

فصلنامه تخصصی

# دانش آزمایشگاهی ایران

سال سوم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۴ ■ شماره پیاپی ۱۰

روش‌های  
کروماتوگرافی  
برای تخلیص پروتئین‌ها



تعیین وزن مولکولی با دستگاه  
تفرق نور پویا



بررسی انواع پوشش‌های رسانا به‌منظور  
تصویربرداری با میکروسکوپ  
الکترونی روبشی



بررسی مواد در مقیاس نانو با استفاده  
از میکروسکوپ ظرفیتی روبشی

ایجاد بستر نوین خدمات آزمایشگاهی در قالب ارائه اعتبار به محققان و پژوهشگران



ارایه بیش از ۲۶۰ هزار خدمت آزمایشگاهی طی گذشت کم‌تر از یک سال



کتابت الکترونیک

کتابت الکترونیک







# فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران

سال سوم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۴ ■ شماره پیاپی ۱۰

## فهرست مطالب

ایجاد بستر نوین خدمات آزمایشگاهی در قالب ارائه اعتبار به محققان و پژوهشگران

۲ <

ارایه بیش از ۲۶۰ هزار خدمت آزمایشگاهی طی گذشت کم تر از یک سال از شکل گیری شبکه آزمایشگاهی فناوری های راهبردی

۴ <

### STANDARDS

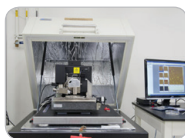
اندازه گیری ضخامت پوشش با روش میکروسکوپ الکترونی روبشی

۶ <



تعیین وزن مولکولی با دستگاه تفرق نور پویا

۷ <



بررسی مواد در مقیاس نانو با استفاده از میکروسکوپ ظرفیتی روبشی

۱۰ <



روش های کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین ها (قسمت دوم)

۱۸ <



بررسی انواع پوشش های رسانا به منظور تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی

۲۵ <

صاحب امتیاز: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

سرمدبیر: رضا اسدی فرد

مدیرمسئول: مجتبی نسب

مدیریت اجرایی: شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

دبیر مقالات: داود قرایلو

همکاران این شماره: روزبه عباسی، فرانک پور نوربخش، محسن نمازی زادگان، فریبا علی، داود قرایلو، ساسان مرادده، مریم خراشادی زاده، صدیقه صادق حسنی، زهرا ثبات امیر فتحی، مریم یوسفی، مهدی محمدی، محمود نادری سمانه غفرانی، مریم علیزاده ذوالبین، معصومه معدنی پور

طراحی و صفحه آرایی: سیمین رفیع پور لنگرودی

ویراستاران: زینب زرینچه، صدیقه صادق حسنی

نشانی: تهران . صندوق پستی ۳۴۴-۱۴۵۶۵

تلفن: ۰۲۱ ۶۳۱۰۳۴۵۱

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

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



شبکه آزمایشگاهی فناوری نانو

## ایجاد بستر نوین خدمات آزمایشگاهی در قالب ارائه اعتبار به محققان و پژوهشگران

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، از فراهم شدن امکان ارائه خدمات آزمایشگاهی از همه آزمایشگاه‌های عضو شبکه در سراسر کشور به پژوهشگران و نخبگان و در قالب تعریف اعتبار و از طریق کد ملی خبر داد.



را در دیگر آزمایشگاه‌های شبکه استفاده کنند، عنوان کرد: «آزمایشگاه‌ها، گزارش خدماتی را که از این طریق به مشتریان ارائه داده‌اند، به شبکه آزمایشگاهی ارسال کرده و معادل نقدی آن را دریافت می‌کنند.»

اسدی فرد، با اشاره به این‌که در بیش‌تر موارد، بخش عمده و حجم عظیمی از منابع مالی پیش‌بینی شده برای یک طرح یا پروژه پژوهشی، از نوع خدمات آزمایشگاهی است، اظهار کرد: «ارائه این تسهیلات در قالب اعتبار خدمات آزمایشگاهی، می‌تواند ضمن کمک به بهره‌مندی از خدمات بهتر و با کیفیت‌تر به مدیریت هزینه‌ها کمک کرده و از طرفی، از پرداخت مستقیم وجه نقد جلوگیری کند.»

وی افزود: «زیرساخت ارائه تسهیلات آزمایشگاهی با کد ملی، امکان خوبی فراهم می‌کند تا همه نهادهایی که به نوعی به فعالان محقق و پژوهشگر، تسهیلات و گرنت ارائه می‌دهند، به جای پرداخت مستقیم وجه نقد برای انجام فعالیت‌های پژوهشی، این تسهیلات یا بخشی از آن را به شکل اعتبار خدمات آزمایشگاهی ارائه کنند.»

اسدی فرد به آمادگی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی برای انعقاد تفاهم‌نامه و همکاری سازنده با ستادهای توسعه فناوری‌های راهبردی و همه نهادهای ارائه دهنده تسهیلات به محققان و پژوهشگران اشاره کرد و افزود: «ستادهای توسعه فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری، صندوق حمایت از پژوهشگران، بنیاد ملی نخبگان، دانشگاه‌های سراسر کشور و تمامی نهادهایی که حمایت از تحقیق و پژوهش را دستور کار خود دارند، می‌توانند با انعقاد

دکتر رضا اسدی فرد مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، از ایجاد بستر جدید ارائه خدمات آزمایشگاهی به نخبگان، محققین و پژوهشگران در قالب اعطای اعتبار خبر داد و گفت: «شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی از طریق این زیرساخت، ضمن تعریف اعتبار برای محققین و پژوهشگران، زمینه‌ای فراهم کرده تا افراد بتوانند با ارائه کد ملی خود به هریک از آزمایشگاه‌های عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، از خدمات و تسهیلات آزمایشگاهی به میزان اعتبارشان بهره‌مند شوند.»

اسدی فرد با بیان این‌که یکی از اهداف معاونت علمی و فناوری از ایجاد شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، فراهم‌سازی زیرساختی مناسب برای بهره‌مندی آسان‌تر و کیفی‌تر متقاضیان خدمات آزمایشگاهی بوده است، افزود: «در حال حاضر زیرساختی نوین در شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی ایجاد شده که یک محقق، پژوهشگر یا صنعتگر، می‌تواند از اعتباری که در شبکه آزمایشگاهی برای وی تعریف می‌شود، با ارائه کارت ملی خود، بهره‌مند شود.»

وی ادامه داد: «با بهره‌گیری از چنین زیرساختی، محققین و پژوهشگران که چنین اعتباری به آن‌ها اختصاص داده می‌شود، می‌توانند با مراجعه به هریک از حدود ۲۰۰ آزمایشگاه عضو شبکه مستقر در بیش از ۲۰ استان کشور، با ارائه کارت ملی، از اعتبار تعریف‌شده برای دریافت خدمات آزمایشگاهی بیش از ۲۰۰۰ دستگاه بهره‌مند شوند.»

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی معاونت علمی، با بیان این‌که افراد می‌توانند باقی مانده اعتبار خود





برای آزمایشگاه‌های عضو شبکه نیز سودمند خواهد بود، چراکه از این طریق، اعتبارهای پژوهشی به سوی آنان سرازیر خواهد شد و بهره‌وری آزمایشگاه افزایش خواهد یافت.»

وی افزود: «این تسهیلات یک سود چند جانبه را به همراه دارد و نهادهایی که با شبکه تفاهم‌نامه انعقاد می‌کنند مثل ستادهای توسعه فناوری و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور، به جای پرداخت مستقیم وجه نقد، تسهیلات را در قالب اعتبار اعطا می‌کنند که از این طریق ضمن این که اعتبار به میزان واقعی هزینه خواهد شد و حتی ممکن است بخشی از آن باقی بماند، هزینه این اعتبار با تأخیر پرداخت می‌شود که به سود نهادها خواهد بود.»

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی معاونت علمی و فناوری، در پایان ضمن اشاره به آمادگی کامل این شبکه برای همکاری با نهادهای ارائه‌کننده تسهیلات به محققان و پژوهشگران یادآور شد: «نخستین تفاهم‌نامه شبکه آزمایشگاهی در این طرح، به ارزش یک و نیم میلیارد تومان با برنامه «دستیابی به مرجعیت علمی» که از سوی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری دنبال می‌شود، منعقد شده و افراد برتر و عضو باشگاه مرجعیت علمی، می‌توانند به میزان اعتباری که شبکه آزمایشگاهی به آن‌ها اختصاص می‌دهد، با ارائه کارت ملی، از همه آزمایشگاه‌های عضو شبکه، خدمات آزمایشگاهی دریافت کنند.»

تفاهم‌نامه با شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، فهرستی از افراد منتخب مشمول این تسهیلات شامل نخبگان، محققین، پژوهشگران و یا صنعتگران را به شبکه آزمایشگاهی ارائه کنند تا پس از تخصیص اعتبار، این افراد از طریق کد ملی خود از خدمات آزمایشگاه‌های عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی بهره‌مند شوند.»

وی ادامه داد: «شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، مجموعه خدمات ارائه شده به متقاضیان معرفی شده از سوی هر نهاد دارای توافق‌نامه را، در دوره‌های زمانی معین، به آنان گزارش خواهد کرد و پس از دریافت منابع مالی گزارش شده، این منابع را میان آزمایشگاه‌های ارائه دهنده خدمت توزیع می‌کند.»

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی معاونت علمی، با اشاره به الزام رعایت مقررات و بندهای یادشده در دستورالعمل‌های شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی توسط آزمایشگاه‌های عضو، اضافه کرد: «فعال بودن دستگاه‌های آزمایشگاه، ارائه خدمات به میزان ساعات معین (حداقل ۴۰ ساعت در هفته) معادل حداقل ۵ روز در هفته و هر روز ۸ ساعت، مشتری‌مداری، حفظ و امانت‌داری نمونه‌ها و مهم‌تر از همه تعامل خوب با مشتریان و دیگر آزمایشگاه‌ها از عمده‌ترین این اصول و الزامات عضویت آزمایشگاه‌ها در شبکه است.»

اسدی‌فرد با بیان این که اعتبار خدمات آزمایشگاهی، روند دریافت خدمات را به طور چشمگیری برای دریافت‌کنندگان خدمات آسان خواهد کرد و افراد صرفاً با ارائه کد ملی خود می‌توانند از اعتبار خود استفاده کنند افزود: «این زیرساخت

# ارایه بیش از ۲۶۰ هزار خدمت آزمایشگاهی طی گذشت کم‌تر از یک سال از شکل‌گیری شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی



مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، با اشاره به معرفی ۱۰ آزمایشگاه برتر ارائه‌کننده خدمات آزمایشگاهی که عضو قطعی این شبکه هستند، از ارائه بیش از ۲۶۰ هزار خدمت آزمایشگاهی طی گذشت کم‌تر از یک سال از شکل‌گیری این شبکه آزمایشگاهی خبر داد.

راهبردی، با ارزیابی آزمایشگاه‌های عضو، ضمن استخراج، پایش و بررسی وضعیت تک تک آزمایشگاه‌ها به یک رتبه‌بندی نهایی می‌رسد، رقم تبادل مالی و خدمات ارائه شده را قابل توجه دانست و افزود: «از مجموع بیش از ۲۶۰ هزار خدمت ارائه شده توسط آزمایشگاه‌های شبکه، حدود ۱۱۶ میلیارد ریال گردش مالی و به همین میزان درآمد برای آزمایشگاه‌ها حاصل شده است.»

## حضور قابل قبول بخش خصوصی در جمع آزمایشگاه‌های برتر

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، بر ضرورت حضور بخش خصوصی در ارائه خدمات آزمایشگاهی تأکید کرد و گفت: «شرکت‌های خصوصی فقط ۱۰ درصد از مجموع اعضای قطعی شبکه را شامل می‌شوند، اما خوشبختانه موفق شده‌اند سهم یک‌سوم از جمع آزمایشگاه‌های برتر و به تبع آن، عدد قابل توجهی از خدمات ارائه شده شبکه را به خودشان اختصاص دهند.»

اسدی‌فرد نقش‌آفرینی آزمایشگاه‌های خصوصی را با توجه به میزان حضور این آزمایشگاه‌ها در شبکه درخور توجه دانست و گفت: «علیرغم این که ۱۰ درصد از اعضای قطعی شبکه، آزمایشگاه‌های خصوصی هستند، اما حضور ۳ آزمایشگاه خصوصی در میان ۱۰ رتبه برتر ارزیابی، مشارکت قابل قبول بخش خصوصی در ارائه خدمات به مشتریان را به میزان ۳۰ درصدی نشان می‌دهد.» وی با اشاره به تنوع آزمایشگاه‌های دولتی و خصوصی حاضر در میان ۱۰ رتبه برتر ارزیابی گفت: «بر اساس این ارزیابی در میان ۱۰ رتبه برتر آزمایشگاه‌های عضو ارائه‌دهنده خدمات آزمایشگاهی، سه آزمایشگاه خصوصی، سه آزمایشگاه وابسته به وزارت علوم و

به گزارش مرکز روابط عمومی و اطلاع‌رسانی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری، دکتر رضا اسدی‌فرد مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، با اشاره به ارزیابی آزمایشگاه‌های عضو این شبکه به‌عنوان یکی از فعالیت‌های شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی معاونت علمی در راستای ترغیب آزمایشگاه‌ها به ارائه خدمات کیفی‌تر به محققان و پژوهشگران، بهبود کیفیت خدمات و توانمندی‌های آزمایشگاه‌ها از طریق کمک به عملکرد آزمایشگاه‌های فعال عضو شبکه، عنوان کرد: «با توجه به این که سال گذشته، نخستین سال فعالیت شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی معاونت علمی بود، نخستین دوره ارزیابی آزمایشگاه‌های عضو شبکه از آغاز فعالیت شبکه تاکنون، صورت گرفت و ۱۰ آزمایشگاه برتر این شبکه، بر اساس معیارها و شاخص‌های ارزیابی این شبکه مشخص شدند.»

## ارائه بیش از ۲۶۰ هزار خدمت آزمایشگاهی

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، با بیان این که صرفاً ۵۴ عضو شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی که عضویت آن‌ها قطعی شده، مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند افزود: «این ۵۴ عضو قطعی از میان ۱۰۸ عضو شبکه، در مجموع در طی هشت ماه منتهی به پایان سال ۹۳ موفق شده‌اند بیش از ۲۶۰ هزار خدمت گوناگون آزمایشگاهی به بیش از ۲۵۰۰۰ مشتری خود که طیف گسترده‌ای از شرکت‌های دانش‌بنیان، صاحبان صنایع، دانشگاهیان، محققان و پژوهشگران و... را شامل می‌شود، ارائه کنند.» اسدی‌فرد با اشاره به این که شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های

بهربرداری صحیح وجود دارد و در مرحله بعدی، با بررسی شایستگی آزمایشگاه برای در اختیار داشتن آن دستگاه و بر اساس اولویت، حمایت خود را صورت می‌دهد.»

### ایجاد زمینه حمایت از آزمایشگاه‌های خصوصی دانش‌بنیان

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی با اشاره به حضور شرکت‌های خصوصی ارائه‌کننده خدمات آزمایشگاهی در فهرست شرکت‌های دانش بنیان، گفت: «اخیراً با موافقت کارگروه ارزیابی و تشخیص صلاحیت شرکت‌های دانش‌بنیان معاونت علمی و فناوری، آزمایشگاه‌های خصوصی نیز در جمع شرکت‌های دانش‌بنیان پذیرفته می‌شوند و می‌توانند از تسهیلات قانون حمایت از شرکت‌های دانش‌بنیان بهره‌مند شوند.»

وی با اشاره به این‌که آزمایشگاه‌های عضو شبکه با پیوستن به جمع آزمایشگاه‌های دانش بنیان، می‌توانند علاوه بر حمایت‌هایی که شبکه آزمایشگاهی به این آزمایشگاه‌ها ارائه می‌کند، از تسهیلات قانون حمایت از شرکت‌های دانش بنیان از جمله معافیت‌های گمرکی، تسهیلات وام و حمایت‌های صندوق نوآوری و شکوفایی بهره‌مند شوند افزود: «علاوه بر این موارد، خود شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، برای رتبه‌های برتر شرکت‌های خصوصی تسهیلات قرض‌الحسنه خوبی پیش‌بینی کرده که در راستای افزایش توانمندی‌های خودشان مورد استفاده قرار دهند. این امر باعث ترغیب بخش خصوصی برای سرمایه‌گذاری بیش‌تر در حوزه‌های مورد نیاز کشور خواهد شد.»

### تعامل بهتر آزمایشگاهیان در بستر شبکه اجتماعی کارشناسان و متخصصان

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، ایجاد شبکه مجازی کارشناسان و متخصصان آزمایشگاهی را یکی از خدمات اثرگذار شبکه در راستای بهتر معرفی شدن ظرفیت‌ها و توانمندی‌های آزمایشگاهی و تخصصی کشور دانست و گفت: «علاوه بر این که مشتریان از طریق پایگاه داده کامل شبکه آزمایشگاهی به طیف گسترده‌ای از خدمات دسترسی دارند، اخیراً شبکه‌ای اجتماعی در فضای مجازی ایجاد شده تا کارشناسان و متخصصان آزمایشگاه‌های عضو شبکه، از این طریق بتوانند تجربیات و دستاوردهای خود را در حوزه آزمایشگاهی از طریق کارگروه‌های تخصصی ایجاد شده به هم منتقل کنند.»

وی در پایان به عضویت بیش از ۳۰۰ نفر از فعالان آزمایشگاهی و استفاده آنان از این شبکه مجازی اشاره کرد و گفت: «هشت کارگروه تخصصی در این شبکه مجازی بر مبنای نوع تجهیزات، ایجاد شده و بیش از ۸۰ درصد از کارشناسان و متخصصین آزمایشگاهی در این شبکه مجازی حضور دارند که به مرور، بر تعداد اعضای این شبکه مجازی تخصصی افزوده خواهد شد.»

آزمایشگاه‌هایی از وزارت نفت، وزارت صنعت، معدن و تجارت، وزارت جهاد کشاورزی و جهاد دانشگاهی قرار دارند.»

وی ادامه داد: «علاوه بر رتبه‌بندی و ارزیابی، یک کارنامه عملکرد برای آزمایشگاه‌ها ارائه خواهد شد، تا با بررسی عملکرد خود، به اصلاح نقاط ضعف و تقویت و بهبود عملکرد خود در آینده بپردازند.»

### مشتری مداری، عملکرد و همکاری سازنده، شاخص‌های رتبه‌بندی آزمایشگاه‌ها

اسدی‌فرد، به شاخصه‌های اصلی شبکه برای ارزیابی عملکرد آزمایشگاه‌ها اشاره کرد و گفت: «کارکرد آزمایشگاه که براساس گزارش‌های عملکرد ارائه شده توسط آزمایشگاه بررسی می‌شود و نشان می‌دهد این آزمایشگاه، تا چه میزان از تجهیزات و ظرفیت‌های انسانی خودش برای ارائه خدمات بهره برده است. مشتری‌مداری دومین شاخصه ارزیابی آزمایشگاه‌ها است، که با توجه به ارتباط و نظرسنجی از مشتریان آزمایشگاه‌ها، در قالب شش شاخص ارزیابی می‌شود و سومین معیار برای ارزیابی آزمایشگاه‌ها، میزان همکاری و تعاملات شبکه‌ای است، بدین معنا که یک آزمایشگاه تا چه میزان در همکاری با دیگر آزمایشگاه‌ها و مراکز پژوهشی برای پیاده‌سازی سیاست‌های شبکه آزمایشگاهی موفق بوده است.»

