای مخدر و روانگردان در مواد مختلف، فقط مختص آزمایشگاه های تشخیص و آنالیز مواد مخدر پلیس، پزشکی قانونی و سیستم قضایی کشورهای مختلف نیست، بلکه در صنعت مواد آرایشی و بهداشتی، تولید دارو و غیره نیز کاربرد دارد. در شکل (۳) کاربرد روش کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی کانابینوئیدها در صنعت مواد آرایشی و بهداشتی ارائه شده است:



شکل (۳): استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک برای شناسایی کانابینوئیدها در صنعت [۱۲].

## ■ نکات مهم آنالیزی

♦ مقادیر  $R_f$  همیشه به دلیل تغییرات کوچک در ترکیب صفحه TLC و فعال سازی آن، فاز متحرک، اشباع مخزن یا فاصله توسعه فاز متحرک، تکرارپذیر نیستند. این مقادیر، همچنین وابسته به شرایط آزمایشگاهی (دما، رطوبت و غیره) دستخوش تغییرات هستند. بنابراین، مقادیر  $R_f$  ارائه شده، نشانه هایی از رفتار کروماتوگرافی مواد فهرست شده هستند. ♦ ضروری است که استانداردهای مرجع به طور هم زمان در یک صفحه اجرا شوند.

♦ برای اهداف شناسایی، هم مقدار  $R_f$  و هم رنگ لکه ها، بعد از اسپری با معرف های تصویر ساز، باید همیشه در کنار هم بررسی و در نظر گرفته شوند.

در برخی موارد ممکن است برآورد سریع غلظت تترا هیدرو کانابینول نمونه شاهدانه مفید باشد. این کار را می توان با استفاده از مقایسه لکه های نمونه و محلول استاندارد انجام داد. در ذیل مثالی برای این مورد ذکر شده است:

♦ تهیه نمونه شاهدانه

✓ وزن گیاه شاهدانه نمونه برداری شده: ۵۰۰ میلی گرم؛

✓ حجم حلال مورد استفاده برای استخراج: ۱۰ میلی لیتر؛

✓ حجم نمونه اعمال شده بر صفحه TLC: ۱ میکرو لیتر.

♦ آماده سازی محلول استاندارد THC

✓ غلظت استاندارد THC: ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر؛

✓ حجم محلول استاندارد اعمال شده بر صفحه TLC: سه نقطه مختلف به حجم ۱، ۲ و ۳ میکرو لیتر.

شدت لکه نمونه را با لکه های غلظت های مختلف محلول استاندارد THC مقایسه کنید. اگر لکه نمونه دارای شدت رنگ مشابهی به اندازه لکه استاندارد ۳ میکرو لیتری THC باشد، محتوای THC خنثی، در نمونه شاهدانه را می توان با استفاده از رابطه های (۲) و (۳) برای ۳ میکرو لیتر محلول استاندارد THC

## نتیجه گیری

با توجه به الزام پیاده سازی فرآیند اعتباربخشی در آزمایشگاه، باید روش های کروماتوگرافی لایه نازک، برای آنالیز کانابیس ها، با توجه به هدف انجام آزمایش، قبل از استفاده متداول، اعتباربخشی و تایید شوند. در روش های کروماتوگرافی لایه نازک اعتباربخشی شده در آزمایشگاه تشخیص و آنالیز مواد مخدر و در بین فازهای متحرک پیشنهادی، فاز متحرک پیشنهادی شماره (۳)، فقط برای شناسایی کانابینوئیک اسیدها مناسب است و از سه روش پیشنهادی دیگر می توان برای جداسازی کانابینول، تترا هیدرو کانابینول و کانابیدول بهره برد. برای جداسازی مطلوب آنها، استفاده از صفحات TLC روکش شده با سیلیکاژل ۶۰ (F254) نتیجه بهتری را در پی دارد. روش های شناسایی مواد مخدر و روانگردان مختص آزمایشگاه های تشخیص و آنالیز مواد مخدر نیست؛ به دلیل اینکه این آزمایشگاه ها، منبع کلیدی اطلاعات و داده های علمی معتبر و قابل اعتماد در زمینه آنالیز مواد مخدر هستند، از ظرفیت اطلاعاتی آنها در صنعت نیز می توان استفاده نمود.

## پی‌نوشت

1. New psychoactive substances (NPS)
2. Cannabis
3. Tetrahydrocannabinol(THC)
4. Isomer
5. Stereochemical
6. Cannabidiol(CBD)
7.  $\Delta^9$ -THC
8.  $\Delta^8$ -THC
9. Cannabis sativa L. (Linnaeus)
10. The genera Cannabis and Humulus (hops)
11. Cannabaceae
12. C. sativa subsp. sativa
13. C. sativa subsp. indica
14. C. sativa subsp. ruderalis
15. C. sativa subsp.spontanea
16. C. sativa subsp. Kafiristanca
17. Gas chromatography (GC)
18. High-performance liquid chromatography (HPLC)
19. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)
20. Polarity
21. Thin Layer Chromatography (TLC)
22. Silica gel G
23. Silica gel GF254
24. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)
25. Fast Blue B
26. Cannabinol (CBN)
27. tetrahydrocannabinolic acid (THCA)

## مراجع

- [1] Cummings J, Ward TH, Greystoke A, Ranson M, Dive C. Biomarker method validation in anticancer drug development. Br J Pharmacol. 2008;153(4):646–656. Doi: 10.1038/sj.bjp.0707441.
- [2] B.Magnusson & U.Ornemark (eds.)Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0.
- [۳] شیرزادی، زهرا (۱۳۹۵)، معرفی انواع پارامترهای اعتبارسنجی روش‌های آزمایشگاهی و داده‌های لازم برای آن، چهارمین همایش ملی شیمی، پتروشیمی و نانو ایران، تهران، <http://civilica.com/doc/587448>
- [۴] فیض‌بخش، روح‌اله (۱۳۹۷). گزارش کارگاه آموزشی اعتباربخشی به نتایج در آزمایشگاه آنالیز مواد مخدر، تهران: پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا.
- [5] Martin Raithelhuber, Sabrina Levissianos, Joao Rodrigues: The role of drug analysis laboratories in Early Warning Systems,Vienna: UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME,2020
- [6] Iphigenia Naidis & Conor Crean:Recommended Methods for the IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CANNABIS AND CANNABIS PRODUCTS,Vienna: UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME,2022
- [7] Barbara Remberg:Recommended Methods for the IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF CANNABIS AND CANNABIS PRODUCTS,Vienna: UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME,2009
- [۸] صفوی، زهرا (۱۳۹۸). آشنایی با ماده اعتیاد آور «گل» و عوارض و اثرات سوء مصرف آن. فصلنامه علمی مطالعات مبارزه با مواد مخدر، ۱۱(۴۳). ۴۷-۶۶.
- [۹] قربانی، ابراهیم (۱۳۹۶)، روش‌های نوین کشف و آنالیز قانونی مواد مخدر و روانگردان، فصلنامه مطالعات مبارزه با مواد مخدر، ۹(۳۴). ۳۵-۴۵.
- [۱۰] حسین‌زاده اقدم، وحید؛ محمدی، نرگس (۱۳۹۵). کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا. فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران، ۴(۱۶). ۵-۱۴.
- [۱۱] کارشناسان پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا (۱۳۹۷). دانشنامه تخصصی مواد مخدر(جلد اول)، تهران: پلیس مبارزه با مواد مخدر ناجا.
- [12] <https://mslavenda.com/tlcanalysis.htm>



## نویسنده

ساناز شبیکه<sup>۱،۲\*</sup>

۱. لیسانس الکترونیک، کارشناس آزمایشگاه  
میکروسکوپ الکترونی عبوری دانشگاه شیراز  
۲. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی  
عبوری

\*researchers4u@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰

## واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ الکترونی عبوری، نیمه‌هادی، تحلیل  
عنصری، آماده‌سازی نمونه.

# کاربرد میکروسکوپ الکترونی عبوری در زمینه توسعه، تحلیل و تشخیص نقایص دستگاه‌ها و قطعات صنعت نیمه‌هادی

## چکیده

در سال‌های اخیر، صنعت نیمه‌هادی به‌طور چشمگیری فناوری‌های جدیدی را معرفی نموده و به سرعت در حال کاهش اندازه تولیدات خود است که در نتیجه این امر، کارکرد دستگاه‌ها به‌طور قابل توجهی بهبود یافته‌اند. در این بین، میکروسکوپ الکترونی عبوری<sup>۱</sup> نقش بسیار مهمی در فرآیند توسعه، کنترل تولید و تحلیل نقایص قطعات نیمه‌هادی داشته است. از طرف دیگر، پیشرفت‌های دست یافته در زمینه چگونگی مشاهده نمونه‌های نیمه‌هادی درون TEM موجب شده که دیگر از آن به‌عنوان دستگاهی مختص عملیات تحقیقاتی در مؤسسات علمی و دانشگاه‌ها یاد نشود و به‌عنوان منبعی قابل اطمینان به‌منظور فرآیندهای ارزیابی و تحلیل نقایص نیمه‌هادی‌ها در نظر گرفته شود. روش‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری علاوه بر قدرت تفکیک‌پذیری مکانی برتر، قابلیت‌های تحلیل عنصری بسیار حساس را نیز برای به کارگیری در فرآیند سنج‌شناسی و مشخصه‌یابی مواد دستگاه‌ها/قطعاتی با اندازه زیر نانومتر مورد استفاده در فناوری‌های نیمه‌هادی پیشرفته ارائه می‌نماید. کاربرد TEM برای مواردی نظیر ارزیابی جزئیات سطحی، ابعاد ساختارهای دستگاه/قطعه و نقایص و عیوب به وقوع پیوسته در طول فرآیند تولید بسیار مؤثر است. در این مقاله، کاربردهای TEM در زمینه مشخصه‌یابی فیزیکی، تحلیل ترکیبی و تحلیل نقایص ساختارهای قطعات نیمه‌هادی بررسی می‌شود. همچنین در این مقاله، علاوه بر شرح تفصیلی روش‌های مختلف آماده‌سازی نمونه‌های متنوع نیمه‌هادی، مزایا و معایب (به‌عنوان مثال: آسیب و صدمه القاء شده با پرتو یونی متمرکز و آلاینش گالیم)<sup>۲</sup> آنها و روش‌های کنترل هر یک شرح داده شده‌اند و چالش‌های به وجود آمده به دلیل افزودن ساختارهای جایگزین گیت<sup>۳</sup>، ویژگی‌های اندازه نانو، دی الکتریک‌های<sup>۴</sup> گیت<sup>۵</sup> K-بالا و نیازمندی‌های مواد جدید در زمینه یکپارچگی ساختارهای قطعات نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

## مقدمه

شرکت‌های پیشرو در زمینه تولید نیمه‌هادی به سرعت در حال تغییر خط تولید خود برای ارائه محصولاتی با مقیاس زیر یک چهارم میکرون هستند. قطعات با اندازه  $0.18 \mu\text{m}$  در حال تولید بوده و فناوری تولید قطعات با اندازه  $0.13 \mu\text{m}$  نیز در راه است. از آنجایی که اندازه ترانزیستور به چنین ابعاد کوچکی تقلیل یافته، لذا تمام ویژگی‌ها نظیر عرض گیت پلی سیلیکون<sup>۶</sup> و ضخامت اکسید گیت<sup>۷</sup> نیز باید در مقیاس اتمی تنظیم شوند. در این بین، دستیابی به اتصال قابل اطمینان بین ده‌ها میلیون ترانزیستور با اتصالات میانی چند لایه‌ای (که بیش از ۸۰ درصد از مراحل فرآیند تولید قطعات نیمه‌هادی را پوشش داده) به چالشی عظیم برای مهندسان فرآیند تبدیل شده‌است. به‌منظور دستیابی به چنین اتصالات میانی، بسیاری از روش‌های پردازش پیشرفته باید به‌صورت صحیح پیاده‌سازی و برای توزیع اندازه دقیقی از مواد مورد نظر در موقعیت‌های ایده‌آل نیز شرایط پردازش باید بدون کوچکترین خطایی کنترل شود. هم‌اکنون تغییر جنس اتصالات میانی از آلومینیوم به مس نیازمند پیاده‌سازی فرآیندهای بی‌شماری نظیر سد تانتالم<sup>۸</sup>، دانه مس، پردازش ساختارهای دمشقی دوگانه و آبکاری الکترولیتی است. تاکنون تولید نیمه‌هادی تا این حد به انجام مشخصه‌یابی دقیق در هر مرحله از فرآیند کلی وابسته و همچنین عملکرد قطعات نیمه‌هادی نیز هرگز تا این اندازه به کیفیت فیلم/غشاء، ساختار رابط/واسط، ناخالصی‌ها و آلیش حساس نبوده است. به‌طور واضح انتظار می‌رود که میکروسکوپ الکترونی عبوری به دلیل ارائه قدرت تفکیک‌پذیری مکانی و قابلیت تحلیلی بسیار بالا، نقش مهم و مؤثری در زمینه تولید و توسعه قطعات نیمه‌هادی با اندازه زیر یک چهارم میکرون بر عهده داشته باشد. با وجودی که TEM در مقابل دیگر روش‌های تحلیلی، مزایای بسیار زیادی را ارائه نموده، اما پیش از اینکه صنعت نیمه‌هادی آن را به‌عنوان ابزاری جدایی‌ناپذیر و ضروری در این حوزه به کار گیرد، این میکروسکوپ باید سه نیازمندی مورد نظر صنعت مذکور را برطرف نماید. نیازمندی نخست، قابلیت بررسی تعداد زیادی از ویژگی‌ها با استفاده از TEM است. با توجه به این امر که امکان دارد یک قطعه نیمه‌هادی مدرن مرسوم شامل چند میلیون ترانزیستور باشد، بنابراین، بررسی تنها چند ویژگی محدود کافی نیست و در برخی مواقع، گمراه کننده است؛ در نتیجه، نمی‌توان ادعا نمود که این چند ویژگی، نماینده شرایط پردازش کل قطعه هستند. بنابراین، باید شرایط به‌گونه‌ای فراهم شود که نمونه نیمه‌هادی برای بررسی در TEM به‌صورت لایه‌ای نازک با وسعت زیاد تهیه شود. نیازمندی دوم، دسترسی‌پذیر بودن قابلیت انتخاب ویژگی خاص برای انجام فرآیند تحلیل نقایص به‌طور اختصاصی در TEM است. این امکان وجود دارد که نقص در یکی از چند میلیون ویژگی همچون اتصال، حفره اتصال یا گیت پلی سیلیکون قطعه نیمه‌هادی پدیدار شود. در این صورت، نمونه TEM باید به‌طور دقیق با توجه به همان ویژگی تهیه شود تا اطلاعات مفیدی ارائه دهد. نیازمندی سوم، دسترسی به زمان بازگشت/گردش سریع در TEM است. هر قدر هم تصویر TEM بی‌نظیر باشد، اما تا زمانی که سرعت این دستگاه، همتای سرعت پیشرفت صنعت نیمه‌هادی نباشد، قابلیت‌های TEM به خوبی در این حوزه مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. سرعت این صنعت چند میلیارد دلاری را نمی‌توان برای هیچ دستگاهی کندتر یا متوقف نمود. یکی از مهمترین نیازمندی‌ها در این صنعت که TEM باید آن را برآورده سازد، دسترسی به زمان بازگشت/گردش سریع است. بیشتر مشکلات اصلی مرتبط با کاربرد TEM، به مرحله آماده‌سازی نمونه آن مربوط می‌شود. با وجود اینکه دستگاه‌ها و روش‌های متعددی برای بهینه‌سازی کیفیت و کارایی مرحله آماده‌سازی نمونه TEM ارائه شده‌اند، اما این مرحله هنوز به‌عنوان چالش برانگیزترین بخش تحلیل TEM برای صنعت نیمه‌هادی محسوب می‌شود [۱].

