

نویسندگان

داود قرایلو^{۱*}پیام آزادی^۲

Davoud.Gharailou@gmail.com*

ارایه دو روش برای کالیبراسیون دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری

چکیده

با توسعه فناوری‌های مربوط به تصویربرداری، دستگاه‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری^۱ بهبود زیادی پیدا کرده‌اند با این حال، کنترل کالیبراسیون این تجهیزات، امری مهم است به طوری که باید درستی بزرگنمایی دستگاه ارزیابی شود. این موضوع باید همیشه مورد نظر باشد که بزرگنمایی میکروسکوپ الکترونی عبوری به مرور تغییر می‌کند. بنابراین، کالیبراسیون موضوعی مهم در تصویربرداری است. در این مقاله دو روش مختلف برای کالیبراسیون دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری ارائه شده‌است و در ادامه تحلیل‌هایی درباره عدم قطعیت دستگاه مطرح می‌شود.

واژه‌های کلیدی

کالیبراسیون، میکروسکوپ الکترونی عبوری، کالیبراسیون بزرگنمایی، عدم قطعیت

مقدمه

میکروسکوپ الکترونی عبوری را می‌توان از نقطه نظر قدرت تفکیک و بزرگنمایی، قوی‌ترین میکروسکوپ در دنیای علم دانست؛ همین جایگاه ویژه، موجب شده تا اطمینان از نتایج آن برای کاربر اهمیت زیادی پیدا کند. کالیبراسیون برای ایجاد اطمینان بیشتر از نتایج این دستگاه بسیار ضروری بوده و باید به صورت دوره‌ای انجام شود. از این رو در این مقاله تلاش شده تا روش مناسب برای کالیبراسیون و همچنین تعیین عدم قطعیت با استفاده از این ابزار مورد بررسی قرار گیرد. در ابتدا نیاز است تا برخی مفاهیم کلیدی در بحث کالیبراسیون و عدم قطعیت مورد معرفی شود.

هستند که در اندازه‌گیری‌ها به صورت غیر قابل پیش‌بینی تغییر می‌کند. از آنجا که تعداد اندازه‌گیری‌هایی که می‌توان انجام داد محدود است خطای تصادفی را فقط با تخمین می‌توان تعیین نمود. از سویی امکان حذف خطاهای تصادفی وجود ندارد بلکه می‌توان با انجام تدابیری، میزان آن را به حداقل رساند. خطاهای سیستماتیک، خطاهایی هستند که در اندازه‌گیری‌ها به طور معمول ثابت بوده و یا قابل پیش‌بینی هستند. این خطا قابل کمی شدن بوده و حتی با استفاده از یک ضریب می‌توان آنها را اصلاح کرد. دقت^۲ به معنای نزدیک بودن مقادیر اندازه‌گیری به همدیگر است، خواه این مقادیر واقعیت را نشان بدهد یا خیر. صحت^۳ به معنای

اندازه‌گیری به مجموعه عملیاتی گفته می‌شود که به منظور تعیین مقدار یک کمیت انجام می‌گیرد. اندازه‌گیری درباره یک ویژگی از چیزی، اطلاعاتی ارائه می‌کند که همواره با استفاده از یک نوع وسیله انجام می‌شود مانند خط‌کش، کرومومتر، ترازو و ترمومتر. نتیجه اندازه‌گیری به طور معمول در دو قسمت ارائه می‌شود: یک عدد و یک واحد اندازه‌گیری.

هیچ اندازه‌گیری عاری از خطا نیست، در واقع می‌توان گفت که خطا جزء جدایی‌ناپذیر اندازه‌گیری محسوب می‌شود. شناخت این خطا به کاربر درباره قضاوت صحیح پیرامون نتیجه آزمون کمک شایانی می‌کند. خطاهای تصادفی جزئی از خطای اندازه‌گیری

که آن را استفاده می‌کند بتواند قابلیت اطمینان آن را ارزیابی کند. بدون این اطلاعات نتایج اندازه‌گیری را نمی‌توان با یکدیگر مقایسه نمود. بنابراین، بعد از بدست آوردن عدم قطعیت باید در گزارش نهایی، نتیجه آزمون را به صورت زیر گزارش نمود:

مقدار اندازه‌گیری شده \pm عدم قطعیت

▣ کالیبراسیون بزرگنمایی TEM با رپلیکا و نانوذرات لاتکس:

برای کالیبراسیون بزرگنمایی دستگاه TEM می‌توان از چند روش مختلف استفاده کرد: استفاده از رپلیکا^۱، استفاده از نانوذرات با ابعاد مشخص.