### نقش شبکه آزمایشگاهی در استفاده بهینه تجهیزات کشور و جلوگیری از خریدهای موازی

مدیر شبکه آزمایشگاهی فناوری‌های راهبردی، با اشاره به نقش اثرگذار شبکه آزمایشگاهی در بهبود کیفیت خدمات آزمایشگاهی به مشتریان از طریق شناسایی ظرفیت‌های ملی گفت: «این شبکه آزمایشگاهی، با در نظر گرفتن شاخص‌های مختلف ارزیابی آزمایشگاه‌ها، طیف گوناگونی از تسهیلات و حمایت‌ها را برای آزمایشگاه‌های فعال و برتر در نظر گرفته و با لحاظ کردن این تسهیلات به آزمایشگاه‌ها، ضمن ترغیب آنان به بهبود کیفیت خدمات، باز بودن درب آزمایشگاه‌ها به روی مراجعین و مشتریان، صرفه‌جویی در هزینه خرید تجهیزات و جلوگیری از ایجاد آزمایشگاه‌های موازی، زمینه‌ای مناسب برای ارائه خدمات گسترده و یکپارچه به کل کشور فراهم می‌کند.»

اسدی‌فرد با اشاره به این که شبکه آزمایشگاهی با نیازسنجی ملی و بر اساس نیاز متقاضیان منطقه‌ای به جلوگیری از خریدهای موازی و تهیه تجهیزات ضروری کمک می‌کند، گفت: «این شبکه با بهره‌گیری از بانک داده کاملی که از تجهیزات و توانمندی‌های آزمایشگاهی کشور در اختیار دارد، حمایت از خرید هر دستگاهی را تأیید نمی‌کند و علاوه بر سنجش شرایط آزمایشگاه که یکی از آن‌ها قرار داشتن آزمایشگاه جزو ۲۰ آزمایشگاه برتر عضو شبکه است، از خرید تجهیزات آزمایشگاهی ضروری کشور حمایت می‌کند.»

وی افزود: «شبکه آزمایشگاهی بررسی می‌کند که از آن دستگاه در سطح ملی وجود دارد یا خیر و چه میزان ظرفیت





## تست غیر مخرب-پراش پرتو ایکس از مواد چندبلوری و بی شکل

### نویسندگان

روزبه عباسی<sup>۱</sup>، فرانک پور نوربخش<sup>۲</sup>

محسن نمازی زادگان<sup>۳</sup>، فریبا علی<sup>۴</sup>

[f.ali.ars@gmail.com](mailto:f.ali.ars@gmail.com)

۱. دانشگاه تهران، دانشکده متالورژی

۲. سازمان زمین شناسی و اکتشافات معدنی کشور

۳. دانشگاه تحصیلات تکمیلی کرمان

۴. دانشگاه صنعتی امیرکبیر

۵. عضو کارگروه تخصصی دستگاه‌های اشعه ایکس شبکه آزمایشگاهی

به حداکثر فواصل صفحه‌ای قابل حصول، به نوع آنالیز و نمونه آزمون بستگی دارد. و به تفصیل فرآیندهای سودمند در پردازش و تحلیل داده‌های خام (کاهش پارامترهای غیر ضروری) چون کسر کردن پس زمینه، جستجوی پیک و تطابق پروفایل الگوی پراش در حوزه‌های مختلف کاربری آمده است.

در پیوست‌های این استاندارد نیز، مواردی چون فرم گزارش نتایج، روابط مراحل مختلف فرآیند جمع آوری داده‌ها، توابع تحلیلی متداول تطابق پروفایل و چندین روش سازگاری و ارزیابی کیفیت داده‌ها خلاصه و مستند شده است.

پراش پودری اشعه ایکس (XRPD) یک روش آزمون قدرتمند غیر مخرب (NDT) برای تعیین محدوده ای از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مواد محسوب می‌شود. این ویژگی‌ها شامل نوع و مقدار فازهای موجود، سلول واحد، ساختار و بافت بلورشناسی، میکروتنش، اندازه بلور و تابع توزیع شعاعی الکترونی هستند این استاندارد اروپایی، دستورالعمل‌های پایه مورد استفاده در روش XRPD با محوریت قراردادان دستگاه‌های پراش سنج اشعه ایکس با هندسه براگ-برانتو در شناسایی فاز را ارائه می‌کند اگر چه برای طیف وسیعی از پراش‌سنج‌ها قابل استفاده است، اما یک استاندارد تفضیلی یا خاص برای هر حوزه از کاربرد یا نوع تحلیل نمی‌باشد.

با در نظر گرفتن این واقعیت که آماده‌سازی نمونه در تحلیل، تعیین اعتبار و کیفیت داده‌های جمع‌آوری شده نقش به‌سزایی دارد، بخش قابل توجهی از این استاندارد به روش‌های صحیح آماده‌سازی نمونه پودری و قطعه (از جمله آسیاب و الک کردن نمونه‌های پودری چند فاز و تک فاز، آماده‌سازی سطح، قرارگیری نمونه و غیره) و همچنین به خطاهای رایج در روش‌ها آماده‌سازی نمونه اختصاص می‌یابد.

به علاوه، بیان می‌شود که چگونه تعیین محدوده زاویه‌ای پراش و روش جمع‌آوری داده‌ها جهت دستیابی

## نویسندگان

داود قرایلو<sup>۱\*</sup>ساسان مرادده<sup>۲</sup>

Davoud.gharailou@gmail.com



## تعیین وزن مولکولی

## با دستگاه

## تفرق نور پویا

## واژه‌های کلیدی

DLS، تفرق نور پویا، وزن مولکولی.

## چکیده

دستگاه تفرق نور پویا<sup>۳</sup> ابزاری ساده و سریع برای تعیین وزن مولکولی است. این دستگاه می‌تواند از روی شعاع هیدرودینامیکی نمونه‌های مختلف، وزن مولکول را مشخص کند. در این دستگاه، با استفاده از پراش ایستایی نور و همچنین به کارگیری نمونه‌های آماده‌سازی شده در غلظت‌های مختلف، فرآیند تعیین وزن مولکولی انجام می‌شود. در این دستگاه یک محاسبه‌گر دمای تک زاویه‌ای نیز وجود دارد که به کمک آن می‌توان اثرات زاویه‌ای را با استفاده از محاسبات ریاضی انجام داد. تعیین وزن مولکولی با کیووت (سل مخصوص انجام آزمایش) شیشه‌ای و کوآرتزی قابل انجام است و غالباً از تولون به‌عنوان نمونه استاندارد استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که کیووت‌های پلی‌استایرن نمی‌تواند مقاومت بالایی در برابر تولون داشته باشد.

## مقدمه

DLS، دستگاه تفرق نور پویا دستگاهی است که در آن با استفاده از تابش نور لیزر به یک نمونه سوسپانسیون، برخی از خواص آن اندازه‌گیری می‌شود. برای مثال، به کمک این دستگاه می‌توان توزیع اندازه ذرات در ابعاد نانو، پتانسیل زتا و وزن مولکولی را به‌دست آورد. همچنین توزیع اندازه ذرات نیز در ابعاد نانو با دستگاه DLS قابل اندازه‌گیری است. این دستگاه، کاربردهای زیادی در صنایع مختلف دارد که از جمله آنها می‌توان به صنعت رنگ، داروسازی، پتروشیمی و موادغذایی اشاره نمود. همان‌طور که گفته شد یکی از کاربردهای دستگاه DLS تعیین وزن مولکولی است. در این مقاله، چگونگی محاسبه وزن مولکولی با این دستگاه مورد بررسی قرار گرفته است.

دماها و طول موج‌های مختلف باشد. با داشتن نسبت ریلی نمونه استاندارد و با استفاده از رابطه زیر می‌توان ضریب ریلی نانوذرات مورد آزمایش را به دست آورد:

$$R_{\theta} = \frac{I_A n_0^2}{I_T n_T^2} R_T \quad \text{معادله (۳):}$$

که در آن:

$I_A$ : شدت پراکندگی نور باقیمانده است که با استفاده از رابطه زیر حاصل می‌شود:

{(شدت پراکندگی نور دیسپرسانت = سیال) - (شدت پراکندگی نور نمونه) = (شدت پراکندگی نور باقیمانده)}

$I_T$ : شدت پراکندگی نور در تولوئن

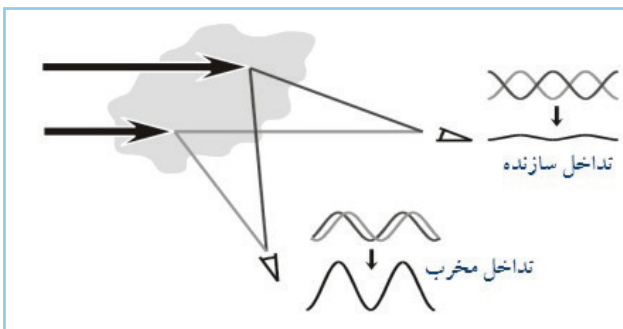
$\eta_0$ : ضریب شکست دیسپرسانت

$\eta_T$ : ضریب شکست تولوئن

$R_T$ : ضریب ریلی تولوئن است.

### وابستگی زاویه‌ای شدت پراکندگی ریلی ( $P_{\theta}$ )

اگر شدت پراکندگی نور یک ذره از دو زاویه مختلف به وسیله شناساگر اندازه‌گیری شود، جواب به دست آمده برای اندازه شدت پراکندگی این ذره در دو زاویه متفاوت، دو اندازه مختلف است. در واقع، اندازه شدت پراکندگی نور به زاویه‌ای که شناساگر با امتداد تابش نور دارد، وابسته است. همان‌طور که در شکل (۱) نیز دیده می‌شود، شدت پراکندگی فوتون‌های متفرق شده ذره‌ای در نمونه آزمایشی با دو زاویه مشخص به وسیله شناساگر ثبت شده‌است. با توجه به شکل، می‌توان به این مطلب پی برد که اندازه شدت پراکندگی این ذره از دو زاویه مختلف با هم تفاوت دارد. از یک زاویه، شدت تفرق فوتون‌های برخورد کننده با ذره باهم جمع می‌شوند و از زاویه دیگر، باعث خنثی شدن یکدیگر شده‌اند. به این پدیده که موجب تغییر در شدت پراکندگی نور فوتون‌های متفرق شده از نمونه آزمایشی در زوایای مختلف می‌شود، پراکندگی می<sup>۷</sup> گفته می‌شود و زمانی اتفاق می‌افتد که اندازه ذرات به قدری بزرگ باشند که فوتون‌های متعددی با این ذره برخورد کنند.



شکل ۱: نمایی از محل قرارگیری شناساگر در دو زاویه مختلف

با توجه به توضیحات داده شده می‌توان نتیجه گرفت، در صورتی که ذرات موجود در سوسپانسیون خیلی کوچک باشند، وابستگی زاویه‌ای شدت پراکندگی نور نزدیک به عدد یک است و می‌توان از آن در معادله ریلی صرف نظر کرد. برای نمونه‌هایی با اندازه ذرات کوچک،

### تئوری پراکندگی ثابت شدت نور

در ابتدا به این موضوع پرداخته می‌شود که این دستگاه از چه روشی برای رسیدن به وزن مولکولی استفاده می‌کند؟ دستگاه DLS برای تعیین وزن مولکولی نمونه آزمایشی، از روشی به نام پراکندگی ثابت شدت نور استفاده می‌کند. نور مرئی از منبع تابش به نمونه آزمایشی که نانوذرات معلق موجود در سوسپانسیون هستند، برخورد می‌کند و بعد از برخورد، از سطح ذره متفرق می‌شود. به دلیل وجود حرکت براونی در نانوذرات معلق در سوسپانسیون و جابجایی آنها به‌طور پیوسته، میزان پراکندگی ثابت شدت نور که به وسیله شناساگرهای دستگاه ثبت می‌شود، در هر زمان متغیر است. شدت پراکندگی متغیر نور، همان عاملی است که این دستگاه با استفاده از آن می‌تواند توزیع اندازه نانوذرات سوسپانسیون مورد آزمایش را اندازه‌گیری کند. به میانگین شدت پراکندگی متغیر نور در یک بازه زمانی (مثلاً ۱۰ تا ۳۰ ثانیه‌ای)، شدت پراکندگی ثابت نور گفته می‌شود که برای تعیین وزن مولکولی و ضریب ویربال در دستگاه DLS مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از پراکندگی ثابت شدت نور در غلظت‌های مختلف سوسپانسیون حاوی نانوذرات مورد آزمایش، می‌توان وزن مولکولی نانوذرات را با استفاده از معادله ریلی (۱) محاسبه نمود:

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left( \frac{1}{M} + 2A_2C \right) P(\theta) \quad \text{معادله (۱):}$$

که در آن:

$R_{\theta}$ : نسبت ریلی<sup>۴</sup> (نسبت نور پراکنده شده به نور ساطع شده)<sup>۵</sup>

$M$ : وزن مولکولی نانوذرات

$A_2$ : ضریب دوم ویربال<sup>۶</sup>

$C$ : غلظت

$P_{\theta}$ : وابستگی شدت پراکندگی نور متفرق شده از نمونه آزمایشی به زاویه تابش فوتون  
 $K$ : ثابت اپتیکی است که ثابت اپتیکی تابعی تعریف شده به صورت زیر دارد:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left( n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \text{معادله (۲):}$$

که در آن:

$N_A$ : ثابت آووگادرو

$\lambda_0$ : طول موج نور متفرق شده

$\eta_0$ : ضریب شکست سیال (دیسپرسانت)

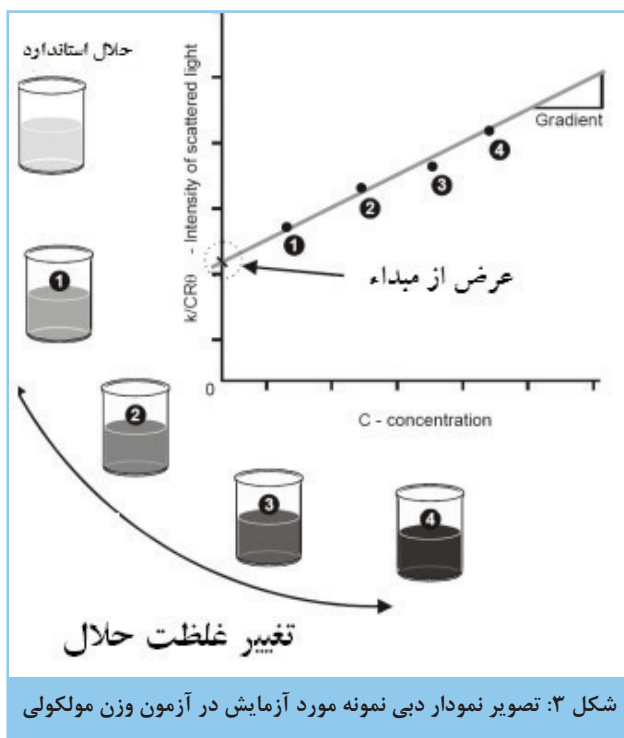
$dn/dc$ : تغییرات ضریب شکست به تغییرات غلظت است.

برای محاسبه وزن مولکولی با دستگاه DLS باید عوامل معادله ریلی را به دست آورد تا با قرار دادن در معادله، وزن مولکولی که مجهول معادله است، تعیین شود.

### نسبت ریلی ( $R_{\theta}$ )

برای تعیین نسبت ریلی نمونه آزمایشی، نمونه استاندارد مورد نیاز است. معمولاً از تولوئن به‌عنوان نمونه استاندارد استفاده می‌شود که دلیل آن می‌تواند تغییر ناچیز نسبت ریلی تولوئن در





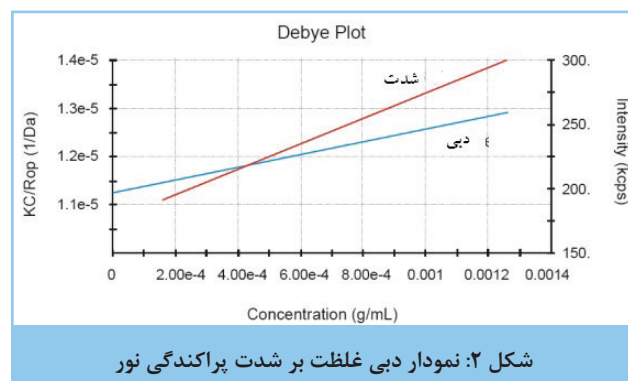
شکل ۳: تصویر نمودار دبی نمونه مورد آزمایش در آزمون وزن مولکولی

معادله ریلی به صورت زیر ساده می‌شود؛ در واقع شدت پراکندگی تقریبی جایگزین شدت پراکندگی ریلی شده‌است.

$$R_{\theta} = \frac{I_A n_o^2}{I_T n_T^2} R_T \quad \text{معادله (۴)}$$

## نمودار دبی<sup>۸</sup> و روش کار دستگاه DLS برای اندازه‌گیری وزن مولکولی

شدت پراکندگی نور متفرق شده از نمونه آزمایشی، با وزن مولکولی نمونه و غلظت سوسپانسیون نمونه آزمایشی متناسب است. در دستگاه DLS برای به‌دست آوردن وزن مولکولی، شدت پراکندگی نور متفرق شده از نمونه آزمایشی در یک زاویه و غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری می‌شود. سپس تغییرات شدت پراکندگی نور در غلظت‌های مختلف با شدت پراکندگی نور متفرق شده از یک نمونه استاندارد مثل تولوئن مقایسه می‌شود. با توجه به نتایج و نموداری که از این مقایسه به‌دست می‌آید، می‌توان وزن مولکولی نمونه آزمایشی را تعیین نمود. نمودار حاصل از این مقایسه را نمودار دبی می‌نامند که در شکل (۲) آورده شده‌است.



شکل ۲: نمودار دبی غلظت بر شدت پراکندگی نور

## روش کار دستگاه (DLS)

برای به‌دست آوردن وزن مولکولی با دستگاه DLS، نیاز به تهیه (۴) سوسپانسیون با غلظت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۳، و ۰/۰۰۴ برحسب گرم بر میلی‌لیتر از نمونه آزمایشی است. البته می‌توان برای افزایش اطمینان از نتیجه به‌دست آمده، سوسپانسیون‌هایی با غلظت‌های بالاتر تهیه نمود. شکل (۳) نشان می‌دهد که چگونه وزن مولکولی از روی نمودار دبی به‌دست می‌آید.

همان‌طور که در شکل (۳) نیز مشاهده می‌شود، غلظت سوسپانسیون با شدت پراکندگی نور رابطه مستقیم دارد و با افزایش غلظت شدت پراکندگی نور در نمونه آزمایشی نیز زیاد می‌شود. چنانچه شدت پراکندگی نور تنها از یک زاویه ثبت شود، نمودار (KC/Rθ) نسبت به غلظت باید به صورت خطی باشد. با داشتن اندازه شدت پراکندگی نور در غلظت صفر، که به کمک نمودار دبی قابل محاسبه است و نقطه تلاقی نمودار دبی با محور y، و همچنین استفاده از معادله ریلی، می‌توان وزن مولکولی نمونه آزمایشی را محاسبه کرد. در ضمن، ضریب ویرال نیز از روی شیب نمودار دبی به‌دست می‌آید.

برای اندازه‌گیری وزن مولکولی نمونه با استفاده از دستگاه DLS، باید چند نمونه با غلظت‌های مختلف را تهیه نموده و به همراه یک نمونه استاندارد در دستگاه DLS آزمون گرفت. در این دستگاه با استفاده از معادله ریلی، وزن مولکولی و ضریب دوم ویرال محاسبه می‌شود.