تحلیل اضافی به‌منظور حمایت از فرآیندهای تولید محصولات با فناوری نسل بعدی است. ویژگی‌های قطعات با اندازه کوچک به فرآیندهای اندازه‌گیری و تحلیل نیازمند بوده که محدودیت قدرت تفکیک‌پذیری میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱۰</sup> از ارائه آنها معذور است. TEM ابزاری قدرتمند برای تحلیل ریزساختار در قدرت تفکیک‌پذیری مکانی بالا است، اما کاربرد آن در صنعت نیمه‌هادی به دلیل چالش‌های موجود، مربوط به آماده‌سازی منطقه معینی از نمونه برای مدتی محدود شده بود. نقش TEM در صنعت نیمه‌هادی با ظهور ابزار آماده‌سازی منطقه معینی از نمونه با نام دستگاه پرتو یونی متمرکز<sup>۱۱</sup> به‌طور مطلوبی تغییر

کوچک شدن مداوم مقیاس ساختارهای ترانزیستور اثر میدان نیمه‌هادی اکسید فلز<sup>۹</sup> نیز به‌عنوان چالشی جدی برای تعیین دقیق لایه‌های فوق نازک، زبری سطحی و توزیع شیمیایی کنترل کننده مشخصات الکتریکی نظیر قابلیت اطمینان و جریان نشتی محسوب می‌شود. ویژگی‌های با اندازه نانومتری و همچنین معرفی مواد جدید از جمله دی الکتریک‌های گیت با ضریب K بالا، گیت‌های فلزی، مهندسی باند/نوار، سیلیسید-نیکل و دی الکتریک‌های جداسازی با ضریب K پایین مشوق اصلی تلاش برای بهینه‌سازی کارایی روش‌های سنج‌شناسی موجود و همچنین کشف و پیاده‌سازی روش‌های

نیمه‌هادی، در سال‌های اخیر، تقاضا برای به‌کارگیری TEM در حوزه تحلیل نقایص قطعات نیمه‌هادی نیز به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. مهمترین مرحله در فرآیند تحلیل نقایص، مشخصه‌یابی فیزیکی و شیمیایی عیب و نقص مورد نظر است. علت ریشه‌ای نقص مورد نظر از طریق بررسی و بازرسی فیزیکی مکان نقص تعیین شده با تحلیل الکتریکی شناسایی می‌شود. مشخصه‌یابی شیمیایی و بازرسی فیزیکی را می‌توان با SEM انجام داد. در SEM یک پرتو الکترونی در طول سطح تراشه پویش/پیمایش داده می‌شود و تصویر نهایی نیز از طریق ثبت الکترون‌های (ثانویه یا برگشتی) منعکس شده، شکل می‌گیرد. تغییرات کنتراست مشاهده شده در تصویر ذکر شده، به‌طور معمول مربوط به تغییرات/نوسانات به وقوع پیوسته در مکان‌نگاری سطح یا تفاوت در وزن اتمی عناصر مستقر روی سطح پویش شده است. در بیشتر موارد، اطلاعات مفیدی در رابطه با نقصی که هیچ‌گونه تغییری در مکان‌نگاری سطح ایجاد نکرده (به‌عنوان مثال، نقص بلور نظیر نابجایی‌ها) یا نقصی که زیر سطح مربوطه رخ دهد، به‌دست نخواهد آمد. در بیشتر موارد، هنگام استفاده از SEM می‌توان با اعمال فرآیند زدایش تزئینی بسیار حساس، مکان‌نگاری نقص را برای انجام عملیات تشخیص تغییر داد. زدایش تزئینی، فرآیندی مخرب بوده که مانع از انجام تحلیل شیمیایی بیشتر می‌شود. حتی پس از اعمال فرآیند زدایش تزئینی نیز SEM قادر به بررسی بیشتر ویژگی‌ها و لایه‌های سطحی (با ابعادی در حدود چند نانومتر) شکل گرفته با فناوری‌های پیشرفته نیست. چنین نقایص و لایه‌های سطحی که بررسی آنها از محدوده SEM خارج بوده را می‌توان به‌منظور تشخیص علت ریشه‌ای وقوع عیب مورد نظر با استفاده از TEM مشخصه‌یابی نمود. در این مقاله، روش‌های مبتنی بر TEM و رویه‌های آماده‌سازی نمونه که در صنعت نیمه‌هادی کاربرد داشته است، بررسی شده‌اند [۲].

### پیش زمینه‌ای درباره روش‌های مختلف تصویربرداری TEM و کاربرد آنها برای نیمه‌هادی‌های متفاوت

در TEM، تصویر نهایی با عبور دادن پرتو الکترونی با انرژی بالا (۱۰۰ keV تا ۳۰۰ keV) از برشی نازک از نمونه مورد نظر به‌دست می‌آید. هم‌زمان با عبور کردن پرتو الکترونی از برش نازک مورد نظر، برهم‌کنش‌های متغیری میان نمونه و پرتو ایجاد شده که منجر به تولید الکترون‌های عبوری، الکترون‌های پراکنده الاستیک و غیر الاستیک، فوتون‌های اشعه X و الکترون‌های اوژه می‌شود. از بیشتر الکترون‌های عبور کرده و به‌صورت الاستیک پراکنده شده و از مقداری از الکترون‌های پراکنده شده به‌صورت غیر الاستیک، برای تشکیل تصویر نهایی استفاده می‌شود. فوتون‌های اشعه X و برخی از الکترون‌های پراکنده شده به‌صورت غیر الاستیک، مختص تشخیص ترکیب شیمیایی حجم پراکندگی هستند. در صورت به‌کارگیری طیف‌سنجی پراکندگی انرژی<sup>۲۱</sup> و طیف‌سنجی افت انرژی الکترون<sup>۲۲</sup> از این فوتون‌های اشعه X

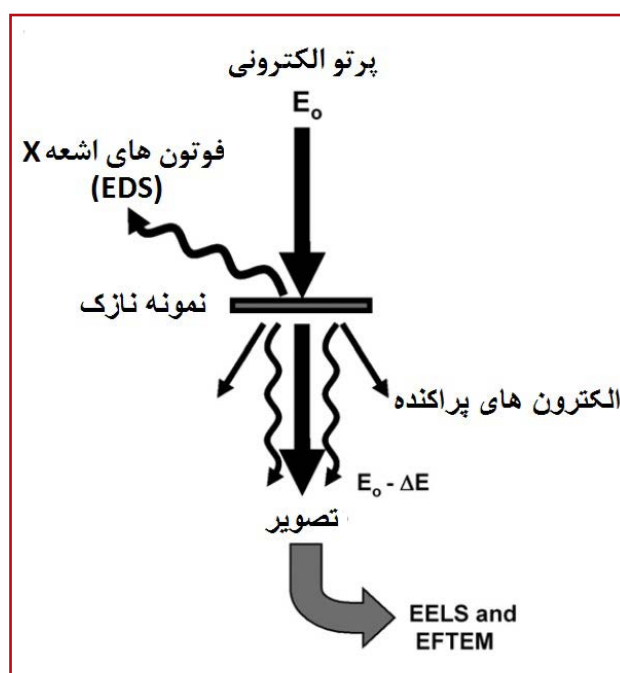
کرد. دسترس‌پذیر بودن ابزارهای پیشرفته در برگیرنده دو ستون با یون‌عاری از رانش و قدرت تفکیک‌پذیری بالا و ستون‌های پرتو الکترونی قابلیت تصویربرداری هم‌زمان از برش مورد نظر درون حالت پرتو الکترونی و انجام عملیات برش‌برداری درون حالت پرتو-یون را فراهم می‌آورد. در نتیجه، هم‌اکنون از TEM به‌منظور تحلیل مدارهای مجتمع<sup>۱۲</sup> برای توسعه قدرت پردازش، ارتقاء بهره‌وری/کارایی و تحلیل نقایص استفاده می‌شود. در TEM پرتو الکترونی انرژی بالا (بین ۱۰۰ keV تا ۳۰۰ keV)، از بالای ستون بر برش نازک نمونه تابیده شده و پس از عبور از آن، تصویر نهایی شکل می‌گیرد. تصویر TEM برخلاف SEM شامل اطلاعات سه بعدی از برش نازک نمونه مورد نظر است. متغیر بودن کنتراست در طول تصویر، به دلیل برهم‌کنش‌های پیچیده میان پرتو-نمونه بوده که مختص دستگاه TEM است. کنتراست به تغییرات کوچک در ویژگی‌های شیمیایی، ساختاری و مکان‌نگاری/توپوگرافی نمونه ذکر شده نیز حساس است. از این مشخصه به‌طور مداوم برای نمایش و تحلیل اثرات نامحسوس لایه‌های سطحی و نقایص بلور استفاده می‌شود. در ضمن، قدرت و توان تفکیک ارائه شده با TEM به دلیل طول موج کوچکتر (۰/۰۲۵ nm ~ ۲۰۰ keV) پرتو الکترونی با انرژی بالا نسبت به SEM به‌طور ذاتی مطلوب‌تر است. لایه‌ای نازک از دی اکسید سیلیکون<sup>۱۳</sup> به‌طور گسترده به‌عنوان ماده دی الکتریک گیت به‌منظور عایق کردن الکتروود گیت از کانال سورس/درین درون ترانزیستورهای اثر میدانی اکسید فلز نیمه‌هادی<sup>۱۴</sup> استفاده می‌شود. امروزه ضخامت این ماده دی الکتریک گیت (SiO<sub>2</sub>) یا اگزینیتريد سیلیکون<sup>۱۵</sup> دارای ابعادی در حدود ۱/۵ الی ۲ nm است. اندازه‌گیری دقیق ضخامت اکسید گیت از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، زیرا حتی وقوع کاهش ۰/۱ nm در ضخامت اکسید، منجر به افزایش چشمگیر مرتبه بزرگی جریان نشتی می‌شود. عایق‌های به نسبت ضخیم‌تر با ثابت‌های دی الکتریک بالا (K بالا) در حال گذراندن مرحله آزمایشی بوده تا پس از دستیابی به ظرفیت خازنی بالای گیت و جلوگیری از وقوع فرآیند تونل‌زنی جایگزین SiO<sub>2</sub> در ترانزیستورهای MOSFET شوند. TEM با قدرت تفکیک‌پذیری بالا<sup>۱۶</sup> روشی بسیار مطلوب برای اندازه‌گیری دقیق لایه‌های نازک محسوب می‌شود، زیرا حاشیه‌های شبکه توری موجود در زیرلایه (Si)، استاندارد لازم برای عملیات کالیبراسیون را فراهم می‌آورند. کاربرد سیلیکون (Si) کرنشی برای قطعات MOSFET مرسوم را می‌توان با فناوری اصلی پردازش<sup>۱۷</sup> موجود مقایسه نمود، اما نظارت بر کیفیت ویفر<sup>۱۸</sup> و نیازمندی‌های دقیق برای ریخت‌شناسی فیلم/لایه و کرنش یکنواخت، همگی نیازهای جدیدی را در زمینه مشخصه‌یابی مواد تحمیل می‌کنند. کرنش را می‌توان با به‌کارگیری روش پراش الکترون پرتو همگرا<sup>۱۹</sup> یا اندازه‌گیری تغییرات/جابجایی‌های کوچک در موقعیت قله‌های ماکسیمم/بیشینه تابع تبدیل فوریه سریع<sup>۲۰</sup> دو بعدی به‌دست آمده از تصویر HRTEM تعیین نمود. علاوه‌بر کاربرد ضروری TEM در زمینه برآورده ساختن نیازمندی‌های مشخصه‌یابی

دراپوارانه‌های خارجی برای حرکت دادن روزنه ذکر شده، به‌منظور عبور کردن الکترون‌های مستقیم یا برخی از الکترون‌های پراکنده، از آن مورد استفاده قرار می‌گیرند. در صورت انتخاب الکترون‌های مستقیم، تصویر ثبت شده نهایی با عنوان تصویر میدان روشن و در صورت گزینش پرتو پراکنده، آنگاه تصویر نهایی با نام تصویر میدان تاریک شناخته می‌شود. بیشتر قطعات نیمه‌هادی روی ویفر سیلیکونی تک بلوری دربرگیرنده ویفر عادی موازی با جهت [۰۰۱] ساخته شده‌اند. در چنین ویفری، جهت [۱۱۰] موازی با سطح صاف یا فرورفتگی ویفر مربوطه روی صفحه (۱۱۱) (صفحه تورق) و جهت عمود [۰۰۱] (عمود بر سطح ویفر) مستقر است. با ثبت تصویر سطح مقطع از طریق به کارگیری پرتو الکترونی دارای جهت‌گیری موازی با جهت [۱۱۰] زیرلایه سیلیکون از عمود بودن ویژگی‌های قطعه مورد نظر اطمینان حاصل شده و همچنین از وقوع پدیده همپوشانی ویژگی‌های مختلف قطعات درون تصویر به‌دست آمده از نمونه نازک، جلوگیری به عمل می‌آید. به همین دلیل است که بیشتر تصاویر سطح مقطعی مربوط به قطعات سیلیکونی در امتداد جهت [۱۱۰] تهیه می‌شوند. به‌طور اصولی، کنتراست در تصویر TEM با سه سازوکار متفاوت به نام‌های کنتراست پراش، کنتراست ضخامت-جرم و کنتراست فاز، شکل می‌گیرد. یک تحلیل‌گر مجرب TEM برای تهیه تصویری واضح از جزئی‌ترین اثرات نقص به وقوع پیوسته، قادر است سهم هر یک از این سازوکارهای کنتراست را بهینه‌سازی نماید. سازوکارهای کنتراست ذکر شده در قسمت ذیل شرح داده می‌شوند.

### ● کنتراست پراش

کنتراست پراش در عمل، از طریق رهگیری الگوی پراش با استفاده از روزنه شیئی در صفحه کانونی پشتی عدسی شیئی مورد استفاده (که تنها به پرتو عبوری اجازه شکل‌دهی تصویر را داده) به‌دست می‌آید. این تصویر، نوسان‌هایی را در شدت پرتو الکترونی گزینشی/منتخب هم‌زمان با عبور آن از نمونه مربوطه نمایش می‌دهد. کنتراست پراش به شدت نسبت به جهت‌گیری بلورشناسی/بلورنگاری و نوسان‌های ضخامت درون نمونه مورد نظر حساس است. در مواد بلوری، پراش حاصل شده از مناطق حول نقص بلور نسبت به پراش مناطق بی‌عیب و نقص متفاوت است. دلیل این امر، وجود کرنش‌های الاستیکی حول نقایص بوده که منجر به وقوع نوسانات کنتراست در تصویر نهایی می‌شود. ناپجایی‌ها، نقایص چیدمان و دیگر نقص‌های بلور باعث خمیدگی صفحات بلور شده و با کمک کنتراست پراش به‌صورت واضح درون تصویر نهایی نمایش داده می‌شوند. کنتراست پراش درون مواد چند بلوری نظیر: پلی سیلیکون یا نیتريد تیتانیوم<sup>۲۴</sup> به دلیل نوسانات به وقوع پیوسته در جهت‌گیری دانه‌های مجاور و نزدیک به یکدیگر در اثر تابش پرتو الکترونی افزایش می‌یابد. به‌کارگیری کنتراست پراش

و الکترون‌های پراکنده شده به‌صورت غیرالاستیک می‌توان برای تحلیل عنصری استفاده کرد. نمایی از موقعیت فیزیکی صفحه تصویربرداری، EDS و EELS درون میکروسکوپ الکترونی عبوری در شکل (۱) نمایش داده شده‌است. در یک نمونه با ساختار بلوری در معرض روشنایی پرتو الکترونی موازی، پرتو الکترونی پراکنده شده به‌صورت الاستیک به یک پرتو عبوری و چند پرتو پراشیده تقسیم می‌شود. تصویر این نوع پرتوها را می‌توان به آسانی با انتخاب حالت پراش درون TEM ثبت نمود که به‌عنوان الگوی پراش، مورد استفاده قرار می‌گیرد. پراش الکترونی ناحیه گزینشی<sup>۲۳</sup> با انتخاب ناحیه‌ای از نمونه با استفاده از روزنه ناحیه منتخب حاصل می‌شود. اگر پرتوی همگرا جایگزین پرتوی موازی حاوی الکترون‌های فرودی شود، آنگاه نقاط پراش، بزرگ شده و به‌صورت قرص/دیسک‌های پراش الکترون پرتو همگرا (CBED) ظاهر می‌شوند. الگوی پراش نقطه‌ای و الگوی پراش حلقه‌ای به ترتیب از مواد تک بلوری و مواد چند بلوری به‌دست می‌آیند. هر نقطه یا حلقه، نماینده مجموعه‌ای از صفحات بلورشناسی درون نمونه است. فاصله‌گذاری هر یک از نقاط یا حلقه‌ها از نقطه مرکزی (۰۰۰)، رابطه‌ای معکوس با فاصله‌گذاری «d» یا بین صفحه‌ای بلورشناسی متناظر با نقطه یا حلقه مورد نظر دارد. الگوهای نقطه‌ای و حلقه‌ای به‌طور مداوم برای تعیین ساختار بلوری فازهای مختلف در نمونه، مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این شرایط، تصویر TEM را می‌توان با استفاده از پرتو عبوری (نقطه مرکزی) یا پرتو پراکنده ثبت نمود. روزنه‌ای به درون صفحه کانونی پشتی عدسی شیئی وارد شد که در نتیجه آن، بیشتر الگوی پراش به غیر از مقداری که از طریق روزنه مذکور قابل رؤیت است، مسدود می‌شود.