رپلیکا: اولین روش، استفاده از نمونه استاندارد رپلیکا است. این نمونه‌ها دارای خطوط و شبکه‌هایی هستند که فاصله موجود میان آنها از پیش مشخص شده‌است. برای مثال، یکی از نمونه استاندارد های رپلیکای موجود در بازار دارای ۲۱۶۰ خط در هر میلیمتر است. از روی این عدد می‌توان فاصله میان دو خط را به طور دقیق مشخص کرد. با مشخص شدن فاصله میان دو خط، امکان کالیبراسیون بزرگنمایی وجود خواهد داشت. در این روش، ابتدا در کمترین بزرگنمایی، از نمونه استاندارد تصویر گرفته می‌شود. سپس بزرگنمایی افزایش داده شده و تصاویر جدید از نمونه استاندارد در بزرگنمایی فعلی گرفته می‌شود. این کار در بزرگنمایی‌های مختلف تکرار و در هر بزرگنمایی تصاویر مختلفی از نمونه استاندارد گرفته می‌شود. برای کالیبراسیون دستگاه باید با استفاده از یک نرم‌افزار پردازشگر تصویر فاصله میان دو خط اندازه‌گیری شود. این اندازه برحسب پیکسل خواهد بود. همان‌طور که در شکل (۱) نشان داده شده، فاصله بین دو خط (با حرف A) بر حسب پیکسل است. فرض کنید این فاصله ۱۰۰۰ پیکسل بوده و از سویی با محاسبه تعداد خط‌های موجود روی نمونه استاندارد، فاصله دو خط از هم ۵۰۰ نانومتر باشد. در این صورت می‌توان با استفاده از نمونه نرم‌افزار، یک خط مقیاس کنار تصویر به طول ۱۰۰۰ پیکسل کشید و روی آن عدد ۵۰۰ نانومتر را درج کرد. این بدان معناست که هر دو نقطه روی تصویر که از هم ۱۰۰۰ پیکسل فاصله داشته باشند، در واقع در فاصله ۵۰۰ نانومتری هم قرار دارند. لازم به ذکر است که این کار باید در تمام بزرگنمایی‌ها انجام شود؛ به این معنا که این رابطه (هر ۱۰۰۰ پیکسل = ۵۰۰ نانومتر) فقط در بزرگنمایی‌ها مربوط به همان تصویر صادق است و برای دیگر بزرگنمایی‌ها مصداق ندارد و برای آنها باید این رابطه بدست آید. در پایان کار به ازای هر بزرگنمایی، یک رابطه (هر A پیکسل = B نانومتر) بدست خواهد آمد. بهتر است این رابطه در نرم‌افزار دستگاه TEM وارد شود تا به صورت خودکار بعد از گرفتن هر تصویر، خود نرم‌افزار مقدار خط مقیاس را زیر تصویر مشخص کند. لازم به ذکر است که با هر بار تعمیر دستگاه، لازم است این فرآیند تکرار یا کنترل شود.

نزدیکی مقادیر اندازه‌گیری شده به مقدار واقعی است. دقت فقط به توزیع خطاهای تصادفی بستگی دارد و ارتباطی به مقدار واقعی یا مقدار مشخص شده، ندارد. صحت خطای سیستماتیک کل است که امکان دارد از یک یا چند مؤلفه خطای سیستماتیک تشکیل شده باشد. انحراف استاندارد یکی از شاخص‌های پراکندگی است که نشان می‌دهد به‌طور میانگین، داده‌ها چه مقدار از مقدار متوسط فاصله دارند. اگر انحراف معیار مجموعه‌ای از داده‌ها نزدیک به صفر باشد، نشانه آن است که داده‌ها نزدیک به میانگین هستند و پراکندگی اندکی دارند؛ در حالی که انحراف معیار بزرگ بیانگر پراکندگی قابل توجه داده‌ها است. انحراف معیار برابر با ریشه دوم واریانس بوده و مزیت آن نسبت به واریانس، هم بعد بودن آن با داده‌ها است (واریانس با میانگین‌گیری از مربع فاصله مقدار محتمل و یا مشاهده شده با مقدار مورد انتظار محاسبه می‌شود). انحراف معیار برای تعیین ضریب اطمینان در تحلیل‌های آماری نیز به کار می‌رود. در مطالعات علمی به‌طور معمول، داده‌های با انحراف معیار بیشتر از دو، به‌عنوان داده‌های پرت در نظر گرفته و از تحلیل خارج می‌شوند. برای بدست آوردن انحراف معیار از رابطه ۱ استفاده می‌شود:

$$s(q_k) = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}$$

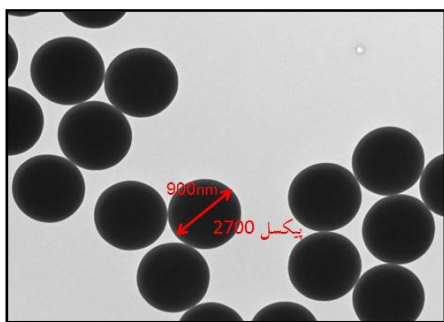
رابطه ۱

که در آن: q_k نتایج بدست آمده و \bar{q} میانگین نتایج است. عدم قطعیت عاملی غیرمنفی است و پراکندگی مقادیری را مشخص می‌کند که می‌توان براساس اطلاعات موجود، آن را به نتیجه آزمون نسبت داد. عدم قطعیت اندازه‌گیری تشریح این واقعیت است که برای یک نمونه و نتیجه یک اندازه‌گیری یک مقدار واحد وجود ندارد بلکه تعداد نامحدودی مقادیر وجود دارد که در اطراف نتیجه به‌دست آمده گسترده شده‌اند. دلایل نوسانات مربوط به نتایج اندازه‌گیری‌های تکرار شده، کمیت‌های تاثیرگذار هستند که می‌توانند نتیجه اندازه‌گیری را تحت تاثیر قرار دهند. تعیین تمام کمیت‌های تاثیرگذار روی نتیجه اندازه‌گیری غیرممکن است اما می‌توان آنهایی که بیشترین تاثیر را دارند، شناسایی نمود و میزان تاثیر آنها بر نتیجه اندازه‌گیری را تخمین زد. بدیهی است که منظور از نتیجه هر اندازه‌گیری، بهترین تخمین مقدار نمونه است و نیز بدیهی است که همه مؤلفه‌های عدم قطعیت در پراکندگی سهم دارند. کلمه عدم قطعیت به معنی تردید در خصوص مقدار نتیجه اندازه‌گیری است. عدم قطعیت اندازه‌گیری به ما اطلاعاتی درباره کیفیت اندازه‌گیری ارائه می‌دهد. نتیجه فقط تخمینی از مقدار واقعی بوده و فقط هنگامی کامل است که با بیانیه‌ای در خصوص عدم قطعیت همراه باشد. واژه عدم قطعیت به معنی تردید است. اما عدم قطعیت اندازه‌گیری نه تنها نشان‌دهنده تردید در مورد اعتبار اندازه‌گیری نیست، بلکه آگاهی در مورد عدم قطعیت، باعث افزایش اعتماد به اعتبار نتایج آزمایشگاه می‌شود. هنگامی که نتیجه اندازه‌گیری یک کمیت فیزیکی گزارش می‌شود، الزامی است که بعضی اشارات کمی در مورد کیفیت نتیجه ارائه شود تا کسی

باشد، می‌توان برای درج خط مقیاس از یک تناسب ساده استفاده کرد. به این شکل که اگر فرض کنیم هر ۹۰۰ نانومتر روی تصویر برابر ۲۷۰۰ پیکسل باشد، بنابراین اگر بخواهیم خط مقیاس ۱۰۰۰ نانومتری رسم کنیم باید خطی به طول ۳۰۰۰ پیکسل رسم کنیم:

$$\text{طول خط مقیاس} = \frac{۲۷۰۰ \times ۱۰۰۰}{۹۰۰}$$

چنین خط مقیاسی باید برای تمام بزرگنمایی‌ها مشخص شود. این خط مقیاس با هر بار تعمیر دستگاه ممکن است تغییر کند بنابراین لازم است بعد از هر بار تعمیر، کالیبراسیون دستگاه کنترل شود.