## نتیجه‌گیری

## پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد فناوری‌نانو، آزمایشگاه فناوری‌نانوکفا
۲. کارشناس ارشد مهندسی مواد، آزمایشگاه فناوری‌نانوکفا

3. Dynamic light scattering (DLS)
4. Rayleigh ratio
5. incident light
6. Virial Coefficient
7. Mie
8. Debye

## مراجع

- [1] Zetasizer nano application note mak528-01.
- [2] Zetasizer nano user manual man0317 issue3.1 July 2007.
- [3] Hiemenz, Paul, C "light scattering by polymer solutions" in polymer chemistry: the basic concepts, chpt 10; pub: Marcel Decker inc, New York; 1984, 659.
- [4] Mattison, K; Kaszuba, M. measuring absolute protein molecular weight: is multi-angle instrumentation absolutely essential? American biotechnology laboratory 2003; 21(7), 28

## نویسندگان

مریم خراشادی زاده<sup>۱\*</sup>صدیقه صادق حسینی<sup>۲</sup>زهرا ثبات<sup>۲</sup>امیر فتحی<sup>۲</sup>

M\_khorashad\_ph@yahoo.com

# بررسی مواد در مقیاس نانو با استفاده از میکروسکوپ ظرفیتی روبشی

## چکیده

میکروسکوپ ظرفیتی روبشی<sup>۶</sup>، یکی از انواع میکروسکوپ‌های پروبی روبشی است که در آن یک پروب الکترونی نازک، سطح نمونه را روبش می‌کند. در این روش با استفاده از اطلاعاتی که از تغییر ظرفیت الکترواستاتیک بین سطح و پروب حاصل می‌شود، سطح نمونه مورد بررسی و شناسایی قرار می‌گیرد.

میکروسکوپی ظرفیتی روبشی، روشی غیرمخرب است که برای شناسایی و بررسی نمونه‌های نیمه‌هادی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از کاربردهای تجاری میکروسکوپ ظرفیتی روبشی، تصویربرداری از ناخالصی‌ها در قطعات نیمه‌هادی است. این میکروسکوپ می‌تواند برای اندازه‌گیری چگالی حامل‌های بار با دقتی در مقیاس نانومتر نیز استفاده شود. توانایی این روش در تصویربرداری از توزیع بار با توان تفکیک و حساسیت بسیار بالا سبب شده‌است که به‌عنوان روشی با ارزش برای شناسایی نانومواد محسوب شود.

## واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ روبشی ظرفیتی، نیمه‌هادی، غیرمخرب و ظرفیت الکترواستاتیک.

## مقدمه

تعیین مشخصات فیزیکی یک قطعه نیمه‌هادی همواره یک موضوع چالش برانگیز برای مهندسیین و محققین بوده است. تاکنون روش‌های استاندارد تعیین مشخصات نیمه‌هادی‌ها، شامل میکروسکوپی الکترونی روبشی<sup>۷</sup>، میکروسکوپی الکترونی عبوری<sup>۸</sup>، طیف‌سنجی جرمی یون ثانویه<sup>۹</sup>، ترسیم نمودار مقاومتی صفحه گسترده<sup>۱۰</sup> و ترسیم نمودار یک بعدی ظرفیت - ولتاژ (C-V)، ابزارهای مؤثری برای بررسی دو بعدی این قطعات بوده‌اند. ظهور قطعاتی با ابعاد کوچک‌تر و ضرورت دستیابی به قابلیت اطمینان در اندازه‌گیری‌ها، باعث شده‌است ابزارهای شناسایی جدیدی برای تشخیص، مورد نیاز قرار گیرند. از جمله این ابزارها، انواع مختلف میکروسکوپ‌های پروبی روبشی<sup>۱۱</sup> هستند که نه تنها توانایی شناسایی و بررسی نیمه‌هادی‌ها را دارند، بلکه می‌توانند فرآیند عملکرد آنها را نیز مورد پایش قرار دهند. ترکیب روش میکروسکوپی ظرفیتی روبشی با میکروسکوپی نیروی اتمی<sup>۱۲</sup> به‌دلیل غیرمخرب بودن و توان تفکیک فضایی بالا، یکی از روش‌های توانمند برای شناسایی و بررسی قطعات نیمه‌هادی

است. میکروسکوپ ظرفیتی روبشی می‌تواند تغییرات فضایی ظرفیت را تصویربرداری کند. یکی از رایج‌ترین کاربردهای این روش، تهیه نقشه تراکم بار در نمونه‌های نیمه‌هادی با آلاینده‌گی غیریکنواخت است که مرحله کلیدی در فرآیند ساخت نسل جدید ابزارهای میکرو و نانوالکترونیکی به‌شمار می‌رود. با استفاده از روش SCM، تعیین مشخصات آلاینده‌ها در نیمه‌هادی‌های یون کاشته<sup>۱۳</sup>، شناسایی خواص الکتریکی نیمه‌هادی‌های فلز-اکسید<sup>۱۴</sup> و تهیه نقشه توزیع نقص‌ها با موفقیت قابل دستیابی است. همچنین می‌توان از SCM برای بررسی حافظه‌های غیرفرار با تراکم فوق‌العاده بالا استفاده نمود [۳-۱]. در میکروسکوپ ظرفیتی روبشی از یک پروب رسانای بسیار تیز (اغلب پروب سیلیکونی اسیدشویی شده با روکش پلاتین - ایریدیوم یا کبالت - کروم) استفاده می‌شود. وقتی پروب به سطح نزدیک می‌شود، در مجاورت سطح، ولتاژ بایاس (AC) اعمال می‌شود تا اختلاف ظرفیتی را در نمونه ایجاد کرده و با استفاده از یک حسگر ظرفیتی، فرکانس تشدید را در مقیاس (GHz) شناسایی کند. سپس در حالی که ارتفاع سوزن به وسیله سیستم بازخورد نیروی تماسی کنترل می‌شود، سوزن، سطح نمونه نیمه‌هادی را در دو بعد روبش می‌کند.

اعمال ولتاژ بایاس متناوب به پروبی که دارای پوشش فلزی است باعث می‌شود که بار به‌صورت متناوب در لایه‌های سطحی نیمه‌هادی انباشته و خالی شده و از این طریق ظرفیت سوزن - نمونه تغییر کند. میزان بزرگی تغییر ظرفیت با اعمال ولتاژ، اطلاعاتی را در مورد تراکم بارها فراهم می‌کند (داده‌های دامنه در SCM)، در حالی که اختلاف فاز بین تغییر ظرفیت و ولتاژ اعمالی (داده‌های فاز در SCM)، اطلاعات حامل‌های بایاس را در خصوص علامت حامل‌های بار به‌صورت متناوب تغییر می‌دهد [۱].

### اصول کار میکروسکوپ ظرفیتی روبشی

میکروسکوپی ظرفیتی روبشی در واقع نوعی میکروسکوپی نیروی الکترواستاتیک<sup>۱۵</sup> است که در آن تیرک به‌صورت مستقیم تحت اعمال ولتاژ بایاس قرار می‌گیرد. این ولتاژ به‌صورت زیر تعریف می‌شود:

$$V_{tip} = V_{dc} + V_{ac} \sin(\omega t) \quad (1)$$

که در آن  $(V_{ac})$  ولتاژ محرک است. نیروی ظرفیتی  $F_{cap}(z)$  بین سوزن و سطح نمونه در پتانسیل  $(V_s)$  به‌صورت زیر تعریف می‌شود:

$$F_{cap}(z) = (1/2) (V_{tip} - V_s)^2 (dC/dz) \quad (2)$$

که در آن  $C(z)$  ظرفیت سوزن - نمونه است که به ساختار هندسی سوزن، توپوگرافی سطح و میزان جدایی سوزن - سطح  $(z)$  وابسته است.

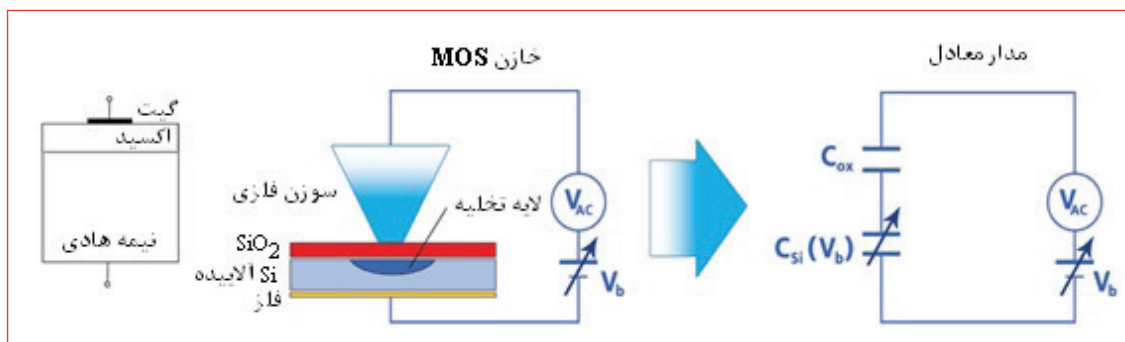
دومین هارمونی نیروی ظرفیت به  $(dC/dz)$  و  $(V_{ac})$  وابسته است:

$$F_{cap2w}(z) = (1/2)(dC/dz)V_{ac}^2 \sin(2\omega t) \quad (3)$$

از این معادله، می‌توان برای به‌دست آوردن اطلاعات اضافی مانند توزیع ظرفیت سطحی روی نمونه استفاده نمود. برای به حداکثر رساندن نوسانات هارمونی دوم، فرکانس ولتاژ (AC)  $(\omega)$  باید برابر نصف فرکانس تشدید تیرک تنظیم شود [۴].

میکروسکوپ SCM شامل یک سوزن پروب فلزی رسانا و یک حسگر ظرفیتی فوق‌العاده حساس به‌همراه اجزای AFM معمولی است. در SCM همانند EFM، بین سوزن و نمونه، یک ولتاژ به‌صورت ساختار MOS اعمال می‌شود. سوزن فلزی پروب در تماس با نمونه نیمه‌هادی اکسیدی، یک خازن MOS را به‌وجود می‌آورد که در آن (M) پروب فلزی، (S) ماده نیمه‌هادی و (O) دی‌الکتریک نازکی است که روی سطح نیمه‌هادی تشکیل شده‌است. در خازن MOS، الکترون فلزی که با نام گیت<sup>۱۶</sup> شناخته می‌شود با یک لایه اکسیدی از الکترون نیمه‌هادی، جدا می‌شوند [۲].

شکل (۱) خازن MOS را که از سوزن SCM و نیمه‌هادی تشکیل شده‌است، نشان می‌دهد. ظرفیت کل با ضخامت لایه اکسید و ضخامت لایه تخلیه تعیین می‌شود و به تراکم بار در زیر لایه سیلیسیم و ولتاژ (DC) اعمال شده بین سوزن و نیمه‌هادی وابسته

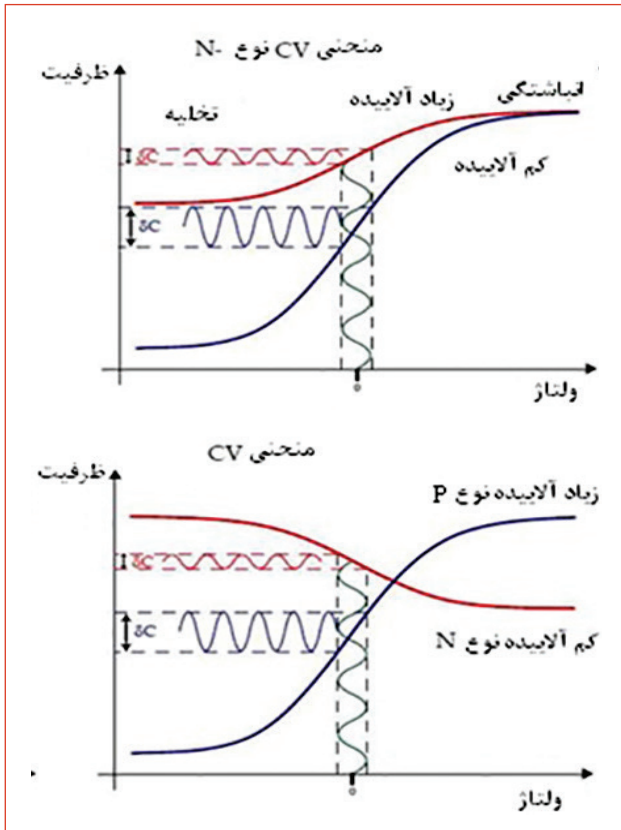


شکل ۱: خازن MOS که از سوزن SCM و نمونه نیمه‌هادی تشکیل شده‌است [۲].



نمونه‌های نیمه‌هادی که اندکی آلاینده شده‌اند، تغییرات ظرفیت بزرگ خواهد بود. این تغییرات و در نتیجه سیگنال اندازه‌گیری شده با حسگر SCM، می‌تواند برای مواد آلاینده در منحنی (C-V) مشاهده شود [۵].

شکل (۳) (سمت چپ)، منحنی (C-V) مربوط به یک ماده نوع (n) را در دو سطح مختلف ناخالصی نشان می‌دهد.

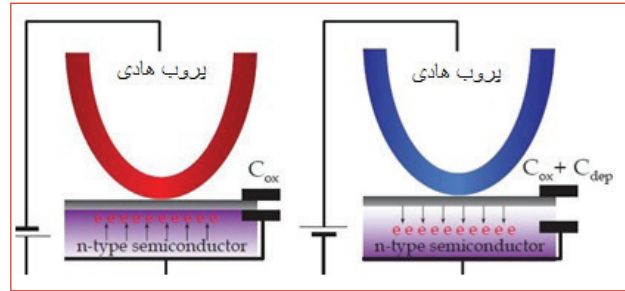


شکل ۳: (شکل بالا) منحنی (C-V) برای نیمه‌هادی نوع (n) با مقدار آلاینده‌گی زیاد در بالا و مقدار کم آلاینده‌گی در پایین را نشان می‌دهد. دامنه داده‌های SCM ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ ) برای ترکیباتی که کمتر آلاینده شده‌اند، بزرگ‌تر است. منحنی (C-V) در شکل پایین، را برای ترکیبات نوع (n) و (p) نشان می‌دهد. در هر دو مورد، نمودار دامنه به صورت تابعی از غلظت آلاینده تغییر می‌کند و نمودار فاز با نوع آلاینده جابه‌جا می‌شود [۵].

منحنی (C-V)، مسیر حرکت بارها و یا لایه تخلیه در پاسخ به ولتاژ اعمال شده را نشان می‌دهد. وضعیت SCM در حالت اجرای (C-V) نشان می‌دهد که با اعمال ولتاژ ( $\delta V$ ) متناوب بین سوزن و نمونه، تغییر ظرفیت ( $\delta C$ ) به‌وجود خواهد آمد. همان‌طور که پیش از این اشاره شد، دامنه این تغییر ظرفیت، اطلاعاتی را درباره سطح ناخالصی در زیر سوزن فراهم می‌کند. به هر حال، ماهیت دامنه همیشه مقداری مثبت است. بنابراین، نمی‌توان به سادگی و با نگاه کردن به دامنه داده‌های ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ )، ناخالصی‌های نوع (n) و (p) را از یکدیگر تشخیص داد. هنگام تصویربرداری در حالت دامنه، برای ترکیبات نوع (n) و نوع (p) از نظر حسگر SCM، یکسان به نظر می‌رسند. حال اگر منحنی (C-V) را برای نیمه‌رسانای نوع (p) در شکل (۳) (سمت راست) در نظر بگیریم، ملاحظه می‌شود که شیب منحنی (C-V) مثبت است. بنابراین، اگر فاز سیگنال ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ ) مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد، مشاهده

است. چنانچه بارهای آزاد داخل نمونه تحت تأثیر میدان الکتریکی (AC) که به‌وسیله پروب رسانا اعمال می‌شود، قرار گیرند حرکت خواهند کرد [۲]. مدار شامل ظرفیت ذخیره ( $C_{ox}$ ) و ظرفیت تخلیه ( $C_d$ ) است که به ترتیب به ضخامت لایه اکسید و میزان ناخالصی وابسته هستند.

ظرفیت اندازه‌گیری شده به‌وسیله حسگر SCM، با حرکت بارها به‌سوی پروب (حالت انباشتگی) و با دور شدن از آن (وضعیت تخلیه) تغییر می‌کند. نمای این مطلب در شکل (۲) نشان داده شده‌است [۵].



شکل ۲: اندازه‌گیری ظرفیت به‌وسیله حسگر SCM با حرکت حامل‌ها به‌سوی پروب (وضعیت انباشته) و یا دور شدن از آن (وضعیت تخلیه) [۵].

هنگامی که نمونه کاملاً تخلیه شود، ظرفیت اندازه‌گیری شده به لایه اکسیدی و لایه تخلیه مربوط است و زمانی که حامل‌ها در سطح انباشته شوند، ظرفیت اندازه‌گیری شده به لایه اکسیدی مربوط می‌شود. این تغییرات، ظرفیت خازن در برابر میدان اعمال شده به سوزن، اساس اندازه‌گیری SCM را تشکیل می‌دهد [۵]. باید توجه داشت که ظرفیت بین دو صفحه با رابطه زیر به‌دست می‌آید:

$$C = \frac{\epsilon A}{t} \quad (4)$$

که در آن: ( $\epsilon$ ) ثابت دی‌الکتریک، ( $A$ ) مساحت سطح و ( $t$ ) فاصله بین صفحات را نشان می‌دهد. بنابراین، زمانی که صفحات به یکدیگر نزدیک هستند، ظرفیت بالا خواهد بود.

در شرایط انباشتگی، بارها به سوی سطح جذب می‌شوند. این عمل، مشابه حرکت صفحه پایینی به سمت بالا است. بدین ترتیب، میزان جدایی صفحات ( $t$ ) کاهش یافته و ظرفیت خازنی افزایش می‌یابد. بنابراین، برای ترکیبات نوع (n) هنگامی که ولتاژ اعمالی مثبت است، ظرفیت اندازه‌گیری شده بالاترین مقدار را دارد. هنگامی که ولتاژ به سوی مقادیر منفی جابه‌جا می‌شود، به دلیل این که بارهای آزاد از سطح رانده می‌شوند، ظرفیت کاهش پیدا می‌کند که مشابه حالتی است که در آن میزان جدایی صفحات افزایش می‌یابد (شکل ۳) [۵].

حرکت بارهای آزاد و در نتیجه دامنه تغییرات ظرفیت خازن تابع سطح آلاینده‌های نمونه است که به‌صورت مستقیم در زیر پروب قرار دارند. در ترکیباتی که به شدت آلاینده شده‌اند، بارها نمی‌توانند زیاد دور شوند، از این رو تغییر ظرفیت اندازه‌گیری شده بین ناحیه انباشته و ناحیه تخلیه کم است؛ برعکس، برای

نمونه معمولاً با ترکیبی از صیقل کاری مکانیکی و حکاکی شیمیایی که برای هر نمونه به صورت اختصاصی انتخاب می‌شوند، انجام می‌شود که در این صورت تغییرات توپوگرافی در حد چند نانومتر خواهد بود [۳].

هدف اصلی این مرحله، آماده‌سازی ایده‌آل نمونه است تا نمونه‌ای با سطح کاملاً صاف و مسطح، لایه اکسیدی با ضخامت یکنواخت و لایه‌های میانی با چگالی کاهش یافته به دست آید. دستیابی به این مشخصات برای رسیدن به نتایج تکرارپذیر برای هر نمونه ضروری است. روش استاندارد برای آماده‌سازی نمونه در روش SCM تهیه شده‌است و نتایج نهایی این روش به شدت به تمیز بودن محیط و مهارت‌های فردی که عملیات صیقل کاری را انجام می‌دهد، بستگی دارد. بهترین نتایج SCM برای نمونه‌های بسیار صاف با RMS کمتر از (۱ nm) به دست می‌آید. بعد از این که نمونه کاملاً تمیز شد، در مرحله بعد اکسیدهای طبیعی با استفاده از محلول آبی ۱:۱۰ فلئوئوریک اسید (HF) زدوده می‌شود. چند قطره فلئوئوریک اسید رقیق به مدت تقریبی ده ثانیه برای حذف اکسیدهای طبیعی از سطح نمونه کافی است. سپس نمونه بلافاصله با استفاده از آب یون‌زدایی شده و به مدت ۲۰-۳۰ ثانیه شسته می‌شود. در مرحله بعد، یک لایه اکسیدی روی سطح رشد داده می‌شود که برای تهیه آن می‌توان اکسیداسیون را به دو روش انجام داد:

▶ در دمای  $300^{\circ}\text{C}$  در هوا و تحت تابش اشعه فرابنفش به مدت ۴۰ دقیقه.