شکل (۱): نمایی از راهنمای موقعیت فیزیکی صفحه تصویربرداری، EDS و EELS درون میکروسکوپ الکترونی عبوری [۲].

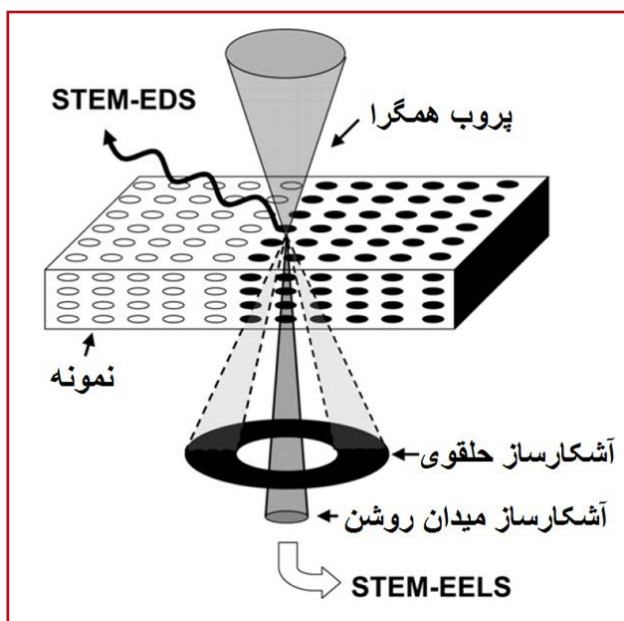


امر از طریق مقایسه الگوی پراش مورد نظر با الگوی پراش عناصر شناخته شده و همچنین اندازه‌گیری فاصله‌گذاری بین صفحه‌ای انجام می‌شود.

### ● میکروسکوپ الکترونی عبوری-رویشی

میکروسکوپ الکترونی عبوری-رویشی<sup>۲۶</sup> گونه‌ای بسیار کارآمد از روش‌های تصویربرداری مرسوم TEM بوده که به شرح آن خواهیم پرداخت. در STEM، پرتو الکترونی روی نقطه کوچکی از نمونه متمرکز می‌شود. سپس با استفاده از پرتو ناحیه‌ای، از نمونه پویش می‌شود. آشکارساز مستقر زیر نمونه، الکترون‌های عبوری را جمع‌آوری می‌کند. سپس تصویر نهایی روی صفحه‌ای از جنس لامپ اشعه کاتدی<sup>۲۷</sup> نمایش داده می‌شود. بزرگنمایی، با در نظر گرفتن نسبت اندازه ناحیه پویش شده به اندازه صفحه CRT محاسبه می‌شود. مزایای STEM نسبت به TEM مرسوم عبارتند از: تفسیر آسان‌تر و دستیابی به قابلیت به کارگیری نمونه‌های ضخیم‌تر.

مزایای STEM در مقایسه با TEM مرسوم در حوزه تحلیل نقایص نیمه‌هادی نیز عبارتند از: تفسیر آسان‌تر و دستیابی به قابلیت به کارگیری نمونه‌های ضخیم‌تر به دلیل حساسیت کمتر نسبت به ابیراهی‌های فامی/رنگی. در شکل (۲) نمایی از اجرای عملیات STEM درون یک TEM نمایش داده شده‌است.



شکل (۲): نمایی از اجرای عملیات حالت STEM درون یک TEM. الکترون‌های پراکنده شده در زوایای بالا، با آشکارساز حلقوی جمع‌آوری شده تا یک تصویر در برگرفته کنتراست Z تهیه شود. فوتون‌های اشعه X نیز به‌منظور تهیه نقشه عنصری STEM-EDS جمع‌آوری می‌شوند. آشکارساز میدان روشن برای انجام عملیات نگاشت STEM-EELS از مسیر پرتو عبوری خارج می‌شود [۲].

تصویر نهایی در اصل، یا از طریق جمع‌آوری الکترون‌های عبوری (روش مشهور به تصویربرداری STEM میدان روشن<sup>۲۸</sup>) و یا با جمع‌آوری الکترون‌های پراکنده با استفاده از آشکارساز حلقوی (روش مشهور به تصویربرداری میدان تاریک حلقوی<sup>۲۹</sup>)

در زمینه تحلیل نقایص نیمه‌هادی برای مواردی مانند تعیین ریزساختار مؤلفه‌های مختلف قطعه مورد نظر همچون رگه‌ها و لایه‌های پلی سیلیکون، یا شناسایی ویژگی‌های سطحی که به احتمال زیاد منجر به وقوع اتصال کوتاه یا باز شده بسیار مؤثر است. یکی دیگر از ویژگی‌های کارآمد اپتیک/فیزیک نور TEM، ترکیب پراش با فرآیند تصویربرداری از طریق به کارگیری روش پراش الکترونی ناحیه گزینشی است. قابلیت ذکر شده، به دلیل امکان تغییر دادن ساده و سریع طول کانونی عدسی‌های الکترومغناطیسی دسترس‌پذیر است. روش پراش الکترونی ناحیه گزینشی به‌منظور حصول اطمینان از همخوانی داشتن کنتراست تصویر با شرایط پراش (به‌خصوص برای نمونه‌های بلوری) کاربرد مهمی دارد.

### ● کنتراست ضخامت-جرم

الکترون‌ها با توجه به وجود میزان ضخامت متفاوت در کل نمونه، پراکنده، پراشیده و جذب می‌شوند؛ این امر، موجب نوسان در کنتراست شده که این پدیده با عنوان کنتراست ضخامت شناخته می‌شود. در شرایط کنتراست جرمی، نوسان شدت، در اصل، نقشه‌ای از قدرت پراکندگی عنصرهای موجود در نمونه مورد نظر را ارائه می‌کند. با کنتراست جرمی در میکروسکوپ الکترونی، تهیه تصاویری با حساسیت ترکیبی و قدرت تفکیک‌پذیری اتمی امکان‌پذیر است. عناصر سبک‌تر و سنگین‌تر به ترتیب الکترون‌های کمتر و بیشتری را جذب می‌کنند. کنتراست جرمی از ساختار بلوری قطعه مستقل است؛ به همین دلیل، برای بررسی چند لایه‌های نازک آمورف<sup>۲۵</sup> نظیر اکسید سیلیکون، نیتريد سیلیکون و اکسی نیتريد سیلیکون کاملاً مطلوب است.

### ● کنتراست فاز

کنتراست فاز برای تهیه تصاویر TEM با قدرت تفکیک‌پذیری بالا با هدف اندازه‌گیری دقیق ابعاد مهم و بحرانی قطعه مربوطه نظیر ضخامت اکسید گیت بسیار نازک مورد استفاده قرار می‌گیرد. تصاویر شبکه توری با قدرت تفکیک‌پذیری بالا در نتیجه تداخل پرتوهای پراشیده و عبوری شکل می‌گیرند. اگر یک یا چند پرتو پراشیده قوی غیر هم خط با پرتو عبوری به‌منظور شکل‌گیری تصویر نهایی به‌صورت متقارن درون روزنه شیئی (شکل (۹)) قرار گیرند، آنگاه دو یا چند مجموعه از لبه/حاشیه‌های موازی قابل مشاهده خواهد بود. چنین تصویری در واقع ارائه دهنده تصویر متناوب دو بعدی متناظر با فاصله‌گذاری بین صفحه‌ای مربوط به پرتوهای پراشیده مورد نظر بوده که در برخی موارد به تصویر ساختاری بلور بسیار نازک شکل گرفته در امتداد جهت‌گیری معین، شباهت دارد. در مقابل، تبدیل فوریه الگوی دو بعدی تصویر به‌دست آمده، تصویری حاوی نقاط الگوی پراش را ارائه می‌کند. از نقاط موجود درون تصویر حاصل شده از اعمال تبدیل فوریه می‌توان برای شناسایی مواد استفاده کرد. این

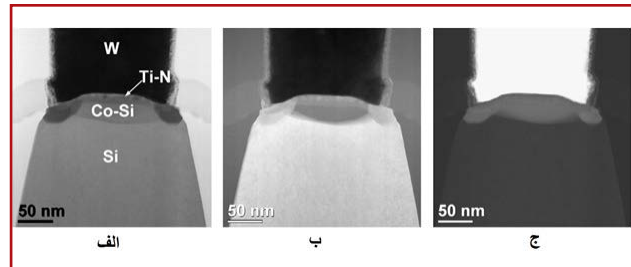
### ● طیف‌سنجی پراکندگی انرژی (EDS)

در روش EDS، هنگام تابیده شدن الکترون‌ها بر نمونه و جمع‌آوری شدن آنها با طیف‌سنج مورد نظر، اشعه‌های X مشخصه‌یاب با استفاده از عنصرهای مختلف، ساطع/منتشر می‌شوند. اشعه‌های X مشخصه‌یاب تولید شده با یک عنصر، به سادگی می‌تواند توسط عنصری متفاوت موجود در حجم یکسان جذب شود. بنابراین، حساسیت روش مورد نظر به‌عنوان تابعی از عنصر، آشکار شده و ترکیب حجمی که عنصر مذکور در آن حضور داشته، در نظر گرفته می‌شود. استفاده از نمونه مرجع با ترکیب از پیش شناخته شده برای تحلیل کمی کاربردی و مؤثر، الزامی است. در صورت به کارگیری عناصر آشکار ساز فوق نازک یا بدون پنجره، اگر کمیت مناسبی درون حجم مورد تحلیل وجود داشته باشد، آنگاه دستیابی به وزن اتمی به کوچکی وزن بورون امکان‌پذیر است. در فرآیند تحلیل نقایص و فرآیند توسعه پردازش نیمه‌هادی به‌منظور تعیین عناصر مختلف حاضر در نقص مربوطه و در نتیجه، شناسایی منبع مشکل مورد نظر از تحلیل EDS استفاده می‌شود.

### ● طیف‌سنجی افت انرژی الکترون (EELS)

همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، پرتو الکترونی (۳۰۰ keV) هنگام عبور از نمونه مورد نظر، به‌صورت غیر الاستیکی پراکنده می‌شود. در طول فرآیند پراکندگی غیر الاستیکی بسته به مشخصه عنصر مورد استفاده، الکترون‌ها مقداری انرژی از دست می‌دهند. در نتیجه، پرتو عبوری شامل الکترون‌هایی با دامنه‌ای گسترده از انرژی‌ها است. در روش طیف‌سنجی افت انرژی الکترون (EELS) یک طیف‌سنج زیر ستون TEM مستقر می‌شود تا الکترون‌هایی با افت انرژی مشابه مشخصه عنصر شناسایی شده را آشکار کند. این طیف‌سنج شامل آهن‌ربای قوسی و یک سیستم آشکارسازی می‌شود. آهن‌ربای قوسی (شکل (۴)) پرتوی الکترونی عبوری را با زاویه ۹۰ درجه منحرف می‌سازد. در طول این فرآیند، الکترون‌ها با انرژی‌های مختلف توسط میدان مغناطیسی حاضر تا حدود متفاوتی منحرف می‌شوند. سرانجام، از اجرای این فرآیند، یک طیف افت انرژی الکترون به‌دست می‌آید. EELS در مقایسه با EDS، قدرت تفکیک‌پذیری بالاتر (۱ nm) و قابلیت آشکارسازی عناصر سبک (نظیر: کربن، اکسیژن، و نیتروژن) را ارائه می‌نماید. به‌منظور دستیابی به نتایج دقیق، توصیه شده که ضخامت نمونه  $\leq 50$  و منبع الکترونی، همدوس، عاری از رانش (نظیر: تفنگ الکترونی گسیل/نشر میدانی) باشد. از TEM در حالت STEM می‌توان برای ثبت تصویر مبتنی بر انرژی نمونه استفاده کرد. اطلاعات انرژی به‌عنوان انرژی اشعه‌های X حاصل شده از نواحی مختلف نمونه یا افت انرژی در الکترون‌های عبوری از نواحی مختلف نمونه مورد نظر نمایان می‌شود. روش‌های STEM-EDS (STEM جفت شده با EDS)، STEM-EELS (STEM جفت شده با EELS)، و TEM با قابلیت فیلتر کردن انرژی<sup>۳۱</sup> همگی قابلیت تصویربرداری از نمونه در حوزه انرژی را فراهم می‌آورند. هر یک از این روش‌ها به‌طور خلاصه شرح داده شده‌اند.

ثبت می‌شود. به‌طور معمول، آشکارساز حلقوی در درگاه معینی از ستون TEM نصب شده و دارای ارتفاع ثابتی است. در صورت بررسی نمونه‌های چند بلوری، اثرات پراش الکترونی کنتراست تصاویر BF و ADF را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. عدسی‌های اپتیک/نوری الکترونی TEM را می‌توان به‌گونه‌ای تنظیم نمود که به‌طور گزینشی، الکترون‌های پراکنده در زوایای بالا (بیشتر از ۵۰ mrad) به سمت آشکارساز حلقوی افکنده شوند. این روش با عنوان تصویربرداری میدان تاریک با زاویه حلقوی بالا STEM<sup>۳۰</sup> شناخته می‌شود. کنتراست در تصویر HAADF STEM، به نوسانات جرمی اتم‌های پایین پروب الکترونی کوچک درون ستون مورد نظر حساس است. در میکروسکوپ الکترونی عبوری پیشرفته مجهز به منبع گسیل/نشر میدانی، به‌منظور حصول یک پروب کوچک برای تهیه تصاویری با قدرت تفکیک‌پذیری اتمی می‌توان عدسی‌های الکترون بالای نمونه را به‌طور دقیق تنظیم کرد. تصویربرداری HAADF STEM با عنوان تصویربرداری با کنتراست Z نیز شناخته شده که در آن، Z نماینده عدد اتمی است. هم‌زمان با عبور کردن پرتو الکترونی از نمونه مورد نظر، عناصر با وزن اتمی سنگین، الکترون‌های بیشتری را پراکنده نموده و در تصویر HAADF STEM روشن‌تر نمایان می‌شوند. نمونه‌هایی از تصاویر ADF، BF و HAADF STEM در شکل (۳) ارائه شده‌اند.

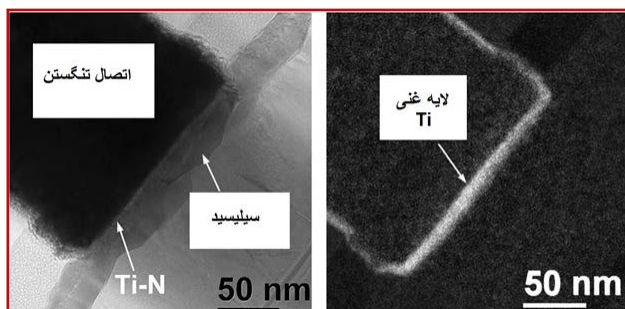


شکل (۳): تصاویر STEM از پشته/توده‌ای از جنس تنگستن/نیتريد تیتانیوم/کبالت-سیلیکون/سیلیکون (W/TiN/Co-Si/Si). (الف): میدان روشن (BF)، (ب): میدان تاریک حلقوی (ADF) و (ج): میدان تاریک با زاویه حلقوی بالا (HAADF) [۲].

### تحلیل عنصری TEM و کاربرد روش‌های مختلف موجود برای صنعت نیمه‌هادی

پروپ باریک موجود درون TEM مجهز به منبع گسیل/نشر میدانی، با شدت بالا، اجرای فرآیند تحلیل عنصری با قدرت تفکیک‌پذیری بالا (۱ nm) از مناطقی با ضخامت کمتر از چند صد آنگستروم را امکان‌پذیر می‌سازد. روش‌های تحلیل عنصری مبتنی بر TEM از رویدادهای پراکندگی غیر الاستیکی (اتلاف انرژی) حاصل شده در زمان عبور پرتو الکترونی از نمونه مورد نظر استفاده می‌کنند. دو روش مرسوم در این حوزه عبارتند از: طیف‌سنجی پراکندگی انرژی (EDS) و طیف‌سنجی افت انرژی الکترون (EELS). نمایی از پیاده‌سازی روش‌های EDS و EELS در دستگاه TEM در شکل (۱) نمایش داده شده‌است.