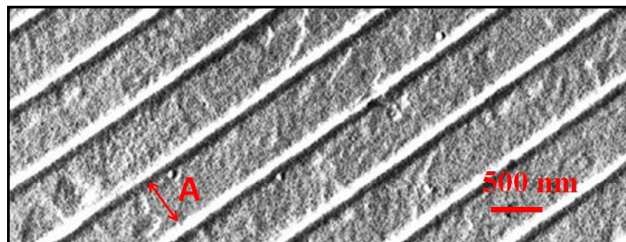


شکل ۳: تصویر گرفته از نمونه نانوذرات لاتکس با ابعاد ۹۰۰ نانومتر که نرم‌افزار قطر این نانوذرات را برحسب پیکسل ارائه کرده است

آماده‌سازی، تصویربرداری و محاسبه عدم قطعیت:

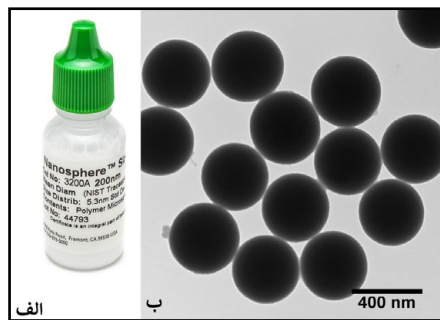
به‌طور معمول برای تصویربرداری و مشخصه‌یابی مواد با استفاده از TEM باید جنس مواد و هدف مورد نظر را به‌منظور انتخاب مسیر کار در نظر گرفت. روش مورد استفاده باید به‌گونه‌ای باشد که روی شکل و ابعاد ذره تاثیری نگذارد. در حال حاضر چند استاندارد نظیر ISO13322 و ISO9276 برای آماده‌سازی و تصویربرداری تدوین شده‌اند. در این مقاله با بهره‌گیری از این روش‌ها، عدم قطعیت ابعاد نانوذرات نمونه استاندارد گواهی‌نامه‌دار^۹ مورد بررسی قرار می‌گیرد. این نانوذرات تقریباً ابعاد یکسانی داشته و درون محلول آبی غوطه‌ور هستند.

برای آماده‌سازی نمونه، مقدار ۱۰ میکرولیتر از این نمونه روی سطح توری^{۱۰} کربنی حاوی پوشش کربنی قرار داده می‌شود. این توری دارای مش ۴۰۰ است. از آنجایی که غلظت نمونه استاندارد بسیار زیاد است باید آن را از قبل رقیق کرد که برای این کار از آب مقطر استفاده می‌شود. آب دو بار تقطیر برای فرآیند رقیق‌سازی قابل استفاده است. از آنجایی که برای این نمونه‌ها نیاز به قدرت الکترونی بالا نیست، از ولتاژ ۸۰ یا ۱۲۰ کیلوولت برای تصویربرداری استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که در این روش، تنها تصاویر مود روشن^{۱۱} گرفته خواهد شد و مودهای دیگر دستگاه مورد نیاز نیست. پس از آماده‌سازی و خشک کردن توری، نمونه‌ها با استفاده از TEM تصویربرداری شده و تصاویر با کمک دوربین دیجیتال ثبت می‌شود. لازم به ذکر است که دستگاه باید قبل از تصویربرداری کالیبره شده باشد. برای آنالیز نتایج نیز بهتر است از یک نرم‌افزار پردازشگر



شکل ۱: تصویر نمونه استاندارد رپلیکا. فاصله دو خط (A) برحسب پیکسل مشخص شده و از آن برای تعیین خط مقیاس استفاده می‌شود (۵۰۰ نانومتر).