▶ در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  در محیط هیدروژن پراکسید به مدت ۱۰ دقیقه.

هر دو روش اکسیداسیون، لایه اکسیدی به ضخامت (۳-۴ nm) را به وجود می‌آورند. مشخص شده‌است که برای اجتناب از نشت لایه اکسیدی و برای رسیدن به سیگنال ظرفیت قوی، لازم است که ضخامت لایه اکسیدی حداقل (۳ nm) باشد. در خصوص آماده‌سازی نمونه‌ها در روش SCM، مطالعه‌ای صورت گرفته و مشخص شده‌است که انجام اکسیداسیون خشک روی پروب‌های الماس، بهترین نتایج را از نظر تکرارپذیری فراهم می‌کند. در حالی که، در روش اکسیداسیون مرطوب لایه‌های اکسیدی یکنواخت‌تری فراهم می‌شود و از این نظر برای نمونه‌هایی با سطح بزرگ مناسب‌تر است [۶].

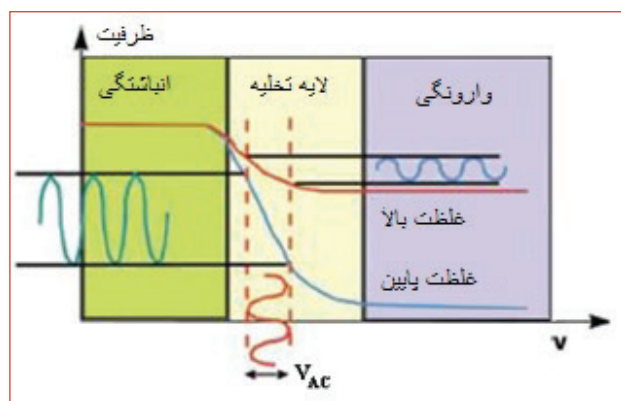
### ویژگی پروب‌های SCM

سوزن مورد استفاده در روش SCM باید تا حد امکان تیز باشد که حالت ایده‌آل، تیز بودن در مقیاس اتمی است. در عمل، با استفاده از پیشرفته‌ترین فناوری‌هایی که تا به امروز به دست آمده است، می‌توان پروب‌هایی با شعاع انحنای در حدود چند نانومتر ساخت. اهمیت اندازه نوک پروب بسیار بالا است؛ زیرا یکی از مؤلفه‌های مهم در تعیین توان تفکیک این روش است.

از دیگر ویژگی مهم پروب، سختی آن است؛ زیرا در روش‌های تماسی از شکستگی پروب به هنگام روبش که باعث کاهش حساسیت سوزن و کاهش کنترل در اندازه‌گیری می‌شود، ممانعت

می‌شود که یک تغییر فاز (۱۸۰) درجه‌ای بین مواد نوع (n) و (p) وجود دارد. بنابراین، با دریافت هر دو مؤلفه دامنه و فاز سیگنال ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ ) از حسگر SCM، نه تنها تشخیص میزان ناخالصی، بلکه تشخیص نوع ناخالصی نیز امکان‌پذیر می‌شود. تصاویر به دست آمده از روبش سطح نمونه، تغییر ناخالصی‌ها را در دو بعد نشان می‌دهند. هنگامی که این تصاویر در مورد نمونه‌هایی که با روش درست تهیه شده‌اند به دست می‌آید، دستیابی به تغییرات سه بعدی ناخالصی‌ها امکان‌پذیر می‌شود [۵].

در شکل (۴) چگونگی اندازه‌گیری ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ ) برای یک نمونه نیمه‌هادی نوع (p) نشان داده شده‌است. ولتاژ بایاس (AC)، باعث تغییر ظرفیت در ولتاژ بایاس (DC) ثابت می‌شود [۲].



شکل ۴: چگونگی اندازه‌گیری ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ ) برای نمونه نیمه‌هادی نوع (p) [۲].

ولتاژ بایاس متناوب ( $\delta V$ ) از طریق پروب به نمونه اعمال شده و با به حرکت در آوردن بارها باعث تغییر ظرفیت ( $\delta C$ ) می‌شود. تغییرات ظرفیت خازنی ( $\delta C$ ) را می‌توان به کمک یک تقویت‌کننده و حسگر اندازه‌گیری کرد. خروجی تقویت‌کننده به صورت دامنه ( $\frac{\delta C}{\delta V}$ ) و یا تصویر فاز نشان داده می‌شود. کنتراست تصویر به دست آمده، تغییرات ظرفیت اندازه‌گیری شده را نشان می‌دهد و از این رو حاوی اطلاعاتی در مورد سطح ناخالصی و نوع آلاینده است [۵].

در SCM سیستم شناسایی ظرفیت از سه ولتاژ مختلف استفاده می‌کند: ولتاژ بایاس (VDC)، ولتاژ بایاس (VAC) در محدوده (kHz) و ولتاژ بایاس (VAC) در محدوده (UHF) (در حدود (Gz)). ولتاژ بایاس (DC) به سوزن - نمونه اعمال می‌شود تا سیستم را در نقطه شروع، آماده کند، ولتاژ (AC) نیز باعث نوسان سریع در محدوده (kHz) می‌شود. فرکانس سیگنال (AC) باید به میزان کافی بزرگ باشد تا فرکانس‌های بالا در منحنی (C-V) حاصل شود. دامنه ولتاژ (UHF) کوچک انتخاب می‌شود تا با خروجی سیستم تداخل پیدا نکند. این ولتاژ تنها برای آشکارسازی سیگنال‌های کوچکی که به وسیله حسگر ظرفیت ایجاد می‌شوند، استفاده می‌شود [۶].

### آماده‌سازی نمونه

آماده‌سازی نمونه برای به دست آوردن نتایج قابل قبول و با کیفیت بالا بسیار مهم است. می‌توان نمونه‌ها را روی سطح سیلیسیم تصویربرداری نمود. با توجه به ساختار قطعه مورد نیاز، آماده‌سازی

**----- نشت ظرفیت -----**

یکی دیگر از منابع انحراف در این روش، نشت ظرفیت است که بر اثر برهم کنش بین نمونه و بدنه تیرک حاصل می‌شود. برای حل این مسئله، شکل هندسی دستگاه به گونه‌ای طراحی می‌شود که اتصالات پشتیبانی کننده تیرک در بالای نمونه قرار نگیرند، بلکه در نواحی جانبی آن واقع شوند. بدین ترتیب، ظرفیت نویزی بین بدنه تیرک و نمونه حذف می‌شود [۳].

**----- رطوبت محیط -----**

با ایجاد میدان الکتریکی قوی بین سوزن و نمونه ممکن است ذرات آب موجود در سطح لایه اکسیدی تجزیه شده و باعث تزریق پروتون‌ها ( $H^+$ ) به داخل این سطح شود. تزریق بار به این شکل منجر به انحراف سیگنال می‌شود. همچنین وجود رطوبت می‌تواند پدیده اکسیداسیون آندی را که در AFM و STM پدیده شناخته شده‌ای است، به وجود آورد. پدیده اکسیداسیون به عواملی نظیر درصد رطوبت، ولتاژ بایاس اعمالی، بایاس پلاریزاسیون، اندازه سوزن، ضخامت لایه اکسیدی و کیفیت اکسیداسیون بستگی دارد که این عوامل می‌توانند کیفیت اندازه‌گیری SCM را تحت تأثیر قرار دهند [۳].

**----- تخلیه سوزن -----**

عامل دیگر انحراف، تخلیه سوزن است. هنگامی که عمل روبش روی نواحی به شدت آلاینده صورت می‌گیرد، لازم است ولتاژ بایاس قوی تری اعمال شود. این ولتاژ بایاس قوی ممکن است باعث تخلیه سوزن‌های از جنس سیلیسیم شده و در نتیجه منجر به انحراف سیگنال شود [۳].

**----- وارونگی کنتراست -----**

یکی از موارد مورد بحث در روش SCM، وارونگی کنتراست است. در واقع باید سیگنال SCM با کاهش غلظت آلاینده در نمونه، به صورت یکنواخت افزایش یابد. بارها مشاهده می‌شود که به هنگام کار با این میکروسکوپ، سیگنال SCM با افزایش غلظت آلاینده افزایش می‌یابد که به آن پدیده وارونگی کنتراست گفته می‌شود. عوامل پدید آورنده این اثر هنوز چندان مشخص نیستند [۳].

**----- نور لیزر -----**

نور لیزر نیز باعث انحراف سیگنال SCM می‌شود و اثر نویزی در سیستم آشکارسازی دارد [۳].

**کاربردها**

روش SCM یک ابزار میکروسکوپی عالی است که به کمک آن می‌توان تصویر اختلاف غلظت آلاینده‌ها را با توان تفکیک بالا تهیه کرد. اگر نوع آلاینده متفاوت باشد (نوع n یا p)، به کمک SCM می‌توان با بهره‌گیری از آشکارساز حساس به فاز، این تفاوت را نشان داد. همچنین برای نمونه‌های بزرگ با سطح گسترده و یا قطعاتی که به چندین روبش در مناطق مختلف سطح نیاز دارند نیز می‌توان از این میکروسکوپ استفاده نمود. گرچه تاکنون، روش SCM به‌عنوان

به عمل می‌آورد. اگر سوزن روکش شود، لایه پوششی سخت، از فرسودگی لایه رسانای خارجی جلوگیری می‌کند. لازم است که هدایت الکتریکی پروب بسیار بالا و نزدیک به هدایت فلزات باشد. قابلیت انعکاس خوب سطح فوقانی تیرک نیز برای سیستم لیزری آشکارساز نوری ضروری است.

در روش SCM، تیرک، نیرویی در حد چند نانونیوتن به سطح وارد می‌کند و از این رو سختی تیرک معمولاً در محدوده  $(0.1-5 \text{ N/m}^2)$  در نظر گرفته می‌شود. در پروب‌های SCM به‌منظور به حداقل رساندن برهم کنش الکتریکی سوزن - نمونه، بهتر است از سوزن‌هایی با نسبت منظر  $17$  بزرگتر استفاده نمود. پروب‌های تجاری در دسترس برای SCM، پروب‌های سیلیسیم با پوشش فلز و پروب‌های سیلیسیم آلاینده با پوشش الماس هستند که اولی با شعاع  $(10-30 \text{ nm})$  تیزتر است ولی سریع‌تر ساییده می‌شود، در حالی که دومی با شعاع  $(100-60 \text{ nm})$  ضخیم‌تر بوده ولی در برابر آسیب‌های مکانیکی بسیار مقاوم‌تر است. مقایسه عملی این دو نوع پروب آشکار می‌کند که کارایی سوزن‌های با پوشش الماس در انجام روبش از نظر تکرارپذیری اندازه‌گیری، بسیار بالاتر است. رسانایی بالای این نوع سوزن‌ها به دلیل مقدار زیاد بور بوده که در لایه روکش الماس آلاینده به کار رفته است [۶].

**عوامل مؤثر بر تکرارپذیری نتایج**

روش SCM یک روش شناسایی نانومتری است که به وسیله آن می‌توان تغییر خواص لایه اکسیدی از یک نقطه به نقطه دیگر را تشخیص داده و عدم یکنواختی ضخامت لایه اکسیدی را در کل سطح نمونه ارزیابی کرد. تغییر ضخامت لایه اکسیدی به اندازه چند آنگستروم، می‌تواند باعث ایجاد تغییر قابل ملاحظه‌ای در دامنه سیگنال شود. همچنین با این روش می‌توان توزیع غیریکنواخت نقص‌ها را در لایه اکسیدی به صورت جابه‌جایی قابل ملاحظه در منحنی‌های حاصل از آن، تشخیص داد. ولی به‌هر حال عواملی وجود دارند که می‌توانند کیفیت اندازه‌گیری در این روش را تحت تأثیر قرار دهند که در ذیل شرح داده می‌شوند [۳].

**----- تغییر اندازه سوزن -----**

در اندازه‌گیری‌های میکروسکوپ SCM، سوزن، نقش الکتروود گیت را بازی می‌کند. ابعاد سوزن در انواع مختلف آن متفاوت است و همچنین ممکن است در طول روبش دچار نقصان شده، شکلش تغییر یافته و شعاعش افزایش یابد. تماس بین سوزن و نمونه می‌تواند باعث فرسایش لایه اکسیدی و یا سوزن شود. زمانی که سوزن تغییر شکل یابد، سیگنال SCM بزرگتر از مقدار واقعی اندازه‌گیری می‌شود که دلیل آن تغییر غلظت نمونه تحت روبش نیست بلکه بزرگتر شدن سطح گیت است. همچنین ممکن است بخشی از لایه روکش سوزن بر اثر ساییدگی در طول فرآیند روبش از بین برود که این اثر نیز می‌تواند روی کنتراست تصویر تأثیر بگذارد. با توجه به این که سیگنال ظرفیت متناسب با ابعاد الکتروود گیت است، به نظر می‌رسد که باید سوزن‌ها با اندازه‌های مختلف و همچنین عامل فرسایش سوزن را به‌عنوان عوامل مؤثر در نوسانات دامنه سیگنال SCM مد نظر قرار داد [۳].



انجام شود. ترکیبات با خاصیت دی‌الکتریک پایین باعث کاهش نشت ظرفیت و افزایش نسبت سیگنال به نویز ( $\frac{S}{N}$ ) می‌شود. شکل (۵) سازوکار عملی اندازه‌گیری ظرفیت سری XE-SCM را نشان می‌دهد. در حسگر ظرفیت از یک نوسانگر RF ( $\approx 1 \text{ GHz}$ ) که به یک تشدیدکننده با مدار آشکارسازی توان RF متصل است، استفاده می‌شود [۲].

پروب SCM به تشدیدکننده ماکروویو که دارای یک خازن داخلی متغیر است، متصل می‌شود. در این صورت پروب به‌گونه‌ای تنظیم می‌شود که دارای فرکانس تشدید ( $f_t$ ) و عامل کیفیت ( $Q$ ) بهینه باشد. طراحی این پروب به‌گونه‌ای است که پایداری فوق‌العاده‌ای را برای فرکانس فراهم می‌کند [۲].

یکی از رایج‌ترین کاربردهای XE-SCM، نقشه‌برداری از تراکم حامل بار در یک نمونه نیمه‌هادی است که به‌صورت غیریکنواخت آلاینده شده‌است. تاکنون ابزارهای رایجی مانند SIMS، SRP و (C-V) تک بعدی، توانسته‌اند اطلاعات مربوط به تراکم حامل بار و یا آلاینده را با دقت بسیار بالا و توان تفکیک محدود در یک بعد فراهم آورند. به هر حال، روش XE-SCM نشان می‌دهد که از توان فوق‌العاده‌ای برای اندازه‌گیری مستقیم تراکم حامل‌های فعال به‌صورت دوبعدی و با دقت در مقیاس نانومتر برخوردار است [۲].

همچنین، برای بهبود سیگنال‌های SCM، می‌توان در امتداد پروب و نمونه، از یک تشدیدکننده و یک مدار تشدید استفاده نمود که باعث ایجاد تغییر در ظرفیت سوزن - نمونه شده و در نتیجه دامنه و ولتاژ خروجی آشکارساز را تغییر دهد.

از دیگر پیشرفت‌هایی که در این حوزه انجام شده‌است، استفاده از حسگرهای چند پروبی با توان تفکیک بسیار بالاست. در شکل (۶) تصاویری که به‌وسیله SCM برای مدارهای پشتیبانی SRAM در سطح سیلیسیم به‌دست آمده، نشان داده شده‌است. تصویر با وضوح بالاتر در شکل پایین، معرف توان تفکیک فضایی بالای حسگر چند پروبی SCM است و نشان می‌دهد که در میکروسکوپ SCM پیشرفت قابل ملاحظه‌ای اتفاق افتاده است [۵].

یک روش اندازه‌گیری استاندارد برای استفاده عمومی در نظر گرفته نشده‌است، ولی تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که استفاده از این روش برای اندازه‌گیری‌های کمی، پیشرفت قابل توجهی کرده است. همچنین مناسب بودن این روش برای ترکیبات نیمه‌هادی نظیر سیلیسیم کاربید و الماس نیز به اثبات رسیده است [۵].

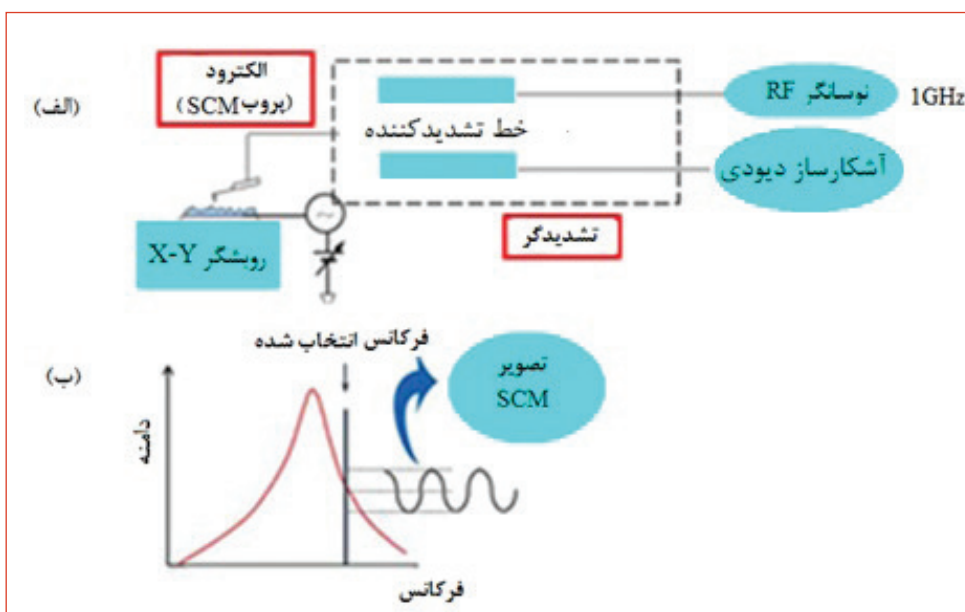
از کاربردهای دیگر این روش می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

- ▶ بررسی و شناسایی قطعات نیمه‌هادی که به‌دلیل غیرمخرب بودن این روش، تهیه تصاویر سه بعدی و به دست آوردن توان بالا قابل استفاده است؛
- ▶ قابلیت تهیه تصویر از تغییرات ناخالصی‌ها در قطعات نیمه‌هادی؛
- ▶ اندازه‌گیری تراکم حامل‌های بار به‌صورت دو بعدی و با دقتی در مقیاس نانومتر؛
- ▶ نقشه‌برداری از تراکم حامل‌های بار در نمونه‌هایی که به‌صورت غیریکنواخت آلاینده شده‌اند؛
- ▶ توصیف خواص الکتریکی گیت اکسید در قطعات MOS و غیره.

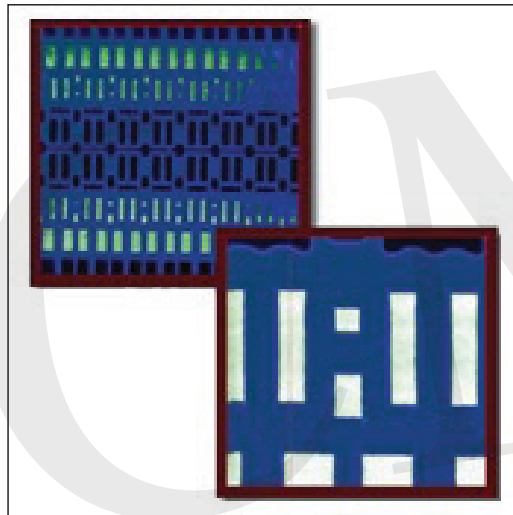
## پیشرفت‌های روش SCM

در SCM‌های متداول که از یک نوسانگر RF با یک فرکانس ثابت استفاده می‌شود، دستیابی به یک تصویر خوب SCM برای نمونه‌های فلزی و دی‌الکتریک دشوار است [۲].

با پیشرفت روش SCM از مدل XE-SCM در تصویربرداری استفاده می‌شود. در سری XE از دستگاه‌های SCM، عملیات اندازه‌گیری با حساسیت عالی و توان تفکیک فضایی بسیار بالا همراه با فرکانس‌های عملیاتی قابل تنظیم به‌منظور انتخاب فرکانس تشدید و عامل کیفیت بهینه برای هر اندازه‌گیری، انجام می‌شود. علاوه بر این، استفاده از محافظ‌های الکتریکی جدید و نگه دارنده‌های پروب SCM باعث می‌شود که اندازه‌گیری‌ها مستقل از تأثیرات محیطی



شکل ۵: (الف) نمای روش XE-SCM، (ب) نمودار تغییر در ظرفیت سوزن - نمونه [۲].



شکل ۶: تصاویر SCM برای مدار پشتیبانی SRAM [۵].

SCM، حسگرها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که فقط به‌هنگام تصویربرداری مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیش از جداسازی حسگر، باید سوزن عقب کشیده شود و در نتیجه تصویر محل مورد بررسی از دست می‌رود. به هر حال، محدودیت‌های موجود در طراحی الکترونیکی این حسگرها، باعث کاهش قابل توجه کارایی آنها شده‌است. حسگر SCM چند پروبی نماینده نسل بعدی ابزارهای تصویربرداری است. در آینده، حسگرهایی با طراحی خاص الکترونیکی، امکان اندازه‌گیری چندین عامل را بدون نیاز به جدا نمودن حسگر یا پروب، فراهم خواهند آورد و بدین ترتیب بهره‌وری و عملکرد SCM را به‌طور مستقیم افزایش خواهند داد [۵].

به هر حال باید توجه داشت که روش SCM یک روش کیفی است. رویکردها برای کمی‌سازی نمودار آلاینده‌ها، همگی براساس روش‌های شبه کمی هستند، بدین ترتیب که ابتدا دامنه سیگنال یک آلاینده با غلظت مشخص ثبت می‌شود و سپس غلظت نواحی آلاینده شده با مقایسه دامنه سیگنال‌های ظرفیت در این نواحی با دامنه سیگنال ظرفیت در ناحیه مرجع تعیین می‌شود. تلاش‌های زیادی به‌منظور شبیه‌سازی و تهیه مدل‌هایی برای تعیین کمیت غلظت آلاینده‌ها انجام شده‌است که هنوز به روش‌های قطعی منجر نشده‌است [۳].

## روش SCM در آینده

یکی از رویکردهای اساسی برای میکروسکوپ SCM در آینده، محاسبه یک مدل نظری کامل است که در آن کلیه عوامل مؤثر در SCM مانند شکل سوزن، نشت میدان، بارهای سطحی، زبری سطح و غیره مدنظر قرار گرفته شده و بدین ترتیب محاسبات کمی امکان‌پذیر می‌شود. در این میان، ظرفیت‌های نشت‌شده هنوز ناشناخته است و اگر بررسی و تجزیه و تحلیل این موضوع به خوبی انجام نشود، روش SCM در حد یک روش کیفی برای ترسیم نقشه آلاینده‌ها باقی خواهد ماند.

موضوع دیگری که در مطالعات SCM بسیار جالب توجه است، بررسی قطعاتی است که دارای شکاف‌های میکروبی هستند. دستیابی به روشی استاندارد برای مطالعه میکروشکاف‌ها به‌وسیله SCM یکی از چالش‌های این حوزه است.

تلاش برای تلفیق توان تفکیک پروب‌های روکش‌دار با ویژگی قابلیت هدایت خوب پروب‌های فلزی یا الماسی یکی دیگر از موضوعات چالش برانگیز این حوزه است. پروب‌های اکسیدی مقاوم در برابر اکسیداسیون و نانولوله‌های کربنی که به انتهای سوزن متصل می‌شوند، از جمله این تلاش‌ها هستند [۷].

از نقطه ضعف‌های قابل توجه این روش، ناتوانی حسگرهای موجود برای اندازه‌گیری هم‌زمان چند عامل است. در روش

## نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات آزمایشگاهی انجام شده روی روش میکروسکوپی ظرفیتی روشی، مشخص شده‌است که این روش در تهیه نقشه آلاینده‌ها در ساختار نیمه‌هادی و تشخیص و شناسایی لایه اکسیدی، یک روش قدرتمند است. برای تهیه یک تصویر کیفی از وجود آلاینده در ساختار نیمه‌هادی، نظیر بررسی مراحل ساخت و جای دادن صحیح ریزساختارها در یک قطعه الکترونیکی، همچنین بررسی حضور یا عدم حضور آلاینده‌ای با نوع مشخص در یک ناحیه، میکروسکوپ SCM به‌عنوان یک ابزار توانمند ظاهر شده‌است. هنگام بررسی کمی با این روش، لازم است تا کالیبراسیون تصاویر SCM در نواحی که لایه اکسیدی در آنها به روشی یکسان رشد یافته، انجام شود. ابتدا یک منحنی شبه کالیبره برای نمونه مرجع به‌دست آمده و سیگنال SCM آن اندازه‌گیری می‌شود و سپس برای نمونه آزمایشی، استفاده می‌شود. البته این روش بسیار محدود است که باید در آن نمونه‌ها برای تهیه لایه اکسیدی یکسان، به‌صورت کاملاً مشابه آماده‌سازی شوند.

## پی نوشت

۱. کارشناس ارشد فیزیک، دانشگاه بیرجند - آزمایشگاه مغناطیس و ابر رسانایی
۲. کارشناس ارشد شیمی تجزیه، پژوهشگاه صنعت نفت، مرکز تحقیقات نانو فناوری
۳. کارشناس ارشد شیمی فیزیک، پژوهشگاه صنعت نفت، مرکز تحقیقات نانو فناوری
۴. کارشناس ارشد مهندسی مواد - مواد مرکب، پژوهشگاه صنعت نفت، پژوهشگاه کاتالیست
۵. عضو کارگروه تخصصی دستگاه‌های SPM شبکه آزمایشگاهی

6. Scanning capacitance microscopy (SCM)
7. Scanning electron microscopy (SEM)
8. Transmission electron microscopy (TEM)
9. Secondary ion mass spectroscopy (SIMS)
10. Spreading sheet resistance profiling (SRP)
11. Scanning Probe Microscope (SPM)
12. Atomic Force Microscopy (AFM)
13. Ion implanted semiconductor
14. Metal Oxide Semiconductor (MOS)
15. Electrostatic Force microscopy (EFM)
16. Gate
17. Aspect ratio

## مراجع

- [1] Natey, J.R.; Blanc, J. "Scanning Capacitance Microscopy". Journal of Applied Physics", 57 (5): (1985), 1437-1444.
- [2] www.parkAFM.com, "Scanning Capacitance Microscopy (SCM)", Nanotechnology Solutions Partner JOUR, 114-117
- [3] Octavian, L. "Reliability of the Scanning Capacitance Microscopy and Spectroscopy for the nanoscale characterization of semiconductors and dielectrics", these for Institut national des sciences appliquées, Lyon; Publication year: 2010
- [4] <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/scanning-capacitance-microscopy>
- [5] Erickson, A.; Harris, P. "Scanning Capacitance Microscopy", MultiProbe JOUR.
- [6] Stangonl, M.V. "Scanning Probe Techniques for Dopant Profile Characterization", A dissertation submitted to the Swiss federal institute of technology Zurich, 2005
- [7] Duhayon, N. "Experimental study and optimization of scanning capacitance microscopy for two-dimensional carrier profiling of submicron semiconductor devices", these for Departement Natuurkunde en Sterrenkunde Celestijnenlaan, 2006



# روش‌های کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین‌ها

(قسمت دوم)

نویسندگان

مریم یوسفی<sup>۱\*</sup>  
مهرداد محمدی<sup>۲</sup>  
محمود نادری<sup>۳</sup>

m.yousefi@avicenna.ac.ir

## چکیده

دانش تخلیص پروتئین قدمتی نزدیک به یک قرن دارد. برای جداسازی یک پروتئین خاص از مخلوط، از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاص آن پروتئین استفاده می‌شود. هیچ روش منحصر به فرد یا راه ساده‌ای برای خالص‌سازی همه انواع پروتئین‌ها وجود ندارد. روش‌ها و شرایط اعمال شده در تخلیص یکی از پروتئین‌ها می‌تواند باعث غیر فعال شدن سایر پروتئین‌ها شود. در این مقاله دو نوع از روش‌های کروماتوگرافی متداول، کروماتوگرافی میل ترکیبی و کروماتوگرافی اندازه طردی بررسی شده و مزایا، معایب و محدودیت‌های هر روش مورد بحث قرار می‌گیرد.

## واژه‌های کلیدی

کروماتوگرافی، پروتئین، کروماتوگرافی میل ترکیبی، کروماتوگرافی اندازه طردی.

## مقدمه

هزاران نوع پروتئین با خواص و عملکردهای مختلف وجود دارند. برای مطالعه یک پروتئین باید فرم خالصی از آن را در اختیار داشت. برای خالص‌سازی پروتئین، روش‌های جداسازی مختلفی بر حسب ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین وجود دارد. کروماتوگرافی، روشی قدرتمند برای شناسایی و خالص‌سازی ترکیبات بیولوژیکی است. اصول جداسازی در کروماتوگرافی، توزیع و یا تفکیک مولکول‌ها میان دو فاز امتزاج ناپذیر به نام‌های فاز متحرک و فاز ساکن است. امروزه متداول‌ترین روش شناسایی و خالص‌سازی مولکول‌های بیولوژیک، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است. همان‌گونه که در مقاله روش‌های کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین‌ها (قسمت اول)، ذکر شد؛ کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی برهم‌کنش هیدروفوبی، کروماتوگرافی اندازه طردی و کروماتوگرافی میل ترکیبی از جمله روش‌های جداسازی با استفاده از روش کروماتوگرافی به‌عنوان روش‌های تخلیص پروتئین‌ها هستند. در قسمت اول مقاله به دو روش نخست پرداخته شد و در مقاله حاضر، دو روش آخر مورد بحث قرار خواهد گرفت.

در یک فرآیند معمول کروماتوگرافی، اولین مرحله، مرحله به دام اندازی<sup>۱</sup> است که ماده مورد نظر به سطح جاذب متصل می‌شود در حالی که ناخالصی‌ها اتصال نمی‌یابند. پس از آن، پروتئین‌هایی که به میزان ضعیفی اتصال یافته‌اند قبل از تغییر شرایط به‌منظور شویش پروتئین مورد نظر، خارج می‌شوند [۶-۱].

انواع روش‌های کروماتوگرافی مایع (که عمدتاً در نوع فاز ساکن متفاوت هستند) برای خالص‌سازی پروتئین استفاده می‌شوند. تنها، فرآیند کروماتوگرافی اندازه طردی تا حدی متفاوت است؛ زیرا جداسازی در آن براساس تفاوت اندازه پروتئین‌ها و اندازه حفره‌های فاز ساکن است و نه براساس جذب سطحی. مقایسه دو روش کروماتوگرافی تبادل یونی و اندازه طردی در شکل (۲) نشان داده شده‌است.

به‌طور کلی، روش‌های تخلیص پروتئین‌ها با استفاده از کروماتوگرافی را می‌توان به چهار دسته عمده کروماتوگرافی تبادل یونی، کروماتوگرافی بر پایه آب‌گریزی، کروماتوگرافی میل ترکیبی و کروماتوگرافی اندازه طردی تقسیم‌بندی نمود. در قسمت اول این مقاله، به دو روش نخست پرداخته خواهد شد و دو روش دیگر در قسمت دوم مقاله مورد بحث قرار خواهند گرفت.

اتصال لیگاندها به آگاروز وجود دارد. تعدادی بسترهای آلی و معدنی سنتزی نیز به‌عنوان بسترهای کروماتوگرافی وجود دارند که از میان آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود؛ دکستران‌های اتصال عرضی شده، پلی استایرن، پلی آکریلامید، سلولز، سیلیکا و شیشه متخلخل.

#### ◆ لیگاندها

یک فرآیند تخلیص موفق به لیگاندی نیاز دارد که عملکردی اختصاصی داشته و به بستر کروماتوگرافی نیز به روش کووالانسی متصل شده باشد. لیگاندها باید بسیار انتخابی عمل نموده و تنها به یک یا تعداد کمی از پروتئین‌ها اتصال یابند. از جمله مثال‌ها در این مورد، می‌توان آنتی‌بادی‌ها، گیرنده‌های پروتئینی، هورمون‌های استروئید، ویتامین‌ها و بازدارنده‌های آنزیمی را نام برد. برخی لیگاندها عملکرد اختصاصی ضعیفی داشته و به یک گروه از ترکیبات دارای ساختار مشابه با ویژگی‌های شیمیایی مشابه متصل می‌شوند. با این وجود، این برهم‌کنش‌ها برای حل برخی از مشکلات جداسازی کارگشا هستند. به‌عنوان مثال در این زمینه، استافیلوکوکال، پروتئین‌های (A) و (G) به‌عنوان لیگاند هستند که برای ایمونوگلوبولین‌ها استفاده می‌شوند.

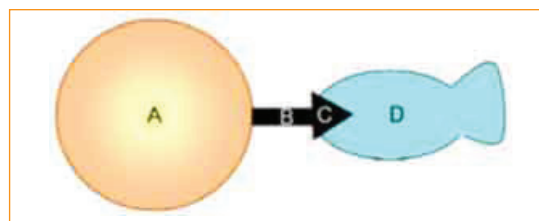
لیگاندهای کوپل شده باید قادر باشند، کمپلکس‌های برگشت‌پذیری با پروتئین‌هایی که قرار است جدا شوند تشکیل دهند. پایداری کمپلکس تشکیل شده نیز باید در حدی باشد که در طول فرآیند کروماتوگرافی باعث بازداری کامل پروتئین موردنظر شود. بسیار مهم است که پس از شستشوی ترکیبات بازداری نشده، تفکیک این کمپلکس با یک تغییر ساده در محیط، بدون تأثیرگذاری برگشت‌ناپذیر بر پروتئین جداسازی شده و یا لیگاند متصل به آن صورت پذیرد. برای تهیه جاذب‌های میل ترکیبی، لیگاند باید با حلال‌های مورد استفاده در فرآیند کروماتوگرافی سازگار باشد. به این منظور، بهترین نوع لیگاند برای کروماتوگرافی میل ترکیبی، یک مولکول سنتزی است که پایدار، ایمن و ارزان باشد. لیگاندهای پروتئینی معمولاً گزینش‌پذیری مناسبی فراهم می‌آورند ولی برای تولید مناسب نیستند؛ زیرا در طول فرآیند پاک‌سازی ستون تخریب می‌شوند؛ علاوه بر آن، پروتئین‌ها گران هستند و باید قبل از اتصال به ستون، خلوص بالایی داشته باشند. ضروری است که لیگاند موردنظر حداقل یک گروه عاملی داشته باشد که با استفاده از آن روی بستر تثبیت شود. متداول‌ترین این گروه‌ها، آمین‌ها، تیول‌ها، کربوهیدروکسیدها و گروه‌های هیدروکسیل هستند.

#### ◆ بازوی حایل<sup>۶</sup>

برای جلوگیری از تأثیر گذاشتن اتصال لیگاند به بستر، بر توانایی آن در اتصال به مولکول هدف، بهتر است یک بازوی حایل میان لیگاند و بستر قرار داد (شکل ۱). در نتیجه لیگاند از سطح بستر فاصله گرفته و ممانعت فضایی را نسبت به حالتی که لیگاند به‌صورت مستقیم به بستر متصل باشد، کاهش می‌دهد. بازوهای حایل، برای لیگاندهای کوچک تثبیت شده بسیار اهمیت دارند، اما برای لیگاندهای بزرگ‌تر وجودشان الزامی نیست. مناسب‌ترین طول برای بازوی حایل، (۱۰-۶) اتم کربن یا معادل آن

#### کروماتوگرافی میل ترکیبی

از جمله برهم‌کنش‌های بیولوژیکی پروتئین‌ها، برهم‌کنش‌های ویژه آن‌ها با دیگر مولکول‌هاست که لیگاند نامیده می‌شوند. این برهم‌کنش‌ها با ترکیباتی با وزن مولکولی پایین مانند سوبستراها یا بازدارنده‌ها و یا دیگر پروتئین‌ها رخ می‌دهند. یک پروتئین برهم‌کنش‌کننده، مکان‌های اتصال دارد که مکمل لیگاند هستند. این اتصال می‌تواند تلفیقی از برهم‌کنش‌های آب‌گریز یا الکتروستاتیک و یا برهم‌کنش‌های مولکولی کوتاه مانند نیروهای واندروالس و پیوندهای هیدروژنی باشد. یک لیگاند خاص به‌صورت کووالانسی به یک بستر کروماتوگرافی خنثی متصل می‌شود (شکل ۱). در شرایطی که اتصال ویژه و برگشت‌پذیر پروتئین با لیگاند حاصل شود، نمونه مورد آنالیز قرار می‌گیرد. از آنجایی که در طول عبور ماده مخلوط از ستون، تنها پروتئین موردنظر جذب سطحی می‌شود، لذا دیگر ترکیبات، شسته شده و بدون جذب از ستون عبور می‌کنند. برای شستشوی مولکول هدف، شرایط به‌گونه‌ای تنظیم می‌شود که برهم‌کنش پروتئین - لیگاند شکسته شود.



شکل ۱: یک بستر اتصال یافته به پروتئین هدف؛ A. دانه‌های ستون، B. بازوی حایل، C. لیگاند، D. پروتئین هدف

در ابتدا این روش در سال ۱۹۶۸ برای خالص‌سازی آنزیم‌ها به کار گرفته شد و از آن زمان، کاربرد آن به پروتئین‌های گیرنده، ایمونوگلوبولین‌ها، نوکلئوتیدها و حتی به سلول‌های کامل، گسترش یافته است. کاربرد این روش تنها با در دسترس بودن لیگاندهای اختصاصی برای پروتئین موردنظر، محدود می‌شود.

#### ◆ فاز ساکن

برای کروماتوگرافی میل ترکیبی، یک بستر ایده‌آل باید ویژگی‌های مشخصی داشته باشد. اول از همه بستر باید گروه‌های شیمیایی مناسبی داشته باشد که لیگاند بتواند به‌صورت کووالانسی به آن متصل شود تا سطح بزرگی را برای اتصال فراهم آورد. شرایط سختی که در طول فرآیند مشتق‌سازی به وجود می‌آید، ایجاب می‌کند که بستر از لحاظ شیمیایی و مکانیکی پایدار باشد. همچنین بستر موردنظر باید نسبت به حلال‌ها و بافرهای مورد استفاده در فرآیند، به ویژه در مرحله شوی پروتئین بی‌اثر باشد. بنابراین، بسترهای آب‌دوست و خنثی به‌منظور جلوگیری از برهم‌کنش غیراختصاصی پروتئین با بستر ترجیح داده می‌شوند. بستر باید متخلخل با اندازه حفرات بزرگ<sup>۵</sup> باشد تا برهم‌کنش پروتئین‌های بزرگ و لیگاندها را در خود جای دهد و در عین حال، جریان بتواند به خوبی از آن عبور کند. آگاروز متداول‌ترین بستر کروماتوگرافی میل ترکیبی است؛ به دلیل این‌که راه‌های ساده و مناسبی برای

روش‌های فعال‌سازی یک جاذب میل ترکیبی، براساس شیمی لیگاند و جاذب و این‌که آیا بازوی حایل مورد نیاز است یا خیر، متغیر است. برخی از روش‌های متداول تثبیت در جدول (۱) نشان داده شده‌اند. بستر باید به‌گونه‌ای فعال شده باشد که با روش شیمی ملایم، اتصال کووالانسی لیگاند به آن انجام شود.

فعال‌سازی معمولاً شامل وارد کردن یک گروه الکترون‌دوست به بستر است. در طول اتصال لیگاند، این گروه با گروه‌های هسته‌دوست مانند آمین، تیول و گروه هیدروکسیل واکنش می‌دهد. بستری که با گروه‌های هسته‌دوست مانند تیول فعال شده باشد را هم می‌توان برای اتصال لیگاندی که حاوی گروه‌های الکترون‌دوست است فعال نمود؛ گرچه چنین فرآیندی کم‌تر متداول است.

است. بازوهای حایل نباید از لحاظ شیمیایی و یا ساختاری، اثری روی نمونه یا لیگاند داشته باشند.

#### ◆ اتصال لیگاند

به‌طور کلی، فرآیند تثبیت لیگاند شامل سه مرحله است. ابتدا بستر برای واکنش با گروه عاملی لیگاند فعال می‌شود. پس از آن لیگاند به‌صورت کووالانسی، از طریق یک واکنش شیمیایی اتصال می‌یابد و در نهایت، گروه‌های باقیمانده واکنش نداده و با مقدار اضافی از ترکیبی با وزن مولکولی پایین مانند اتانول آمین، مسدود می‌شوند. این عمل موجب می‌شود تا از همه اتصالات میان لیگاند و نمونه اطمینان حاصل نمود.

واکنش‌گر لازم برای فعال‌سازی	بستر فعال شده	گروه‌های عاملی لیگاند	لیگاند متصل شده
CNBr		NH <sub>2</sub> لیگاند	
Epichlorohydrine		NH <sub>2</sub> لیگاند	
Epichlorohydrine + 6-aminohe xanoic acid + N-hydroxysuccinimide (NHS)		NH <sub>2</sub> لیگاند	
N,N' carbonyldiimidazole (CDI)		NH <sub>2</sub> لیگاند	
Tosyl chloride		NH <sub>2</sub> لیگاند	

بافر به‌گونه‌ای تغییر می‌کند که برهم‌کنش میان مولکول هدف و لیگاند را بشکند و در نتیجه مولکول هدف از ستون خارج شود.

#### ◆ راهبرد شویس

اساس واجذب، تغییر تعادل اتصال مواد جذب شده از فاز ساکن به فاز متحرک است و این امر به کمک تغییر شرایط محلولی رخ می‌دهد که پیوند لیگاند و بیومولکول در آن رخ داده است و تغییر شرایط به‌گونه‌ای است که دیگر در آن، این اتصال مطلوب نیست. این کار با راه‌های مختلفی قابل انجام است چه به روش ویژه و چه غیرویژه. این که بافر شویس سریع عمل کند و عملکرد یا فعالیت پروتئین موردنظر را تغییر ندهد بسیار مهم است.

#### ◆ فاز متحرک

در کروماتوگرافی میل ترکیبی باید حداکثر دقت را به‌منظور برقراری اتصال میان مولکول هدف و لیگاند به عمل آورد. شرایط بافر برای برقراری یک اتصال ایده‌آل باید به‌گونه‌ای تغییر داده شود که از برهم‌کنش مؤثر مولکول هدف با لیگاند، اطمینان حاصل شود و مولکول هدف به‌وسیله محیط کروماتوگرافی میل ترکیبی، بازداری شده و برهم‌کنش‌های غیرویزه به حداقل برسد. در اغلب موارد، بافر اتصال برای شستشوی ترکیبات اتصال نیافته از ستون بدون شستشوی مولکول‌های هدف هم به کار می‌رود. تغییر سرعت جریان می‌تواند اثرات شگفت‌آوری بر موفقیت روش کروماتوگرافی میل ترکیبی داشته باشد. اگر نمونه با سرعت بالایی پمپ شود، اتصال به خوبی برقرار نمی‌شود. در فاز شستشو، شرایط



به عنوان مثال، بستر پلی ساکارید را می توان با پی کلروهیدرین یا بیس اپوکسی‌رنا که گروه اپوکسی را به عنوان الکترون دوست به بستر وارد می کنند، فعال نمود.

به غیر از واکنش با آمین‌های نوع اول، گروه اپوکسی با سولفهدریل<sup>۸</sup> به سرعت و به آهستگی با گروه‌های هیدروکسیل واکنش می دهد. این پدیده از آنجایی مفید است که امکان اتصال لیگاندهای فنیدی را فراهم می آورد. زمانی که از بیس اکسیران استفاده می شود، ویژگی قابل توجهی مشاهده می شود و آن، لیگاندی است که به وجود می آید؛ زیرا به گونه‌ای است که خود بخود یک بازوی حایل آب دوست (۱۲) کربنه دارد که برای کاربردهای خاصی مطلوب است. پس از اتصال یک آلکانوئیک اسید به عنوان بازوی حایل، گروه کربوکسیل انتهایی این قطعه را می توان باز هم با استفاده از استر N-هیدروکسی سوکسین ایمید (NHS) فعال کرد. بسترهای فعال شده با (NHS) امروزه به طور متداول استفاده می شوند، چنین بسترهایی با گروه‌های حاوی آمین نوع اول واکنش داده و پیوند پایدار آمیدی تشکیل می دهند.

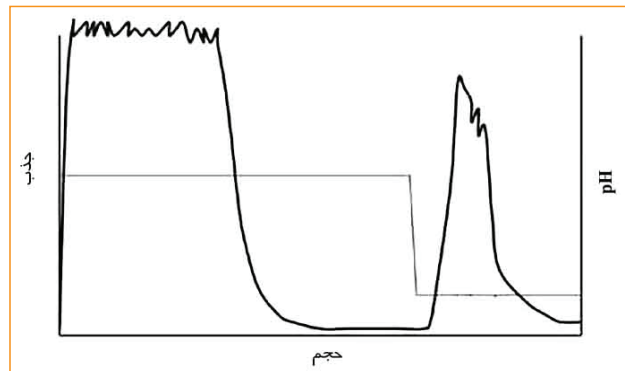
بسترهای پلی ساکاریدی را می توان با عوامل کربونیل کننده کم ضرتری مانند N و N' کربونیل دی ایمیدازول (CDI) فعال کرد تا مشتقات ایمیدازول کربنات تولید شود. این مشتقات در pH های قلیایی به آسانی با لیگاندهای حاوی آمین‌های نوع اول، کربامات تشکیل می دهند. پیوند کربامات بسیار پایدار و در شرایط کروماتوگرافی تبادل یونی بدون بار است. البته این روش اتصال، حداقل فاصله از بستر را ایجاد می کند.

روشی که در آن هیچ بازوی حایلی به وجود نمی آید از سولفونیل هالیدهایی چون توسیل کلراید و یا فعال تر از آن از ترسیل کلراید استفاده می کند. این واکنش‌گرها با گروه‌های هیدروکسیل واکنش داده و سولفونات‌ها را به وجود می آورند که گروه‌های ترک کننده بسیار خوبی بوده و امکان اتصال مستقیم هسته دوست‌های لیگاند به کربن هیدروکسیل را فراهم می آورند. افزایش قدرت یونی بافر هم برای شویس پروتئین‌های اتصال یافته کارآمد است. از نمک (NaCl) یک مولار اغلب برای این هدف استفاده می شود. زمانی که اتصال از طریق برهم کنش‌های قوی آب‌گریز انجام شود از روش‌های سخت‌تری برای شویس مانند کاهش قطبیت یا افزودن نمک‌های کیلیت‌دهنده باید استفاده شود.

### کروماتوگرافی اندازه طردی

در تمامی روش‌هایی که تاکنون مورد بحث قرار گرفتند، بازداری، براساس برهم کنش میان پروتئین و بستر بوده است. کروماتوگرافی اندازه طردی بهترین روش برای حفظ ساختار و عملکرد پروتئین‌ها است. در کروماتوگرافی اندازه طردی، بستر شامل ذرات متخلخل است و جداسازی براساس اندازه و شکل مولکول انجام می شود (شکل‌های (۳) و (۴)). نام دیگر این روش ژل فیلتراسیون<sup>۹</sup> و یا ژل تراوایی<sup>۱۰</sup> است.

برهم کنش لیگاند - پروتئین براساس تلفیقی از برهم کنش‌های الکتروستاتیک و آب‌گریز و پیوندهای هیدروژنی است. عواملی که این برهم کنش‌ها را ضعیف می سازند، ممکن است به عنوان شوینده‌های مؤثر غیرویژه عمل کنند. در نظر داشتن اهمیت نسبی این سه نوع برهم کنش روی پایداری پروتئین متصل شده به انتخاب یک شوینده مناسب کمک می کند.



شکل ۲: یک کروماتوگرام نمونه از خالص سازی براساس میل ترکیبی که شویس در آن با بافری با pH پایین انجام شده است.

یک تغییر (pH) منجر به تغییر حالت یونیزاسیون گروه‌ها در لیگاند و مولکول هدف شده و اثر بسیار مهمی بر اتصال می گذارد. در نتیجه، متداول ترین روش شستشوی موادی که به شدت اتصال یافته‌اند، به صورت غیراختصاصی، کاهش (pH) بافر است (شکل ۲). برای واجذب، اغلب (pH) حدود (۲) لازم است؛ اما میزان (pH) را پایداری شیمیایی بستر، لیگاند و مواد جذب شده و این که (pH) بافر را تا چه حد می توان کاهش داد، تعیین می کند. اگر شویس با تغییر (pH) انجام شود گاهی لازم است که (pH) اجزای جمع‌آوری شده را بلافاصله پس از شستشو خنثی کند تا خطر از دست دادن ساختار پروتئین به حداقل برسد.

متداول ترین روش برای اتصال، فعال سازی اولیه با سیانوزن برماید<sup>۷</sup> است که با گروه‌های هیدروکسیل بستر پلی ساکارید برهم کنش می دهد تا یک بستر فعال به وجود آورد. بسترهای فعال شده با (CNBr) برای اتصال لیگاندهایی مانند پلی پپتیدها و پروتئین‌ها بسیار مناسب هستند؛ زیرا در شرایط قلیایی ضعیف (۹-۱۰ pH) با آمین‌های نوع اول واکنش داده و مشتقات ایزو اوره به وجود می آورند. متأسفانه پیوند ایزو اوره در (pH) فیزیولوژیک (۹/۵ ~ pKa) بار مثبت دارد و خواص تبادل آنیونی به جاذب می بخشد. از طرف دیگر، بسیاری از لیگاندهایی که اتصال می یابند بار منفی دارند؛ بنابراین مشتقات ایزو اوره ممکن است اثرات احتمالی تبادل کاتیونی را خنثی کنند. با این همه، روش (CNBr) برای اتصال تک نقطه‌ای لیگاند مناسب نیست؛ زیرا پیوند ایزو اوره به راحتی می شکند و از آنجا که (CNBr) به شدت سمی است و با اسیدی شدن محیط (HCN) آزاد می کند، بسترهای تجاری فعال در این مورد توصیه می شوند. بستر را با دیگر واکنش‌های شیمیایی نیز می توان فعال کرد.

### ◆ فاز ساکن

چنین تلقی می‌شود که در (SEC)، گزینش‌گری تنها به تخلخل ذاتی مواد بستگی دارد. در نتیجه، شیمی فاز ساکن به‌گونه‌ای انتخاب می‌شود که خواص جذب سطحی آن در حداقل میزان خود باشد. بسترهای مورد استفاده در روش (SEC) متشکل از پلیمرهای طبیعی مانند آگاروز و یا دکستران هستند اما می‌توانند مخلوطی از پلیمرهای سنتزی مانند پلی آکریلامید هم باشند.

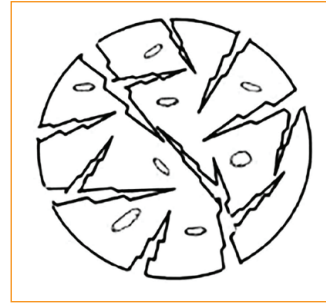
ژل‌ها را ممکن است که از طریق برقراری اتصالات عرضی به شکل شبکه‌ای سه بعدی تهیه نمود. اندازه حفرات را می‌توان با تغییر درجه اتصال عرضی به‌دست آورد. اولین بستر (SEC) تجاری، سفادکس، از برقراری اتصال عرضی میان دکستران و اپی کلروهیدرین به‌وجود آمده است. امروزه ژل‌های بسیاری به‌صورت تجاری با اندازه حفرات متنوع وجود دارند. سطح این بسترها عمدتاً حاوی گروه‌های هیدروکسیل است که محیط خوبی را برای پروتئین‌های آب‌دوست فراهم می‌آورد. اگر چه این آب‌دوستی تا حدی با ورود عوامل اتصال عرضی کننده کاهش می‌یابد. برخی پلیمرها مانند آگاروز قادر به تشکیل خود بخود ژل در شرایط غیر پروتون دهنده هستند. سیلیکاهای متخلخل با اندازه حفرات بزرگ هم در (SEC) استفاده شده‌اند اما باید با یک لایه آب‌دوست برای جلوگیری از تخریب پروتئین پوشانده شوند.

تمامی مولکول‌های بزرگ‌تر از اندازه حفره کاملاً از کانال‌های حفرات طرد می‌شوند؛ بنابراین، بازداری نشده و به همراه هم از ستون خارج می‌شوند. در نتیجه، اندازه حفرات ژل را می‌توان به‌گونه‌ای طراحی کرد که همه مولکول‌هایی که اندازه آنها بیشتر از اندازه حفرات است از ستون خارج شوند.

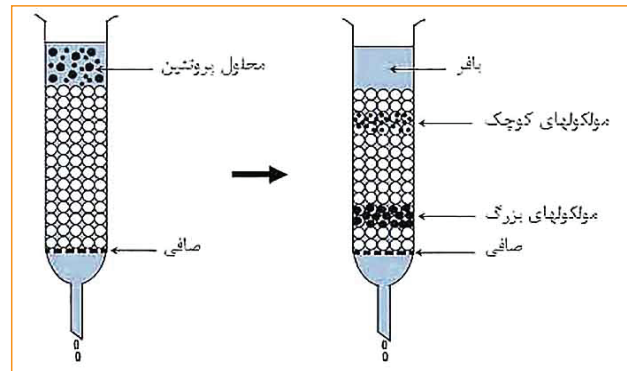
همچنین اندازه حفرات، سرعت مولکول‌هایی که وارد حفرات می‌شوند را هم تعیین می‌کنند. زمان میانگین اقامت مولکول‌ها در کانال‌ها، به اندازه و شکل مولکول‌هایی که وارد حفرات می‌شوند بستگی دارد؛ بنابراین، مولکول‌های مختلف، زمان اقامت مختلفی در ستون دارند. رزین‌ها معمولاً براساس ظرفیت جداسازی اندازه‌های مختلف یک پروتئین کروی فرضی، طبقه‌بندی می‌شوند. حد بالای، حدی است که مولکول‌های بزرگ‌تر کاملاً از کانال‌ها خارج می‌شوند و بنابراین، هیچ جداسازی رخ نمی‌دهد. حد پایینی حدی است که مولکول‌های کوچک‌تر قادرند وارد کانال‌ها شوند؛ بنابراین، مولکول‌هایی که از این حد کوچک‌تر هستند کانال دیگری برای دسترسی نداشته و به همین دلیل، هیچ گزینش‌گری میان این اندازه‌ها رخ نمی‌دهد. محدوده خطی میان این دو حد آن چیزی است که برای هر بستر گزارش می‌شود.

### ◆ فاز متحرک

برخلاف دیگر بسترها، گزینش‌گری بستر (SEC) با تغییر ترکیب فاز متحرک قابل تغییر نیست. در بهترین حالت هیچ جذب سطحی رخ نمی‌دهد و فاز متحرک را باید تنها به‌عنوان فاز حامل در نظر گرفت و نه یک عامل تأثیرگذار بر کروماتوگرافی. اگر چه نمونه ممکن است به یک محلول بافر با (pH) و قدرت یونی معین برای حفظ ساختار و فعالیت بیولوژیکی ماده موردنظر نیاز داشته باشد.



شکل ۳: مدلی که نشان‌دهنده تخلخل دانه‌های ژل آب‌دوست به کار رفته در کروماتوگرافی اندازه طردی است.



شکل ۴: جداسازی دو پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی اندازه طردی. مخلوط پروتئین‌ها در بالای ژل بارگذاری می‌شود. سپس مولکول‌های بزرگ سریع‌تر از مولکول‌های کوچک عبور می‌کنند.

### ◆ غربال مولکولی

برای جداسازی در کروماتوگرافی اندازه طردی (SEC)<sup>۱۱</sup> از خواص غربالگری مولکولی برخی بسترهای متخلخل استفاده می‌شود. بسترهای (SEC) گستره وسیعی از ذرات هستند که تفاوت اندکی در اندازه حفره خود دارند. فرآیند جداسازی به توانایی متفاوت پروتئین‌های مختلف برای ورود به تمامی، بخشی و یا هیچ کدام از کانال‌ها در ذرات متخلخل بستگی دارد. مولکول‌هایی که از ستون (SEC) عبور می‌کنند باید از یک ماز عبور نمایند که هر چه مولکول کوچک‌تر باشد این ماز پیچیده‌تر می‌شود؛ زیرا مولکول‌های کوچک، کانال‌های عبور بالقوه بیشتری در دسترس دارند. از طرف دیگر، مولکول‌های بزرگ‌تر به دلایل فضایی از کانال‌ها طرد می‌شوند و به آسانی از میان ذرات عبور می‌کنند. در نتیجه، مولکول‌های کوچک‌تر بیشتر بازداری شده و مولکول‌های بزرگ‌تر کم‌تر بازداری می‌شوند. به‌طور کلی، جداسازی در (SEC) براساس وزن مولکولی است، این ادعا که جداسازی براساس طرد و یا جذب متفاوت درون حفرات است، دقیق‌تر است. سهولت نفوذ به حجم هیدرودینامیک بستگی دارد؛ تفاوت میان حجم هیدرودینامیک و وزن مولکولی، در شکل مولکول است. پروتئین‌ها تمایل دارند تا به شکل کروی باشند در حالی که (DNA) و یا پلی ساکاریدها تمایل دارند به شکل خطی قرار گیرند. مولکول‌های خطی حجم هیدرودینامیک بزرگ‌تری از مولکول‌های کروی دارند؛ بنابراین، یک مولکول (DNA) با وزن مولکولی ۱۰/۰۰۰ سریع‌تر از پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰/۰۰۰ از ستون خارج می‌شود.

در نمونه، به‌عنوان مثال، مولکول‌های نمک با ماده بافری دیگری در حلال تبادل می‌شوند. (SEC) را می‌توان با استفاده از تعویض بافر به کار برد؛ زیرا مولکول‌های نمک با وزن مولکولی پایین به آسانی از پروتئین‌های بزرگ جدا می‌شوند. در این حالت، درجه تخلخل ژل به روشی که پروتئین‌ها را دفع کند، انتخاب می‌شود. از آنجایی که پروتئین‌ها در حجم خالی ستون<sup>۱۳</sup> وجود دارند در حالی که آلودگی‌ها یا حل شونده‌های با وزن مولکولی پایین در کانال‌های حفرات گیر افتاده‌اند، این فرآیند را در سرعت جریان‌های بالا بدون از دست دادن قدرت تفکیک می‌توان اجرا کرد. علاوه بر این، به دلیل این‌که حجم کل حفرات برای آلودگی‌های با وزن مولکولی پایین حجم بالای نمونه در دسترس است، حتی حجم‌های بالای نمونه را هم می‌توان در یک مرحله خالص‌سازی کرد. این روش سریع‌تر و کارآمدتر از دیالیز است و حتی در مقیاس‌های پایین (در حد نوک سمپلر) و یا مقیاس‌های بالا (در حد لیتر) قابل انجام است.

#### ◆ جزء به جزء سازی پروتئین

در جزء به جزء سازی تهیه‌ای، پروتئین موردنظر باید از بقیه حل شونده‌ها با اندازه مشابه جدا شود. از نقطه نظر تئوری، جداسازی کامل مولکول‌های کروی که کمتر از ۳۰ درصد در جرم مولکولی متفاوت باشند، امکان‌پذیر نیست.

#### ◆ تعیین اندازه مولکولی

حجم شویس پروتئین‌ها عمدتاً با استفاده از اندازه مولکولی آن‌ها تعیین می‌شود؛ در نتیجه، تهیه یک منحنی کالیبراسیون با پروتئین‌هایی با شکل مشابه و وزن مولکولی مشخص این امکان را فراهم می‌آورد که اندازه مولکولی دیگر پروتئین‌ها را تخمین زد. با این روش، (SEC) امکان تشخیص تفاوت در اندازه پروتئین‌های سالم و تخریب شده را هم می‌دهد.

#### ◆ راهبرد شویس

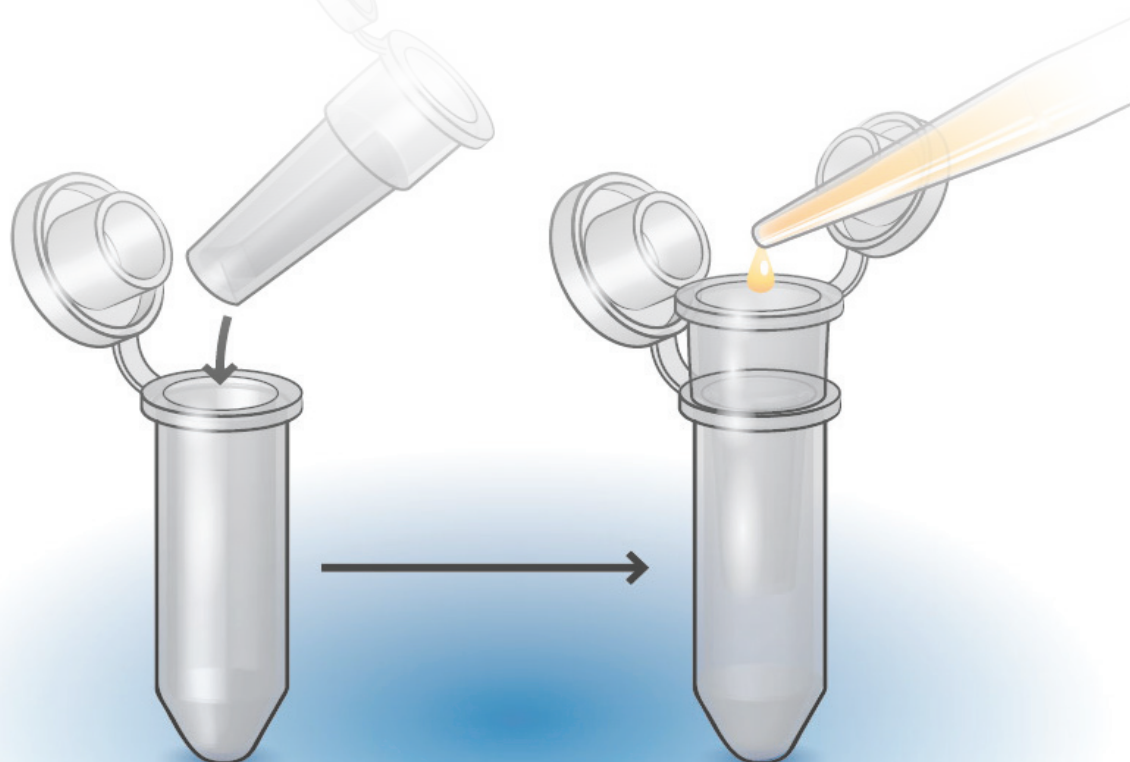
از آنجایی که مولکول‌ها در ستون (SEC) جذب سطحی نشده و فقط بازداری می‌شوند، پروتئین‌ها به روش ایزو کراتیک شسته شده و به ترتیب بزرگی (بزرگ‌ترین مولکول در ابتدا) از ستون خارج می‌شوند. در این سیستم یک تک بافر استفاده می‌شود که به معنای آن است که نیازی به استفاده از پمپ گرادیان نیست. روش جداسازی (SEC) حداقل جداسازی با کم‌ترین ظرفیت و بالاترین میزان دقت نمونه را در میان دیگر روش‌های کروماتوگرافی به‌دست می‌دهد. همچنین به‌دلیل سهولت اجرای آن و برخی مشخصاتی که در دیگر روش‌ها دیده نمی‌شود این روش، متداول‌ترین روش است. مزیت اساسی (SEC)، عدم برهم‌کنش بستر کروماتوگرافی با نمونه است که باعث بالاترین درجه حفظ خواص بیولوژیکی آن می‌شود. علاوه بر این، از آنجایی که جداسازی به خواص جذب سطحی مولکول بستگی ندارد، (SEC) روشی برای جداسازی مالتیم‌رهایی که با استفاده از دیگر روش‌های کروماتوگرافی قابل جداسازی نیستند، فراهم می‌آورد. زمانی که نمونه وارد ستون می‌شود، جداسازی به‌صورت مستقیم آغاز شده و به همین دلیل، مقطع عرضی باید به حد کافی برای حجم نمونه موردنظر بزرگ باشد. اگر چه طول ستون هم عامل مهمی است؛ زیرا بر درجه تفکیک و زمان فرآیند تأثیرگذار است. در نتیجه (SEC)، به‌عنوان مرحله نهایی که حجم نمونه کاهش یافته است مورد استفاده قرار می‌گیرد.

#### ◆ کاربردها

کروماتوگرافی اندازه طردی کاربرد وسیعی در تخلیص پروتئین چه به روش تجزیه‌ای و چه تهیه‌ای دارد. (SEC) تهیه‌ای را می‌توان به دو دسته تعویض بافر و جزء به جزء سازی<sup>۱۲</sup> تقسیم‌بندی نمود. تخلخل بستر براساس هدف موردنظر انتخاب می‌شود.

#### ◆ تعویض بافر

تعویض بافر حالتی است که ترکیبات با وزن مولکولی پایین





## پی‌نوشت

۱. دکتری شیمی آلی، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا
۲. دکتری شیمی آلی، گروه مهندسی فرآیند، پژوهشکده زیست‌فناوری صنعت و محیط‌زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران
۳. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۴. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌نانو
5. Macro porous.
6. Spacer Arm
7. Cyanogen bromide (CNBr)
8. Sulfhydryl
9. Gel filtration
10. Gel permeation
11. Size Exclusion Chromatography (SEC)
12. Fractionation
13. Void Volume

## نتیجه‌گیری

در این مقاله به بحث در مورد دو نوع از متداول‌ترین روش‌ها برای تخلیص پروتئین‌ها، کروماتوگرافی میل ترکیبی و کروماتوگرافی اندازه‌طردی پرداخته شد. در مورد هر روش به ویژگی‌های کلی، خواص فاز ساکن به فاز متحرک و کاربردهای آن اشاره شد. کروماتوگرافی میل ترکیبی از جمله ویژه‌ترین انواع کروماتوگرافی است؛ اما فاز ساکن آن بسیار گران است و اتصال برای یک مولکول خاص و یا یک دسته مولکول خاص برقرار می‌شود. در کروماتوگرافی میل ترکیبی، اغلب از ستون‌های کوچک و سیستم‌های ساده استفاده می‌شود. اصول جداسازی کروماتوگرافی اندازه‌طردی، نفوذ مولکول‌ها به درون حفرات دانه‌ها است. مولکول‌های بزرگ قادر به نفوذ در حفرات نیستند در صورتی که مولکول‌های کوچک‌تر به درون حفرات نفوذ می‌کنند. از آنجا که حفرات، اندازه‌های مختلف دارند، مولکول‌ها براساس جرم مولکولی‌شان از هم جدا می‌شوند.

## مراجع

- [1] Roe, S., Protein Purification Techniques, Oxford University Press, Oxford (2001).
- [2] Scopes, R., Protein Purification, Principle and Practice, Springer-Verlag, New York (1994).
- [3] Simpson, R. J., Proteins and Proteomics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2003).
- [4] Sofer, G., Preparative chromatographic separations in pharmaceutical, diagnostic, and Biotechnology industries: current and future trends, J Chromatogr A, 707, 23 (1995).
- [5] Sofer, G., Hagel, L., Handbook of Process Chromatography: A Guide to ptimization, Scale-up and Validation, Academic Press, San Diego (1997).
- [6] Stulik, K., Pacakova, V., and Ticha, M., Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography, J Biochem Biophys Methods, 56, 1 (2003).
- [7] Wilson, K., Walker, J, Principles and Techniques of Practical Biochemistry, Cambridge University Press.
- [8] Porath, J., from gel filtration to adsorptive size exclusion, J Protein Chem, 16, 463 (1997).

## نویسندگان

سمانه غفرانی<sup>۴۱\*</sup>مریم علیزاده ذوالبین<sup>۴۲</sup>معصومه معدنی پور<sup>۴۳</sup>

Samaneh\_ghofrani@yahoo.com



## بررسی انواع پوشش‌های رسانا به منظور تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی

### چکیده

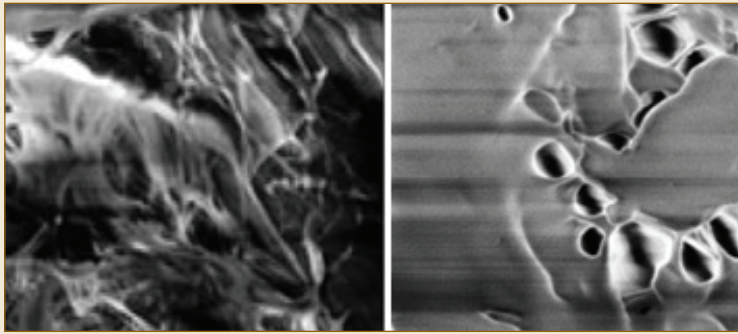
امروزه مطالعه درباره خواص مواد بدون آگاهی از اطلاعات مربوط به ریزساختار آن‌ها امکان‌پذیر نیست. به منظور دستیابی به این مهم، استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۵</sup> بسیار رایج و حائز اهمیت است. با توجه به ضرورت به کارگیری باریکه الکترونی برای تصویربرداری در این میکروسکوپ‌ها و همچنین با در نظر گرفتن این مسئله که طیف گسترده‌ای از مواد هدایت الکتریکی مناسبی ندارند، استفاده از این میکروسکوپ باعث بروز مشکلاتی برای رسیدن به نتایج مطلوب می‌شود. برای این منظور، استفاده از پوشش هادی روی سطح نمونه‌های نیمه‌رسانا و نارسانا به‌عنوان بهترین راهکار ارائه شده‌است که به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مقاله ابتدا به انواع پوشش‌های استفاده شده روی نمونه‌های مورد بررسی در میکروسکوپ الکترونی روبشی اشاره می‌شود و در ادامه نیز، به دلایل استفاده از هر یک از آن‌ها و انواع روش‌های پوشش‌دهی خواهیم پرداخت.

### واژه‌های کلیدی

میکروسکوپ الکترونی روبشی، پوشش، هدایت الکتریکی.

### مقدمه

در میکروسکوپ الکترونی روبشی، بررسی نمونه با استفاده از باریکه الکترونی انجام می‌شود. در برخورد باریکه الکترونی با سطح نمونه مورد نظر، الکترون‌ها قسمت اعظم انرژی خود را از دست داده و به‌وسیله نمونه جذب می‌شوند. حال اگر نمونه مورد نظر هادی باشد، جریان الکترون‌ها از نمونه به جانمونه‌ای منتقل شده و پدیده روبش الکترونی به سادگی صورت می‌پذیرد؛ اما اگر نمونه نیمه‌رسانا یا نارسانا باشد، الکترون‌ها روی سطح نمونه جمع شده و پدیده شارژ الکتریکی رخ خواهد داد. در پدیده شارژ الکتریکی با تجمع الکترون‌ها روی سطح نمونه، باریکه الکترونی هنگام روبش دچار جابه‌جایی و انحراف شده و در نتیجه، تصاویر به‌دست آمده بسیار نامطلوب و بی‌کیفیت خواهند بود. معمولاً پدیده شارژ الکتریکی به شکل منطقه بسیار روشن در تصویر دیده می‌شود و در اغلب موارد، مانع از تصویربرداری مطلوب خواهد شد [۱ و ۲]. در شکل (۱) تصویر مربوط به نمونه‌ای که پدیده شارژ الکتریکی در آن اتفاق افتاده است، دیده می‌شود.



شکل ۱: تصاویر مربوط به تجمع الکترون‌ها روی سطح نمونه که منجر به پدیده شارژ الکتریکی شده و به شکل مناطق روشن در تصویر دیده می‌شود.

با در نظر گرفتن این مهم، نمونه‌های مورد استفاده در میکروسکوپ الکترونی روبشی باید هادی باشند تا از تجمع الکترون‌ها روی سطح آن‌ها ممانعت به عمل آید. در مورد بررسی نمونه‌های نیمه‌رسانا و یا نارسانا مانند نمونه‌های سرامیکی، پلیمری و نمونه‌های زیستی که در برخورد با باریکه الکترونی، الکترون‌ها روی سطح آن‌ها جمع شده و منجر به ایجاد پدیده شارژ الکتریکی می‌شود، بهترین راه حل ارائه شده، اعمال یک پوشش هادی بسیار نازک روی سطح نمونه است [۳ و ۱].

انواع پوشش‌های رایج، با توجه به نتیجه مورد نیاز، به شکل خلاصه آورده شده است [۳].

جدول ۱: انواع پوشش‌های متداول و موارد استفاده آن‌ها [۳]

عنوان	کاربرد
طلا، پلاتین، طلا-پالادیوم	تصاویر الکترون‌های ثانویه
کربن	تصاویر الکترون‌های برگشتی
کربن، آلومینیوم، طلا	آنالیز عنصری
کربن	الگوی کانال‌زنی

### انواع روش‌های پوشش‌دهی

یکی از مهم‌ترین نکات مورد توجه در مورد اعمال پوشش مناسب روی سطح نمونه‌های نیمه‌رسانا و نارسانا، مقدار ضخامت پوشش اعمالی است که رابطه مستقیمی با روش پوشش‌دهی دارد. ضخامت لایه پوشش اعمالی باید تنها به اندازه‌ای باشد که بتواند یک مسیر هادی مناسب برای جریان الکترون‌ها ایجاد کند. از طرف دیگر، پوشش اعمالی باید به اندازه‌ای نازک باشد که باعث تیره شدن و ناپدید شدن جزئیات مربوط به توپوگرافی سطح نمونه نشود. معمولاً از دو روش، پوشش‌دهی به روش کندوپاش<sup>۸</sup> و پوشش‌دهی به روش تبخیر تحت خلأ<sup>۹</sup> برای پوشش‌دهی نمونه‌های مورد بررسی

### انواع پوشش‌های اعمالی روی سطح نمونه

پوشش‌های متداول مورد استفاده روی سطح نمونه‌های نیمه‌رسانا و نارسانا به‌طور معمول شامل طلا، طلا/پالادیوم، پلاتین و یا کربن هستند. انتخاب نوع پوشش اعمالی به جنس نمونه و نوع اطلاعاتی که از نمونه مورد نیاز است، بستگی دارد. از نکات مهم برای انتخاب ماده پوشش اعمالی می‌توان به دارا بودن هدایت الکتریکی مناسب، سرعت انتشار الکترون‌های ثانویه مناسب، پایداری شیمیایی و قیمت مناسب آن اشاره کرد. لازم به ذکر است که در موارد بسیار خاص و با توجه به نتایج درخواستی از نمونه، از پوشش‌های کروم، مس، آلومینیوم و انواع فلزات دیرگداز نظیر تنگستن و تانتالیوم نیز می‌توان به‌عنوان پوشش هادی روی سطح نمونه‌ها استفاده نمود [۴].

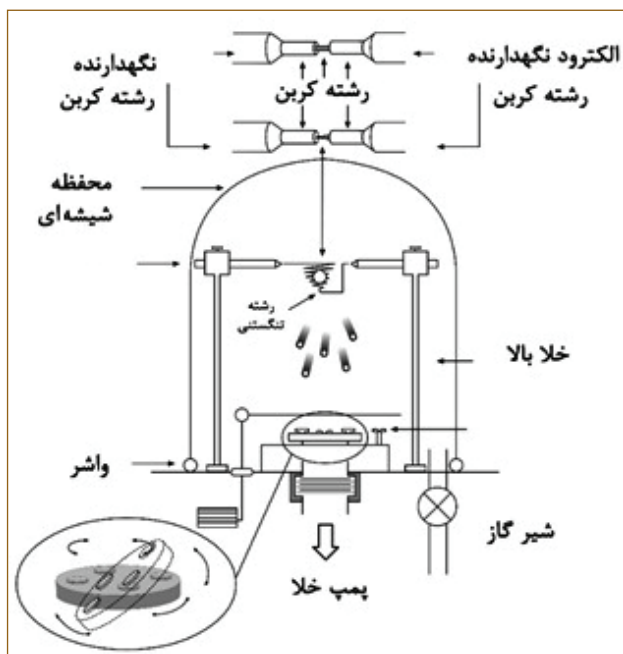
به‌طور کلی، برای بررسی توپوگرافی سطح نمونه، از پوشش طلا و یا طلا/پالادیوم استفاده می‌شود، زیرا ضریب برگشتی الکترونی عنصر طلا بیشتر از بقیه عناصر بوده و کیفیت تصاویر به‌دست آمده مطلوب‌تر خواهد بود. از طرف دیگر، ذرات طلا به‌طور کامل ریزدانه بوده و به شکل همگن‌تری روی سطح نمونه می‌نشینند. در مورد نتایج مربوط به آنالیز شیمیایی نمونه، عنصر طلا بیشترین هم‌پوشانی را با عناصری نظیر فسفر و گوگرد دارد و از طرفی باعث کاهش دقت مربوط به درصد عناصر موجود در نمونه می‌شود؛ بنابراین، معمولاً برای نمونه‌هایی که نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی آن‌ها مورد نیاز است، پوشش کربن به پوشش طلا ترجیح داده می‌شود که علت آن، عدد اتمی کم عنصر کربن است و کمترین تأثیر را روی طیف اشعه ایکس خواهد داشت. در جدول (۱) موارد استفاده هر یک از



شده با یک ضخامت معین، در دستگاه کندوپاش قرار می‌گیرند که پس از پایان مدت زمان مصرف آن‌ها، باید تعویض شوند.

### روش تبخیر تحت خلأ

در روش تبخیر تحت خلأ، هدف مبدأ (معمولاً کربن)، در محیط خلأ، به اندازه‌ای گرم می‌شود که اتم‌های هدف تبخیر شده و روی نمونه مقصد می‌نشینند (شکل ۳). با استفاده از این روش، در مقایسه با روش کندوپاش، نمونه‌ها کمتر گرم شده که در نتیجه، لایه با دانه‌های ریزتری خواهیم داشت اما کنترل ضخامت لایه مشکل‌تر و زمان‌بر بوده و لایه تشکیل شده ناهمگن‌تر خواهد بود [۴]. از این روش معمولاً برای پوشش‌دهی کربن استفاده می‌شود که در آن، هدف کربن به شکل رشته‌ای است که پس از یک بار استفاده، قابل استفاده مجدد نبوده و باید تعویض شود. در شکل (۳) نمای کلی مربوط به روش تبخیر تحت خلأ نشان داده شده‌است.

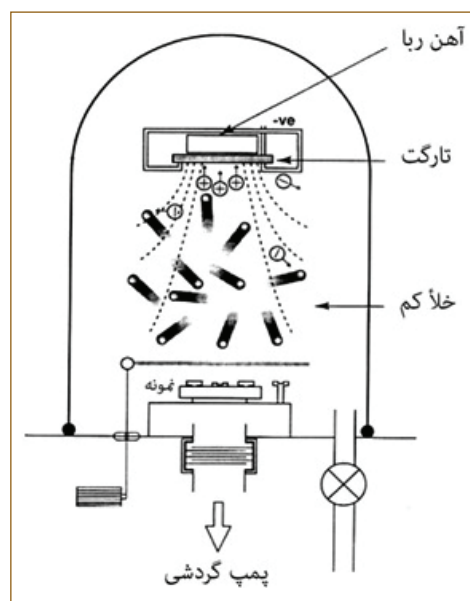


شکل ۳: تصویر مربوط به سازوکار پوشش‌دهی به روش تبخیر تحت خلأ [۴].

در دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده می‌شود که در ادامه به شرح هر یک از آن‌ها خواهیم پرداخت [۵و۶].

### روش کندوپاش

در روش کندوپاش، اتم‌های هدف که از شمش خالص (طلا، پالادیم، پلاتین و غیره) به وسیله پلاسمای تشکیل شده از یک گاز خنثی (معمولاً آرگون) بمباران شده و به این ترتیب، اتم‌های هدف مبدأ برای مثال طلا که به عنوان کاتد عمل می‌کنند، کنده شده و روی سطح نمونه می‌نشینند (شکل ۲). به دلیل این که روش کندوپاش بسیار سریع و آسان بوده و پوشش نسبتاً همگن‌تری را ارائه می‌دهد، متداول‌ترین روش پوشش‌دهی نمونه، برای استفاده در میکروسکوپ الکترونی روبشی به شمار می‌رود.



شکل ۲: چگونگی عملکرد دستگاه کندوپاش [۴].

در این روش، ضخامت پوشش اعمالی با سه عامل جریان، زمان و فاصله نمونه از هدف، قابل کنترل است و به‌طور معمول از یک نمودار جریان بر حسب زمان، برای تنظیم مقدار ضخامت لایه استفاده می‌شود. کنترل ضخامت مورد نیاز در این روش، در مقایسه با روش تبخیر الکتریکی، دارای دقت بیشتری بوده اما دارای معایبی همچون گرم شدن نسبی نمونه و درشت دانه شدن لایه است.

در این روش، از هدف‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود اما هدف طلا/پالادیم بهترین انتخاب برای مصارف عادی است. معمولاً برای کار در بزرگنمایی‌های کم (۵ تا ۱۰ هزار برابر) هدف طلای خالص، در بزرگنمایی‌های متوسط (۱۰ تا ۵۰ هزار برابر) هدف طلا/پلاتین و در بزرگنمایی‌های بالای ۵۰ هزار برابر، هدف پلاتین مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴].

به‌منظور دستیابی به حد تفکیک بسیار بالا که در آن‌ها ضخامت لایه پوشش باید ناچیز بوده و اندازه ذرات خیلی کوچک باشند، می‌توان از هدف پلاتین، کروم و یا یکی از فلزات دیرگداز نظیر تنگستن یا تانتالیوم استفاده کرد. لازم به ذکر است که هدف‌های فلزی همچون طلا، طلا/پالادیم و پلاتین به شکل صفحه نازک نورد

### نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب ذکر شده درباره اعمال پوشش هادی روی نمونه‌های مورد بررسی در میکروسکوپ الکترونی روبشی، می‌توان نتیجه گرفت که جنس پوشش مصرفی به میزان زیادی به جنس نمونه و نوع اطلاعاتی که از آن مورد نیاز است، بستگی دارد و همچنین به کارگیری هر یک از این دو روش متداول برای پوشش‌دهی (کندوپاش و تبخیر خلأ) مزایا و معایبی نیز به همراه دارد که مهم‌ترین تفاوت آن‌ها، قابل کنترل بودن ضخامت لایه پوشش داده شده به وسیله روش کندوپاش و ریزدانه‌تر بودن لایه به روش تبخیر تحت خلأ است.

## پی‌نوشت

۱. کارشناس ارشد مهندسی مواد و سرامیک، پژوهشگاه مواد و انرژی
۲. کارشناس ارشد مهندسی مواد و متالورژی، پژوهشگاه مواد و انرژی
۳. کارشناس ارشد مهندسی مواد و متالورژی، مرکز تحقیقات فرآوری مواد معدنی ایران
۴. عضو کارگروه تخصصی میکروسکوپ الکترونی روبشی شبکه آزمایشگاهی

5. scanning electron microscope (SEM)
6. Charging
7. Sputtering
8. Vacuum Evaporation

## مراجع

- [1] Goldstein, J. "Scanning Electron Microscopy & X-Ray Microanalysis" Third Edition, Kluwer academic/Plenum Publishers, New York Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2003.
- [2] "Scanning Electron Microscope A to Z", JEOL serving advanced technology.
- [3] SEM Q & A, JEOL serving advanced technology.
- [4] Echim, P. "Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy & X-Ray Microanalysis" Cambridge Analytical Microscopy, UK, 2009.
- [5] Zhou, W. "Scanning Microscopy for Nanotechnology Techniques & Applications", University of New Orleans, 2006.
- [6] Invitation to the SEM words, JEOL serving advanced technology.

## Authors

Samaneh ghofrani<sup>1,4\*</sup>Maryam Alizadeh Zolbin<sup>2,4</sup>Masumeh Madanipour<sup>3,4</sup>

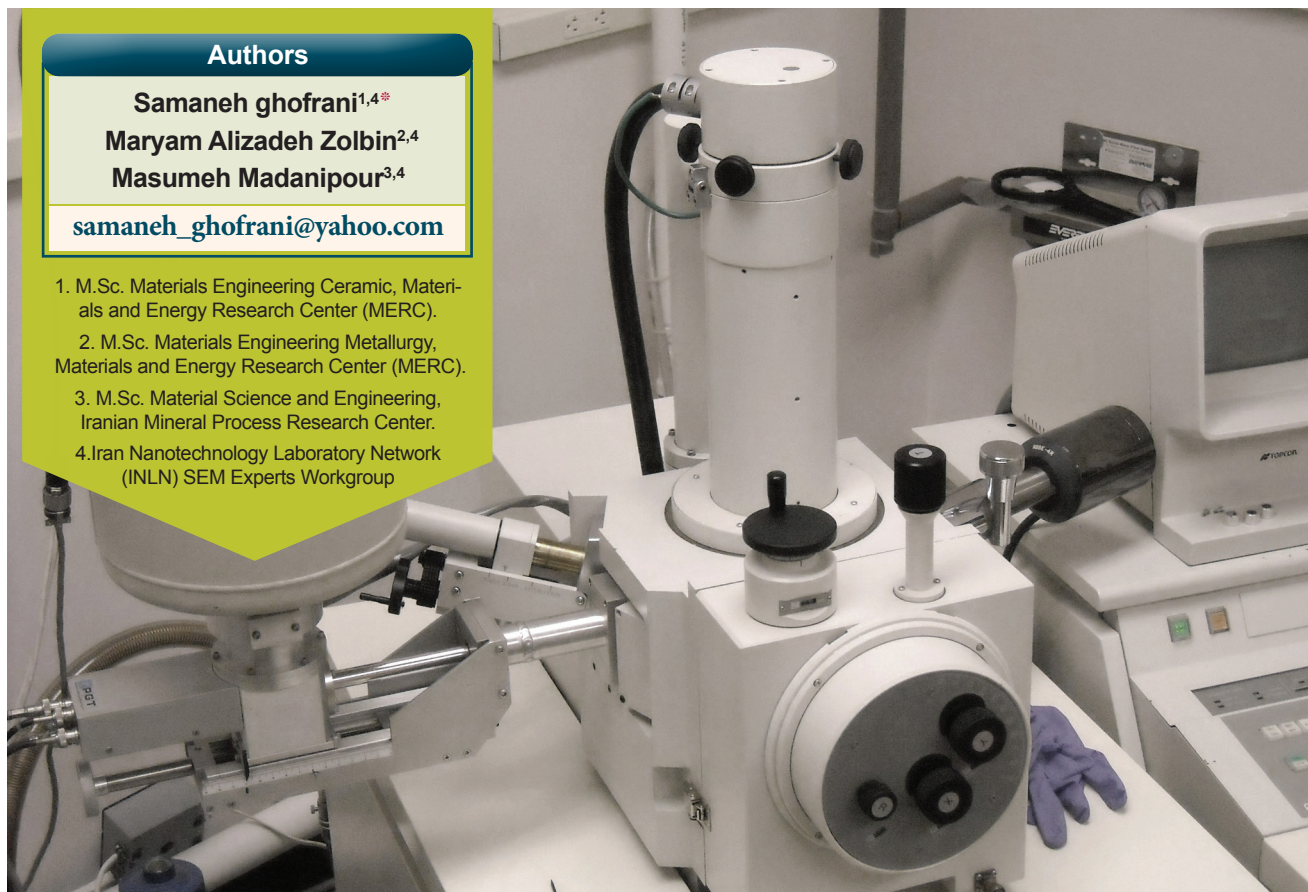
samaneh\_ghofrani@yahoo.com

1. M.Sc. Materials Engineering Ceramic, Materials and Energy Research Center (MERC).

2. M.Sc. Materials Engineering Metallurgy, Materials and Energy Research Center (MERC).

3. M.Sc. Material Science and Engineering, Iranian Mineral Process Research Center.

4. Iran Nanotechnology Laboratory Network (INLN) SEM Experts Workgroup



## Study of Conductive Coatings for Imaging with Scanning Electron Microscope

### Abstract

Studying of the materials properties is impossible without knowing the details of microstructures. In order to achieve this, using a scanning electron microscope (SEM) is very common and important. Due to the necessity of using electron beam in these microscopes and considering the fact that a wide variety of materials don't have a good electrical conductivity, obtaining desired results with this microscope have some problems. For this purpose, a conductive coating on the surface of the non-conductive samples is applied, which is widely used.

This article is an attempt to introduce a variety of coatings used on the samples in scanning electron microscope and the reasons we use them and then different techniques of coating will be discussed.

### Keywords

Scanning electron microscope, coating, electrical conductivity.



# Chromatographic methods for protein purification

(Part 2)

## Authors

Maryam Yousefi<sup>1,4\*</sup>  
Mehdi Mohammadi<sup>2</sup>  
Mahmoud Naderi<sup>3,4</sup>

[m.yousefi@avicenna.ac.ir](mailto:m.yousefi@avicenna.ac.ir)

1. Organic Chemistry Ph.D, Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, Academic Center for Education, Culture and Research.

Email: 2. Organic Chemistry Ph.D, Bioprocess Engineering Department, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology (IIEB), Tehran, Iran

3.M.Sc. Organic Chemistry, Medicinal Plants Department, Research Institute of Forests and Rangelands

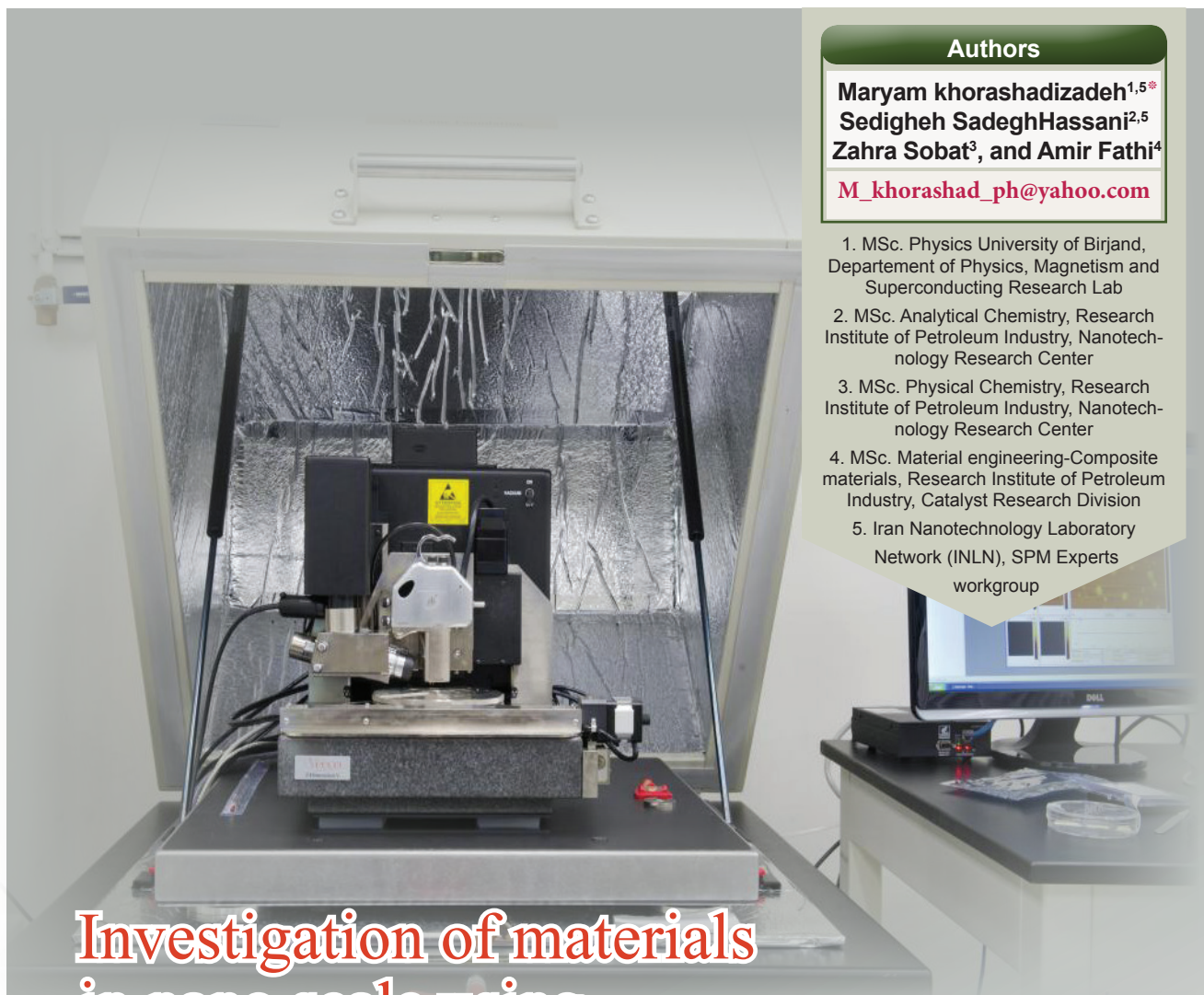
4. Iran nanotechnology laboratory network chromatography Experts Workgroup

## Abstract

The science, art, and practice of protein purification have been with us for more than a century. For purification of a specific a specific protein from a crude mixture the physical and/or chemical properties of the individual protein must be utilized. There is no single or simple way to purify all kinds of proteins. Procedures and conditions used in the purification process of one protein may result in the inactivation of another. In this article, two types of conventional chromatographic methods, affinity chromatography and size exclusion chromatography are investigated; the advantages, disadvantages and the limitations of each method are discussed.

## Keywords

Chromatography, Protein, Affinity Chromatography, Size Exclusion Chromatography.



### Authors

Maryam khorashadzadeh<sup>1,5\*</sup>  
Sedigheh SadeghHassani<sup>2,5</sup>  
Zahra Sobat<sup>3</sup>, and Amir Fathi<sup>4</sup>

[M\\_khorashad\\_ph@yahoo.com](mailto:M_khorashad_ph@yahoo.com)

1. MSc. Physics University of Birjand, Department of Physics, Magnetism and Superconducting Research Lab
2. MSc. Analytical Chemistry, Research Institute of Petroleum Industry, Nanotechnology Research Center
3. MSc. Physical Chemistry, Research Institute of Petroleum Industry, Nanotechnology Research Center
4. MSc. Material engineering-Composite materials, Research Institute of Petroleum Industry, Catalyst Research Division
5. Iran Nanotechnology Laboratory Network (INLN), SPM Experts workgroup

## Investigation of materials in nano scale using Scanning Capacitance Microscopy

### Abstract

Scanning Capacitance Microscope (SCM) is kind of scanning probe microscope in which a thin electrode probe scan across the sample surface. In this way, the sample surface is characterized by data obtained from changing electrostatic capacitance between surface and probe.

Scanning Capacitance Microscopy is non-destructive method and used to characterize and describe the semiconductors. One of the commercial applications of SCM is imaging the dopant in semiconductors. This microscope can also be used to to measure charge carrier density in nano-meter scale. The ability of SCM to image charge distribution with high resolution and sensitivity cause that this is known as a valuable method to identify nano-materials.

### Keywords

Scanning Capacitance Microscopy, semiconductors, non-destructive and Electrostatic capacity.

## Authors

Davoud Gharailou<sup>1\*</sup>Sasan Moraddeh<sup>2</sup>[davoud.gharailou@gmail.com](mailto:davoud.gharailou@gmail.com)

1. MSc NanoTechnology, KEFA nanolaboratory Complex

2. MSc Material Eng, KEFA nanolaboratory Complex



# Determination of molecular weight by Dynamic Light Scattering (DLS)

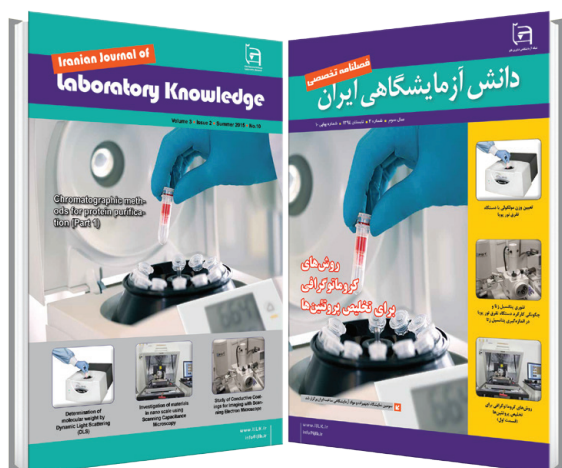
## Keywords

Dynamic Light Scattering, molecular weight, DLS

## Abstract

DLS is a fast and simple tool to identify molecular weight. This instrument can be used to determine the molecular weight from the hydrodynamic radius for various types of specimens. It is possible to perform static light scattering as well with the software by measuring at several manually prepared concentrations. There is also a single-angle Debye Calculator that allows mathematical correction for angular effects. Typically the molecular weight measurements are performed using glass or quartz cuvettes due to their superior optical quality over plastic, and toluene are often selected as a standard sample and polystyrene will not hold up to toluene for a longer time.





# Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Volume 3 ■ Issue 2 ■ Summer 2015 ■ No. 10

**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:

Davoud Gharailou, Sasan Moraddeh, Maryam khorashadizadeh, Sedigheh SadeghHassani, Zahra Sobat, Amir Fathi, Maryam Yousefi, Mehdi Mohammadi, Mahmoud Naderi, Samaneh ghofrani, Maryam Alizadeh Zolbein, Masumeh Madanipour

**Designer :** Simin Rafipour Langroudi

**Editors:** Zeinab Zarincheh, Sedigheh SadeghHassani

Iran, Tehran, Po.Box: 14565-344

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

**Email :** journal@nanolab.ir



Iran Nanotechnology  
Laboratory Network

## Contents

**Study of Conductive Coatings for Imaging with Scanning Electron Microscope**

38 <

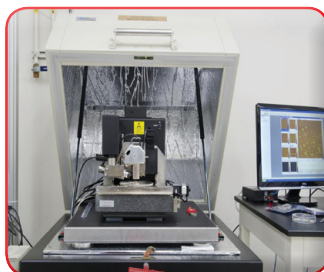


**Chromatographic methods for protein purification (Part 2)**

>39


**Investigation of materials in nano scale using Scanning Capacitance Microscopy**

40 <



**Determination of molecular weight by Dynamic Light Scattering (DLS)**

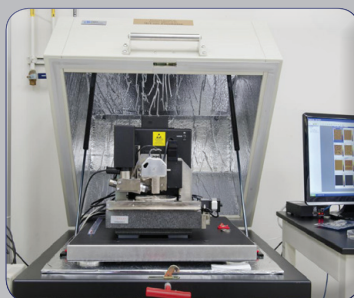
>41



## Chromatographic methods for protein purification (Part 2)



**Determination of molecular weight by Dynamic Light Scattering (DLS)**



**Investigation of materials in nano scale using Scanning Capacitance Microscopy**



**Study of Conductive Coatings for Imaging with Scanning Electron Microscope**