ساختار قطعات نیمه‌هادی ایده‌آل هستند. نمونه‌ای از تصاویر عملیات EFTEM در شکل (۵) ارائه شده‌است.



شکل (۵): تصاویر EFTEM از اتصال تنگستن (W). (الف): تصویر انرژی فیلتر شده شکل گرفته با استفاده از الکترون‌های عبوری با افت انرژی برابر با صفر. (ب): نقشه EFTEM تیتانیوم ثبت شده از لایه سد/مانع نیتريد تیتانیوم (TiN) تولید شده با روش سه پنجره‌ای [۳].

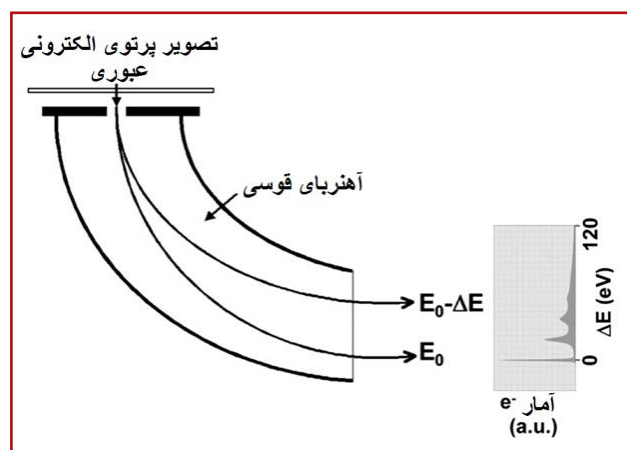
### روش‌های پیشرفته مورد استفاده به‌منظور تصویربرداری از نقایص نیمه‌هادی‌ها با کمک TEM

#### ● توموگرافی الکترونی

توموگرافی الکترونی به‌منظور ترکیب مجدد تصاویر STEM یا EFTEM ثبت شده در زوایای انحرافی مختلف با هدف بازسازی ساختار یا ترکیب سه بعدی قطعات یا نقایص از نرم‌افزار استفاده می‌شود. کاربرد این روش برای مشخصه‌یابی پشته لایه سد/مانع دانه‌ای Ta/Cu توسط استگمان<sup>۳۲</sup> و همکاران [۴] شرح داده شده‌است.

#### ● تمام‌نگاری/هولوگرافی الکترونی

آگاهی از توزیع مکانی یون‌های کاشت (As، P و B) درون ساختارهای ترانزیستور برای بهینه‌سازی عملکرد آنها از اهمیت بسزایی برخوردار است. روش موجود برای نگاشت دو بعدی فرآیندهای کاشت فوق کم عمق در قدرت تفکیک‌پذیری مکانی بالا، تمام‌نگاری الکترونی خارج از محور نام دارد. حصول مقطع عرضی در برگیرنده آرایش دو بعدی کیفی در برخی از مقالات [۵ تا ۹] گزارش شده، اما دستیابی به مقطع عرضی کمی به هیچ عنوان ساده نیست. هنگام تابیدن پرتوی الکترونی هم‌دوس یا یک موج الکترونی تخت روی نمونه نازک عبور دهنده الکترون، پتانسیل الکترواستاتیک حاصل شده از آرایش مورد نظر باعث وقوع جابجایی/تغییر فاز محلی در موج الکترونی مذکور می‌شود. مدولاسیون فاز، تابعی از فرآیند توزیع پتانسیل الکترواستاتیک در طول اتصال/پیوند p-n بوده که می‌توان آن را با تمام‌نگاری الکترونی ثبت نمود. مثال‌هایی از تمام‌نگاری الکترونی در شکل‌های (۶) و (۷) ارائه شده‌است.



شکل (۴): نمایی از فرآیند EELS درون TEM.  $E_0$  نماینده انرژی پرتوی فرودی تابیده شده و  $\Delta E$  نیز نشان دهنده افت انرژی است [۲].

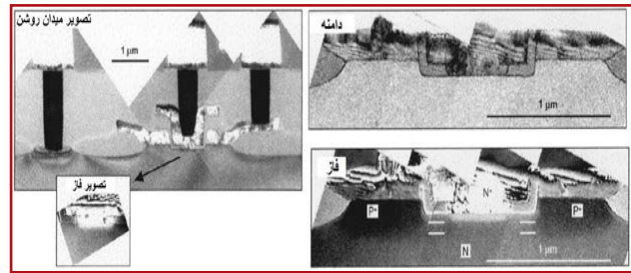
در روش STEM-EDS، سیگنال‌های اشعه X از نواحی پوشش شده با استفاده از STEM جمع‌آوری می‌شوند. ناحیه پوشش شده مورد نظر می‌تواند به شکل یک خط (پوشش خطی) یا مستطیل (پوشش ناحیه‌ای) باشد. سیستم EDS، داده‌ها را پردازش و ذخیره می‌کند. خروجی آن به‌طور معمول یا به‌صورت نمودارهای شدت سیگنال‌های اشعه X یا در قالب تصویر نقشه عنصری ارائه می‌شود. در روش STEM-EELS، الکترون‌های عبوری با طیف‌سنج EELS جمع‌آوری می‌شوند. در این روش نیز می‌توان به‌صورت خطی یا ناحیه‌ای، عملیات پوشش را انجام داد. سیستم EELS، داده‌ها را پردازش و ذخیره می‌کند. خروجی نیز به‌صورت نمودارهای شدت یا نقشه‌های عنصری ارائه می‌شود.

#### ● TEM با قابلیت فیلتر کردن انرژی (EFTEM)

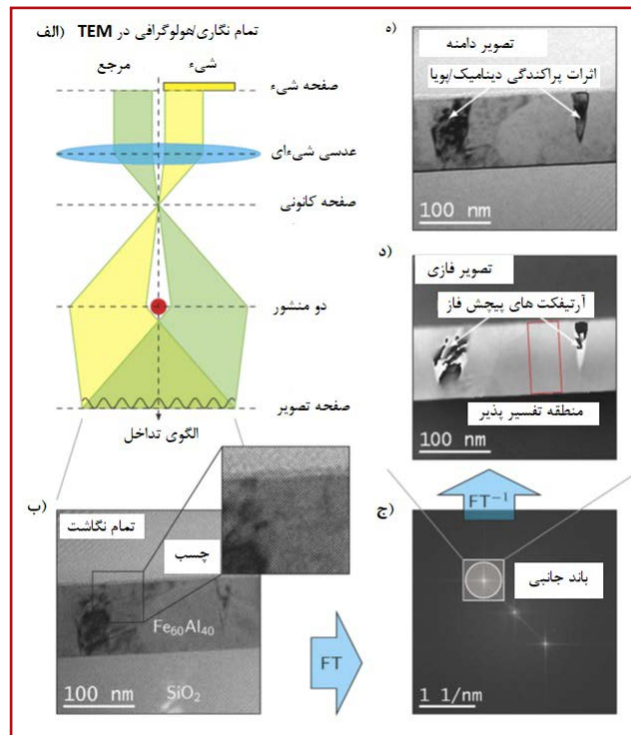
EFTEM را می‌توان به‌عنوان روشی برای تصویربرداری با TEM در نظر گرفت. TEM مرسوم قادر به استفاده از الکترون‌هایی که به‌صورت غیر الاستیکی پراکنده شده‌اند و انرژی خود را در اثر برهم‌کنش با نمونه از دست داده‌اند، نیست. لازم به ذکر است این نوع الکترون‌ها برای فعالیت‌های تحلیلی در مقیاس میکرو و نانو به دلیل شکل‌دهی طیف افت انرژی (EELS) که حاوی اطلاعاتی درباره ترکیب شیمیایی، مشخصات الکترونیکی، و پیوند شیمیایی بوده از اهمیت بسزایی برخوردار هستند. در EFTEM، تصویر نهایی تنها با الکترون‌هایی شکل گرفته که انرژی آنها قادر به عبور از فیلتر انرژی باشد. در این صورت، الکترون‌های دارای انرژی که اجازه عبور از فیلتر انرژی را نداشته از تصویر نهایی حذف می‌شوند. محتویات اطلاعات EELS تنها در صورتی قابل استفاده است که یک طیف‌سنج EEL به دستگاه TEM افزوده شود. فیلترهای انرژی به‌صورت تجاری در انواع مختلف (درون ستونی) یا (بعد از ستون) در بازار موجود هستند. عوامل فیلتر همچون: مقدار انرژی، پنجره انرژی و غیره توسط اپراتور تنظیم می‌شوند. EFTEM‌ها برای تحلیل



اصلی در روش آماده‌سازی نمونه‌ها، دستیابی به لایه‌ای نازک‌تر از ۲۵۰ nm از ناحیه مورد نظر یا ناحیه وقوع نقص به‌منظور حصول اطمینان از عبور مقدار کافی الکترون‌ها برای تهیه تصویر نهایی است. در صورت استفاده از روش تصویربرداری در برگیرنده کنتراست فاز با قدرت تفکیک‌پذیری بالا، ضخامت نمونه باید کمتر از ۱۰۰ nm باشد. در گذشته، روش‌های بسیاری برای آماده‌سازی نمونه‌های TEM برای دستیابی به فرآیند تصویربرداری از نمای بالایی/سطحی و نمای سطح، مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۲] تا [۱۵] که محبوب‌ترین آنها پرداخت/صیقل دادن مکانیکی مرسوم و سایش یون آرگون (Ar) [۳۴] در شرایط وجود نمونه‌های بزرگ همگن/متجانس به کار برده می‌شوند. نمای سطح مقطعی مرسوم حاصل شده از TEM را تنها زمانی می‌توان برای مدارهای مجتمع (IC) ها به کار برد که ناحیه مورد نظر [۳۵] به دفعات بالا درون نمونه مذکور تکرار شده باشد، در ضمن این روش به ندرت در تحلیل نقایص مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حال حاضر، ابزاری با نام پرتوی یونی متمرکز (FIB) به‌عنوان ابزاری برتر، برای آماده‌سازی نمونه‌ها به‌منظور اجرای تصویربرداری از نمای بالایی/سطحی و نمای سطح مقطعی درون TEM در دسترس است. به‌منظور آماده‌سازی سطح مقطعی از ناحیه معینی از نمونه‌ها، سه رویکرد مورد استفاده قرار می‌گیرد. در رویکرد نخست، ابتدا فرآیند پرداخت مکانیکی و سپس نازک‌سازی نهایی نیز با استفاده از سایش با ابزار FIB انجام می‌شود. یانگ [۳۶] و همکاران [۱۶] برای آماده‌سازی نمونه‌های مسطح و حصول سطح مقطعی از نمونه‌ها از رویکرد ذکر شده استفاده کردند. موریس [۳۷] و همکاران [۱۷]، کرک [۳۸] و همکاران [۱۸] و شراوب [۳۹] و رای [۴۰] [۱۹] نیز در تحقیقات خود از رویکرد نخست استفاده کرده‌اند. رویکرد دوم با عنوان «برداشت» نیز در مقالات اوربیچک [۴۱] و همکاران [۲۰]، هرلینگر [۴۲] و همکاران [۲۱] و جیانوتزی [۴۳] و همکاران [۲۲] برای آماده‌سازی نمونه TEM مورد استفاده قرار گرفته است. در این رویکرد، مرحله پرداخت مکانیکی حذف شده و همین امر، مدت زمان آماده‌سازی نمونه را تا میزان زیادی کاهش می‌دهد. در این رویکرد، نمونه نهایی TEM با حداقل آسیب ممکن از زیرلایه مورد نظر جدا شده و ابتدا به گرید پوشیده شده با غشاء بسیار نازک و سرانجام به درون نگهدارنده نمونه TEM منتقل می‌شود. رویکرد سوم، برداشت درجا/به‌هنگام نام داشته و تمام فرآیند آماده‌سازی نمونه TEM را می‌توان درون FIB انجام داد. در این رویکرد می‌توان نمونه نهایی را به اشکال مختلف هندسی تهیه نمود و به دلیل استفاده از یون‌های گالیم و آرگون با انرژی پایین قابلیت‌هایی نظیر نازک‌سازی هر چه بیشتر نمونه و حذف آسیب‌های القاء شده از ابزار FIB نیز در دسترس است. دو روش برای آماده‌سازی نمونه‌های مسطح TEM توسط آندرسون [۴۴] و کلیپس [۴۵] [۲۳] و سابرامانیا [۴۶] و همکاران [۲۴] ارائه شده‌است. آندرسون و کلیپس برای پرداخت نمونه از روش سه پایه استفاده کردند، در صورتی که سابرامانیا و همکاران بدون کمک گرفتن از روش سه پایه، ابتدا مرحله پرداخت پشت و سپس مرحله پرداخت سطح مقطع را برای نمونه به کار بردند. هر دو روش فوق برای تهیه نمونه نهایی TEM از ابزار FIB استفاده می‌کنند. روش



شکل (۶): تصویر TEM ترانزیستور دو قطبی (سمت چپ). بزرگنمایی تصویر تمام‌نگاری الکترونی از منطقه آمیتر-بیس [۳۳] (سمت راست). فرآیند نفوذ زیر آمیتر به‌طور واضح انجام شده‌است، در صورتی که لایه ذاتی بیس آلاییده با p قابل رؤیت نیست (پایین سمت راست) [۱۰].



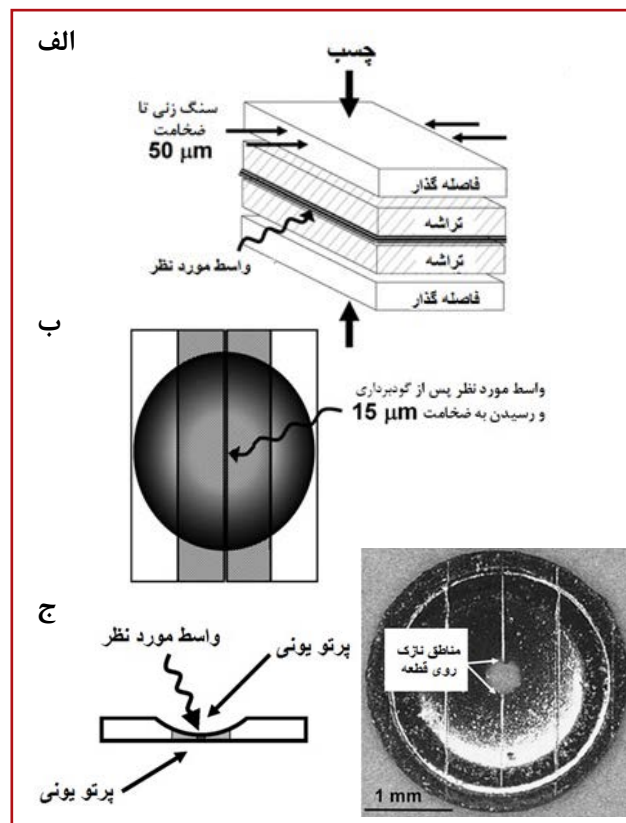
شکل (۷): تهیه و بازسازی تمام نگاشت الکترونی. (الف): چگونگی دستیابی انجام تمام‌نگاری الکترونی درون TEM. (ب): تمام نگاشت تهیه شده از فیلم/غشاء نازک  $Fe_{60}Al_{40}$  با ضخامت 100nm رشد داده شده روی زیرلایه  $SiO_2$  و پوشش یافته با چسب برای اجرای مراحل آماده‌سازی نمونه TEM. (ج): طیف فوری از تمام نگاشت مورد نظر که دو باند جانی و یک باند مرکزی را نمایش می‌دهد. تبدیل فوری به باند جانبی بالایی پایین گذر فیلتر شده با روزه عددی منجر به حصول موج تصویر نمایش داده شده توسط فاز (د) و دامنه (ه) می‌شود [۱۱].

### روش‌های مختلف آماده‌سازی نمونه‌های نیمه‌هادی برای تصویربرداری با کمک TEM

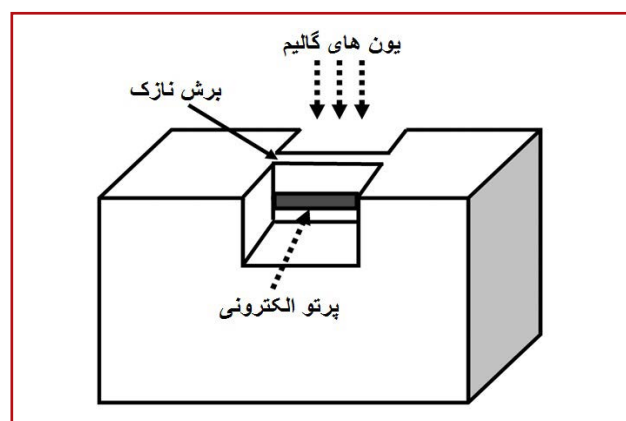
آماده‌سازی نمونه، کلید اصلی موفقیت در هر فرآیند تحلیلی انجام پذیرفته با کمک TEM است. با استفاده از TEM می‌توان تصویربرداری از نمای بالایی/سطحی و نمای سطح مقطعی را برای نمونه اجرا کرد. روند آماده‌سازی نمونه برای TEM به نوع نمونه مورد نظر بستگی دارد. در انتها، نمونه به اندازه یک دیسک/قرص یا میله با قطر ۳ mm تهیه می‌شود. یکی از نیازمندی‌های



مقدماتی پیچیده‌ای نیازمند هستند. این مراحل مقدماتی شامل سنگ‌زنی یا اره‌کاری دقیق برای دستیابی به ضخامت نمونه در محدوده ۷۵-۲۰  $\mu\text{m}$  و همچنین چسباندن نمونه مورد نظر روی حلقه پشتیبان به‌منظور تسهیل موارد انتقال نمونه تراشیده و نازک شده به مکان‌های مختلف است. این مراحل بنا بر هندسه نمونه مورد نظر (یعنی ناحیه سطح مقطعی یا سطحی) متغیر هستند.



شکل (۸): نمایی از روش آماده‌سازی ناحیه‌ای کلی از نمونه. (الف): دو تکه ویفر رو در رو مقابل یکدیگر به هم چسبانده شده‌اند (ویفرهای اضافی نیز برای کنترل آسان‌تر اضافه می‌شوند) و از جهت سطح مقطع، سنگ‌زنی شده تا به ضخامت کمتر از ۵۰  $\mu\text{m}$  برسد. (ب): نمای از بالا به پایین پس از گودبرداری و رسیدن به ضخامت ۱۵  $\mu\text{m}$  در مرکز نمونه. (ج): نمای سطح مقطعی از نمونه گودبرداری شده که برای حصول قابلیت عبور دادن الکترون پرتو یون آرگون ساییده می‌شود. (د): نمای از بالا به پایین تصویر نمونه نهایی به‌دست آمده از میکروسکوپ نوری، مناطق نازک عبور دهنده الکترون با پیکان مشخص شده‌اند [۲].



شکل (۹): نمایی از روش سایش پرتو یونی متمرکز برای آماده‌سازی ناحیه‌ای گزینشی از نمونه TEM [۲].

برداشت نمونه TEM مسطح توسط استیوی<sup>۴۷</sup> و همکاران [۲۵] و رای و همکاران [۲۶] مورد استفاده قرار گرفته است. در قسمت ذیل روندهای مرسوم آماده‌سازی نمونه TEM به‌طور تفصیلی شرح داده شده‌است.

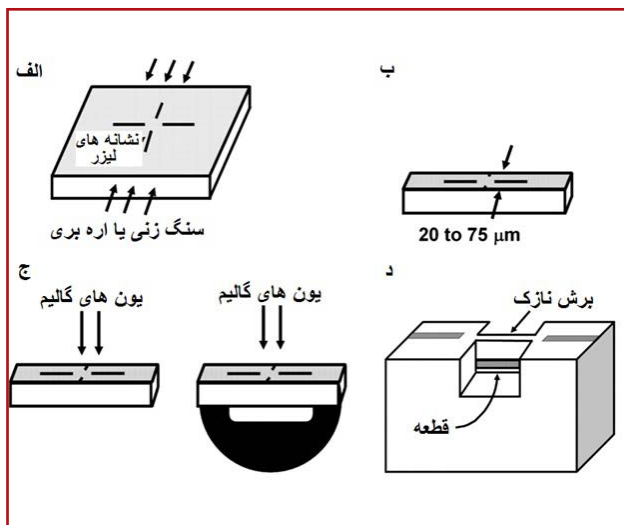
### ● آماده‌سازی ناحیه‌ای کلی از نمونه

در صورت تکرارپذیر بودن ویژگی مورد نظر یا بالا بودن چگالی نقص مربوطه در فرآیند تحلیل نقایص قطعات نیمه‌هادی، آنگاه می‌توان از روش‌های آماده‌سازی ناحیه کلی در TEM استفاده کرد. نمایی از سطح مقطع ناحیه کلی TEM در شکل‌های (۸-الف) و (۸-ج) به نمایش گذاشته شده‌است. دو تکه/بخش از یک تراشه معین (با ابعاد ۵ mm × ۵ mm) به‌طور دائم با قرار گرفتن مدار در میانشان به‌صورت رو در رو به یکدیگر چسبانده شده‌اند. دو تکه سیلیکون اضافی نیز برای پشتیبانی به پشت آنها چسبانده می‌شوند. سپس پشت مورد نظر از هر طرف به ضخامت ۵۰ mm تراشیده می‌شود. ضخامت مرکز نمونه مذکور نیز با استفاده از دستگاه گودی ساب به ۱۵ mm تقلیل می‌یابد. همان‌طور که در شکل (۸-ب) نیز نمایش داده شده، یک حلقه مسی (که می‌تواند از جنس نیکل<sup>۴۸</sup> یا مولیبدن<sup>۴۹</sup> نیز باشد) حفره‌دار با قطر ۳ mm که به‌صورت تجاری در دسترس است، به نمونه چسبانده می‌شود. در پایان، ضخامت نمونه مورد نظر با استفاده از اشعه یون-آرگون به کمتر از ۰/۲۵ mm می‌رسد. این رویه آماده‌سازی نمونه را می‌توان به راحتی با تغییر دادن مراحل گودبرداری و پرداخت سطح مقطعی به گودبرداری و پرداخت سطح پشتی برای تحلیل سطحی ناحیه کلی به کار برد.

### ● آماده‌سازی ناحیه‌ای گزینشی یا معین از نمونه

به‌طور معمول، به دلیل اینکه نقص(ها) یا ویژگی مورد نظر در اصول مربوط به تعداد معدودی از ترانزیستورها درون یک تراشه است، بنابراین، از روش ناحیه کلی TEM به ندرت در صنعت نیمه‌هادی استفاده می‌شود. در این روش جدید، ضخامت ناحیه‌ای از نمونه مربوطه در برگزیده ویژگی مورد نظر یا نقص به وقوع پیوسته به‌صورت گزینشی به‌منظور دسترسی به قابلیت عبور الکترون‌ها از آن ناحیه به کمتر از ۰/۲۵ mm کاهش می‌یابد. به همین دلیل، نام «TEM ناحیه گزینشی» برای این روش انتخاب شده‌است. چالش اصلی در این روند، تقلیل دادن ضخامت همان ناحیه گزینشی بدون تخریب یکپارچگی کل نمونه مورد نظر است. برای دستیابی به این هدف، می‌توان از روش FIB استفاده کرد که اصول کلی آن در شکل (۹) به نمایش گذاشته شده‌است. در این روش، به‌منظور نازک ساختن هر چه بیشتر ناحیه گزینشی نمونه و تسهیل نمودن عبور پرتو الکترونی از آن ناحیه، از پرتو حاوی یون‌های گالیم متمرکز با انرژی بالا استفاده می‌شود. روش‌های آماده‌سازی نمونه مبتنی بر FIB پیش از عملیات نهایی نازک‌سازی نمونه‌ها، به‌طور معمول به مراحل

حاصل شده از نرخ سایش متفاوت مؤلفه‌ای دیگر از قطعه مورد نظر می‌شود. در دنیای واقعی همیشه دسترسی به تنظیم و همترازسازی دقیق امکان‌پذیر نیست.



شکل (۱۰): نمایی از رویه‌های پیش از FIB برای آماده‌سازی سطح مقطعی از ناحیه گزینشی نمونه TEM. (الف): ناحیه مورد نظر با پرتو لیزر نشانه‌گذاری شده است. (ب): تراشه مورد نظر به صورت سطح مقطعی برای حصول ضخامت بین ۲۰ mm الی ۷۵ mm صیقل داده می‌شود، از یک اره دقیق با سرعت بالا به منظور دستیابی به ضخامت مورد نظر می‌توان استفاده نمود. (ج): برش مربوطه به درون FIB انتقال یافته و ساییده می‌شود و حتی در صورت نیاز می‌توان برای دستیابی به قابلیت کنترل بهتر یک نیم حلقه ۳ mm حفره‌دار از جنس مس را به نمونه چسباند و سپس با استفاده از FIB ناحیه مورد نظر ساییده می‌شود. (د): نمای نزدیک از منطقه برش خورده که الکترون می‌تواند از آن عبور کند [۲].

### ● روش بلند کردن و بالا آوردن

رویه‌های نازک‌سازی پیش از استفاده از FIB شرح داده شده در قسمت‌های فوق، به‌طور معمول زمان‌بر و گران قیمت هستند. با به کارگیری روشی نوین با عنوان بلند کردن و بالا آوردن، دیگر نیازی به آماده‌سازی پیش از FIB ناحیه معینی از نمونه TEM نیست. در این روش با استفاده از FIB، برشی نازک از ناحیه مورد نظر نمونه تهیه و آن برش به‌عنوان نمونه نهایی TEM بلند شده و بالا آورده می‌شود. سپس این برش نازک به گریدی با قطر ۳ mm که سطح آن با کربن حفره‌دار پوشش داده شده، انتقال می‌یابد. مزایای روش مورد نظر عبارتند از: تقلیل زمان آماده‌سازی نمونه و امکان‌پذیر بودن آماده‌سازی ناحیه‌ای گزینشی از بیشتر مؤلفه‌های مدار مجتمع نمونه TEM بدون هیچ گونه محدودیت هندسی یا بعدی. در حوزه تحلیل نقص، انعطاف‌پذیری هندسی و بعدی ارائه شده در صورت استفاده از روش بلند کردن و بالا آوردن، منجر به حصول روش‌هایی نوین برای به کارگیری TEM به‌منظور حل کردن مسائل پیچیده می‌شود. نمونه‌هایی از کاربردهای جدید روش بلند کردن و بالا آوردن عبارتند از: تهیه نمونه TEM از ذرات کوچک، مدارهای از پشت

### ● آماده‌سازی سطح مقطعی نمونه

هدف از این رویه، حصول یک سطح مقطع نازک (با ضخامتی کمتر از ۲۵/۰ um) از قطعه در برگرنده ناحیه معیوب است. این روش زمانی مؤثر واقع می‌شود که موقعیت افقی دقیق عیب مورد نظر قابل شناسایی بوده و درون چند لایه تکرار شده باشد. نمایی از مراحل الزامی، پیش از اعمال روش آماده‌سازی نمونه FIB در شکل (۸) نمایش داده شده است. در این رویه، ناحیه مورد نظر با استفاده از لیزر یا خود FIB به‌طور دائم علامت‌گذاری می‌شود. نمونه مورد نظر در راستای جهت موازی با سطح مقطع نهایی با ضخامتی تقریباً برابر با ۷۵-۲۰ تراشیده یا اره می‌شود. نمونه مد نظر به‌طور معمول در مرحله سنگ‌زنی یا اره‌کاری برای تسهیل فرآیند نگه داشتن و حمل و نقل، با استفاده از چسب پلاستیکی حرارتی انحلال‌پذیر در استون<sup>۵۰</sup> به یک لام/اسلاید<sup>۵۱</sup> شیشه‌ای چسبانده می‌شود. سپس نمونه ذکر شده از لام شیشه‌ای جدا و به درون FIB منتقل و در آنجا به ضخامت دلخواه، نازک می‌شود. به‌منظور کار کردن راحت‌تر با نمونه می‌توان یک نیم حلقه حفره‌دار (با قطر ۳ mm و ضخامت ۵۰ mm) را به‌طور دائم روی آن چسباند.

### ● آماده‌سازی نمونه مسطح

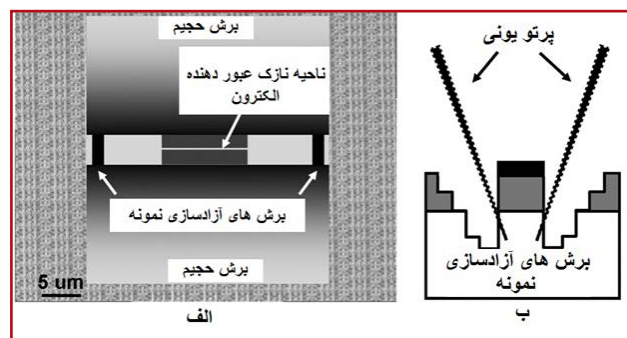
رویه آماده‌سازی نمونه مسطح برای TEM یک مزیت هندسی منحصر‌بفرد را نسبت به روش سطح مقطعی برای موارد تحلیل نقص را در بر داشته که محدود به قطعات سیلیکونی یا لایه‌های معینی از قطعات می‌شود. در روش سطح مقطعی، یک برش نازک (با ضخامتی کمتر از ۲۵/۰ mm) از قطعه مورد نظر برای فرآیند تحلیل نقص تهیه می‌شود، اما در رویه آماده‌سازی نمونه مسطح می‌توان به ناحیه ۲۰ سانتی‌متری مربعی از هر لایه (با ضخامتی کمتر از ۲۵/۰ mm) از قطعه مورد نظر دسترسی پیدا کرد. بنابراین، می‌توان زمانی که نقص مورد نظر به لایه‌ای با ضخامتی تقریباً برابر با ۲۵۰ nm محدود شود و همچنین شرایط عدم قطعیت در مورد موقعیت افقی نقایص وجود داشته باشد، آنگاه بهتر است از روش آماده‌سازی نمونه مسطح استفاده کرد. نمونه‌هایی از این نوع نقایص عبارتند از: نابیایی‌ها در رابط/سطح مشترک قطعه سیلیکونی، نقایص اکسید گیت و واکنش‌های بین سطحی. جزئیات مربوط به رویه آماده‌سازی نمونه مسطح پیش‌تر ارائه شده است. در شکل (۱۰)، نمایی از رویه‌های پیش از FIB برای آماده‌سازی سطح مقطعی از ناحیه گزینشی نمونه TEM ارائه شده است.

هدف اصلی از تحلیل نمای از بالا/سطحی با TEM، دستیابی به قابلیت بررسی هر لایه‌ای از قطعه مورد نظر در مکان وقوع نقص است. این امر نیازمند تنظیم و همتراز ساختن دقیق لایه مورد نظر موازی با پرتو یونی است. هرگونه اشتباه در فرآیند تنظیم و همترازسازی، منجر به بزرگنمایی اثر آبخاری

نمونه TEM نهایی از تراشه به گرید نگهدارنده نمونه است. رویکرد معمول به این صورت است که با استفاده از یک سوزن شیشه‌ای حاوی بار استاتیک/ساکن در نوکش که همانند چسب عمل کرده، نمونه را از تراشه بلند می‌کنند. سپس نمونه نهایی به گرید نگهدارنده نمونه غشاءدار منتقل می‌شود. نرخ موفقیت مرحله انتقال نمونه نهایی را می‌توان با بهینه‌سازی شاخص‌های تاثیرگذار بر مرحله بلند کردن و بالا آوردن را به سادگی به ۱۰۰ درصد رسانید. تصویر میکروسکوپ نوری از نمونه نهایی TEM استقرار یافته روی گرید نگهدارنده نمونه در شکل (۱۳) نمایش داده شده است. عملیات بلند کردن و بالا آوردن زیر یک میکروسکوپ نوری در شرایط فاصله کاری دوردست با حداقل بزرگنمایی  $\times 200$  انجام می‌شود. به‌طور معمول، سوزن مورد نظر به یک بازوی پروب مانند متصل می‌شود. این بازوها که سوزن در انتهای آنها متصل شده و قابلیت کنترل هیدرولیکی آنها نیز برای انجام حرکات دقیق فراهم است، به‌صورت تجاری در دسترس هستند. به کارگیری یک نگاه دارنده سوزن میکروپروب کنترل شده با استفاده از میکرومتر دقیق ساده نیز برای دستیابی به هدف مورد نظر کافی است. میزان موفقیت عملیات انتقال به شارژ/بار استاتیک در نوک سوزن ذکر شده، به مهارت و صبر بالای اپراتور دستگاه بستگی دارد. برخی از عواملی که در مرحله بلند کردن و بالا آوردن موثر بوده عبارتند از: شارژ استاتیک در نوک سوزن، وزن نمونه TEM نسبت به شارژ استاتیک و میزان دقت بازویی که سوزن مربوطه به آن متصل شده است.

شارژ استاتیک به عواملی نظیر سطح رطوبت در اتاق، قطر نوک سوزن و ترکیبات نمونه و سوزن شیشه‌ای بستگی دارد. در صورت بالا بودن میزان شارژ استاتیک، به‌طور معمول، نمونه از سوزن بالا رفته و در این شرایط، انتقال آن روی گرید TEM غیر ممکن خواهد بود. در صورت پایین بودن میزان شارژ استاتیک، نمونه به سوزن مذکور نخواهد چسبید. میزان بهینه‌ای از شارژ استاتیک برای حصول عملیات موفق بلند کردن و بالا آوردن و انتقال نمونه مورد نیاز است. از طریق پوشش‌دهی سوزن و بهینه‌سازی قطر نوک سوزن مذکور نسبت به وزن نمونه مورد نظر می‌توان میزان شارژ استاتیک در نوک سوزن را کنترل کرد. همان‌طور که پیش‌تر نیز ذکر شد، در روش بلند کردن و بالا آوردن، عملیات نازک‌سازی درون FIB تنها یک مرتبه انجام می‌شود. هنگامی که برش نهایی از تراشه بلند و جدا شود و روی گرید قرار گیرد، دیگر انجام عملیات نازک‌سازی اضافی امکان‌پذیر نخواهد بود. می‌توان با نصب یک پروب یا بازوی دستکاری کننده درون FIB بر این محدودیت روش بلند کردن و بالا آوردن غلبه نموده و بر پیشرفت فرآیند آماده‌سازی نمونه TEM نیز از ابتدا تا انتها به‌صورت مرحله به مرحله نظارت

نازک شده و مدارهای از پشت زدایش شده، چندین مکان روی یک تراشه، قسمتی از تراشه پردازش نشده و نقایص آشکار و لایه لایه‌ای. چند تن از مؤلفان مشهور، چند نسخه از روش بلند کردن و بالا آوردن را که نیازمند به هیچ‌گونه آماده‌سازی نمونه پیش از مرحله FIB نداشته را برای آماده‌سازی ناحیه‌ای مورد نظر از نمونه TEM معرفی کردند. در یکی از این نسخه‌های رویه بلند کردن و بالا آوردن با استفاده از FIB، برشی با ضخامت  $2\text{ mm}$ ، عرض  $30\text{ mm}$  و عمق  $15\text{ mm}$  تهیه شد که ناحیه مورد نظر، در مرکز این برش قرار می‌گیرد. سپس ناحیه‌ای به عرض  $10\text{ mm}$  و عمق  $10\text{ mm}$  برای عبور دادن پرتو الکترونی حول ناحیه مورد نظر اولیه، نازک می‌شود. در این هنگام، نمونه نهایی با بریدن قسمت زیرین و سایش لبه‌های نمونه از تراشه جدا می‌شود. نمای نشان‌دهنده مرحله بریدن قسمت زیرین نمونه نهایی و بلند کردن آن در شکل (۱۱) و تصویر SEM از مرحله برش و بلند کردن نمونه نیز در شکل (۱۲) نمایش داده شده است.



شکل (۱۱): روش آماده‌سازی نمونه با عنوان «بلند کردن و بالا آوردن» برای تهیه سطح مقطعی از ناحیه‌ای معین برای بررسی در دستگاه TEM. در این روش، دو طبقه برش دو پله‌ای در دو طرف ناحیه مورد نظر ایجاد می‌شود. نمونه نهایی با بریدن مناطق اطراف و زیر نمونه مورد نظر از تراشه اصلی جدا می‌شود. (الف): نمای بالا به پایین هندسه فرآیند سایش. (ب): نمای سطح مقطعی از هندسه فرآیند سایش و رویه بریدن و برداشتن نمونه مورد نظر [۲].



شکل (۱۲): تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از برش نمونه TEM با FIB [۲].

سخت‌ترین بخش روش بلند کردن و بالا آوردن، انتقال

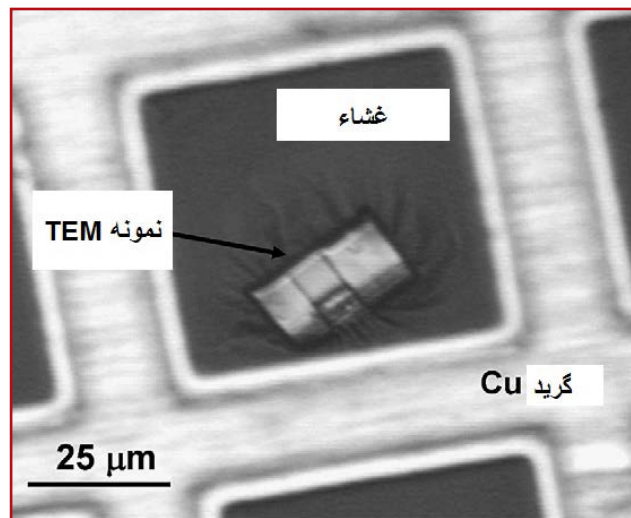


عملیات نازک‌سازی نهایی آن انجام شود، آنگاه ضخامت لایه صدمه/آسیب به ۱۸ nm و در صورت انجام عملیات ذکر شده نهایی با انرژی ۵ KeV نیز ضخامت لایه مربوطه به ۱۰ nm تقلیل می‌یابد. روش‌های کنترل کردن آرتیفکت/ناخالصی‌های FIB ایجاد شده در طول مرحله آماده‌سازی نمونه در قسمت ذیل شرح داده شده‌اند.

### ● صدمه/آسیب یون به سطح رویی

به‌منظور جلوگیری از وقوع صدمه/آسیب به سطح رویی و ایجاد «اثر پرده‌ای»، لایه‌ای نازک از جنس پلاتینیوم یا دیگر فلزات برای ایجاد سطح مسطح و کاهش میزان گرد کردن بالای نمونه پیش از شروع هر گونه عملیات سایش با استفاده از ابزار FIB روی منطقه و ناحیه مورد نظر رسوب داده می‌شود. رسوبدهی فلز مورد نظر مکان‌نگاری نمونه را که احتمالاً منجر به حصول نتایج ناهموار از فرآیند سایش شده را مسطح نموده و یک لایه قربانی ایجاد می‌کند. به‌طور معمول، صدمه/آسیب سطح رویی به دلیل کاشت زود هنگام یون‌های پلاتینیوم در مرحله رسوبدهی/لایه‌نشانی رخ می‌دهد. در طول مراحل نهایی نازک‌سازی، پرتو یونی به جای تاثیرگذاری روی ناحیه نمونه مورد نظر، مقداری از فلز قربانی را حذف می‌کند. در صورت عدم استفاده از لایه قربانی، یون‌های گالیم مورد استفاده برای فرآیند سایش، صدمه و آسیب بسیار بیشتری به سطح مورد نظر وارد می‌کند. اگر برش نازک مربوطه با پرتو یونی در زاویه‌ای بیش از چند درجه موازی با سطح مورد نظر پوشش شده یا حتی اگر از برش مذکور با استفاده از پرتو یونی تصویربرداری شود، آنگاه به سطح مورد نظر صدمه/آسیب وارد می‌شود. چنین صدمه/آسیبی به سطح مورد نظر، منجر به آمورف شدن سطح نمونه شده که همین امر موجب ایجاد اختلال در فرآیند تصویربرداری با قدرت تفکیک‌پذیری بالا می‌شود. در شرایط وقوع صدمه/آسیب بسیار شدید، هر چقدر سطح برش نازک مورد نظر، مدت زمان بیشتری در موقعیت خارج از محور موازی تعیین شده در معرض پرتو یونی قرار گیرد، آرتیفکت‌ها/نقایص نابهنجار بیشتری پدیدار می‌شوند. لزلی<sup>۵۲</sup> و همکاران اثر صدمه/آسیب پرتو با زاویه‌های انحراف مختلف را از طریق ثبت الگوهای پراش الکترونی ناحیه منتخب به‌دست آمده از چندین نمونه Si آماده‌سازی شده در شرایط یکسان با اعمال فرآیند سایش نهایی اجرا شده در زوایای پرتو فرودی مختلف بررسی کرده‌اند. آنها به این نتیجه دست یافته‌اند که زاویه انحراف  $\pm 2^\circ$  درجه از موقعیت عمودی، بهینه‌ترین شرایط را برای عاری بودن نمونه از تغییر فاز/آمورف شدن فراهم می‌آورد. با توجه به عمق ویژگی‌ها و ناحیه مورد نظر، این امکان وجود دارد که صدمه/آسیب وارد شده بر سطح نمونه از اهمیت

داشت. این روش با عنوان «بلند کردن و بالا آوردن درجا/بهنگام» شناخته شده و مزیت آن در برابر روش بلند کردن و بالا آوردن معمولی این است که حتی پس از بررسی نمونه در TEM می‌توان آن را از روی گرید به FIB برگرداند و دوباره عملیات نازک‌سازی را روی آن اعمال نمود. تنها تفاوت این دو روش در این زمینه است که در روش بلند کردن و بالا آوردن درجا/بهنگام برش به نسبت نازک شده به‌صورت درجا/بهنگام درون FIB بلند شده و با استفاده از رسوبدهی/لایه‌نشانی Pt روی گرید TEM قرار می‌گیرد. برش بلند شده که روی گرید قرار می‌گیرد، برای حصول ضخامت مناسب به‌منظور عبور الکترون، با استفاده از FIB نازک‌تر می‌شود.



شکل (۱۳): تصویر میکروسکوپ نوری از برش حاصل شده از روش بلند کردن و بالا آوردن قرار گرفته روی گرید با پوشش غشاء کربنی آماده برای تحلیل درون TEM [۲].

### آرتیفکت‌های عملیات نازک‌سازی FIB

تاثیر یون بر سطح نمونه تنها منجر به انجام عملیات سایش FIB نشده بلکه باعث شکل‌گیری یک لایه آسیب دیده نیز می‌شود. صدمه حاصل شده در صورت استفاده از یون‌های گالیم ۵ KeV تا ۵۰ KeV شامل کاشت یون‌های گالیم، آمورف‌سازی ساختارهای بلورین، ترکیب مؤلفه‌ها و از بین رفتن جزئیات ظریف ساختار مورد نظر می‌شود. پس از انجام آزمایش‌های گوناگون، این نتیجه حاصل شد که این نوع از صدمات در قالب لایه‌ای نازک در سطح نمونه ظاهر می‌شوند. ضخامت این لایه صدمه/آسیب دیده به زاویه برخورد پرتو و انرژی یون بستگی دارد. مشاهده شده که عملیات آماده‌سازی نمونه TEM با سایش FIB در صورت به کارگیری انرژی ۳۰ KeV قادر است لایه صدمه/آسیب دیده‌ای با ضخامت ۴۰ nm را ایجاد نماید. از طرف دیگر، اگر برش حجیم و بزرگی از نمونه با انرژی ۳۰ KeV جدا شده و سپس با انرژی ۱۰ KeV



کندوپاشی گالیم برقرار می‌شود. ایشیتا<sup>۵۳</sup> و همکاران [۲۷] هنگام فرآیند کندوپاشی حالت پایدار نگهداشت یونی را مدل‌سازی نموده و همبستگی خوبی را بین مدل خود و نتایج آزمایشی تجربی گزارش کردند. آنها برای تعیین غلظت/تراکم گالیم در سطح مقاطع مورد نظر از تحلیل EDX استفاده کردند. با به کارگیری فرض تعبیه شدن گالیم درون ۱۰ نانومتر ابتدایی از دیواره‌های جانبی/کناری، مؤلفان مذکور غلظت گالیم درون لایه‌های تنگستنی و سیلیکونی (با توجه به انجام فرآیند نازک‌سازی با پرتو یونی ۳۰ KeV) را به ترتیب برابر با ۴ و ۹ درصد درون لایه‌های مورد نظر برآورد کردند. لنگفورد<sup>۵۴</sup> و همکاران [۲۸] تاثیر شرایط مختلف سایش با پرتو یونی بر غلظت گالیم حالت پایدار تعبیه شده درون نمونه‌های سطح مقطعی سیلیکون را بررسی نمودند. آنها گزارش کردند که گالیم نمونه‌های سطح مقطعی سیلیکونی ساییده شده با استفاده از پرتو یونی ۵ KeV در حدود ۲/۵ برابر کمتر از نمونه‌های سطح مقطعی سیلیکونی ساییده شده با پرتو یونی ۳۰ KeV است. در عین حال، نمونه‌های ذکر شده ساییده شده با زدایش/لایه‌برداری با استفاده از گاز ید<sup>۵۵</sup> با پرتوهای یونی ۵ KeV و ۳۰ KeV در مقایسه با نمونه‌های همای ساییده شده خود با استفاده از پرتو یونی ۳۰ KeV به ترتیب حاوی ۲/۷ و ۳ برابر کمتری هستند. بسیاری از محققان درباره عمق صدمات به دیواره‌های جانبی نمونه‌های سطح مقطعی تحقیق‌های جامعی انجام داده‌اند. در این راستا، کاهش شکل‌گیری لایه آمورف درون دیواره جانبی سیلیکون در صورت به کارگیری انرژی‌های یون برابر با ۳۰ KeV، ۵ KeV و ۵ KeV گزارش شده که در این موارد، صدمه دیواره جانبی مورد نظر به ترتیب برابر است با: ۲۲ nm، ۵ nm و ۱/۵-۰/۵ nm.

کاتو<sup>۵۶</sup> و همکاران [۲۹] عمق صدمات وارد شده به سیلیکون بلوری با استفاده از فرآیند سایش را با پرتو گالیم ۳۰ KeV بررسی نموده و لایه آمورفی تقریباً برابر با ۲۰ nm به‌دست آورده و گزارش کردند که ضخامت مورد نظر در محدوده ۱۰۰ pA - ۵۰۰ pA از جریان پرتو به کار برده شده مستقل است. واکر<sup>۵۷</sup> و همکاران [۳۰]، با استفاده از تحلیل پراش میزان گزارش کردند که در صورت به کارگیری پرتو گالیم ۳۰ KeV، صدمه آمورف شدن در گالیم آرسناید کمتر از ۸ nm خواهد بود. روش‌های بسیاری نظیر کاهش انرژی پرتو یونی تابیده شده، استفاده از سایش پرتو یونی پهن<sup>۵۸</sup> برای پاک‌سازی نمونه‌های سطح مقطعی آماده شده با FIB و همچنین به کارگیری GAE برای کاهش ضخامت لایه آسیب/صدمه دیده مورد نظر توسط پژوهشگران مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در سیستم‌های FIB تجاری کنونی، اپتیک یونی برای انجام فعالیت در ۳۰-۲۰ KeV بهینه‌سازی شده‌است. اگر انرژی تابشی FIB

بالایی برخوردار نباشد. به‌طور معمول، ناحیه مورد نظر به‌عنوان لایه‌ای که ۳۰ nm الی ۶۰ nm از سطح رویی نمونه کلی فاصله داشته، انتخاب می‌شود. اما اگر نواحی مورد نظر به سطح نزدیک باشند، آنگاه حتی رسوبدهی لایه محافظتی پلاتینیوم نیز منجر به وقوع آرتیفکت‌های غیرقابل قبول خواهد شد. البته استفاده از فرآیند رسوبدهی انرژی پایین پلاتینیوم (۵ KeV) به احتمال زیاد از میزان صدمه/آسیب می‌کاهد. در این شرایط، برای محافظت از نمونه در طول فرآیند رسوبدهی، لایه فلزی ضخیم‌تر با استفاده از پرتو یونی با انرژی کامل که در مراحل بعدی اعمال شده، بهتر است ابتدا لایه‌ای نازک از پلاتینیوم را در حالت اعمال پرتو الکترونی رسوب داد. از طرف دیگر، می‌توان لایه‌ای نازک از طلا یا کربن را پیش از وارد کردن نمونه مورد نظر درون سیستم FIB روی سطح آن نمونه رسوبدهی کرد. پس از آن، این لایه از نمونه در برابر فرآیند رسوبدهی القاء شده توسط پرتو یونی محافظت می‌کند. یکی از مشکلات دیگر در قالب رسوبدهی مجدد لایه آمورف زمانی رخ می‌دهد که منطقه‌ای نزدیک به برش نازک مورد نظر ساییده شده باشد. می‌توان با عدم انجام هرگونه فرآیند سایش نزدیکی ناحیه برش نازک مورد نظر پس از نمایان شدن آن به‌عنوان سطح رویی نهایی یا انجام فرآیند سایش تمیزکاری از وقوع این مشکل جلوگیری به عمل آورد. لازم به ذکر است که نمونه‌های آماده شده با فرآیند سایش سیستم FIB گوه شکل است، بدین معنی که بالای آنها باریک و پایین آنها عریض‌تر است. در صورت نیاز به حصول ضخامت یکسان در کل نمونه، می‌توان از ترکیب فرآیند سایش قسمت جلویی و پشتی نمونه مذکور در مرحله نهایی با منحرف ساختن مناسب پایه نگهدارنده نمونه و به کارگیری جریان پرتو پایین استفاده نمود.

### ● آسیب/صدمه دیواره جانبی

احتمال وارد آمدن آسیب/صدمه به دیواره‌های جانبی نمونه‌ها نیز وجود دارد. البته به دلیل تابیده شدن پرتو/اشعه با زاویه خراش پایین، آسیب وارده به دیواره‌های جانبی کمتر از آسیب مربوط به سطح است. اما به هر صورت، آسیب/صدمه دیدن دیواره‌های جانبی روی کل نمونه تاثیر می‌گذارد. برای جلوگیری از وقوع چنین آسیبی می‌توان انجام مرحله بازرسی و بررسی نمونه با حالت تصویربرداری پرتو یونی پس از اجرای مرحله آخر نازک‌سازی و عملیات پاک‌سازی/تمیزکاری را حذف کرد. پیشنهاد می‌شود به‌منظور به حداقل رسانیدن چنین آسیبی، نمونه نهایی را با پرتو الکترونی بازرسی کرد. در طول مرحله نازک‌سازی سطح مقطع نمونه TEM شرایطی با عنوان حالت پایدار کندوپاشی پدیدار شده که در آن توازنی میان نرخ فرآیند کاشت گالیم با نرخ

BIB بر نمونه‌های سطح مقطعی سیلیکون آماده شده برای TEM توسط دستگاه FIB را مورد بررسی قرار دادند. مزیت‌های فرآیند سایش BIB در مقایسه با سیستم‌های FIB، نخست فعال نمودن انرژی‌های فرودی کمتر و دوم حصول زوایای سایش کوچکتری است. کاتو و همکاران [۲۹] گزارش دادند که سایش BIB سطح مقاطع سیلیکونی آماده شده توسط سیستم FIB با به کارگیری پرتو ۴ KeV در زاویه ۴۰° منجر به حصول صدمه‌ای ۸ نانومتری در دیواره‌های جانبی می‌شود. لنگفورد و همکاران رویه‌ای را پیشنهاد کردند که در آن، هر دو طرف نمونه‌های سطح مقطعی با استفاده از روش بلند کردن و بالا آوردن آماده‌سازی شده و سپس با BIB می‌توان آنها را سایشید. در این رویه، ابتدا یک طرف نمونه سطح مقطعی سایشیده شده و سپس با استفاده از یک سوزن و یک بازوی مکانیکی ریز، نمونه مذکور را برگردانده و طرف دیگر آن را سایشید. آنها در این رویه موفق شدند هم از گریدهای مسی و هم از گریدهای سیلیکونی استفاده کنند. علاوه بر کاهش یافتن ضخامت لایه صدمه دیده در دیواره‌های جانبی، یکی دیگر از مزیت‌های اجرای سایش BIB برای نمونه‌های سطح مقطعی از پیش آماده شده با سیستم FIB این است که با به کارگیری نرخ‌های آهسته‌تر سایش، کنترل بیشتری بر تعیین ضخامت نهایی نمونه سطح مقطعی برای کاربر فراهم می‌آورد [۲].

تنها به چند KeV کاهش یابد، آنگاه قدرت تفکیک‌پذیری فرآیند تصویربرداری نیز به دلیل افزایش به وقوع پیوسته در اندازه نقطه و کاهش در نسبت سیگنال به نویز تقلیل خواهد یافت. در نتیجه این امر، سایش سطح مقطع با استفاده از زاویه‌های برخورد کم عمق دشوار می‌شود. کاتو و همکاران [۲۹] گزارش کردند که در صورت منحرف شدن سطح مقاطع سیلیکونی به اندازه ۱۰ درجه و سپس سایش آنها با استفاده از FIB با انرژی ۵ KeV، آنگاه ضخامت لایه آمورف در دیواره‌های جانبی برابر با ۱۰ nm خواهد بود. در روش GAE منطقه در حال سایشید شدن در معرض گاز واکنش‌پذیر نیز قرار می‌گیرد. در این صورت، نرخ زدایش افزایش یافته از فرآیند رسوب‌دهی مجدد مواد، کاسته شده، تعداد نقایص بلور کاهش یافته و میزان گالیم استفاده شده برای نمونه نیز تقلیل می‌یابد. سوگیموتو<sup>۹</sup> و همکاران به منظور کاهش صدمه در نمونه‌های GaAs خود، GAE کلرین/کلر را به کار بردند، در حالی که یاماگوچی و همکاران به منظور بهینه‌سازی نمونه‌های سطح مقطعی InP خود برای HREM از GAE آلوداین/ید استفاده کردند. یاماگوچی<sup>۱۰</sup> و همکاران گزارش نمودند که استفاده از GAE ضخامت لایه صدمه را از ۳۱ nm به ۲ nm الی ۵ nm کاهش داده و همچنین از به وجود آمدن آرتیفکت‌های FIB که قادر به شکل‌دهی ریزبلورها بوده نیز جلوگیری به عمل می‌آورد. کاتو و همکاران و همچنین لنگفورد و همکاران اثر انجام فرآیند سایش

## نتیجه‌گیری

میکروسکوپ الکترونی عبوری به منظور تعیین ویژگی‌های دستگاه‌ها و قطعات با اندازه زیر نانومتر به ابزاری ضروری برای تشخیص و آشکارسازی نقایص، سنج‌شناسی و تحلیل مواد در صنعت نیمه‌هادی تبدیل شده است. سایش FIB به دلیل قابلیت مطلوب آن در زمینه آماده‌سازی منطقه‌ای معین از نمونه برای تحلیل در TEM، روشی محبوب میان محققان این حوزه است. صدمه وارد شده با روش FIB به نمونه را می‌توان از طریق به کارگیری فرآیند سایش با انرژی پایین در مرحله نهایی روند آماده‌سازی نمونه TEM کنترل نمود. پس از تحقیقات فراوان دانشمندان به این نتیجه رسیدند که می‌توان لایه‌های نازک (اکسید گیت، ضخامت فیلم/غشاء K-بالا، لایه سطحی) را با استفاده از HRTEM با دقت بسیار مطلوب اندازه‌گیری کرد اما هنوز باید بر چالش‌هایی همانند ضخامت نمونه، نمونه‌های عاری از آسیب پرتو یونی و مقطع برداری دقیق از نمونه برای نمونه‌هایی که منطقه معینی از آنها مد نظر بوده، غلبه نمود. تحلیل فاز و ریخت‌شناسی نمونه‌های صنعت مذکور را می‌توان با دستگاه TEM مرسوم (میدان روشن، میدان تاریک و پراش الکترونی ناحیه گزینشی)، CBED و FFT دستگاه HRTEM انجام داد. مزیت اصلی تصویربرداری STEM با استفاده از کنتراست Z تشخیص کوچکترین نقایصی است که شناسایی آنها با روش‌های مرسوم تصویربرداری نظیر تصویربرداری فاز-کنتراست و الگوی پراش دشوار است. به دلیل اینکه همواره ساختار قطعات و دستگاه‌های صنعت نیمه‌هادی در حال کوچک و پیچیده‌تر شدن هستند، لذا تحلیل و تشخیص نقایص آنها در بیشتر موارد تنها با استفاده از روش‌های مختلف TEM امکان‌پذیر است. به همین منظور، غلبه بر چالش‌های موجود در رابطه با آماده‌سازی و تصویربرداری از نمونه‌های نیمه‌هادی با استفاده از TEM از اهمیت بالایی برخوردار است.

1. Transmission Electron Microscope (TEM)
2. Gallium
3. Gate
4. Dielectrics
5. kappa
6. Polycrystalline Silicon
7. Gate Oxide
8. Tantalum
9. Metal–Oxide–Semiconductor Field-Effect Transistor (MOSFET)
10. Scanning Electron Microscopy (SEM)
11. Focused Ion Beam (FIB)
12. Integrated Circuit (IC)
13. Silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>)
14. The metal-oxide-semiconductor field-effect transistor (MOSFET)
15. Silicon oxynitride (SiON)
16. High-Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM)
17. Complementary Metal Oxide Semiconductor (CMOS)
18. Wafer
19. Convergent Beam Electron Diffraction (CBED)
20. Fast Fourier Transform (FFT)
21. Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)
22. Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS)
23. Selected Area Electron Diffraction (SAED)
24. Titanium nitride
25. Amorphous layers
26. Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)
27. Cathode Ray Tube (CRT)
28. Bright Field (BF)
29. Annular Dark Field (ADF)
30. High Angle Annular Dark Field (HAADF)
31. Energy Filtered TEM (EFTEM)
32. Stegmann
33. Emitter–Base
34. Argon
35. Region Of Interest (ROI)
36. Young
37. Morris
38. Kirk
39. Schraub
40. Rai
41. Overwijk
42. Herlinger
43. Giannuzi
44. Anderson
45. Klepeis
46. Subramanian
47. Stevie
49. Nickel (Ni)
50. Molybdenum (Mo)
51. Acetone
52. Slide
53. Leslie
54. Ishita
55. Langford
56. Gas Assisted Etching (GAE)
57. Kato
58. Walker
60. Broad Ion Beam (BIB)
61. Sugimoto
62. Yamaguchi

- [1] Transmission electron microscopy for the semi-conductor industry, by: Hong Zhang. February 2002. Micron 33(6):515-21.
- [2] Role of transmission electron microscopy in the semiconductor industry for process development and failure analysis, by: Raghav S. Rai, Swaminathan Subramanian. September 2009. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 55(3-4):63-97.
- [3] R. Brydson, Electron Energy Loss Spectroscopy. Taylor & Francis, 2001.
- [4] H. Stegmann, H.-J. Engelmann, E. Zschech, Microscopy and Microanalysis 9 (Suppl. 3) (2003) 270.
- [5] W.D. Rau, P. Schwander, F.H. Baumann, W. Hoppner, A. Ourmazd, Phys. Rev. Lett. 82 (1999) 2614.
- [6] W.D. Rau, P. Schwadner, A. Ourmazd, Phys. Stat. Sol. B222 (2000) 213.
- [7] M.G.Han, P. Fejes, Q.Xie, S.Bagchi, B.Taylor, J.Conner, M.R.McCartney, IEEE Trans. Electron Dev. 54 (2007) 3336.
- [8] U. Muehle, A. Lenk, M. Lehmann and H. Lichte, Proceedings of the 28th International symposium for Testing and Failure Analysis (2002) 39.
- [9] K. Vogel, A. Lenk, H. Lichte, H.J. Engelmann, U. Muhle, B. Breitag, Microscopy and Microanalysis 9 (Suppl. 3) (2003) 240.
- [10] Assessing the performance of two-dimensional dopant profiling techniques, by: Natasja Duhayon, P. Eyben, Marc Fouchier, and Trudo Clarysse. Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena 22, 385 (2004).
- [11] Direct Depth- and Lateral- Imaging of Nanoscale Magnets Generated by Ion Impact, by: Falk Röder, Gregor Hlawacek, Sebastian Wintz, René Hübner, Lothar Bischoff, Hannes Lichte, Kay Potzger, Jürgen Lindner, Jürgen Fassbender & Rantej Bali. Scientific Reports volume 5, Article number: 16786 (2015).
- [12] R. Anderson, Proceedings of the 49th Annual Meeting of Electron Microscopy Society of America, edited by G.W. Bailey and E.L Hall, San Francisco Press, California (1991) 828.
- [13] H. Oppolzer, Inst. Phys. Conf. Ser. No. 76, Sect. 11 (1985) 461.
- [14] S.J. Klepeis, J.P. Benedict, R.M. Anderson, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 5 (1987) 179.
- [15] J. Szot, D. Yong, A. Bourdillon, K.E. Easterling, Phil. Mag. Lett. 55 (1987) 109.
- [16] R.J. Young, E.C.G. Kirk, D.A. Williams, H. Ahmed, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. (1990) 271.
- [17] S. Morris, S. Tatti, E. Black, N. Dickson, H. Mendez, B. Schwiesow, and R. Pyle, Proceedings of the 17th International Symposium for Testing and Failure Analysis (1991) 417.
- [18] E.C.G. Kirk, D.A. Williams, and H. Ahmed, Inst Phys. Conf. Ser. No. 100 Section 7 (1989) 501.
- [19] D.M. Schraub, R.S. Rai, Prog. Cryst. Growth Character. Mater. 36 (1998) 99.
- [20] M.H.F. Overwijk, F.C. Van den Henvel, C.W.T. Bulle-Lieuwma, J. Vac. Sci Technol. B11 (1993) 2021.
- [21] L.R. Herlinger, S. Chevacharoenkul, D.C. Erwin, Proceedings of the 22nd International Symposium for Testing and Failure Analysis (1996) 199.
- [22] L.A. Giannuzzi, L.L. Drown, S.R. Brown, R.B. Irwin, F.A. Stevie, Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 480 (1997) 19.
- [23] R. Anderson, S.J. Klepeis, Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy of Materials IV, vol. 480, Materials Research Society, Pittsburgh, 1997, 187.
- [24] S. Subramanian, P. Schani, E. Widener, J. Moss and V. Soorholtz, Proceedings of the 24th International symposium for Testing and Failure Analysis (1998) 131.
- [25] F.A. Stevie, R.B. Irvin, T.L. Shofner, S.R. Brown, J.L. Drown and L.A. Giannuzzi Characterization and Metrology for ULSI Technology: 1998 Conference, editors: Seiler et al., AIP (1998) 868.
- [26] R. Rai, S. Subramanian, S. Rose, J. Conner, P. Schani, and J. Moss, Proceedings of the 26th International Symposium for Testing and Failure Analysis, (2000) 415.
- [27] T. Ishitani, H. Koike, T. Yaguchi, T. Kamino, J. Vac. Sci. Technol. B16 (1998) 1907.
- [28] R.M. Langford and A.K. Petford-Long, Proceedings of the 12th EUREM, Brno Czech Republic, July 9e14(2000).
- [29] N.I. Kato, N. Miura, N. Tsutsui, J. Vac. Sci. Technol A16 (1998) 1127.
- [30] J.F. Walker, J.C. Reiner, and C. Solenthaler, Inst. Phys. Conf. Ser. No. 146 (1995) 473.



## Author

Sanaz Shobikheh<sup>1,2\*</sup>

\*researchers4u@yahoo.com

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

# Utilization of Transmission Electron Microscopy for development, analysis, and failure detection in semiconductor industry

## Abstract

In recent years, advanced technologies were applied to semiconductor industry and as a result the size of its features is scaling down drastically. In order to improve its devices performance, this industry needs to keep reducing the size of the parts that it manufactures even more. Meanwhile transmission electron microscopy (TEM) plays an important part in development, manufacturing and fault analysis of the semiconductor industry devices. After witnessing recent advances in TEM field in respect to preparing and imaging of semiconductor specimens, we can no longer limit the utilization of TEM in just academic fields and should apply TEM techniques to thoroughly assess and analyze semiconductor faults that cannot be revealed or examined by any other available methods. TEM techniques not only provide the superior spatial resolution in comparison to other advanced methods, but they also offer ultra-sensitive elemental analysis ability to characterize sub-nanometer materials in semiconductor industry. In this field TEM can be used for applications such as: examining semiconducting devices defects, evaluating surface and interfacial features, identifying device dimensions, and etc. in this article, different types of techniques for semiconductor specimen preparation, analyzing and imaging using TEM have been presented.

## Keywords

Transmission electron microscope; Semiconductor; Elemental analysis; Specimen preparation.

# Validation of the results in the drug detection and analysis laboratories; Identification of cannabinoids by thin layer chromatography

## Authors

**Asghar Eftekhari<sup>1\*</sup>**  
**Ebrahim Ghorbani<sup>2</sup>, Reza Saghi<sup>3</sup>**

**\*dr.ef.2003@gmail.com**

1. phd. chemistry, chairman of the department of Anti-Narcotics, Amin Police Comprehensive Science University.
2. Master of Chemistry, lecturer and member of the anti-narcotics scientific group, Amin Police Comprehensive Science University.
3. Master's student in the field of the anti-narcotics, Amin Police Comprehensive Science University.



## Abstract

Thin layer chromatography is a common technique for the separation and identification of drugs. There are several thin layer chromatography methods for the qualitative and semi-quantitative analysis of cannabis, using a variety of stationary and mobile phases, sample preparation methods, and spot Visualization/detection techniques. However, any method that is newly applied in the laboratory should be tested before routine use; Be validated and approved.

## Keywords

Validation, cannabinoids, Tetrahydrocannabinol, Thin layer chromatography, The Drug Detection and Analysis Laboratories.



## Author

Parvin Hadian<sup>1,2\*</sup>

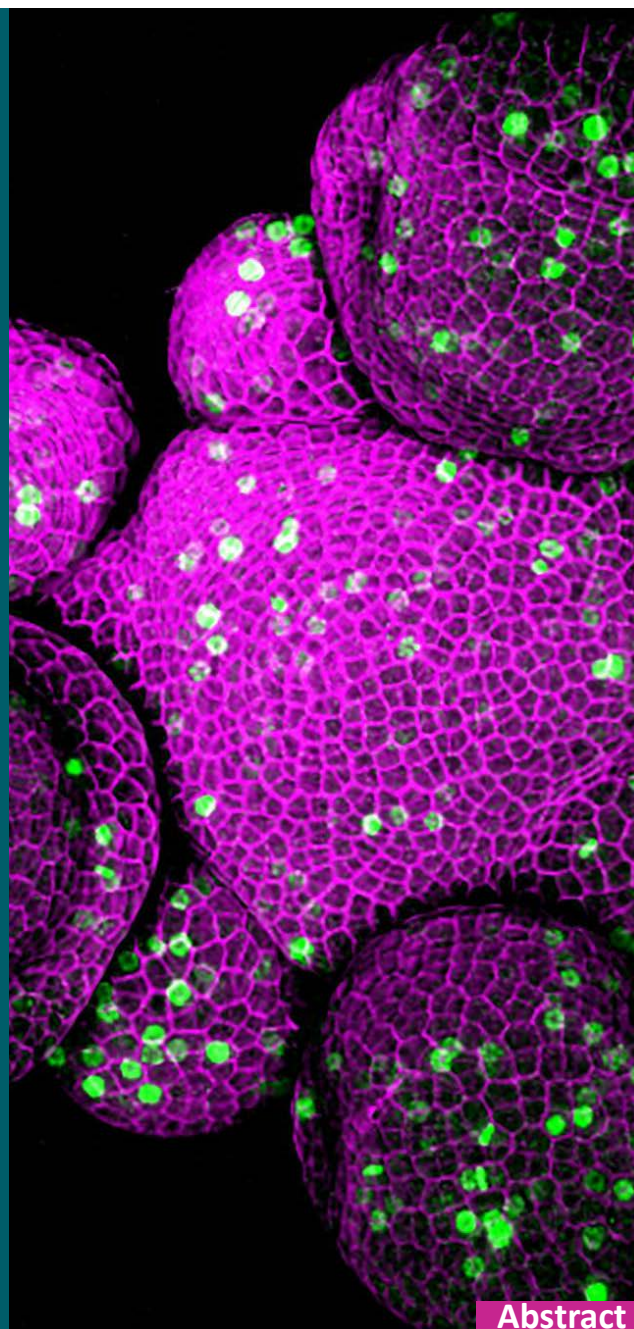
\*parvinhadian@gmail.com

1. MSc. Analytical Chemistry,  
Nanotechnology laboratory, Agriculture  
Biotechnology Research Institute of Iran.

2. SPM Experts Workgroup

# Fluorophores for Confocal Microscopy

## Part 2



### Abstract

Biological laser scanning confocal microscopy relies heavily on fluorescence as an imaging mode, primarily due to the high degree of sensitivity afforded by the technique coupled with the ability to specifically target structural components and dynamic processes in chemically fixed as well as living cells and tissues. Many fluorescent probes are constructed around synthetic aromatic organic chemicals designed to bind with a biological macromolecule (for example, a protein or nucleic acid) or to localize within a specific structural region, such as the cytoskeleton, mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, and nucleus. Other probes are employed to monitor dynamic processes and localized environmental variables, including concentrations of inorganic metallic ions, pH, reactive oxygen species, and membrane potential. Fluorescent dyes are also useful in monitoring cellular integrity (live versus dead and apoptosis), endocytosis, exocytosis, membrane fluidity, protein trafficking, signal transduction, and enzymatic activity. In addition, fluorescent probes have been widely applied to genetic.

### Keywords

Laser scanning confocal microscopy,  
Fluorescence, Fluorophores.



## Author

Sahar Salehi<sup>1,2\*</sup>[\\*Sah.salehi@gmail.com](mailto:Sah.salehi@gmail.com)

1. Ph.D. in Materials Engineering, Central Laboratory of Research Institute of Food Sciences and Industries
2. Secretary of thermal analysis working group

## Determining the purity of materials using a differential calorimetry device

### Abstract

The differential calorimetry (DSC) thermal analysis method is used by many researchers for thermal analysis and to investigate the behavior of different materials when faced with temperature changes. While this method has other practical aspects. One of these applications is determining the purity of materials. Which is very important in the preparation of reference materials or the pharmaceutical industry. This article examines the method of determining the purity of materials. It is paid through a calorimeter. Which is cheaper and faster compared to other methods. And it has acceptable accuracy.

### Keywords

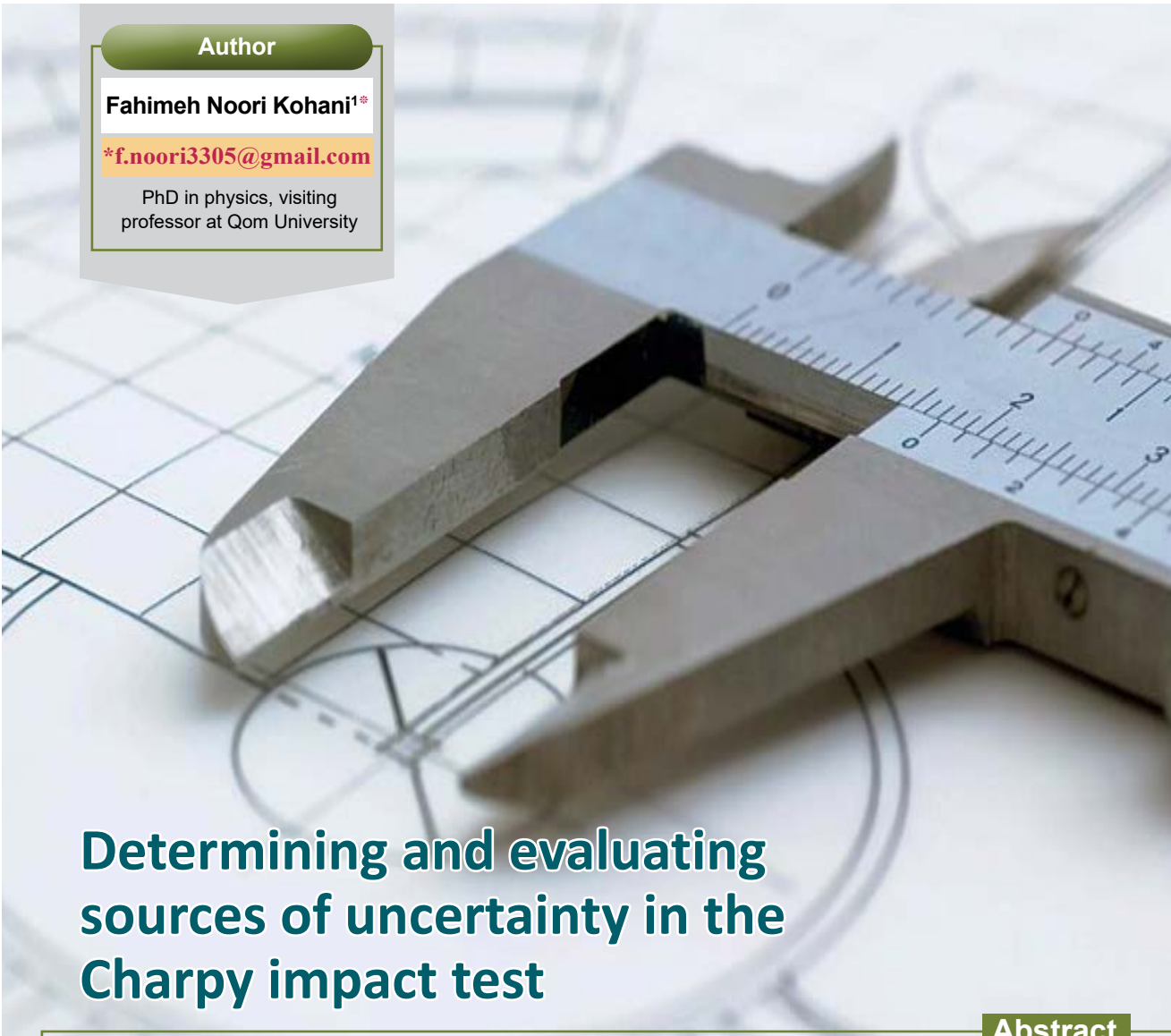
purity, Thermal analysis, van't Hoff's Equation.



## Author

Fahimeh Noori Kohani<sup>1\*</sup>

\*f.noori3305@gmail.com

PhD in physics, visiting  
professor at Qom University

## Determining and evaluating sources of uncertainty in the Charpy impact test

### Abstract

There are always some precision and uncertainties in the measurement of the final report, especially if this measurement is done with laboratory equipment. For this purpose, investigating and evaluating the factors that create uncertainty in the final value can always lead to a more accurate value. Therefore, in this research article, the factors and parameters that cause error and uncertainty in the final value in the Charpy impact test, which is a widely used test in measuring the energy absorbed by various materials such as steel in the construction of steel pipes for use in water transmission, gas, and oil are investigated. The uncertainty of the device was calculated along with the uncertainty resulting from the reproducibility. Finally, for a Charpy test device, the numerical results were calculated to the amount energy absorbed 185.2 J with an expanded uncertainty of 4.078 with a confidence factor of 95%, taking into account the degree of freedom of the test. Also, according to the calculations, the share of repeatability uncertainty is more than other uncertainty factors.

### Keywords

Uncertainty, Impact test, Charpy, Repeatability, Type A and B uncertainty.

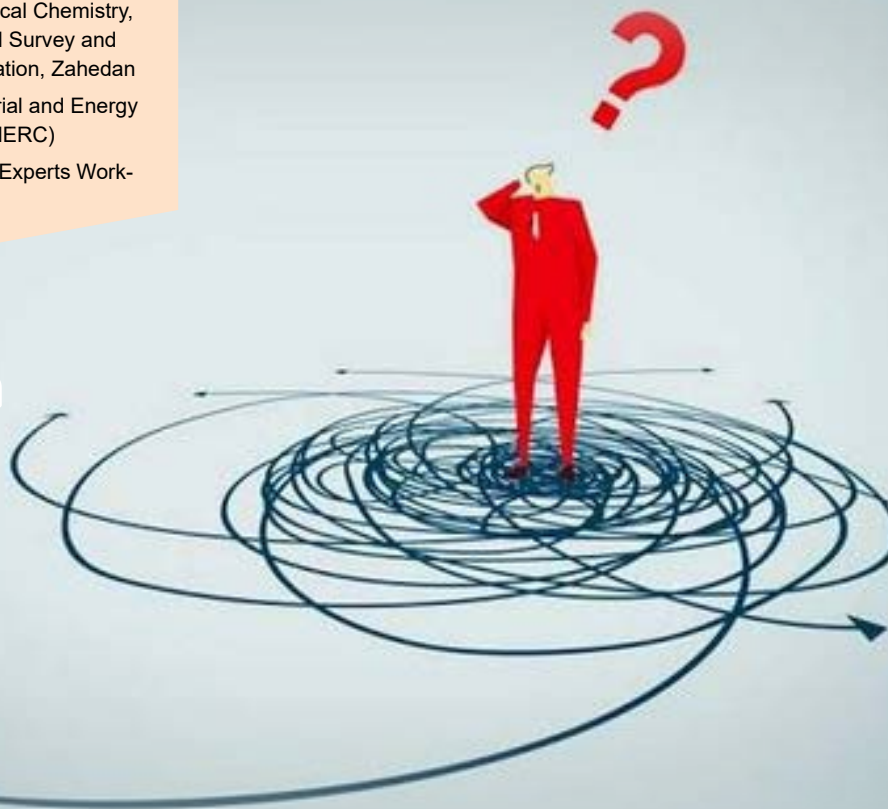
## Authors

**Afsoon Narooie<sup>1,3\*</sup>**  
**Seyed Ahmad Zahirmirdamadi<sup>2,3</sup>**

\*[aanarooie7792@gmail.com](mailto:aanarooie7792@gmail.com)

1. Master's degree in Analytical Chemistry, Eastern Region Geological Survey and Mineral Exploration Organization, Zahedan
2. MSc governmental, Material and Energy Research Center (MERC)
3. Standard and Calibration Experts Work-group

## Uncertainty in the sampling process



### Abstract

Uncertainty in the sampling process is an important challenge in statistical sciences and research studies. In this article, an attempt was made to examine the factors that cause errors and uncertainty in sampling and research, as well as various methods of reducing uncertainty in them.

### Keywords

Sampling, uncertainty.



# Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Volume 11 ■ Issue 2 ■ Summer 2023 ■ No.42

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:

Sanaz Shobikeh, Asghar Eftekhari,  
Ebrahim Ghorbani, Parvin Hadian  
Reza Saghi, Sahar Salehi,  
Fahimeh Noori Kohani, Afsoon Narooie  
Seyed Ahmad Zahirmirdamadi

Designer : Simin Rafipour Langroudi

Editor: Zeinab Zarincheh

Iran, Tehran, Po.Box: 14565-344

[www.IJLK.ir](http://www.IJLK.ir)

Email : [info@ijlk.ir](mailto:info@ijlk.ir)



Iran Nanotechnology  
Laboratory Network

## Contents

## Articles



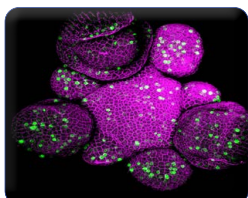
Utilization of Transmission Electron  
Microscopy for development,  
analysis, and failure detection in  
semiconductor industry

>57



Validation of the  
results in the drug  
detection and analysis laboratories;  
Identification of  
cannabinoids by thin layer chromatography

>58



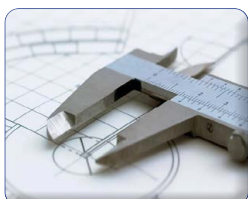
Fluorophores for  
Confocal Microscopy  
(part 2)

>59



Determining the purity of materi-  
als using a differential calorimetry  
device

>60



Determining and evaluating  
sources of uncertainty in the  
Charpy impact test

>61



Uncertainty in the  
sampling process

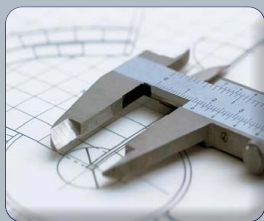
>62



## Utilization of Transmission Electron Microscopy for development, analysis, and failure detection in semiconductor industry



Uncertainty in the sampling process



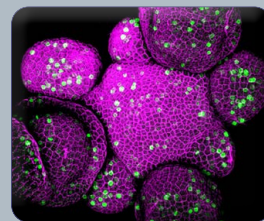
Determining and evaluating sources of uncertainty in the Charpy impact test



Determining the purity of materials using a differential calorimetry device



Determination of modulus of elasticity based on plate load test (PLT) results – case study



Fluorophores for Confocal Microscopy (part 2)