نانوذرات لاتکس: یکی از محدودیت‌های نمونه استاندارد رپلیکا این است که نمی‌توان با استفاده از آن بزرگنمایی‌های بسیار بالا را کالیبره کرد. دلیل این امر آن است که در بزرگنمایی‌های بسیار بالا نظیر ۱۰۰ هزار برابر، فاصله میان دو خط دیده نمی‌شود در واقع دو خط خارج از کادر تصویر خواهند بود. در چنین شرایطی باید از نمونه استانداردهایی استفاده کرد که ابعاد کوچکتری دارند. نانوذرات لاتکس از جمله این گزینه‌ها هستند. مزیت این نانوذرات آن است که می‌توان ابعاد مختلفی از آنها را برای کالیبراسیون مورد استفاده قرار داد. برای مثال برای بزرگنمایی‌های پایین نظیر ۲۰ هزار برابر، نانوذرات ۹۰۰ نانومتر مناسب هستند اما این نانوذرات برای بزرگنمایی ۲۰۰ هزار برابر جوابگو نبوده بلکه باید از نمونه‌های ۲۰ نانومتری استفاده کرد. به بیان دیگر، به دلیل تنوع ابعاد نانوذرات استاندارد می‌توان متناسب با هر بزرگنمایی نمونه مورد نظر را انتخاب کرد، بنابراین دغدغه افزایش بزرگنمایی و مشکل نمونه استاندارد در اینجا وجود ندارد.



شکل ۲: الف) تصویری از یک بطری حاوی نمونه استاندارد لاتکس. ب) تصویر TEM نانوذرات استاندارد لاتکس

روش کالیبراسیون نیز در اینجا مشابه روش رپلیکا است. باید از نمونه‌های استاندارد در بزرگنمایی‌های مختلف تصویربرداری کرد. در هر بزرگنمایی، ابعاد نمونه استاندارد به‌صورت دقیق با استفاده از نرم‌افزار بدست می‌آید. این اندازه‌گیری برحسب پیکسل بوده و به سادگی می‌توان رابطه (A پیکسل = B نانومتر) را تعریف نمود. همان‌طور که در شکل (۳) به‌طور مثال، برای نمونه استاندارد ۹۰۰ نانومتری نشان داده شده، قطر نانوذره با نرم‌افزار مورد بررسی قرار می‌گیرد که در این تصویر، قطر نانوذره با ابعاد ۹۰۰ نانومتر، ۲۷۰۰ پیکسل بوده است. بهتر است حداقل ۱۰ نانوذره مختلف مورد بررسی قرار گیرد و در نهایت میانگین پیکسل‌ها به‌عنوان جواب نهایی استفاده شود. با فرض این که میانگین پیکسل‌ها برابر ۲۷۰۰

$$u_i = s(\bar{q}) = \frac{s(q_k)}{\sqrt{n}}$$

رابطه ۳

که در آن: n تعداد تکرارها است. اگر این عدم قطعیت در عدد ۲ ضرب شود، عدم قطعیت بسط یافته با توزیع نرمال و با سطح اطمینان ۹۵٪ بدست خواهد آمد. اگر در عدد ۳ ضرب شود عدم قطعیت با سطح اطمینان ۹۹/۷٪ حاصل خواهد شد. این درحالی است که ضرب عدم قطعیت تکرارپذیری استاندارد در عدد یک، عدم قطعیت با سطح اطمینان ۶۸٪ را نشان می‌دهد. این عدم قطعیت مربوط به تمام خطاهای غیرسیستماتیک در آماده‌سازی نمونه و تحلیل نتایج است.

نتیجه‌گیری

در این مقاله مفاهیم مربوط به دقت، خطا و عدم قطعیت مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه دو روش رایج برای کالیبراسیون بزرگنمایی TEM ارائه شد. ابتدا روش کالیبراسیون با نمونه رپلیکا و در ادامه کالیبراسیون با نمونه استاندارد لاتکس ارائه شد. همچنین نکات ضروری برای رسیدن به نتیجه مطلوب در فرآیند کالیبراسیون تشریح شد که در بخش عدم قطعیت، عوامل تاثیرگذار در رسیدن به نتیجه صحیح مورد بررسی قرار گرفت.

پی‌نوشت

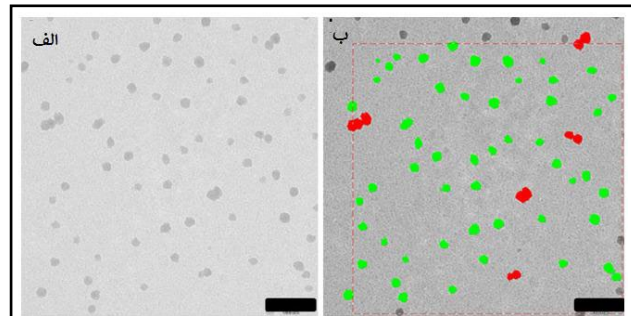
۱. کارشناس ارشد، فناوری‌نانو، دانشگاه صنعتی شریف
۲. کارشناس فیزیک، شرکت کارآفرینی و فناوری ایران (کفا)
۳. عضو کارگروه تخصصی TEM شبکه آزمایشگاهی فناوری‌نانو
۴. عضو کارگروه استاندارد و کالیبراسیون شبکه آزمایشگاهی

5. Transmission Electron Microscope (TEM)
6. Precision
7. Accuracy
8. Replica
9. CRM
10. Grid
11. Bright field

مراجع

[1] 1-Pieter-Jan De Temmerman, Jeroen Lammertyn, Bart De Ketelaere, Vikram Kestens, Gert Roebben, "Eveline Verleysen, Jan Mast. Measurement uncertainties of size, shape, and surface measurements using transmission electron microscopy of near-monodisperse, near-spherical nanoparticles", J Nanopart Res (2014) 16:2177

تصویر استفاده شود. همچنین در آنالیز نتایج، بهتر است ذراتی که حاشیه تصویر یا در لبه‌های آن قرار گرفته، در نظر گرفته نشود. برای انتخاب ذرات موجود در تصویر باید محدوده کاری تعریف نمود، در واقع باید مشخص کرد چه ذراتی را می‌توان در اندازه‌گیری مورد استفاده قرار داد. یکی از عوامل موثر در تعیین این محدوده، کیفیت تصاویر است. به‌صورت قراردادی اگر یک ذره در تصویر، حاوی کمتر از ۱۰۰ پیکسل بود، بهتر است در اندازه‌گیری از آن استفاده نشود. این محدودیت، محدودیت حد پایین کیفیت است. همچنین برای برش منطقه مورد تایید برای اندازه‌گیری باید ۱۰ درصد از تصویر را حذف کرد (براساس استاندارد ISO 13322-1) شکل (۴) چگونگی انتخاب این محل را نشان می‌دهد.



شکل ۴: چگونگی انتخاب ۱۰ درصد از تصویر گرفته شده با استفاده از TEM برای محاسبه ابعاد ذرات. الف) تصویر خام گرفته شده. ب) تصویری که محدود کاری در آن مشخص شده است (با کسر ۱۰ درصد) [۱]

در اینجا باید به این نکته توجه نمود که باید از سمت چپ و بالای تصویر این ده درصد را انتخاب و حذف کرد. این کار برای تمامی بزرگنمایی‌های مورد نظر باید انجام شود. ممکن است در تصاویر گرفته شده، ذرات، ابعاد غیر عادی داشته باشند برای مثال، اگر نمونه استاندارد ۱۰۰ نانومتری است، ممکن است ذرات ۲۰۰ یا ۵۰۰ نانومتری دیده شود که دلیل این امر تجمع ذرات است. بهتر است برای محاسبه عدم قطعیت از ذرات منفرد (به هم نچسبیده باشند) استفاده نمود. با استفاده از نرم‌افزار پردازش تصویر، باید هولوگرام توزیع ابعاد ذرات بدست آید.

برای اندازه‌گیری دقت باید روش مورد استفاده در تصویربرداری در تمام اندازه‌گیری‌ها یکسان باشد. کار نیز توسط یک کاربر انجام شده باشد. در واقع در محاسبه دقت، هدف این است که شرایط محیطی و روش‌ها یکسان باشند تا خطاهای تصادفی مشخص شوند. برای این کار از رابطه ۲ استفاده می‌شود:

رابطه ۲

$$s(q_k) = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2}$$

که در آن: q_k نتایج بدست آمده و \bar{q} میانگین نتایج در یک روز است. اگر آزمون چند بار تکرار شود و این کار طی چند روز مختلف صورت گیرد، آنگاه عدم قطعیت تکرارپذیری استاندارد از رابطه ۳ بدست می‌آید: