



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standards Organization



استاندارد ملی ایران

۱۰۳۴۹

چاپ اول

۱۴۰۱

INSO
10349
1st Edition
2023

Identical with
ISO/TS 23151:
2021

فناوری نانو – توزیع اندازه ذره نانوبلورهای
سلولزی



دارای محتوای رنگی

Nanotechnologies – Particle size
distribution for cellulose nanocrystals

ICS:07.120

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۸۱۱۴۰۳۲۸ (۰۲۶)

رایانامه: standard@inso.gov.ir

وبگاه: <http://www.inso.gov.ir>

Iran National Standards Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@inso.gov.ir

Website: <http://www.inso.gov.ir>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفه تعیین، تدوین، به روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را بر عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- توزیع اندازه ذره نانوبلورهای سلولزی»

رئیس:

صادق حسنی، صدیقه

(دکتری شیمی تجزیه- الکتروشیمی)

سمت و/یا محل اشتغال:

مدیر تحقیق و توسعه - شرکت آرال تجهیز آزما

دبیر:

دارابی، عادل

(دکتری فیزیک)

عضو مستقل

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسلامی پور، الهه

(کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)

کارشناس-گروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

ایراندوخت، اکبر

(دکتری مهندسی شیمی)

عضو بازنشسته هیئت علمی - پژوهشگاه صنعت نفت

سهرابی، ابوذر

(دکتری نانوفناوری- نانومواد)

رئیس هیئت مدیره- شرکت راصد توسعه فناوری‌های پیشرفته

سیفی، مهوش

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

مشاور- گروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

شاکری، روشنگر

(کارشناسی ارشد فیزیک اتمی- مولکولی)

کارشناس استاندارد- سازمان ملی استاندارد ایران

شاهوی، محمدحسن

(دکتری مهندسی شیمی)

عضو هیئت علمی- دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل

ویراستار:

سیفی، مهوش

(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

مشاور- گروه استاندارد و ارزیابی محصولات ستاد ویژه توسعه فناوری نانو

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ز	پیش‌گفتار
ح	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات و تعاریف
۳	۴ کوته‌نوشت‌ها
۳	۵ پراکنش نانوبلورهای سلولزی
۳	۱-۵ ملاحظات کلی
۵	۲-۵ پراکنش نانوبلورهای سلولزی با امواج‌دهی صوتی
۶	۳-۵ ارزیابی پراکندگی پویای نور پراکنه‌ها
۸	۴-۵ تعیین انرژی بهینه امواج‌دهی صوتی
۸	۶ آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپی
۸	۱-۶ ملاحظات کلی
۹	۲-۶ آماده‌سازی نمونه AFM
۱۰	۳-۶ آماده‌سازی نمونه TEM
۱۱	۷ میکروسکوپی نیروی اتمی
۱۱	۱-۷ کلیات
۱۱	۲-۷ دستگاه‌ها و لوازم جانبی
۱۲	۳-۷ کالیبراسیون میکروسکوپ
۱۲	۴-۷ داده‌برداری
۱۴	۵-۷ تحلیل تصویر
۱۴	۸ میکروسکوپی الکترونی عبوری
۱۴	۱-۸ کلیات
۱۵	۲-۸ دستگاه‌ها و لوازم جانبی
۱۵	۳-۸ کالیبراسیون میکروسکوپ
۱۵	۴-۸ داده‌برداری
۱۶	۵-۸ تحلیل تصویر
۱۷	۹ تحلیل داده
۱۷	۱-۹ کلیات
۱۷	۲-۹ ارزیابی کیفیت داده

صفحه	عنوان
۱۸	۳-۹ برآزش مدل‌های توزیع به داده‌ها
۱۹	۴-۹ عدم قطعیت اندازه‌گیری
۲۰	۱۰ گزارش آزمون
۲۰	۱-۱۰ میکروسکوپی نیروی اتمی
۲۲	۲-۱۰ میکروسکوپی الکترونی عبوری
۲۴	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) ارزیابی پراکنه‌های نانوبلور سلولزی
۲۵	پیوست ب (آگاهی‌دهنده) ارزیابی نیروی اعمالی تصویربرداری
۲۷	پیوست پ (آگاهی‌دهنده) نتایج مقایسه بین آزمایشگاهی: AFM
۳۸	پیوست ت (آگاهی‌دهنده) نتایج مقایسه بین آزمایشگاهی: TEM
۵۲	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- توزیع اندازه ذره نانوبلورهای سلولزی» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در یکصد و بیست‌و‌چهارمین اجلاس کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۱/۱۱/۱۹ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط، مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

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

ISO/TS 23151: 2021, Nanotechnologies – Particle size distribution for cellulose nanocrystals

مقدمه

انتظار می‌رود نانومواد سلولزی، شامل نانوبلورهای سلولزی (CNCs)^۱ و نانولیفچه‌های سلولزی اثر تجاری قابل توجهی داشته باشند. نانوبلورهای سلولزی با هیدرولیز اسیدی سلولز طبیعی که عمدتاً از خمیرچوب و گیاهان یکساله به دست می‌آید، تولید می‌شوند. تولید نانوبلورهای سلولزی از منابع سلولزی قابل دسترس، آن‌ها را گزینه مناسبی برای کاربرد به عنوان یک نانوماده بالقوه غیرسمی، زیست‌تخریب‌پذیر^۲ و پایدار^۳ می‌سازد. امکان‌پذیر بودن تولید نانوبلورهای سلولزی در مقیاس وسیع که اخیراً اثبات شده و همچنین در دسترس بودن زیرساخت برای کاشت و برداشت مواد خام، توسعه تجاری نانوبلورهای سلولزی را آسان می‌کند. نانوبلورها و نانولیفچه‌های سلولزی در چند کشور در مقیاس پایلوت^۴، در حال تجاری‌سازی یا به صورت تجاری تولید می‌شوند. برآورد پتانسیل بازار برای نانومواد سلولزی، بسته به کاربردهای پیش‌بینی شده و ضریب نفوذ برآورده شده در بازار، سالانه عددی به بزرگی ۳۵ میلیون تن است [10]، [11]. برای تسهیل توسعه پایدار تجاری و کاربردها، استانداردهای مشخصه‌یابی نانوبلورهای سلولزی برای صدور گواهینامه مواد، الزامی هستند.

نانوبلورهای سلولزی بلورینگی بالایی دارند و در حقیقت، نانومیله‌هایی با استحکام مکانیکی، مساحت سطح و نسبت منظری بالا هستند. این نانوبلورها گرد هم می‌آیند و یک فاز نِماتیک^۵ دستوار^۶ (کایرال) با خواص نوری منحصربه‌فرد ایجاد می‌کنند و شیمی سطح آن‌ها را می‌توان برای حصول اطمینان از پایداری کلئیدی در آب و تسهیل پراکنش^۷ در انواع ماتریس‌ها تغییر داد. این خواص به‌علاوه زیست‌سازگاری^۸، هزینه پایین و سمیت حداقلی، کاربردهای بالقوه بسیاری را ممکن می‌سازد. تولیدکنندگان صنعتی این محصولات در حوزه‌های کاربردی مختلف با صنایع پذیرنده کار می‌کنند، از جمله: مواد نانوجندسازهای، محصولات مراقبت شخصی و بهداشتی، صنعت رنگ، چسب و فیلم‌های نازک، اصلاحگرهای^۹ شارش‌شناسی (رئولوژی) و افزارها و فیلم‌های نوری. فعالیت‌های استانداردسازی در کمیته‌های فنی ISO/TC 229 و ISO/TC 6 در مورد نامگان^{۱۰} و اصطلاحگان^{۱۱}، روش‌های کلی مشخصه‌یابی و روش‌های اختصاصی تعیین گروه‌های عاملی سطح، یون فلزی و میزان خاکستر خشک متمرکز هستند. توزیع اندازه ذره نیز یک خاصیت کلیدی برای مشخصه‌یابی نانوبلور سلولزی است. ریخت‌شناسی و توزیع اندازه ذره، برخی خواص نانوبلورهای سلولزی مجزا را کنترل می‌کنند و در سازمان‌دهی آن‌ها در تعلیق‌ها، ماتریس‌ها و فیلم‌های خشک تا حدی نقش دارند. این خواص و مشخصه‌های شیمیایی، پایداری کلئیدی، گرانروی و خودآرایی^{۱۲} نانوبلور سلولزی، همچنین

-
- 1- Cellulose nanocrystals
 - 2- Biodegradable
 - 3- Sustainable
 - 4- Pilot
 - 5- Nematic
 - 6- Chiral
 - 7- Dispersion
 - 8- Biocompatibility
 - 9- Modifiers
 - 10- Nomenclature
 - 11- Terminology
 - 12- Self-assembly

عملکرد آن در زمینه‌های کاربردی (مانند تقویت^۱ نانوجندسازه‌ها) را تعیین می‌کنند. از توزیع طول نیز می‌توان برای تفاوت قائل شدن بین رتبه‌بندی‌ها^۲ یا محصولات نانوبلور سلولزی استفاده کرد.

این استاندارد روشی برای پراکنش تجدیدپذیر نانوبلورهای سلولزی خشک برای آماده‌سازی نمونه‌های میکروسکوپی شرح می‌دهد، پروتکل‌هایی برای تهیه^۳ تصویر در میکروسکوپی نیروی اتمی و الکترونی عبوری ارائه و روش‌های اجرایی تحلیل تصویر برای تعیین توزیع‌های اندازه ذره را به‌اختصار بیان می‌کند. روش‌های ارائه‌شده با تحلیل نانوبلورهای سلولزی تولیدشده با فرایندهای مختلف سازگار هستند و می‌توان با تنظیم روش‌های نهشت^۳ نمونه و پراکنش، آن‌ها را به نانوبلورهای سلولزی با سطح اصلاح‌شده گسترش داد. دو روش میکروسکوپی ذکرشده اطلاعات مکمل ارائه می‌دهند و از هر دو به‌طور گسترده‌ای برای تحلیل اندازه نانوبلورهای سلولزی استفاده شده‌است.

1- Reinforcement
2- Grades
3- Deposition

فناوری نانو - توزیع اندازه ذره نانوبلورهای سلولزی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تشریح روش‌هایی برای اندازه‌گیری توزیع‌های اندازه ذره نانوبلورهای سلولزی با استفاده از میکروسکوپی نیروی اتمی و میکروسکوپی الکترونی عبوری است. این استاندارد پروتکلی برای پراکنش تجدیدپذیر^۱ ماده با استفاده از «امواج‌دهی فراصوتی»^۲ که با پراکندگی پویای نور ارزیابی می‌شود، ارائه می‌کند. این استاندارد آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپی، تهیه تصویر و تحلیل داده را شامل می‌شود.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 ISO/TS 80004-2, Nanotechnologies - Vocabulary - Part 2: Nano-objects

یادآوری - استاندارد ملی ایران - ایزو شماره ۲-۸۰۰۰۴ : سال ۱۳۹۵، فناوری نانو - واژه‌نامه - قسمت ۲: نانو اشیاء با استفاده از استاندارد ISO 80004-2: 2015 تدوین شده است.

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳ : سال ۱۳۹۹، فناوری نانو - اندازه‌گیری توزیع‌های اندازه و شکل ذرات به وسیله میکروسکوپی الکترونی عبوری

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در استاندارد ISO/TS 80004-2، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به کار می‌رود:^۳

1- Reproducible
2- Ultrasonication

۳- اصطلاحات و تعاریف به کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل دسترسی است.

نانوبلور سلولزی

cellulose nanocrystal

نانوبلوری که به طور عمده از سلولز با حداقل یک لیفیجۀ/بتدی (۳-۳) که به طور عمده دارای نواحی بلورین و نیمه‌بلورین، با نسبت منظری به طور معمول کمتر از ۵۰ اما اغلب بیشتر از ۵، تشکیل شده‌است و فاقد شکاف‌های طولی، درهم‌تنیدگی بین ذرات و یا ساختارهای شبکه‌مانند است.

یادآوری ۱- به طور معمول ابعاد در سطح مقطع ۳ نانومتر تا ۵۰ نانومتر است و در طول، با توجه به منبع نانوبلور سلولزی، ۱۰۰ نانومتر تا چند میکرومتر است.

یادآوری ۲- نسبت منظری به نسبت طولانی‌ترین بُعد به کوتاهترین بُعد اشاره دارد.

یادآوری ۳- از نظر سوابق علمی، نانوبلورهای سلولزی به نام سلولز نانوبلورین (NCC)^۱، ویسکرها (تاره‌ها) مانند نانویسکرها سلولزی (CNW)^۲ و میکرولیفیچه‌ها مانند میکرولیفیچه‌های سلولزی نامیده شده‌اند. آن‌ها همچنین براساس شکل، ابعاد و ریخت‌شناسی^۳، کره‌ها، سوزن‌ها یا نانوسیم‌ها نامیده شده‌اند. نام‌های دیگر مانند میسل‌های (ریشال‌های) سلولزی، بلورک‌های سلولزی و میکروبلورهای سلولزی را نیز شامل می‌شوند.

[منبع: استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۶۰۲: سال ۱۳۹۸]

نانولیفیجۀ سلولزی

cellulose nanofibril

نانولیف سلولزی که حداقل از یک لیفیجۀ/بتدی (۳-۳) دارای نواحی بلورین، نیمه‌بلورین و بی‌شکل با نسبت منظری معمولاً بزرگ‌تر از ۱۰ تشکیل شده‌است که ممکن است شکاف‌های طولی، درهم‌تنیدگی بین ذرات یا ساختارهای شبکه‌ای مانند داشته باشد.

یادآوری ۱- ابعاد به طور معمول در سطح مقطع ۳ نانومتر تا ۱۰۰ نانومتر و در طول تا ۱۰۰ میکرومتر هستند.

یادآوری ۲- نسبت منظری به نسبت طولانی‌ترین بُعد به کوتاهترین بُعد باز می‌گردد.

یادآوری ۳- واژه‌های «سلولز نانولیفیچه‌شده»، «سلولز نانولیفیچه‌ای»، «سلولز میکرولیفیچه‌شده»، «سلولز میکرولیفیچه‌ای»، «میکرولیفیجۀ سلولزی» و «نانولیف سلولزی» برای توصیف نانولیفیچه‌های سلولزی تولیدشده از مواد گیاهی به شیوۀ مکانیکی که اغلب با مراحل پیش‌عمل‌آوری (پیش‌تیمار) شیمیایی یا آنزیمی ترکیب می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرند.

یادآوری ۴- نانولیفیچه‌های سلولزی که با فرایندهای مکانیکی از منابع گیاهی تولید می‌شوند، معمولاً حاوی همی‌سلولز^۴ و در بعضی موارد لیگنین هستند.

1- Nanocrystalline cellulose
2- Cellulose nanowhisker
3- Morphology
4- Hemicellulose

یادآوری ۵- بعضی از نانولیفچه‌های سلولزی ممکن است در نتیجه فرایند ساخت، گروه‌های عاملی روی سطح خود داشته باشند.

[منبع: زیربند ۳-۳-۶، استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۶۰۲: سال ۱۳۹۸، تغییر یافته- یادآوری ۶ حذف شده است.]

۳-۳

لیفچه ابتدایی

elementary fibril

ساختاری نشأت گرفته از یک کمپلکس آنزیم انتهایی منفرد که پیکربندی (آرایش فضایی) زنجیره‌های سلولزی آن برای هر گیاه، حیوان، جلبک و گونه‌های باکتریایی مولد سلولز، اختصاصی است.

[منبع: زیربند ۳-۲-۵، استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۶۰۲: سال ۱۳۹۸]

۴ کوتاه‌نوشت‌ها

معادل فارسی	اصطلاح انگلیسی	کوتاه‌نوشت
میکروسکوپی نیروی اتمی	atomic force microscopy	AFM
نانوبلور(های) سلولزی	cellulose nanocrystal(s)	CNC(s)
پراکندگی پویای نور	dynamic light scattering	DLS
مقایسه بین آزمایشگاهی	interlaboratory comparison	ILC
پلی‌ال‌لیسین	poly-L-lysine	PLL
توزیع اندازه ذره	particle size distribution	PSD
شاخص بس‌پراکندگی	polydispersity index	PDI
پلی‌وینیلیدن دی‌فلوئورید	polyvinylidene difluoride	PVDF
میکروسکوپی الکترونی عبوری	transmission electron microscopy	TEM
پروژه ورسای در مورد استانداردها و مواد پیشرفته	Versailles project on advanced materials and standards	VAMAS

۵ پراکنش نانوبلورهای سلولزی

۱-۵ ملاحظات کلی

نانوبلورهای سلولزی خشک، به صورت انبوه هستند و برای پراکنش آن‌ها که معمولاً با امواج‌دهی فراصوتی انجام می‌شود، باید انرژی صرف کرد. در مطالعات پیشین، بازده امواج‌دهی صوتی برای نانوبلورهای سلولزی مشتق از خمیر چوب بررسی شده است. نانوبلورهای سلولزی در این مطالعات، با هیدرولیز اسیدی خمیر چوب با سولفوریک اسید و خنثی‌سازی با سدیم هیدروکسید که گروه‌های $SO_3^-Na^+$ روی سطح تولید می‌کند،

به دست آمدند [12]. اندازه متوسط CNC و توزیع اندازه آنها، حتی وقتی نسبت انرژی امواج دهی صوتی به جرم CNC ثابت نگه داشته شد، با تغییر غلظت نمونه تغییر کردند؛ مشخص شد که برای پراکنش مؤثر به وسیله امواج دهی صوتی، تعلیقه های CNC با کسر جرمی ۲٪، حالت بهینه هستند. پروتکل زیر با استفاده از نانوبلورهای سلولزی سولفاته شده با سدیم مبادله شده که به روش افشانه ای خشک شده اند، تدوین شده است. این پروتکل ممکن است برای نانوبلورهای سلولزی خشک شده به روش انجمادی [12]، [13]، نانوبلورهای سلولزی که از دیگر منابع زیست توده^۱ سلولزی تولید شده اند و نانوبلورهای سلولزی با میزان متفاوتی از بارگذاری گروه های نیم استرهای سولفاتی یا دیگر گروه های سطحی با بار منفی، نیازمند بهینه سازی باشد.

روش اجرایی برای آماده سازی و امواج دهی صوتی (امواج دهنده پروبی) نمونه، برای تولید یک تعلیقه به خوبی پراکنده شده CNC، در زیربند ۵-۲، ارائه شده است. مشخص شده است که حمام صوتی، برای پراکنش نانوبلورهای سلولزی کافی نیست [12]، [14]. پروتکلی برای تحلیل تعلیقه های CNC با استفاده از DLS در زیربند ۵-۳ ارائه شده است. جزئیات کلی در مورد کاربرد DLS در تعیین اندازه ذرات در استاندارد ISO 22412 در دسترس است [7].

نمونه ای از نتایج که تغییرات اندازه (متوسط Z)^۲ و PDI را به صورت تابعی از انرژی امواج دهی صوتی نشان می دهند، در پیوست الف ارائه شده اند. متوسط Z، قطر میانگین هماهنگ^۳ «وزن دهی شده براساس شدت»^۴ است که از تحلیل تجمعی^۵ داده های DLS، آن گونه که در استاندارد ISO 22412 شرح داده شده، به دست آمده است [7].

متوسط Z، قطر معادل هیدرودینامیکی را به دست می دهد؛ یعنی قطر کره ای که با همان سرعت ذرات سوزنی^۶ CNC نفوذ^۷ می کند.

اگرچه متوسط Z که با روش DLS تعیین می شود، مستقیماً اندازه ذره CNC را به دست نمی دهد، اما روش مفید و سریعی برای ارزیابی تغییرات اندازه نسبی در تعداد زیادی تعلیقه CNC فراهم می کند. پیشرفت های اخیر در زمینه کاربرد روش «جزء جزء کردن جریان با میدان»^۸ جفت شده با چندین سامانه آشکارساز برای تحلیل CNC، می تواند روش جایگزینی برای تحلیل DLS ارائه کند [15]. پروتکل های پراکنش به روش امواج دهی صوتی و ارزیابی DLS، با نتایج تکرارپذیر^۹ و تجدیدپذیر در سه آزمایشگاه استفاده شده اند [12]، [15]، [16].

-
- 1- Biomass
 - 2- Z-average
 - 3- Harmonic
 - 4- Intensity-weighted
 - 5- Cumulant
 - 6- Acicular
 - 7- Diffuse
 - 8- Field flow fractionation
 - 9- Repeatable

برای گزینش مقدار مناسب انرژی امواج‌دهی صوتی برای نمونه‌های مشخص، می‌توان از نمودارهای متوسط Z و PDI به صورت تابعی از انرژی امواج‌دهی صوتی استفاده کرد (به زیربند ۵-۴ مراجعه شود). در این گزینش باید موازنه‌ای برقرار کرد، به این ترتیب که امواج‌دهی صوتی کافی برای پخش بیشتر انبوهه‌ها اعمال شود و در عین حال این اطمینان حاصل شود که انرژی امواج‌دهی صوتی اعمالی، به نمونه آسیب نمی‌زند.

۲-۵ پراکنش نانوبلورهای سلولزی با امواج‌دهی صوتی

نانوبلور سلولزی خشک را از انبار با دمای پایین خارج کنید و تا رسیدن دمای نمونه به دمای اتاق، آن را باز نکنید (معمولاً چند ساعت طول می‌کشد).

از یک ترازوی آزمایشگاهی^۱ برای وزن کردن میزان مطلوبی از CNC در لوله سانتریفیوژ (مرکزگریزانه) از جنس پلی‌پروپیلن استفاده کنید. در این پروتکل برای آماده‌سازی تعلیق‌های CNC با کسر جرمی ۲٪، از مقادیر CNC در گستره ۵۰ mg تا ۳۰۰ mg با لوله‌های سانتریفیوژ ۱۵ ml یا ۵۰ ml استفاده شد. از لوله‌های شیشه‌ای هم می‌توان استفاده کرد، اما در این صورت، از آن جایی که بازده امواج‌دهی صوتی به چندین عامل از جمله جانمایی^۲ و عمق پروب (کاوند) و هندسه و جنس ظرف حساس است، ممکن است نیاز به بهینه‌سازی پروتکل باشد [17].

آب یون‌زدایی‌شده^۳ را به مقدار لازم برای به‌دست آمدن یک تعلیق^۴ CNC با کسر جرمی ۲٪، به لوله اضافه کنید، در لوله را ببندید و لوله را با دست، به مدت چند ثانیه به شدت تکان دهید تا پراکنش CNC بهتر شود. در تمامی مراحل، از آب یون‌زدایی‌شده^۵ (۱۸/۲ MΩ cm) تازه‌تهیه‌شده‌ای که با یک صافی ۰/۲۲ μm (معمولاً بخشی از سامانه تصفیه آب) تصفیه شده‌باشد، استفاده می‌شود.

غلظت بهینه^۶ CNC برای پراکنش به وسیله امواج‌دهی فراصوتی، مقدار ۲٪ کسر جرمی است. در غلظت‌های کمتر، شکسته‌شدن انبوهه‌ها و کلوخه‌ها بازدهی کم‌تری دارد. اگر تعلیق‌هایی با غلظت کمتر مورد نیاز باشند، تعلیق^۴ CNC امواج‌دهی‌شده صوتی با کسر جرمی ۲٪ را با آب یون‌زدایی‌شده رقیق کنید تا غلظت مطلوب به‌دست آید.

مخلوط را به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق بگذارید تا CNC پراکنده شود. مخلوط را می‌توان در فواصل زمانی معین با دست تکان داد تا فرایند پراکنش شتاب گیرد، می‌توان از یک تکان‌دهنده^۴ لوله نیز استفاده کرد.

وضعیت پروب فراصوتی را واریسی کنید (برای حجم‌های به‌کاررفته در اینجا یک پروب ۶ میلی‌متری توصیه می‌شود) و در صورت مشاهده «خوردگی حفره‌ای»^۵ و زبری^۶ در سطح، آن را تمیز کنید.

1- Analytical
2- Placement
3- Deionized
4- Shaker
5- Pitting
6- Roughness

امواج‌دهی صوتی در دماهای پایین بیشترین بازدهی را دارد. بنابراین توصیه می‌شود از گرمایش تعلیقه حین امواج‌دهی طولانی‌مدت اجتناب شود. همان‌گونه که در بالا توصیه شده، اگر پروب در شرایط کاری خوبی باشد، به‌طور صحیح در «دستگاه فراوری‌کننده»^۱ نصب شده و در تعلیقه فرورفته باشد، توصیه می‌شود برای مقادیر CNC خشک و انرژی فراوری توصیه‌شده در این پروتکل، افزایش دما بیشتر از 2°C تا 3°C نباشد. در مدت امواج‌دهی صوتی، لوله را می‌توان در حمام آبی با دمای اتاق قرار داد و در صورت نیاز با چند تکه یخ آن را خنک کرد. استفاده از حمام یخ توصیه نمی‌شود.

پروپ فراصوتی را در تعلیقه فرو برید و اطمینان حاصل کنید که سر پروب در مرکز لوله قرار داشته و هم از زیر سطح تعلیقه و هم از کف (انتهای) لوله حداقل 1.3 cm فاصله داشته باشد.

تعلیقه را در دمای اتاق و با انرژی موردنیاز (ژول بر گرم CNC خشک)^۲ و توان متوسط تقریباً 10 W امواج‌دهی کنید. اطمینان حاصل کنید که سطح تعلیقه تا آنجا که ممکن است صاف باقی بماند و هواسل‌شدگی و حباب‌زدن بیش از اندازه مشاهده نشود. اگر هواسل یا حباب بیش از اندازه یا افت‌وخیز بیش از اندازه سطح مشاهده شد، فوراً موقعیت پروب را تنظیم کنید. برای کمینه‌کردن اتلاف تعلیقه، ناشی از ایجاد هواسل، روی لوله را بپوشانید.

برای حصول اطمینان از این که انرژی اعمالی اطمینان‌پذیر^۳ است و با زمان تغییر نمی‌کند، می‌توان بازده انتقال انرژی را به‌روش گرماسنجی^۴ [17] اندازه‌گیری کرد. آگاهی از انرژی امواج‌دهی صوتی برای مقایسه بین آزمایشگاه‌ها ضروری است.

نمونه را از دستگاه فراوری‌کننده فراصوتی بیرون آورید، برای مدت کوتاه در دمای اتاق (تقریباً 21°C تا 22°C) و برای انبارش بلندمدت در یخچال (تقریباً 5°C) نگاه‌داری کنید.

یادآوری - این پروتکل با مقدار 50 mg تا 300 mg نانوبلور سلولزی خشک آزموده شده‌است. آماده‌سازی تعلیقه‌هایی با مقادیر بیشتر CNC می‌تواند نیازمند بهینه‌سازی شرایط امواج‌دهی صوتی باشد.

۳-۵ ارزیابی پراکندگی پویای نور پراکنه‌ها

دستگاه را همان‌گونه که در دستورالعمل توصیه شده، راه‌اندازی کنید.

اطلاعات در مورد اهمیت تمیزی سلول و نحوه کارکردن^۵ با آن و روش مناسب آماده‌سازی و انتقال تعلیقه‌ها برای اندازه‌گیری‌های DLS در استاندارد ISO/TR 22814 در دسترس است [8].

1- Processor
2- J/g dry CNC
3- Reliable
4- Calorimetry
5- Handling

تأیید کنش‌پذیری^۱ (قابلیت عملکرد) دستگاه DLS با اندازه‌گیری یک نانوماده مرجع (نانوماده‌ای که داده DLS برای آن موجود باشد) برای به‌دست آوردن متوسط Z و PDI، یک بهین‌آزمایی^۲ است. نانوذرات طلا، سیلیکا و پلی‌استایرن با قطر 100 nm در همان گستره اندازه بیشتر نمونه‌های CNC هستند. برای نانوبلورهای سلولزی بزرگ‌تر، می‌توان از یک ماده مرجع با قطر بالای 100 nm استفاده کرد. توصیه می‌شود یک ماده مرجع از منبعی که واجد شرایط ذکرشده در راهنماهای ایزو [1] است، مورد استفاده قرار گیرد. توصیه می‌شود متوسط Z و PDI اندازه‌گیری‌شده در محدوده عدم قطعیت اعلام‌شده برای ماده مرجع باشند. توجه به این نکته مهم است که کنش‌پذیری دستگاه که با استفاده از یک ماده مرجع تأیید شده، به این معنی نیست که مقدار به‌دست‌آمده متوسط Z برای نانوبلورهای سوزنی سلولزی، اندازه درست یا کمی^۳ قطر است.

تعلیق‌های CNC با کسر جرمی 2% را با استفاده از آب یون‌زدایی‌شده تا 0.1% رقیق کنید و سپس 1 ml از محلول سدیم کلرید 10 mmol/l را به 1 ml از تعلیق CNC با کسر جرمی 0.1% اضافه کنید تا 2 ml تعلیق با کسر جرمی 0.105% در سدیم کلرید 5 mmol/l به‌دست آید. تعلیق 0.105% باید در طی چندین ساعت فرایند آماده‌سازی آنالیز شود و پیش از انتقال به سلول DLS به‌شدت تکان داده شود. نمونه را از یک صافی سرنگی $0.45 \mu\text{m}$ غشای PVDF بگذرانید. چند قطره اول را دور بریزید و سپس حجم موردنیاز محلول را به کووت^۴ DLS اضافه کنید. اطمینان حاصل شود که حبابی در سلول نباشد.

کووت را در دستگاه قرار دهید و در دمای مطلوب به تعادل برسانید. زمان لازم برای به تعادل رسیدن، بسته به تفاوت بین دمای هدف و دمای محیط، متغیر خواهد بود. زمان به تعادل رسیدن را می‌توان با اندازه‌گیری دمای حجم معادلی از آب تحت شرایط یکسان تأیید کرد. شدت پراکندگی را با استفاده از نرم‌افزار دستگاه تنظیم کنید. برای هر نمونه سه بار اندازه‌گیری انجام دهید و هر اندازه‌گیری شامل متوسط تعداد اجرا^۵ باشد (برای مثال، ۱۰ اجرای ۱۰ ثانیه‌ای).

برای به‌دست آوردن مقدار متوسط سه اندازه‌گیری و انحراف معیار متوسط Z و PDI نمونه، از روش تجمعی استفاده کنید.

یادآوری – پیکربندی‌های نوری مختلفی برای دستگاه در دسترس است. استفاده از پیش/پس پراکندگی و زاویه پراکندگی بر متوسط Z اندازه‌گیری‌شده اثر می‌گذارد.

-
- 1- Operability
 - 2- Good laboratory practice
 - 3- Quantitative
 - 4- Cuvette
 - 5- Run

۴-۵ تعیین انرژی بهینه امواجدهی صوتی

تعلیقه‌های CNC را با انرژی‌های مختلف امواجدهی صوتی کنید و متوسط Z و PDI در DLS را برای هر نمونه، همان‌گونه که در زیربند ۳-۵ تشریح شده، اندازه‌گیری کنید. نمودار متوسط Z و PDI بر حسب انرژی امواجدهی صوتی را رسم کنید.

برای تولید تعلیقه‌ای با پراکنش مناسب، انرژی امواجدهی صوتی بهینه را از ناحیه‌ای از نمودار که در آن متوسط Z و PDI اندازه‌گیری شده با افزایش انرژی به آرامی تغییر می‌کنند، انتخاب کنید. مثالی از این نمودار در پیوست الف نشان داده شده‌است.

برای اطمینان از تجدیدپذیری^۱، اندازه‌گیری را روی حداقل سه نمونه^۲ همانند^۳ که مستقل از هم آماده شده‌اند، با اعمال انرژی امواجدهی صوتی بهینه انتخاب شده انجام دهید.

۶ آماده‌سازی نمونه برای میکروسکوپی

۱-۶ ملاحظات کلی

برای آماده‌سازی نانوبلورهای سلولزی نهشت‌یافته روی پایه‌ای مناسب برای هریک از روش‌های AFM یا TEM، ملاحظات کلی وجود دارد. اولین مورد، اهمیت حصول اطمینان از استفاده از یک نمونه^۳ نماینده^۳ است. اگر شروع کار با نانوبلورهای سلولزی خشک باشد، تأیید این که پیش از توزین یک نمونه^۴ فرعی برای پراکنش، نمونه به‌خوبی مخلوط شده‌باشد، مهم است. توصیه می‌شود برای تأیید تجدیدپذیر بودن آماده‌سازی پراکنه با امواجدهی، از سه نمونه^۴ فرعی، پراکنه آماده کنید. هریک از سه نمونه را با انرژی امواجدهی صوتی موردنیاز، امواجدهی و سپس متوسط Z و PDI در DLS را همانگونه که در زیربند ۳-۵ تشریح شده، اندازه‌گیری کنید. تغییرات کمتر از ۵٪ در متوسط Z بر پراکنش تجدیدپذیر نمونه دلالت دارند. به‌عنوان روش جایگزین، می‌توان تمام منحنی امواجدهی صوتی را برای هریک از نمونه‌های فرعی اندازه‌گیری کرد.

دومین موردی که باید در نظر گرفته شود، کلوخگی نانوبلورهای سلولزی در تعلیقه اولیه است. با امواجدهی صوتی و فیلتراسیون می‌توان انبوهه‌ها و کلوخه‌های محلول را کم کرد (اما نمی‌توان به‌طور کامل از بین برد).

سومین مورد انتخاب یک پایه یا توری TEM مناسب و روشی برای نهشت است که کلوخگی ذرات را کمینه و در عین حال تعداد ذرات مجزایی که بتوان به‌ازای هر تصویر تحلیل کرد را بیشینه کند. اصولاً استفاده از یک توری یا پایه با بار مثبت برای تثبیت نانوبلورهای سلولزی با بار منفی مفید است. جزئیات بیشتر در مورد AFM و TEM به‌ترتیب در زیربندهای ۲-۶ و ۳-۶ ارائه شده‌است.

1- Reproducibility
2- Replicate
3- Representative
4- Sub-sample

آخرین مورد، تعداد نمونه‌هایی است که به‌طور مستقل آماده شده‌اند و باید تصویر آن‌ها تهیه شود و تعداد ذراتی است که باید تحلیل شوند. تصویربرداری از چندین نمونه، اطلاعاتی در مورد تجدیدپذیری فرایند نهشت نمونه و تأثیر احتمالی آن روی توزیع اندازه CNC فراهم می‌کند. تعداد ذرات مجزای (n) تحلیل‌شده برای هر نمونه باید به‌اندازه‌ای بزرگ باشد که پارامترهایی که توزیع اندازه را تعریف می‌کنند (مانند میانگین و انحراف معیار برای یک توزیع نرمال) را بتوان با عدم قطعیتی در سطح مطلوب تعیین کرد. به‌عنوان یک رهنمود کلی، در توزیع نرمال، عدم قطعیت با عکس ریشهٔ دوم n متناسب است، تحلیلی از اثرات اندازهٔ نمونه بر عدم قطعیت اندازه‌گیری در توزیع‌های لگ^۱ نرمال را می‌توان در استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۰۹۹: سال ۱۳۹۵، پیوست الف یافت [۴]. با افزایش بس‌پراکندگی نمونه، تعداد ذرات موردنیاز افزایش می‌یابد. در تعدادی از مطالعات، نقطهٔ شروع توصیه‌شده در گسترهٔ ۲۰۰ ذره تا ۱۰۰۰ ذره است. استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ به‌عنوان نقطهٔ شروع، تحلیل ۵۰۰ ذره را توصیه می‌کند و همین مقدار برای مقایسه‌های بین آزمایشگاهی AFM و TEM نانوبلورهای سلولزی که در پیوست پ و ت به‌اختصار بیان شده‌اند، پذیرفته شده‌است.

اگرچه خودکارسازی^۲ تحلیل تصویر AFM و TEM را می‌توان به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تعدادی از نانومواد کرووی و با تباین^۳ بالا به‌کار برد (برای مثال‌هایی از TEM به استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ و مراجعی که در آن استاندارد به‌آنها استناد شده‌است، مراجعه شود)، اما در حال حاضر هیچ روش قابل اطمینانی برای خودکارسازی تحلیل تصویر برای نانوبلورهای سلولزی وجود ندارد.

نمونه‌هایی از روش‌های نهشت نمونه، به‌صورت اجمالی در زیر ارائه شده‌اند.

یادآوری - ممکن است برای نمونه‌های خاص CNC، به بهینه‌سازی مقادیر و غلظت‌های نمونه نیاز باشد.

۲-۶ آماده‌سازی نمونهٔ AFM

در اغلب موارد تصویربرداری AFM از نانوبلورهای سلولزی، از میکا که معمولاً با لایهٔ نازکی از پلی‌الیسین (PLL) پوشش‌دهی شده، به‌عنوان پایه استفاده شده‌است [14]، [18]. میکای با پوشش‌دهی سطحی به میکای بدون پوشش ارجحیت دارد، زیرا اثرات الکترواستاتی (الکتروستاتیک) به تثبیت نانوبلورهای سلولزی کمک می‌کند و بدین ترتیب کلوخگی ذرات و اثرات ناخواستهٔ محتمل ناشی از حرکت ذرات حین تصویربرداری را کمینه می‌کند. گاهی از دیگر بسترها نیز استفاده شده‌است، برای جزئیات بیشتر به استاندارد ISO/TR 19716 مراجعه شود [5]. در روش اجرایی زیر، میکای پوشش‌دهی‌شده با PLL با بار مثبت به‌کار می‌رود و از «پوشش‌دهی چرخشی»^۴ برای نهشت استفاده می‌شود. این روش اجرایی نهشت نسبت به روش‌های گرم‌خانه‌گذاری^۵ نمونه‌های تجدیدپذیر بیشتری (چگالی ذرهٔ ناحیه به ناحیه) فراهم

1- Log
2- Automation
3- Contrast
4- Spin coating
5- Incubation

می‌آورد و به منظور بیشینه کردن تعداد ذرات به ازای هر تصویر و در عین حال کمینه کردن کلوخگی و انبوهگی طراحی شده است [16]، [19].

تعلیق‌های از نانوبلورهای سلولزی در آب را به شیوه‌ای که در بند ۵ توضیح داده شده، آماده کنید. آن را با آب یون‌زدایی شده، ۵۰۰ برابر رقیق کنید.

یک ورقه^۱ پوشش‌دهی شده با PLL را با افزودن ریزنمونه‌ای^۲ از محلول PLL با کسر جرمی ۰/۰۱٪ به بستره میکای تازه بریده شده^۳ (برای مثال، ۴۰ μl برای میکای با قطر ۱۲ mm و ۲۰۰ μl برای میکای ۲/۵۴ cm × ۲/۵۴ cm) آماده کنید. میکا را به همراه محلول PLL به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف پتری در پوش‌دار قرار دهید. بستره میکا را با آب یون‌زدایی شده پنج بار آب بکشید و در جریان نیتروژن خشک کنید.

تعلیق CNC تازه رقیق شده را روی مرکز یک بستره تازه آماده شده PLL- میکا که روی «پوشش‌دهنده چرخشی»^۴ سوار است، پیپت کنید، حجم ۴۰ μl و ۲۰۰ μl، به ترتیب برای میکای با قطر ۱۲ mm و میکای در ابعاد ۲/۵۴ cm × ۲/۵۴ cm کافی است. اطمینان یابید که تعلیق، بیشتر سطح بستره را پوشانده باشد. بستره میکا را با سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ s با نرخ شتاب ۲۰۰۰ rpm/s بچرخانید. نمونه را در معرض هوا خشک کنید و پیش از تصویربرداری در یک خشکانه^۵ تحت فشار مثبت نیتروژن نگهداری کنید.

بسته به پراکنش نمونه و سطح انبوهش نمونه اولیه، ممکن است نیاز باشد برخی موارد (مقدار و غلظت تعلیق CNC، زمان و سرعت پوشش‌دهی چرخشی) در روش اجرایی بالا بهینه‌سازی شوند.

یادآوری - نمونه‌ها را می‌توان با گرم‌خانه‌گذاری ریزنمونه‌ای از تعلیق CNC (تقریباً ۸۰ μl از CNC با کسر جرمی ۰/۰۰۱٪ برای میکای در ابعاد ۲/۵۴ cm × ۲/۵۴ cm) روی میکای پوشش‌دهی شده با PLL به مدت ۲ دقیقه، پنج بار شستشو با آب یون‌زدایی شده و خشک کردن تحت نیتروژن آماده کرد. معمولاً در نمونه‌هایی که با گرم‌خانه‌گذاری آماده شده‌اند، نسبت به نمونه‌هایی که با پوشش‌دهی چرخشی آماده شده‌اند، سطح کلوخگی بالاتر و تجدیدپذیری ناحیه به ناحیه کمتر است [16]. [20]

۳-۶ آماده‌سازی نمونه TEM

آماده‌سازی نمونه برای TEM در چندین مقاله^۱ مروری اخیر شرح داده شده است [14]، [21]-[23]. معمولاً در بیشتر مقالات و مطالعات منتشر شده از روش اجرایی زیر استفاده می‌شود و برای مشخصه‌یابی ماده مرجع و نمونه‌های مقایسه بین‌آزمایشگاهی به کار می‌رود (به پیوست ت مراجعه شود).

-
- 1- Slide
 - 2- Aliquot
 - 3- Cleaved
 - 4- Spin coater
 - 5- Desiccator

تعلیق‌های از CNC در آب را براساس توضیحات بند ۵ آماده کنید. تعلیق را با آب یون‌زدایی‌شده تقریباً ۱۰۰ برابر رقیق کنید و به مدت ۵ ثانیه در مخلوط‌کن ورتکس قرار دهید.

توری مسی پوشیده‌شده با فیلم کربنی را با استفاده از پلاسما تمیز کنید (۲ دقیقه). مقدار ۱۰ µl از تعلیق CNC را روی توری نهشت دهید، اجازه دهید ۴ دقیقه بگذرد و سپس مایع اضافی را با یک کاغذ صافی بگیرید. نمونه را با اضافه کردن یک قطره آب یون‌زدایی‌شده به توری و پس از گذشت چند ثانیه، با آب‌گیری با یک کاغذ صافی، بشویید.

نمونه را با نهشت ۱۰ µl محلول فیلترشده (فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری PVDF) اورانیل استات^۱ با کسر جرمی ۲٪ روی توری لکه‌زایی^۲ کنید و به مدت ۴ دقیقه در همان حال بگذارید. توری را در آب یون‌زدایی‌شده فروبرید، نمونه را جدا کنید و پیش از قرار دادن در میکروسکوپ، آن را به مدت حداقل یک ساعت در معرض هوا خشک کنید.

یادآوری - پس از لکه‌زایی با اورانیل استات، توری را می‌توان به جای فرو بردن در آب، با اضافه کردن یک قطره آب یون‌زدایی‌شده و آب‌گیری با کاغذ صافی شست.

۷ میکروسکوپی نیروی اتمی

۱-۷ کلیات

میکروسکوپی نیروی اتمی برای اندازه‌گیری PSD برای طول و ارتفاع نانوبلورهای سلولزی به کار می‌رود. ابعاد جانبی به دست آمده از تصاویر AFM تحت تاثیر کانولوشن^۳ ذره-سوزن هستند. به دلیل نسبت منظری بزرگ نانوبلورهای سلولزی، اثر کانولوشن برای طول به نسبت کوچک‌تر است. با این حال، بزرگی^۴ پهن‌شدگی^۵ ناشی از کانولوشن ذره-سوزن با پهنای نانوبلورهای سلولزی قابل‌مقایسه است و بنابراین اثر قابل‌توجهی روی اندازه‌گیری‌های پهن‌دارد. اندازه‌گیری پهن‌ها با AFM توصیه نمی‌شود، مگر این که تصحیحی برای اثرات کانولوشن اعمال شود [24]. شرایط تصویربرداری باید بهینه‌سازی شود تا اطمینان حاصل شود که برای جلوگیری از فشردگی^۶ ذرات، کمترین مقدار ممکن نیرو در تهیه تصویر استفاده می‌شود. اندازه‌گیری‌های اندازه ذرات باید فقط از ناحیه‌هایی که از پیش روبش نشده باشند، به دست آید.

۲-۷ دستگاه‌ها و لوازم جانبی

از دستگاه‌ها و لوازم جانبی زیر می‌توان در تهیه تصویر از نانوبلورهای سلولزی با استفاده از میکروسکوپی نیروی اتمی استفاده و توزیع، اندازه ذرات را اندازه‌گیری کرد:

-
- 1- Uranyl acetate
 - 2- Stain
 - 3- Convolution
 - 4- Magnitude
 - 5- Broadening
 - 6- Compression

- میکروسکوپ نیروی اتمی، قادر به تصویربرداری با تفکیک‌پذیری^۱ بالا در حالت‌های تماسی^۲ و تماس متناوب^۳؛

- پروب‌های میکروسکوپ نیروی اتمی برای هر دو حالت تصویربرداری تماسی و تماس متناوب در هوا؛

- توری‌های کالیبراسیون یا مواد مرجع نانوذره‌ای، یا هر دو؛

- نرم‌افزار تحلیل تصویر.

۳-۷ کالیبراسیون میکروسکوپ

پیش از تصویربرداری از CNC، باید کالیبراسیون ابعادی میکروسکوپ تأیید شود، مگر این که سوابق کالیبراسیون نشان دهند که این کار ضرورتی ندارد. دوره تناوب کالیبراسیون میکروسکوپ به نوع دستگاه و پایداری آن، هدف از اندازه‌گیری‌ها و تغییرات بالقوه در شرایط عملیاتی محیط بستگی دارد. اگر به کالیبراسیون نیاز باشد، باید آن را مطابق دستورالعمل سازنده انجام داد. رهنمودهای کلی برای کالیبراسیون ابعاد جانبی و ارتفاع در AFM در استاندارد ISO 11952 ارائه شده [3] و راهنمای کاربردی تری برای کاربران در حال تدوین است [25]. ترجیح این است که از چندین استاندارد که مقیاس‌های مناسب x-y و z برای تصویربرداری CNC را پوشش می‌دهند و عدم قطعیت و مقادیر گواهی‌شده و «قابلیت ردیابی اندازه‌شناختی»^۴ دارند، استفاده شود. استانداردهای معمول برای کالیبراسیون شامل استانداردهای پله‌ای ارتفاع (مقیاس z) و استانداردهای اندازه‌گیری جانبی دوبعدی که ساختارهای هم‌فاصله با طرح‌های تعریف‌شده در فواصل ثابت دارند (مقیاس x-y)، هستند.

۴-۷ داده‌برداری

برای تصویربرداری در حالت تماس متناوب، سوزن مناسبی انتخاب کنید و در AFM نصب کنید. نانوبلورهای سلولزی با تیرک‌هایی^۵ با مقادیر مختلف ثابت فنر از $k \approx 40 \text{ N/m}$ تا $k < 10 \text{ N/m}$ تصویربرداری شده‌اند و در صورتی که به کمینه‌کردن نیروی تصویربرداری توجه شود، نتایج قابل مقایسه‌ای به‌دست می‌دهند.

پارامترهای اولیه روبش را انتخاب و بسامد شدید تیرک را تنظیم کنید.

نمونه را در جای خود قرار دهید و سوزن را درگیر کنید و پارامترهای تصویربرداری را برای حالت تماس متناوب تنظیم کنید. سرعت روبش، بهره‌ها^۶ و نقطه تنظیم^۷ را به‌صورتی تنظیم کنید که ردگیری بهینه مسیر

1- Resolution
2- Contact
3- Intermittent
4- Metrological traceability
5- Cantilevers
6- Gains
7- Setpoint

رفت و برگشت به دست آید. برای تأیید همگنی و ریخت‌شناسی کلی نمونه، چند تصویر در اندازه بزرگ ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ یا $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) ثبت کنید.

پیش از تهیه تصاویر برای تحلیل، از یک یا چند ناحیه نمونه ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ یا کوچک‌تر) با چندین مقدار نقطه‌تنظیم تصویربرداری کنید تا کمینه نیروی که از آن در تصویربرداری می‌توان استفاده کرد، تعیین شود. می‌توان از نمودارهای ارتفاع تعداد ۱۰ یا بیشتر نانوبلور سلولزی مجزا، به صورت تابعی از نسبت بین نقطه‌تنظیم دامنه (A_{sp}) و دامنه آزاد (A_0)، برای تعیین نیروی کمینه تصویربرداری که تصویربرداری پایدار را ممکن می‌سازد و همچنین برای تخمین سهم عدم قطعیت در اندازه‌گیری‌های ارتفاع ناشی از تغییر نیروی اعمالی بر اثر تغییر دامنه، استفاده کرد. از نمودارهای ارتفاع بر حسب نیروی اعمالی نیز می‌توان به عنوان روش جایگزین استفاده کرد. مثال‌هایی از هر دو رویکرد در پیوست ب نشان داده شده است.

یک مجموعه تصاویر AFM در ابعاد $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ با حداقل تفکیک‌پذیری $512\ \text{pixels} \times 512\ \text{pixels}$ ، سرعت روبش $0.8\ \text{Hz}$ تا $1.0\ \text{Hz}$ و گستره Z پیزوالکتریک از $1\ \mu\text{m}$ تا $2\ \mu\text{m}$ تهیه کنید. تصاویر را از نواحی مختلف نزدیک به مرکز بستره تهیه کنید و از نواحی که قبلاً تصویربرداری شده، دوباره تصویربرداری نکنید. با در نظر گرفتن فاکتورهایی که در زیربند ۶-۱ ذکر شد، به تعداد کافی تصویر تهیه کنید تا تعداد مورد نیاز از نانوبلورهای سلولزی مجزا برای اندازه‌گیری اندازه ذره در اختیار داشته باشید. با استفاده از پروتکل آماده‌سازی نمونه که در زیربند ۶-۲ ارائه شده، به طور معمول در تصاویر AFM با ابعاد $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ ، می‌توان تقریباً ۲۵ نانوبلور سلولزی مجزا به ازای هر تصویر تحلیل کرد.

یادآوری ۱- برای تصاویر $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ با $512\ \text{pixels} \times 512\ \text{pixels}$ ، تفکیک‌پذیری تقریباً $2\ \text{nm/pixel}$ است. با فرض خطای اندازه‌گیری ۱ پیکسلی، این اندازه پیکسل، برای یک نانوبلور سلولزی با طول $50\ \text{nm}$ ، عدم قطعیت نسبی تقریباً ۱۳٪ خواهد داشت. برای تعلیق‌های CNC که ذرات کوتاه (کوچک‌تر از $50\ \text{nm}$) در آن‌ها سهم بزرگی دارند، افزایش تفکیک‌پذیری (اگرچه به قیمت افزایش زمان داده‌برداری) با روبش نواحی کوچک‌تر یا با استفاده از تفکیک‌پذیری $1024\ \text{pixels} \times 1024\ \text{pixels}$ می‌تواند مطلوب باشد.

یادآوری ۲- به صورت اختیاری، می‌توان تیرک را با گرفتن طیف تنظیم گرمایی به منظور تعیین بسامد تشدید و فاکتور کیفیت کالیبره کرد. ثابت فنر را می‌توان با استفاده از روش سیدر^۱ تعیین کرد [26].

یادآوری ۳- پس از ثبت چند تصویر، به دلیل تغییر میزان تیزی یا آلودگی سوزن، ممکن است کیفیت تصویر افت کند. در این موارد لازم است از چندین سوزن استفاده شود تا بتوان تعداد کافی تصویر برای تحلیل تعداد مورد نیاز ذره مجزای CNC، ثبت کرد.

گزارش شده است که ارتفاع نانوبلورهای سلولزی بر اثر رطوبت نسبی تغییر می‌کند [27]. توصیه می‌شود یا رطوبت نسبی ثبت شود یا در محیطی با رطوبت کنترل شده تصویربرداری انجام شود و یا هر دو.

۵-۷ تحلیل تصویر

پس از حذف نانوبلورهای سلولزی با استفاده از ماسک‌گذاری^۱ آستانه^۲، با نرم‌افزار AFM با برآزش چندجمله‌ای درجه اول، تصاویر را مسطح کنید. تصاویر مسطح‌شده را برای تحلیل اندازه با یک نرم‌افزار مناسب مانند Gwyddion^۳ «پردازشگر تصویر پروب روبشی»^۴ یا نرم‌افزار میکروسکوپ، ذخیره کنید.

در هر تصویر، طول و ارتفاع تمامی ذرات مجزا را اندازه‌گیری کنید. ذرات مجاور را فقط در صورتی که جدایی آن‌ها در نواحی تماس یا نزدیک تماس واضح باشد، تحلیل کنید. ذرات انبوه‌شده، ذراتی که در لبه تصویر قرار دارند یا بخشی از آن‌ها خارج از تصویر است، ذرات با طول کمتر از ۲۵ نانومتر، ذراتی که روی هم افتاده‌اند و ذرات با اثرات ناخواسته تصویربرداری را در نظر نگیرید.

طول ذره را به صورت بلندترین فاصله از یک سر CNC تا سر دیگر آن، اندازه‌گیری کنید. برای اندازه‌گیری ارتفاع ذره از یک رویکرد استاندارد استفاده کنید؛ برای مثال، ارتفاع بیشینه را در امتداد محور طولی که برای اندازه‌گیری طول استفاده شده، اندازه‌گیری کنید. اطمینان حاصل کنید که هنگام اندازه‌گیری ارتفاع بیشینه، خیزه‌های^۵ نوفه‌ای^۶ تصادفی در نظر گرفته نشده باشند.

داده‌های ارتفاع و طول را برای همه ذرات ثبت کنید و تصویر را با ذرات تحلیل‌شده شماره‌گذاری شده ذخیره کنید. شماره‌گذاری ذرات می‌تواند در صورت مشاهده هرگونه داده غیرعادی، در تحلیل‌های بعدی مفید باشد.

مثالی از روش اجرایی تحلیل تصویر AFM با استفاده از نرم‌افزار Gwyddion در پیوست پ ارائه شده است.

یادآوری - به دلیل شکل بی‌قاعده برخی ذرات CNC و این واقعیت که ارتفاع می‌تواند در سرتاسر طول ذره متغیر باشد، شناسایی ذرات مجزا چالش برانگیز است.

۸ میکروسکوپی الکترونی عبوری

۱-۸ کلیات

میکروسکوپی الکترونی عبوری برای اندازه‌گیری توزیع اندازه ذرات برای طول و پهنای CNC به کار می‌رود ولی اطلاعاتی در مورد ارتفاع ذره نمی‌دهد. برای داشتن تباین کافی به لکه‌زایی معمولاً با اورانیل استات نیاز است، دیگر روش‌های لکه‌زایی نیز به کار رفته‌اند [21].

1- Masking

2- Threshold

۳- Gwyddion 2.35 (گوئیدپون ۲،۳۵) نام تجاری محصولی است که موسسه اندازه‌شناسی چک (Czech Metrology Institute) آن را ارائه کرده است. این نرم‌افزار رایگان و متن‌باز است و در وبگاه <http://gwyddion.net/> در دسترس است. این اطلاعات به منظور راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به معنی تأیید محصول نامبرده توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

۴- Scanning Probe Image Processor به اختصار SPIPTM ارائه شده توسط Metrology A/S، مثالی از یک محصول مناسب و از لحاظ تجاری در دسترس است. این اطلاعات به منظور راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به معنی تأیید محصول نامبرده توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

5- Spikes

6- Noise

۲-۸ دستگاه‌ها و لوازم جانبی

- میکروسکوپ الکترونی عبوری با ولتاژ شتاب‌دهنده بین ۸۰ kV و ۳۰۰ kV.

- توری‌های کالیبراسیون یا مواد مرجع نانوذره‌ای.

۳-۸ کالیبراسیون میکروسکوپ

پیش از تصویربرداری نمونه، اعتبار کالیبراسیون را تأیید کنید، مگر این‌که سوابق کالیبراسیون آزمایشگاه نشان دهد که این کار ضرورتی ندارد. در صورت لزوم، میکروسکوپ را با استفاده از یک استاندارد کالیبراسیون مناسب براساس دستورالعمل‌های سازنده کالیبره کنید. کالیبراسیون را در شرایط عملیاتی و با بزرگنمایی مشابه آن‌چه برای نمونه CNC استفاده خواهد شد، انجام دهید. استانداردهای مناسب کالیبراسیون شامل: فاصله‌های شبکه پلا، توری‌های خطی و نانوذرات سیلیکا یا طلا هستند. استفاده از یک استاندارد کالیبراسیون دارای عدم قطعیت و مقدار گواهی‌شده و اظهاریه قابلیت ردیابی اندازه‌شناختی ترجیح داده می‌شود. رهنمودهایی در مورد کالیبراسیون TEM به تفصیل در استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ و استاندارد ISO 29301 ارائه شده است [9].

۴-۸ داده‌برداری

میکروسکوپ را براساس توصیه‌های سازنده آماده و پارامترها را مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ بهینه‌سازی کنید. پارامترهای دستگاه TEM را باید به گونه‌ای انتخاب کرد که تصاویر کیفیت بالایی داشته و تباین خوبی بین پس‌زمینه و ذرات وجود داشته باشد. معمولاً بزرگنمایی و ولتاژهای شتاب‌دهنده بالا ترجیح داده می‌شوند.

روش‌اجرایی آماده‌سازی نمونه در زیربند ۳-۶ بهینه‌سازی شده تا نانوبلورهای سلولزی انبوه‌شده به حداقل رسیده و در عین حال، از وجود تعداد معقولی ذره مجزا در میدان دید اطمینان حاصل شود. با این وجود، احتمال دارد لکه‌زایی نمونه و توزیع CNC ناهمگن باشد و برای شناسایی نواحی با چگالی CNC و لکه‌زایی کافی، نیاز باشد تصاویری با مقیاس بزرگ‌تر (برای مثال $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) از موقعیت‌های مختلف توری تهیه شود.

پس از شناسایی ناحیه‌ای با لکه‌زایی و چگالی CNC مناسب، تصاویری با بزرگنمایی تقریباً ۳۰۰۰۰، به گونه‌ای که تفکیک‌پذیری $0.3 \text{ nm/pixel} \leq$ باشد، تهیه کنید. با نرمال کردن (بهنجار کردن) عدسی در بزرگنمایی انتخاب‌شده برای تصویربرداری، از تنظیمات تجدیدپذیر کالیبراسیون اطمینان حاصل کنید. زمان ثبت تصویر را طوری انتخاب کنید که به اندازه کافی کوتاه باشد تا رانش^۲ «سکوی نمونه»^۳ به حداقل برسد و در عین حال، به اندازه کافی طولانی باشد تا تباین کافی بین ذرات و پس‌زمینه ایجاد شود.

1- Normalization
2- Drift
3- Stage

برای تحلیل تعداد ذرات مورد نیاز، به تعداد کافی ریزنگاشت (میکروگراف) ثبت کنید (برای راهنمایی به زیربند ۶-۱ مراجعه شود) و اطمینان یابید که از چندین (حداقل سه) ناحیه توری تصویربرداری شده است. یادآوری - اندازه پیکسلی $0.3 \sim \text{nm/pixel}$ و خطای اندازه‌گیری یک پیکسلی، برای ذره‌ای با پهنای 6 nm ، عدم قطعیت نسبی تقریباً $1/5 \%$ ایجاد می‌کند.

۵-۸ تحلیل تصویر

تصاویر را همان‌گونه که در زیر به‌اختصار آمده، با استفاده از نرم‌افزارهایی مانند ImageJ^۱ یا Digital Micrograph^۲ تحلیل کنید.

یک تصویر را باز کنید و موارد آلودگی یا اثرات ناخواسته را واریسی کنید؛ تصاویر با چنین مواردی را کنار بگذارید. درخشانی^۳ و تباین را میزان کنید و مقیاس اندازه‌گیری را تنظیم کنید.

ذرات منفرد را انتخاب کنید و طول و پهنای آنها را اندازه‌گیری کنید. توصیه می‌شود تمامی ذرات منفرد هر تصویر تحلیل شوند. نانوبلورهای سلولزی انبوه‌شده، ذرات با آلودگی یا اثرات ناخواسته تصویربرداری و نانوبلورهای سلولزی لبه‌های تصویر را کنار بگذارید. ذراتی که روی هم افتاده‌اند را فقط در صورتی که زاویه بین آنها در گستره تقریبی 30° تا 60° باشد و نشانه واضحی مبنی بر مجزا بودن ذرات وجود داشته باشد، تحلیل کنید.

ذرات روی هم افتاده‌ای که زاویه بینشان خارج از گستره مشخص شده باشد، فقط در صورتی برای تحلیل انتخاب می‌شوند که جدایی بین آنها در نواحی تماس یا نزدیک تماس به‌وضوح مشخص باشد.

طول را در راستای یک خط مستقیم بین دو سر ذره، مستقل از هرگونه عدم‌تقارن یا انحنا در ذرات، اندازه‌گیری کنید. پهنای ذرات را در نقطه میانی طولشان اندازه‌گیری کنید، مگر اینکه ذره به‌وضوح نامتقارن باشد. در این صورت، اندازه‌گیری پهنای را در پهن‌ترین نقطه انجام دهید.

مثالی از روش اجرایی تحلیل تصویر با استفاده از یک ImageJ macro نیمه‌خودکار در پیوست ت ارائه شده است.

پهنای و طول هر ذره را ثبت کنید و تصاویر تحلیل شده را با ذرات نشانه‌گذاری شده ذخیره کنید.

۱- نرم‌افزار ImageJ یک نرم‌افزار رایگان و متن‌باز است و در وبگاه <https://imagej.nih.gov/ij/> در دسترس است. این اطلاعات به‌منظور راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به معنی تأیید محصول نامبرده توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

۲- نرم‌افزار Digital Micrograph مثالی از یک محصول مناسب و از لحاظ تجاری در دسترس است. این اطلاعات به‌منظور راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به معنی تأیید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

۹ تحلیل داده

۱-۹ کلیات

روش‌های آماری متنوعی وجود دارند که می‌توان برای داده‌های اندازه ذره آن‌ها را به کار برد. این روش‌ها می‌توانند در موارد زیر کمک‌کننده باشند:

الف- ارزیابی استواری^۱ داده‌ها در یک اندازه‌گیری و تکرارپذیری^۲ و تجدیدپذیری در اندازه‌گیری‌های متعدد،

ب- برازش داده‌های اندازه ذره به یک مدل مرجع،

پ- محاسبه آمارگان کل یا مقادیر توافقی برای اندازه‌گیری‌های متعدد.

در یک رویکرد رایج، از «آنالیز واریانس»^۳ برای ارزیابی وجود اختلاف بین مقدار میانگین^۴ توصیفگر^۵ یک مجموعه داده با «میانگین کل»^۶ همه مجموعه داده‌ها یا برای ارزشیابی اختلاف بین مقادیر میانگین توصیفگرهای دو مجموعه داده استفاده می‌شود. از تحلیل دومتغیره^۷ می‌توان برای مقایسه زوجی^۸ توزیع‌های توصیفگر استفاده کرد. آزمون‌های غیرپارامتری از قبیل آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف^۹ را می‌توان برای آزمودن اختلاف‌های بین توزیع‌های تجمعی، بدون دانش قبلی از بهترین مدل توزیع برای مجموعه داده به کار برد. توابع توزیع اندازه ذره (مانند نرمال، لگاریتمی نرمال، چوله^{۱۰} نرمال، وایبول^{۱۱}، گاما) را با استفاده از انواع روش‌ها از جمله تطابق گشتاور^{۱۲}، بیشینه درست‌نمایی^{۱۳} یا روش‌های بیزین^{۱۴} می‌توان به داده‌ها برازش کرد و عدم قطعیت‌هایی برای پارامترهای برازش (مانند میانگین و انحراف معیار این توزیع‌ها) به دست آورد. این روش‌ها در تحلیل داده‌های اندازه ذره برای تعدادی از نانومواد به کار رفته‌اند؛ نمونه‌مثال‌هایی در استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ ارائه شده است.

۲-۹ ارزیابی کیفیت داده

ارزیابی تصاویر مجزا برای وارسی آلودگی، اثرات ناخواسته تصویربرداری و موارد دیگر معمولاً پیش از یا به عنوان بخشی از تحلیل اندازه ذره انجام می‌گیرد. با در دست داشتن یک مجموعه داده کامل، بررسی این

-
- 1- Robustness
 - 2- Repeatability
 - 3- Analysis of variance (ANOVA)
 - 4- Mean
 - 5- Descriptor
 - 6- Grand mean
 - 7- Bivariate
 - 8- Pair-wise
 - 9- Kolmogorov-Smirnov
 - 10- Skew
 - 11- Weibull
 - 12- Moment
 - 13- Likelihood
 - 14- Bayesian

مجموعه داده، برای مثال، با رسم بافت‌نگاشت^۱ یا با استفاده از نمودار جعبه‌ای مفید است (به مثال‌های پیوسته‌های ت و ث مراجعه شود). این بررسی می‌تواند نقاط فرین^۲ در یک تک‌مجموعه داده را نشان دهد. با بررسی تصاویر ذخیره‌شده‌ای که ذرات آن‌ها تحلیل شده، می‌توان تأیید کرد که آیا در تحلیل یا انتخاب ذره برای چنین نقاطی خطایی رخ داده یا خیر. با این وجود، توجه داشته باشید که از چنین بررسی‌هایی نباید برای کنار گذاشتن نقطه داده‌ها استفاده شود، مگر این که خطای فنی یا اثر ناخواسته آشکاری شناسایی شود. وقتی چندین مجموعه داده ثبت می‌شود (برای مثال، از نمونه‌های متعدد یا اندازه‌گیری‌های مکرر روی یک نمونه) مقایسه زوجی مجموعه داده‌ها (برای مثال با استفاده از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف) نیز می‌تواند مفید باشد. از این رویکرد می‌توان برای ارزشیابی تکرارپذیری و انجام مقایسه بین دو مجموعه شرایط مختلف (مانند تصاویر ثبت شده با دو تفکیک‌پذیری مختلف) استفاده کرد. با این وجود، نباید مجموعه داده‌ها صرفاً براساس یک آزمون آماری کنار گذاشته شوند، هرچند اثرات ناخواسته تجربی یا خطاهای فنی می‌توانند توجیهی برای صرف نظر از بعضی داده‌ها باشند.

۳-۹ برآزش مدل‌های توزیع به داده‌ها

در اندازه‌گیری‌های اندازه CNC معمولاً طول ذره به همراه پهنا (TEM) یا ارتفاع (AFM) ذره اندازه‌گیری می‌شود و نسبت‌های منطقی همان‌گونه که در استاندارد ISO/TR 19716 [5] به‌اختصار بیان شده، محاسبه می‌شوند. در بیشتر گزارش داده‌های منتشرشده، مقدار میانگین را معمولاً با انحراف معیار، به‌عنوان معیاری از گستردگی^۳ یا پهنای توزیع اندازه گزارش می‌کنند. با این وجود، در این رویکرد این فرض ضمنی وجود دارد که می‌توان داده‌ها را به‌طور مناسبی به یک توزیع نرمال برآزش کرد ولی معمولاً این‌طور نیست. موارد کمی وجود دارند که در آن‌ها از توزیع‌های لگاریتمی نرمال که بیشتر برای توزیع‌های نامتقارن (چوله‌شده به سمت مقادیر بزرگ‌تر) که معمولاً در نانوبلورهای سلولزی مشاهده می‌شود، به‌کار رفته باشد [24]، [28]، [29]. در استاندارد که اخیراً درباره TEM تدوین شده (به استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ مراجعه شود) توصیه شده‌است که توزیع‌های نرمال، لگاریتمی نرمال و وایبول آزموده شوند، درحالی‌که در یک کار جدید دیگر، از رویکردهای دیگری از قبیل تلفیقی از توزیع‌های گوسین برای توصیف بهتر توزیع اندازه ذرات با شکل‌های پیچیده استفاده شده‌است [30]. توصیه می‌شود برای برآزش به مدل‌های توزیع، به‌جای داده‌های دسته‌بندی شده^۴، از مجموعه داده کامل استفاده شود. برای بهینه‌سازی برآزش داده‌ها و ایجاد امکان ارزشیابی کیفیت برآزش، روش‌های متنوعی را می‌توان به‌کار گرفت. خطای استاندارد (یا خطای استاندارد نسبی) برای پارامتر برآزش، معیاری از کیفیت آن پارامتر ارائه می‌کند.

داده‌های ILC در پیوسته‌های پ و ت، با توجه به وجود شکل‌های پیچیده و تغییرات نسبتاً بزرگ در پهنای توزیع و عدم تقارن مشاهده‌شده در مجموعه داده‌های آزمایشگاه‌های مختلف، با استفاده از یک رویکرد

1- Histogram
2- Extreme
3- Breadth
4- Binned

جایگزین برآزش داده، ارزیابی می‌شوند. در این حالت، مجموعه داده‌ها به یک توزیع چوله نرمال برآزش می‌شوند که با سه پارامتر مشخص می‌شود: موقعیت (معیاری از «گرایش به مرکز»^۱، مانند میانگین یا میانه^۲)، مقیاس (معیاری از پهنای توزیع، مانند انحراف معیار) و یک فاکتور شکل (که چولگی^۳ یا عدم تقارن توزیع را اندازه‌گیری می‌کند). توزیع توافقی نهایی با تلفیق توزیع‌های هر یک از آزمایشگاه‌ها و برآزش یک توزیع چوله نرمال به داده‌های ادغام‌شده^۴ با استفاده از روش‌های بیزین به دست می‌آید [31]. بدین ترتیب، برآوردی از موقعیت، مقیاس، شکل و عدم قطعیت‌های آن‌ها برای توزیع توافقی فراهم می‌آید.

۴-۹ عدم قطعیت اندازه‌گیری

رویکرد استاندارد ISO/IEC 98-3:2008 [2] در مورد عدم قطعیت شامل مراحل زیر است:

الف- تعریف اندازه‌دهه^۵؛

ب- شناسایی تمامی منابع مرتبط عدم قطعیت؛

پ- محاسبه عدم قطعیت تلفیقی (ادغام‌شده)؛

ت- برآورد عدم قطعیت بسط‌یافته در یک سطح اطمینان مشخص.

منابع عدم قطعیت عموماً به دو رده، طبقه‌بندی می‌شوند. مؤلفه‌های نوع الف مانند مواردی که ناشی از اندازه‌گیری‌های تکراری هستند، با روش‌های آماری ارزشیابی می‌شوند. مؤلفه‌های نوع ب با روش‌های دیگری ارزشیابی می‌شوند و شامل عواملی از قبیل خطاهای کالیبراسیون، تغییرات دمایی و عدم قطعیت‌های مربوط به دستگاه / روش هستند. مؤلفه‌های معمول نوع ب در AFM و TEM به اختصار در زیر بیان شده‌اند.

مؤلفه‌های عدم قطعیت نوع ب در AFM شامل موارد زیر است: برهم‌کنش‌های سوزن- نمونه که نمونه را فشرده می‌کند و موجب خطا در ارتفاع می‌شود، خطاهای کالیبراسیون مربوط به Z (ارتفاع) و یا X,Y (اندازه‌گیری‌های جانبی)، اثرات کانولوشن سوزن در اندازه‌گیری‌های اندازه‌جانبی، عدم قطعیت در تعیین ارتفاع ذره ناشی از انتخاب بیشینه ارتفاع و سطح پس‌زمینه (که تحت تأثیر از صافی بسته است)، خطای پیکسل در اندازه‌گیری‌های جانبی، آماده‌سازی نمونه (که می‌تواند در اندازه‌گیری‌های تکرارپذیری، تجدیدپذیری به حساب آورده شود)، ذهنیت^۶ آزمونگر در انتخاب ذرات مجزا برای تحلیل اندازه، استفاده از چندین پروب AFM به دلیل افت کیفیت پروب پس از جمع‌آوری چند تصویر.

مؤلفه‌های عدم قطعیت نوع ب در TEM شامل موارد زیر است: خطاهای کالیبراسیون، رانش باریکه الکترونی یا سکوی نمونه، وضوح، تفکیک‌پذیری پیکسلی، سطح آستانه، صافی پس‌زمینه، ذهنیت آزمونگر در گردآوری

1- Central tendency
 2- Median
 3- Skewness
 4- Pooled
 5- Measurand
 6- Subjectivity

انتخابی ذرات برای تحلیل اندازه، آماده‌سازی نمونه (که می‌تواند در اندازه‌گیری‌های تکرارپذیری، تجدیدپذیری به حساب آورده شود)؛ اثرات ناشی از لکه‌زایی ذره.
برای تعداد محدودی از آزمایشاتی که در یک آزمایشگاه انجام شده‌اند، عدم قطعیت معمولاً با رابطه زیر ارزیابی می‌شود:

$$u_c = (u_{\text{rep}}^2 + u_t^2 + u_{\text{cal}}^2 + u_{\text{other}}^2)^{1/2} \quad (1)$$

که در آن:

u_{rep}	عدم قطعیت تکرارپذیری است؛
u_t	عدم قطعیت صحت ^۱ است؛
u_{cal}	عدم قطعیت کالیبراسیون است؛
u_{other}	انواع دیگر عدم قطعیت‌های نوع ب است که می‌توان برآورد کرد.

رویکردی برای ارزیابی عدم قطعیت کلی از یک مطالعه ILC در پیوست پ و ت به اختصار ارائه شده‌است. در این رویکرد توزیع توافقی نهایی مدلسازی شده‌است تا پارامترهای برازش و عدم قطعیت‌ها به دست آید. به‌عنوان یک روش جایگزین، در استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ توصیه شده‌است که برای هر یک از پارامترهای برازش شده، ضریب تغییرات محاسبه شده و از آن برای برآورد عدم قطعیت اندازه‌گیری استفاده شود.

۱۰ گزارش آزمون

۱-۱۰ میکروسکوپی نیروی اتمی

۱-۱-۱۰ اطلاعات کلی

- آزمایشگاه؛
- نویسنده گزارش؛
- تاریخ گزارش؛
- استاندارد ملی مورداستفاده، شامل سال انتشار (به‌صورت استاندارد ملی ایران شماره: سال انتشار).

۲-۱-۱۰ نمونه

- شماره شناسایی نمونه، تاریخ دریافت؛
- منبع CNC (سازنده، روش)، نوع نمونه (خشک، پودر)؛

- عمل‌آوری نمونه (روش پراکنش، رقیق‌سازی)؛
- نهشت (غلظت تعلیقه، نوع، اندازه و پوشش‌دهی بستره، روش نهشت).

۱۰-۱-۳ داده‌برداری

- دستگاه AFM (سازنده، شماره مدل)؛
- گستره یا نوع روبشگر؛
- حالت عملیاتی (برای مثال حلقه باز یا بسته، ضربه‌زنی)؛
- شرایط تهیه تصویر (دما، لرزش یا عایق صوتی)؛
- کارور^۱؛
- کالیبراسیون (استاندارد، روش، تاریخ آخرین کالیبراسیون)؛
- تاریخ(های) داده‌برداری؛
- پروب AFM (نوع یا سازنده، تیرک، ثابت فنر، شعاع انحنا یا ابعاد سوزن)؛
- اندازه روبش، تعداد پیکسل‌ها؛
- سرعت روبش؛
- دیگر پارامترها (برای مثال دامنه آزاد در هوا، نقطه تنظیم، بهره‌ها)؛
- آزمون نیروی تصویربرداری (شامل نمودار ارتفاع بر حسب نسبت دامنه برای ذرات منتخب)؛
- هرگونه انحراف از روش اجرایی؛
- هرگونه شاخصه غیرمعمول مشاهده‌شده؛
- نام‌های تصاویر در فایل.

۱۰-۱-۴ تحلیل تصویر

- پردازش تصویر (برای مثال مسطح کردن)؛
- نرم‌افزار یا روش؛
- فایل‌های تصویری تحلیل‌شده؛
- تعداد ذرات تحلیل‌شده؛
- روش‌های آماری تحلیل.

۱۰-۲ میکروسکوپی الکترونی عبوری

۱۰-۲-۱ اطلاعات کلی

- آزمایشگاه؛
- نویسنده گزارش؛
- تاریخ گزارش؛
- استاندارد ملی مورداستفاده، شامل سال انتشار (به صورت استاندارد ملی ایران شماره: سال انتشار ...).

۱۰-۲-۲ نمونه

- شماره شناسایی نمونه، تاریخ دریافت؛
- منبع CNC (سازنده، روش)، نوع نمونه (خشک، پودر)؛
- عمل آوری نمونه (روش پراکنش، رقیق سازی)؛
- نهشت (غلظت تعلیقه، نوع توری، روش نهشت، لکه زایی).

۱۰-۲-۳ داده برداری

- دستگاه TEM (سازنده، شماره مدل)؛
- ولتاژ شتاب؛
- کالیبراسیون (استاندارد، روش اجرایی، تاریخ آخرین کالیبراسیون)؛
- میدان دید؛
- بزرگنمایی تصویر؛
- اندازه پیکسل؛
- کارور؛
- تاریخ(های) داده برداری؛
- دیگر پارامترها؛
- هرگونه انحراف از روش اجرایی؛
- هرگونه شاخصه غیرمعمول مشاهده شده؛
- نامهای تصاویر در فایل.

۴-۲-۱۰ تحلیل تصویر

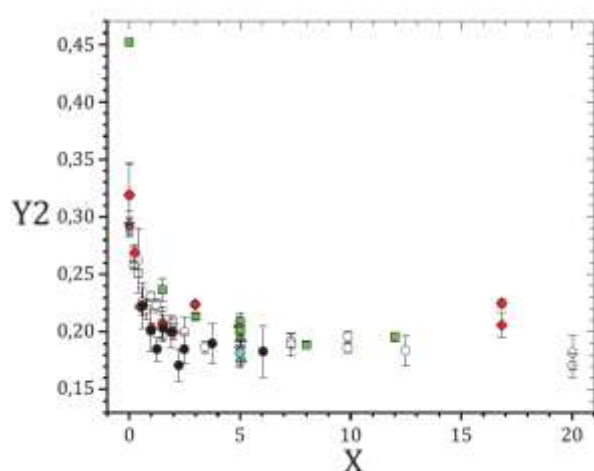
- نرم افزار یا روش؛
- فایل های تصویری تحلیل شده؛
- تعداد ذرات تحلیل شده؛
- روش های آماری تحلیل.

پیوست الف

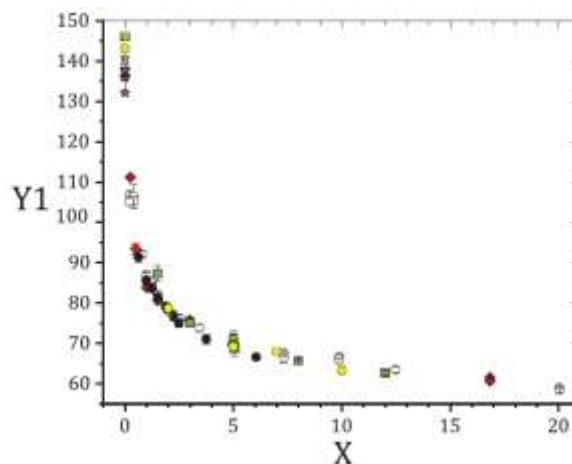
(آگاهی‌دهنده)

ارزیابی پراکنه‌های نانوبلور سلولزی

شکل الف-۱ نمودارهای متوسط Z و شاخص بس پراکندگی اندازه‌گیری شده به روش DLS را به صورت تابعی از انرژی امواج‌دهی صوتی تقسیم بر جرم CNC نشان می‌دهد.



ب- شاخص بس پراکندگی به صورت تابعی از انرژی امواج‌دهی صوتی تقسیم بر جرم CNC



الف- متوسط Z به صورت تابعی از انرژی امواج‌دهی صوتی تقسیم بر جرم CNC

راهنما:

X انرژی امواج‌دهی صوتی (kJ/g)

Y1 متوسط Z

Y2 PDI

یادآوری- اندازه‌گیری‌ها مربوط به تعلیق‌های با کسر جرمی ۲٪ هستند؛ آزمایش‌های مجزا توسط افراد متعددی در طی یک دوره تقریباً یک ساله انجام گرفته و هر آزمایش با نمادی با شکل و رنگ مختلف نشان داده شده است [16]. میله‌های خطا متناظر با یک انحراف معیار حاصل از سه اندازه‌گیری DLS برای هر نمونه هستند. نمادها، میله‌های خطای بیشتر نقاط متوسط Z را پوشانده‌اند و میله‌های خطا به خوبی دیده نمی‌شوند.

منبع: مرجع [16]، با کسب اجازه تحت حق‌نشر کرون^۱ (crown) بازنشر شده‌است.

شکل الف-۱- اندازه‌گیری‌های DLS به صورت تابعی از انرژی امواج‌دهی صوتی تقسیم بر جرم CNC

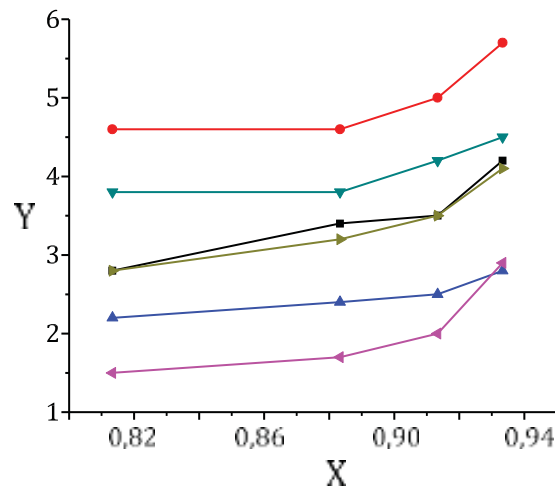
۱- قانون حق‌نشر دولتی کشورهای مشترک‌المنافع

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

ارزیابی نیروی اعمالی تصویربرداری

شکل ب-۱ نمودارهای ارتفاع اندازه‌گیری شده CNC به صورت تابعی از نسبت نقطه تنظیم دامنه به دامنه آزاد را نشان می‌دهد.



راهنما:

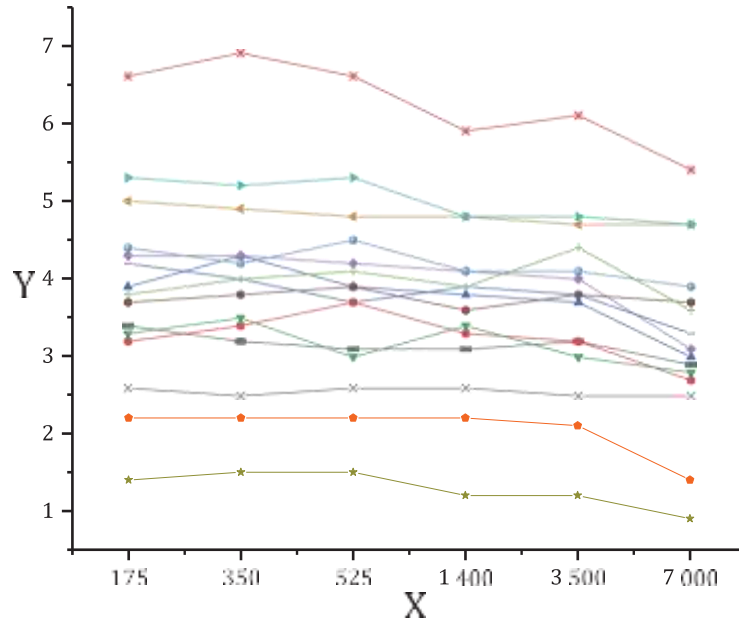
X نقطه تنظیم دامنه تقسیم بر دامنه آزاد
Y ارتفاع (nm)

یادآوری- داده‌ها در حالت تماس متناوب با سوزن سیلیکونی AFM (شعاع نوعی ۸ نانومتر، ثابت فنر ۲/۷ N/m) به دست آمده‌اند.

منبع: مرجع [16]، با کسب اجازه تحت حق نشر کرون باز نشر شده‌است.

شکل ب-۱- نمودارهای ارتفاع اندازه‌گیری شده CNC به صورت تابعی از نسبت نقطه تنظیم دامنه به دامنه آزاد

شکل ب-۲ نمودارهای ارتفاع اندازه‌گیری شده CNC را به صورت تابعی از نیروی اعمالی نشان می‌دهد.



راهنما:

X نیرو (pN)

Y ارتفاع (nm)

یادآوری - داده‌ها با استفاده از یک میکروسکوپ نیروی اتمی با پروب‌های ۰/۴ N/m (ثابت نامی فنر)، ۲ nm (شعاع نامی) به دست آمده‌اند. هر نماد/خط رنگی داده‌های یک CNC را ارائه می‌کند.

منبع: مرجع [35]. با کسب اجازه تحت حق نشر کرون بازنشر شده‌است.

شکل ب-۲ - نمودارهای ارتفاع اندازه‌گیری شده CNC به صورت تابعی از نیروی اعمالی

پیوست پ

(آگاهی‌دهنده)

نتایج مقایسه بین آزمایشگاهی: AFM

پ-۱ پیش‌زمینه و اهداف

از AFM اغلب برای اندازه‌گیری طول و ارتفاع نانوبلورهای سلولزی استفاده می‌شود. این مقایسه بین آزمایشگاهی زیر نظر «حوزه کاری فنی ۳۴»^۱ (جمعیت‌های نانوذره‌ای) در پروژه VAMAS و با هدف آزمودن پروتکل‌های تهیه تصویر و تحلیل تصویر در AFM انجام شد. در این ILC که سازمان‌دهی آن بر عهده «شورای تحقیقات ملی کانادا» (NRC)^۲ بود، از یک ماده مرجع CNC (CNCD-1) استفاده شد که NRC آن را در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار داد. نانوبلور سلولزی با هیدرولیز اسیدی خمیر چوب نرم با سولفوریک اسید و پس از آن خنثی‌سازی با NaCl تولید شد که در این فرایند گروه‌های سولفات نیمه‌استری روی سطح ایجاد شدند. جزئیات کامل مربوط به مشخصه‌یابی در دسترس است [16]، [32]. ده موسسه شرکت‌کننده از آسیا، استرالیا، اروپا و آمریکای شمالی مجموعه داده‌های خود را ارسال کردند: سه دانشگاه، یک شرکت صنعتی و شش آزمایشگاه دولتی که چهارتای آن‌ها مؤسسات ملی اندازه‌شناسی بودند. همه آزمایشگاه‌ها تجربه قبلی تصویربرداری از نانوبلورهای سلولزی را نداشتند. مقایسه بین آزمایشگاهی از دو فاز تشکیل شده بود: فاز اول با تعداد محدودی شرکت‌کننده برای آزمودن پروتکل‌های تحلیل تصویر با استفاده از مجموعه‌ای از تصاویر AFM که آزمایشگاه راهبر^۳ فراهم کرده بود، طراحی شد. فاز دوم شامل آماده‌سازی نمونه توسط آزمایشگاه راهبر، تهیه تصویر و تحلیل تصویر توسط شرکت‌کنندگان و تحلیل نهایی داده‌ها توسط کارکنان NRC بود. در این پیوست روش و نتایج ILC به اختصار بیان می‌شود. جزئیات کامل در مرجع [33] منتشر شده است.

پ-۲ فاز یک

پ-۲-۱ کلیات

شش تصویر AFM برای تحلیل با استفاده از نرم‌افزار Gwyddion برای سه شرکت‌کننده فرستاده شد. پروتکل Gwyddion (نسخه خلاصه‌شده‌ای از آن در زیربند پ-۲-۲ ارائه شده است) بر پایه رسم پروفایل‌های خطی از میان محور بلند ذره برای تمامی نانوبلورهای سلولزی مجزا در یک تک‌تصویر است. سپس به ترتیب ارتفاع و طول هر ذره اندازه‌گیری می‌شود. این روش، زمان تحلیل داده را در مقایسه با اندازه‌گیری دستی تک‌تک پروفایل‌های CNC برای استخراج داده‌های مربوط به طول و ارتفاع، کاهش می‌دهد. سطح قابل توجه انبوهش، استفاده از یک رویکرد خودکار در تحلیل را غیرعملی می‌سازد. انتخاب نانوبلورهای سلولزی با تبعیت از روش اجرایی توصیه‌شده در زیربند ۷-۴ بوده است.

1- Technical working Area 34
2- National Research Council Canada
3- Piloting

پ-۲-۲ روش اجرایی تحلیل Gwyddion

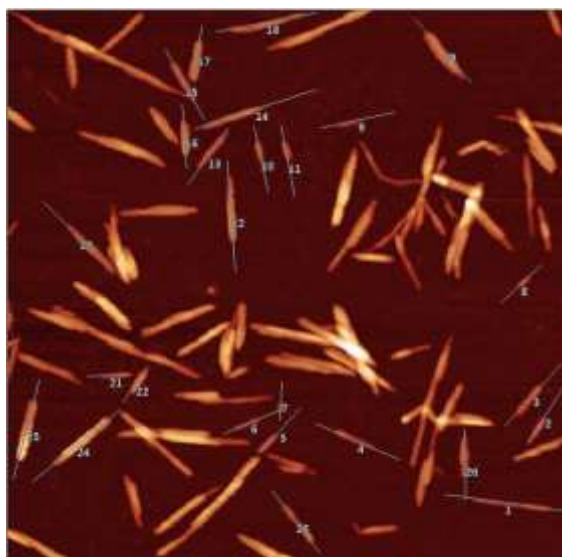
عملیات «Extract profiles» را باز کنید تا پنجرهٔ پروفایل باز شود؛ ضخامت را روی ۳ پیکسل و درون‌یابی خطی را تنظیم کنید، خط‌ها را شماره‌گذاری کنید و پروفایل‌ها را جدا کنید و تفکیک‌پذیری ثابت را انتخاب نکنید.

پروفایلی در امتداد محور بلند یک ذرهٔ CNC رسم کنید؛ پروفایل را فراتر از دو انتهای ذره ادامه دهید تا به سطح پس‌زمینه برسید. این کار را برای تمامی نانوبلورهای سلولزی قابل‌تحلیل تکرار کنید و تصویر را ذخیره کنید. یک نمونه تصویر پیش و پس از انتخاب ذرات در شکل پ-۱ نشان داده شده‌است.

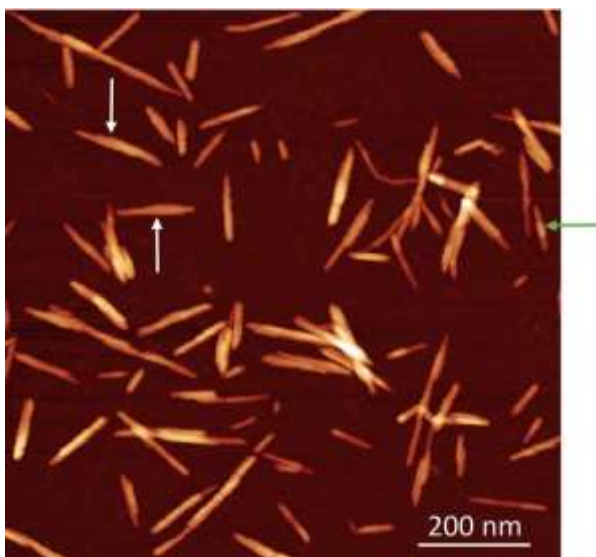
در پنجرهٔ پروفایل‌ها روی گزینهٔ «Apply» کلیک کنید تا هر پروفایل در یک پنجرهٔ جدید باز شود، هر پروفایل با شماره‌ای که متناظر با CNC شماره‌گذاری شده در تصویر است، شناسایی می‌شود. گزینهٔ «Measure distance in graph» را انتخاب کنید و ارتفاع را به‌صورت اختلاف بین جابه‌جایی عمودی در بالاترین ناحیهٔ پروفایل (با صرف‌نظر از هر خیزهٔ تک نقطه‌ای معمول روی لبه) و پس‌زمینهٔ مجاور اندازه‌گیری کنید و مقدار ارتفاع را ثبت کنید. طول را با استفاده از گزینهٔ «Intersections» اندازه‌گیری کنید. طول یک CNC به‌صورت فاصلهٔ بین دو نقطهٔ برخورد پروفایل خطی با خط مبنا^۱ تعیین می‌شود. اندازه‌گیری طول و ارتفاع را برای هریک از پروفایل‌های تصویر تکرار کنید و داده‌ها را ثبت کنید.

روش اجرایی بالا را برای تمامی تصاویر تکرار کنید.

1- Baseline



ب- تصویر AFM نمایش داده شده در Gwyddion پس از رسم پروفایل برای تمامی نانوبلورهای سلولزی مجزا



الف- تصویر AFM نمایش داده شده در Gwyddion پیش از رسم پروفایل برای تمامی نانوبلورهای سلولزی مجزا

یادآوری- دو نانوبلور سلولزی که با یک پیکان سفید نشان داده شده‌اند، هنگامی که در مقیاس بزرگ‌تری مشاهده شوند، به نظر می‌رسد که ذرات به‌طور جانی انبوه شده باشند؛ نانوبلور سلولزی که با پیکان سبز نشان داده شده، کنار گذاشته شده‌است، زیرا مشخص نیست که یک تک‌ذره است یا این که ذره کوچکی روی ذره بزرگ‌تری قرار گرفته‌است.

منبع: مرجع [33]. با کسب اجازه تحت حق نشر کرون بازنشر شده‌است.

شکل پ-۱- تصاویر AFM نانوبلورهای سلولزی نمایش داده شده در Gwyddion

پ-۲-۳ نتایج

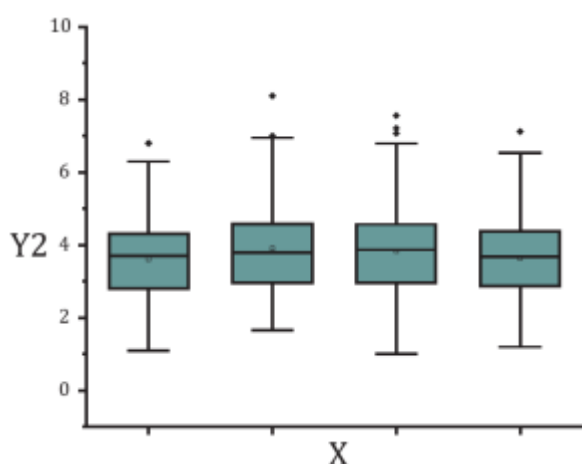
دو آزمایشگاه، تحلیلی از داده‌ها ارسال کردند. این داده‌ها به همراه داده‌های اندازه‌گیری شده توسط دو تحلیلگر به‌عنوان بخشی از فرایند مشخصه‌یابی CNCD-1 با یکدیگر مقایسه شدند. چهار مجموعه داده برای طول و ارتفاع به‌صورت نمودارهای جعبه‌ای در شکل پ-۲ نمایش داده شده‌اند. اگرچه شرکت کنندگان تعداد متفاوتی ($n = 87, 140, 146, 198$) نانوبلور سلولزی را انتخاب و تحلیل کردند، اما نتایج بسیار به هم شبیه است. تحلیل کولموگوروف-اسمیرنوف نشان می‌دهد که فقط یک مورد از مقایسه‌های دو به دو آزمایشگاه‌ها برای طول متفاوت است (آزمایشگاه ۱ تحلیلگر ۲، آزمایشگاه ۳) و برای ارتفاع هیچ کدام متفاوت نیستند. این مطلب مبنی بر این است که، علی‌رغم تعداد محدود مجموعه داده‌ها، تغییرپذیری^۱ در انتخاب و تحلیل، عدم قطعیت بزرگی در نتیجه نهایی وارد نمی‌کند.

1- Variability

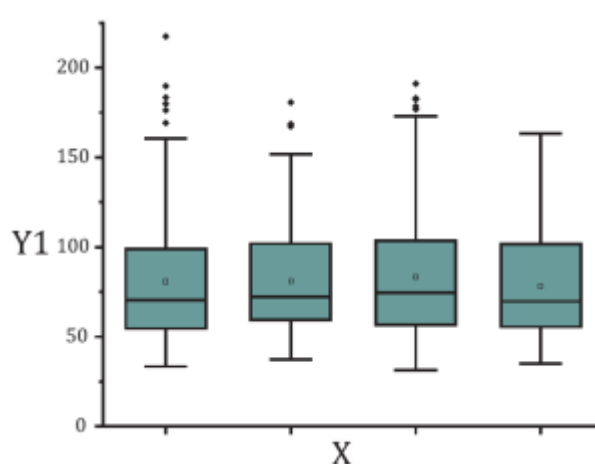
پ-۳ فاز دو

پ-۳-۱ کلیات

در فاز دو، آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده از نمونه‌های CNC که توسط آزمایشگاه راهبر آماده شده بود، تصویربرداری کرده و با استفاده از پروتکل‌های تهیه‌شده داده‌برداری و تحلیل، تصاویر را تحلیل کردند. داده‌های زیر ثبت شدند: قالبی از اکسل حاوی اطلاعات کلی در مورد دستگاه و شرایط عملیاتی، داده‌های طول و ارتفاع برای تمامی ذرات تحلیل‌شده، بافت‌نگاشت‌های طول، ارتفاع و نسبت منظری به‌همراه میانگین و انحراف معیار هریک، رونوشت‌هایی از فایل‌های اصلی تصویر و تصاویر پردازش‌شده با ذرات شماره‌گذاری‌شده.



ب- نمودار جعبه‌ای داده‌های ارتفاع برای آزمون‌های تحلیل تصویر AFM



الف- نمودار جعبه‌ای داده‌های طول برای آزمون‌های تحلیل تصویر AFM

راهنما:

X کد آزمایشگاه (از چپ به راست): آزمایشگاه ۱ تحلیلگر ۱، آزمایشگاه ۱ تحلیلگر ۲، آزمایشگاه ۲، آزمایشگاه ۳
 Y1 طول (nm)
 Y2 ارتفاع (nm)

یادآوری - پایین و بالای جعبه‌های رنگی بیست‌وپنجمین و هفتادوپنجمین صدک (وسط ۵۰٪ داده‌ها) را نمایش می‌دهند؛ میانگین و میانه، به‌ترتیب به‌صورت یک مربع توخالی و یک خط ممتد نشان داده شده‌اند. میله‌های عمودی یک و نیم برابر دامنه میان‌چارکی هستند، QR (از $Q1 - 1.5 IQR$ تا $Q3 + 1.5 QR$)، نقاطی که خارج از این دامنه قرار می‌گیرند با لوزی‌های توپر نشان داده شده‌اند.

منبع: مرجع [33]، با کسب اجازه تحت حق نشر کرون بازنشر شده‌است.

شکل پ-۲- نمودارهای جعبه‌ای داده‌های طول و ارتفاع برای آزمون‌های تحلیل تصویر AFM

پ-۳-۲ آماده‌سازی نمونه

آزمایشگاه راهبر با استفاده از پروتکل استاندارد امواج‌دهی صوتی (به زیربند ۵-۲ مراجعه شود) [16]، پراکنه‌هایی از CNC با کسر جرمی ۲٪ آماده و نانوبلورهای سلولزی را روی میکای پوشش‌دهی‌شده با پلی‌لیسین نهشت داد (به زیربند ۶-۲ مراجعه شود). براساس انتخاب شرکت‌کننده، از ورقه‌های میکا با قطر ۱۲ mm یا در ابعاد $2.54 \text{ cm} \times 2.54 \text{ cm}$ استفاده شد. برای هر آزمایشگاه شرکت‌کننده دو نمونه ارسال شد، نمونه دوم، نمونه پشتیبان در صورت بروز مشکل بود. پیش از ارسال نمونه‌ها برای شرکت‌کنندگان، برای تأیید کیفیت نمونه، از حداقل یک نمونه از هر دسته^۱ در NRC تصویربرداری شد. آزمون‌ها نشان دادند که اگر نمونه‌ها در محیط خشک تمیزی نگهداری شوند، تا پنج هفته افت کیفیت نخواهند داشت.

پ-۳-۳ داده‌برداری و تحلیل تصویر

در پروتکل از شرکت‌کنندگان خواسته شده بود که پس از دریافت نمونه، طی دو هفته از آن تصویربرداری کنند. به آن‌ها گفته شده بود که پیش از تصویربرداری، AFM را بر طبق توصیه‌های سازنده دستگاه و رویه استاندارد آزمایشگاه شرکت‌کننده کالیبره کنند، مگر این که نحوه استفاده از دستگاه و سوابق کالیبراسیون نشان دهد که کالیبراسیون قبلی، کافی است. حالت تماس متناوب برای تصویربرداری توصیه شده بود. برای تأیید کیفیت نمونه، پیش از ثبت یک سری تصویر در ابعاد $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ، چندین تصویر با مقیاس بزرگ‌تر ثبت شوند. به شرکت‌کنندگان گفته شده بود که تأیید کنند نیروی تصویربرداری به کار رفته، کمینه مقدار مجاز برای تصویربرداری پایدار، بر اساس موارد مطرح‌شده در زیربند ۷-۳ است.

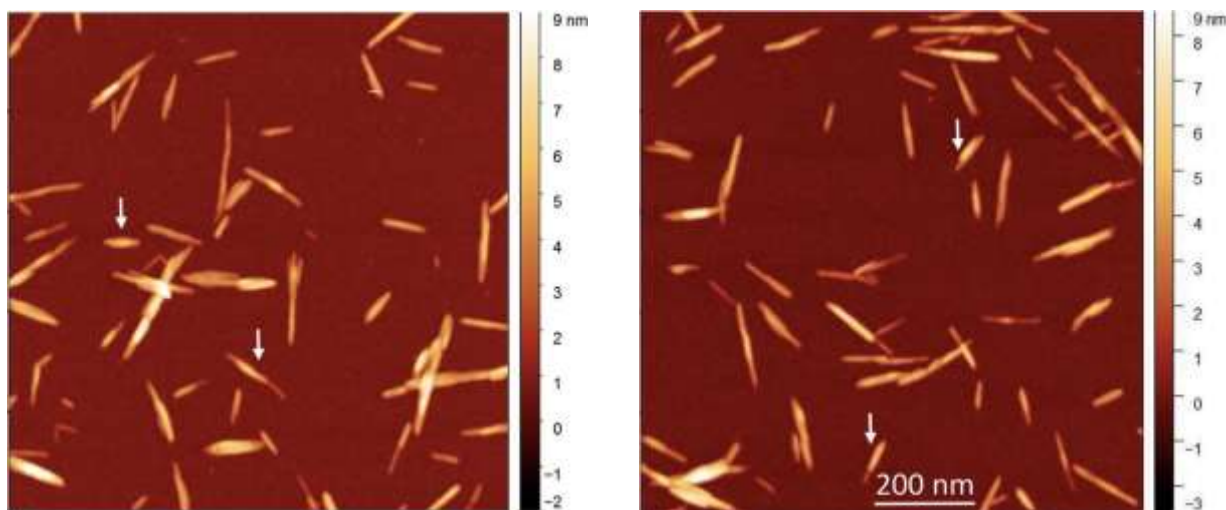
آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده از دستگاه‌هایی از چهار سازنده استفاده کردند و همان‌گونه که از آنان خواسته شده بود، از حالت تماس متناوب استفاده کردند. پروب‌هایی با گستره‌ای از ثابت فنر (۰٫۴ N/m تا ۴۲ N/m) و هندسه و شعاع سوزن (شعاع نامی ۲ نانومتر، ۷ یا ۸ نانومتر و کوچک‌تر از ۱۰ نانومتر) به کار رفتند. اندازه تصویر و تعداد پیکسل‌ها کمترین مقدار خواسته‌شده تفکیک‌پذیری (1.95 nm/pixel) را داد، به‌جز یک آزمایشگاه که از تفکیک‌پذیری 0.98 nm/pixel استفاده کرد. شش مجموعه داده همان‌گونه که خواسته شده بود، ≥ 500 نانوبلور سلولزی تحلیل‌شده داشتند، چهار مجموعه داده تعداد ۱۲۶، ۳۵۵، ۴۰۹ و ۴۴۱ نانوبلور سلولزی تحلیل‌شده داشتند. به‌طور معمول، شرکت‌کنندگان زمان موردنیاز را عامل محدودکننده تعداد نانوبلورهای سلولزی تصویربرداری‌شده، گزارش کردند. بیشتر آزمایشگاه‌ها از چندین پروب برای تصویربرداری از تعداد مورد نیاز نانوبلور سلولزی استفاده کردند، اما چهار آزمایشگاه فقط از یک پروب برای تمامی تصاویر استفاده کردند.

تحلیل تصویر با استفاده از روش اجرایی Gwyddion که در اختیار شرکت کنندگان قرار گرفته بود، انجام شد. دو مورد استثناء وجود داشت؛ دو آزمایشگاه از نرم افزار Nanoscope و نرم افزار متن باز (FiberApp) [34] استفاده کردند.

پ-۳-۴ تحلیل داده

مجموعه داده‌ها برای اطمینان از این که تمام اطلاعات خواسته شده، تهیه شده و تصاویر نیز برای ارزیابی انتخاب ذره بازبینی شدند. در مواردی که بخشی از اطلاعات ناقص بود و به توضیحات بیشتر در مورد جزئیات نیاز بود، پیگیری مجزا با هر شرکت کننده برای دریافت اطلاعات انجام شد. تصاویر نماینده در شکل پ-۳ نشان داده شده‌اند. بررسی اولیه بافت‌نگاشت‌ها، نمودارهای جعبه‌ای و نمودارهای توزیع تجمعی مجموعه داده‌های مختلف نشان دادند که شکل و پهنای توزیع‌های ذره به میزان قابل توجهی با هم تفاوت دارند. این مطلب با نمودارهای چندکی^۱ که در شکل پ-۴ نشان داده شده، به تصویر کشیده شده است. تلاش‌های اولیه برای برآزش مجموعه داده‌ها به مدل‌های توزیع استاندارد (مانند نرمال، لگ نرمال، وایبول، گاما) که در دیگر مطالعات به کار رفته بود، نشان داد که یک تک‌توزیع دوپارامتره که بتواند برآزش‌های قابل قبولی برای تمامی مجموعه داده‌ها ارائه کند، برای هیچ یک از داده‌های طول و یا ارتفاع وجود ندارد. از آنجایی که انتخاب یک مدل توزیع که بتواند بهترین نتیجه را برای هر مجموعه داده ارائه کند، غیرعملی است، تصمیم بر آن شد که از یک توزیع سه‌پارامتره منعطف استفاده شود. هر یک از مجموعه داده‌های مجزا همان‌طور که در شکل پ-۵ برای چندین مثال نشان داده شده است، به یک توزیع چوله نرمال برآزش شدند. این روش سه پارامتر را در اختیار قرار می‌دهد: میانگین، انحراف معیار (معیاری از پهنای توزیع) و یک عامل شکل، α ، (معیاری از چولگی توزیع). برخلاف توزیع‌های نرمال یا لگ نرمال، توزیع چوله نرمال این امکان را فراهم می‌آورد که شکل‌های بسیار متنوعی به توزیع‌های اندازه ذره تطبیق داده شوند. اگر $\alpha = 0$ باشد، توزیع به توزیع نرمال تبدیل می‌شود.

1- Quantile



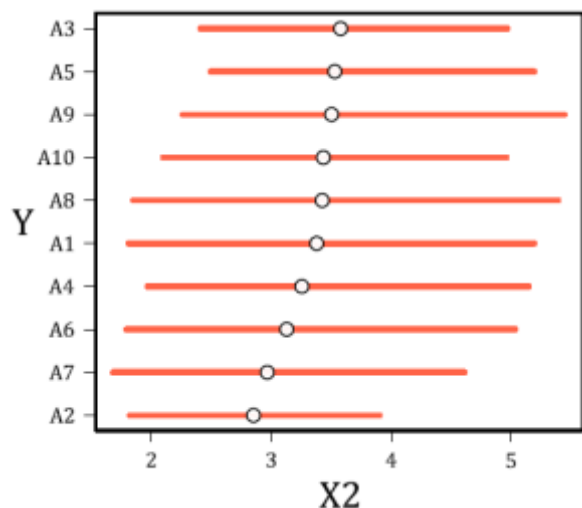
ب- تصویر نماینده روش AFM از آزمایشگاه الف ۷

الف- تصویر نماینده روش AFM از آزمایشگاه الف ۴

یادآوری - پیکان‌ها شاخصه‌هایی را نشان می‌دهند که به نظر می‌رسد بیش از یک ذره باشند.

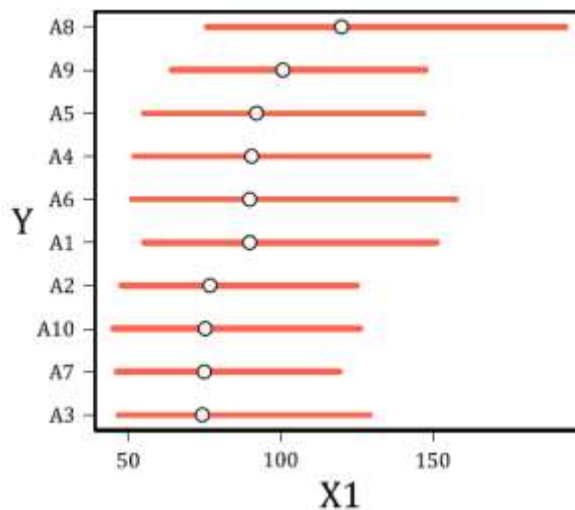
منبع: مرجع [33]. با کسب اجازه تحت حق نشر کرون بازنشر شده است.

شکل پ-۳- تصاویر نماینده روش AFM



ب- نمودار مقایسه ده مجموعه داده مربوط به ارتفاع

AFM



الف- نمودار مقایسه ده مجموعه داده مربوط به طول

AFM

راهنما:

X1 طول (nm)

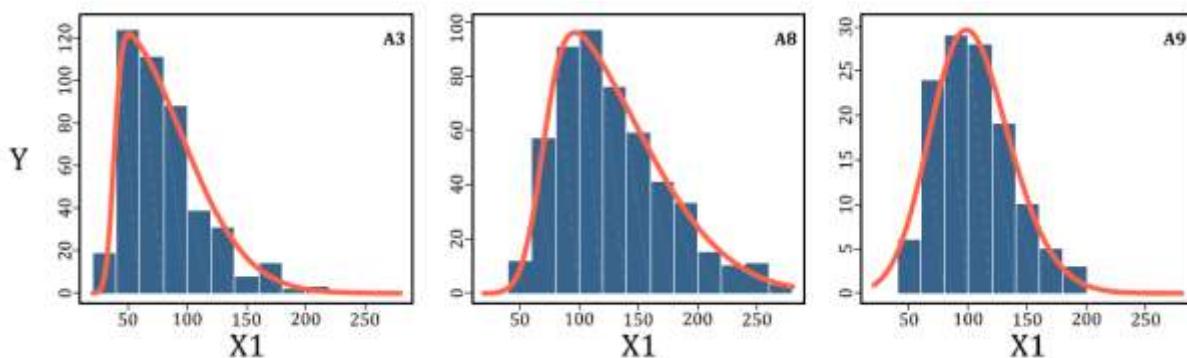
X2 ارتفاع (nm)

Y کد آزمایشگاه

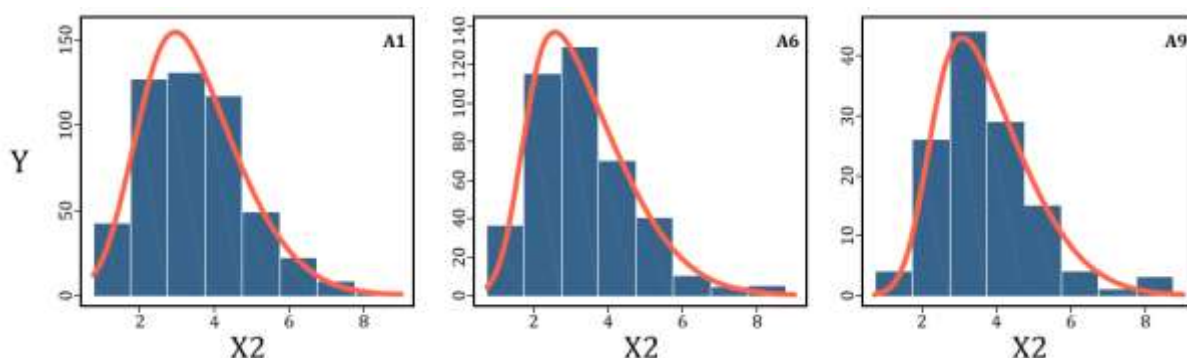
یادآوری- خطوط قرمز ۱۰٪ تا ۹۰٪ داده‌ها را نمایش می‌دهند و مقدار ۵۰٪ (میانه) با دایره نشان داده شده‌است. آزمایشگاه‌ها به ترتیب افزایش مقدار میانه چیده شده‌اند.

منبع: مرجع [33]، با کسب اجازه تحت حق‌نشر کرون بازنشر شده‌است.

شکل پ-۴- نمودارهای مقایسه ده مجموعه داده مربوط به طول و ارتفاع AFM



الف - مجموعه داده‌های طول مربوط به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده منتخب



ب - مجموعه داده‌های ارتفاع مربوط به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده منتخب

راهنما:

X1 طول (nm)

X2 ارتفاع (nm)

Y فراوانی

یادآوری - داده‌های خام به صورت بافت‌نگاشت‌هایی نشان داده شده که برازش‌های چوله نرمال قرمز رنگ روی آن‌ها قرار گرفته‌اند. کد آزمایشگاه روی هر تصویر نشان داده شده‌است.

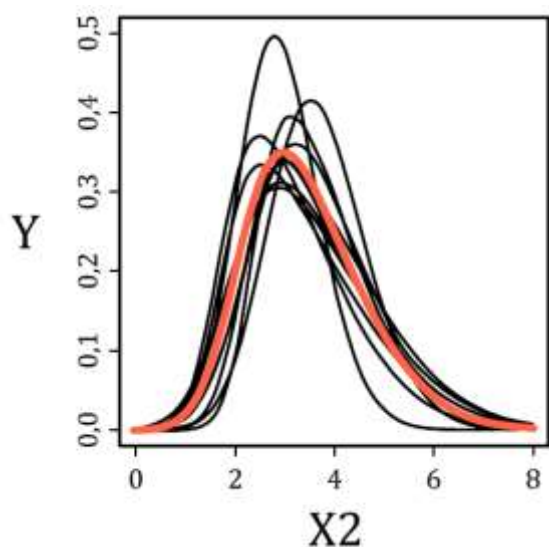
منبع: مرجع [33]، با کسب اجازه تحت حق‌نشر کرون بازنشر شده‌است.

شکل پ-۵ - مجموعه داده‌های طول و ارتفاع مربوط به آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده منتخب

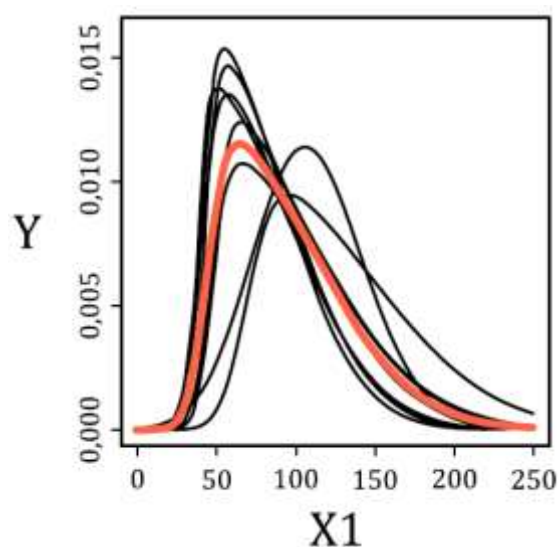
پراکندگی بین آزمایشگاه‌ها نیز به صورت یک توزیع چوله نرمال مدلسازی شد. با ادغام توزیع‌های چوله نرمال نمایش‌دهنده نتایج هر یک از آزمایشگاه‌ها به صورت مجزا، توزیع توافقی به دست آمد. از هر یک از توزیع‌های چوله نرمال آزمایشگاهی به تعداد مساوی ($N = 1000$) نمونه‌های تصادفی برداشته شد و در ترکیب کلی قرار گرفت. به این ترتیب، مدل آماری کل مطالعه بین‌آزمایشگاهی (برای هر اندازه‌ده) با سه پارامتر برای هر آزمایشگاه به همراه سه پارامتر اضافی توصیف‌کننده توزیع مقادیر توافقی، شکل، مقیاس و میانگین کل^۱، خلاصه شد. شکل پ-۶ مقایسه‌ای بین توزیع‌های طول و ارتفاع آزمایشگاه‌های مختلف با توزیع نهایی توافقی

1- Grand

چوله نرمال (قرمز رنگ) ارائه می‌کند. مقادیر و عدم قطعیت‌های مربوطه که با روش‌های بی‌زین به‌دست آمده‌اند نیز در جدول پ-۱ ارائه شده‌اند. پراکندگی بین میانگین نتایج آزمایشگاهی نیز به عنوان معیاری از تغییرپذیری بین ۱۰ آزمایشگاه ارائه شده‌است.



ب- مقایسه بین توزیع توافقی (قرمز) و برازش‌های چوله نرمال مجزا مربوط به هر مجموعه داده (سیاه) برای ارتفاع AFM



الف- مقایسه بین توزیع توافقی (قرمز) و برازش‌های چوله نرمال مجزا مربوط به هر مجموعه داده (سیاه) برای طول AFM

راهنما:

X1	طول (nm)
X2	ارتفاع (nm)
Y	چگالی احتمال

منبع: مرجع [33]، با کسب اجازه تحت حق نشر کرون بازنشر شده‌است.

شکل پ-۶- مقایسه بین توزیع توافقی (قرمز) و برازش‌های چوله نرمال مجزا مربوط به هر مجموعه داده (سیاه) برای طول و ارتفاع AFM

جدول پ-۱- پارامترهای توزیع چوله نرمال برای توزیع‌های توافقی طول و ارتفاع CNC حاصل از اندازه‌گیری‌های AFM

فاکتور شکل α	انحراف معیار nm	میانگین nm		
۶٫۴ (۰٫۳)	۳۹٫۶ (۰٫۳)	۹۴٫۵ (۰٫۴)	مقدار توافقی (عدم قطعیت استاندارد)	طول
		۱۵٫۰ (۰٫۶)	پراکندگی (عدم قطعیت استاندارد)	
۲٫۷ (۰٫۱)	۱٫۲۱ (۰٫۱)	۳٫۴۴ (۰٫۱)	مقدار توافقی (عدم قطعیت استاندارد)	ارتفاع
		۰٫۲۸ (۰٫۰۲)	پراکندگی (عدم قطعیت استاندارد)	

تحلیل مجموعه داده‌های مختلف نشان داد که اختلاف بین پروب‌ها و اُفت کیفیت پروب با تصویربرداری مداوم فاکتورهای هستند که سهم قابل توجهی در تغییرپذیری میانگین طول بین آزمایشگاه‌ها دارند. آزمون‌های نیروی اعمالی در تصویربرداری نشان دادند که تصویربرداری بدون فشردن نانوبلورهای سلولزی ممکن است. اگرچه تعداد مورد نیاز نانوبلورهای سلولزی برای به دست آوردن یک مجموعه داده قابل اطمینان با شرایط عملیاتی، تغییر می‌کند، اما اگر پارامترهای مختلف به دقت کنترل شوند، تحلیل تعداد ۲۵۰ نانوبلور سلولزی تا ۳۰۰ نانوبلور سلولزی کافی است.

پیوست ت

(آگاهی‌دهنده)

نتایج مقایسه بین آزمایشگاهی TEM:

ت-۱ پیش‌زمینه و اهداف

روش TEM یکی از پرکاربردترین روش‌ها برای تحلیل اندازه نانوبلورهای سلولزی است. این مقایسه بین آزمایشگاهی زیرنظر «حوزه کاری فنی ۳۴» (جمعیت‌های نانوذره‌ای) در پروژه VAMAS و با هدف آزمودن پروتکل‌های تهیه تصویر و تحلیل تصویر TEM انجام شد. در این ILC که سازمان‌دهی آن بر عهده «شورای تحقیقات ملی کانادا» (NRC) بود، از یک ماده مرجع CNC (CNCD-1) استفاده شد که NRC آن را در اختیار آزمایشگاه‌ها قرار داد. نانوبلور سلولزی با هیدرولیز اسیدی خمیر چوب نرم با سولفوریک اسید و پس از آن خنثی‌سازی با NaCl تولید شد که در این فرایند گروه‌های سولفات نیمه‌استری روی سطح ایجاد شدند. جزئیات کامل مربوط به مشخصه‌یابی در مراجع [16] و [32] در دسترس است. ده موسسه شرکت‌کننده از آسیا، اروپا و آمریکای شمالی مجموعه داده‌های خود را ارسال کردند: سه دانشگاه، یک شرکت صنعتی و شش آزمایشگاه دولتی. همه آزمایشگاه‌ها تجربه قبلی تصویربرداری از نانوبلورهای سلولزی را نداشتند. مقایسه بین آزمایشگاهی از دو فاز تشکیل شده بود: فاز اول با تعداد محدودی شرکت‌کننده برای آزمودن پروتکل‌های تحلیل تصویر با استفاده از مجموعه‌ای از تصاویر TEM که آزمایشگاه راهبر فراهم کرده بود، طراحی شد. فاز دوم شامل آماده‌سازی نمونه توسط آزمایشگاه راهبر، تهیه تصویر و تحلیل تصویر توسط شرکت‌کنندگان و تحلیل نهایی داده‌ها توسط کارکنان NRC بود. در این پیوست روش و نتایج ILC به اختصار بیان می‌شود. جزئیات کامل در مرجع [31] منتشر شده است.

ت-۲ فاز یک

ت-۲-۱ کلیات

مجموعه‌ای از ۳۰ تصویر TEM برای تحلیل به چهار شرکت‌کننده فرستاده شد و درخواست شد که از یک ImageJ macro سفارشی که آزمایشگاه راهبر در اختیار آن‌ها قرار داده بود، استفاده شود. این تصاویر به‌عنوان بخشی از فرایند مشخصه‌یابی CNCD-1، ماده مورد استفاده در آماده‌سازی نمونه‌ها برای فاز دو ILC، تهیه شده بودند. برنامه ImageJ macro این امکان را می‌دهد که یک مجموعه تصویر به‌صورت خودکار و پشت سر هم باز شوند و اندازه‌گیری طول و پهنای پروفایل‌ها به‌صورت دستی انجام شود. سپس داده‌ها و تصاویری را که در آنها پروفایل‌ها و نانوبلورهای سلولزی تحلیل شده، مشخص شده‌اند، ذخیره می‌کند (نسخه خلاصه‌شده‌ای از روش‌اجرایی در زیربند ت-۲-۲ ارائه شده است). تمامی نانوبلورهای سلولزی مجزای هر تصویر باید با استفاده از رهنمودهای ارائه‌شده در زیربند ۴-۸ تحلیل می‌شدند. در آزمون‌های اولیه با استفاده

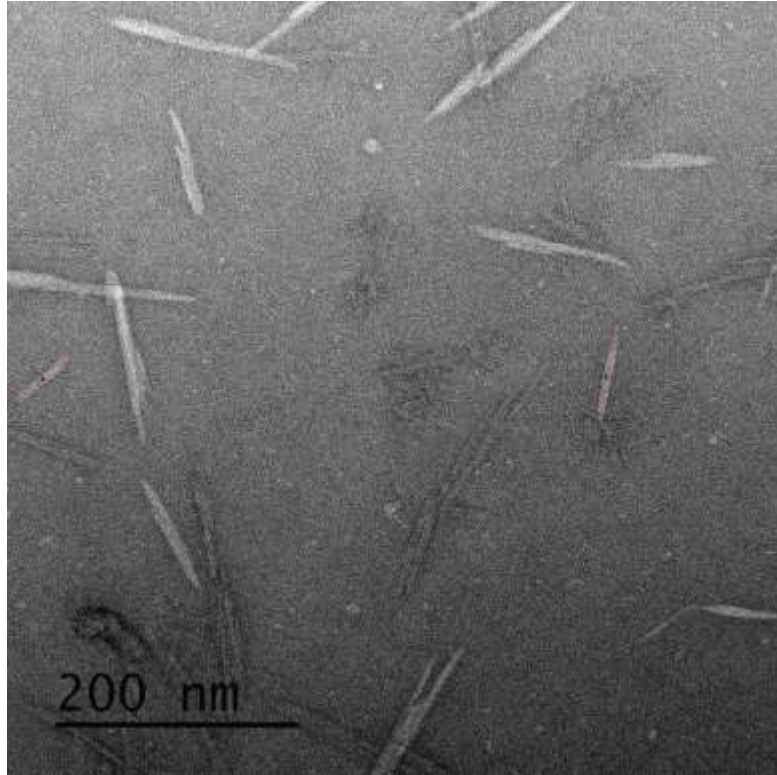
از هر دو حالت دستی و یا ابزار «رسم چندضلعی»^۱ در ImageJ (پیش از این برای چندین ILC که در استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۸۹۳: سال ۱۳۹۹ به صورت خلاصه بیان شده، به کار رفته است) احتمالاً به دلیل مشکلات مربوط به استفاده از این ابزارها برای ذرات مخروطی، مقادیر مناسبی برای قطر فرت^۲ کمینه (minFerret) به دست نیامد.

ت-۲-۲ روش اجرایی تحلیل ImageJ

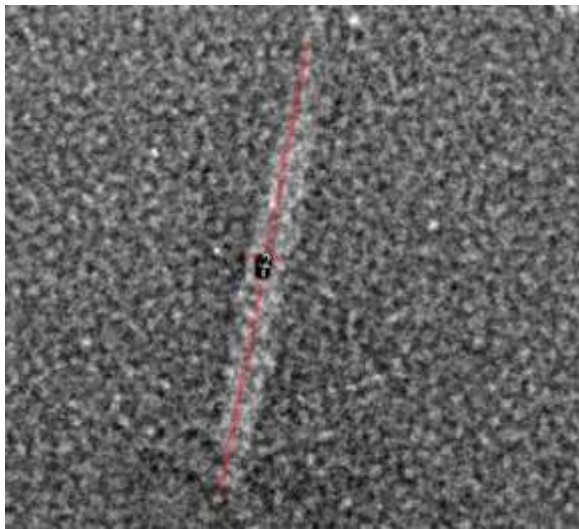
برنامه ImageJ macro از گزینه «next file» استفاده می کند که نیازمند قالب فایل tiff است و به کاربر امکان می دهد که هر تصویر را در یک پوشه مشخص به ترتیب باز و تحلیل کند. داده های اندازه گیری به پیکسل به صورت فایل با قالب «مقادیر جدا شده با ویرگول»^۳ (CSV) و تصاویر نیز با پروفایل های نشانه گذاری شده ذخیره می شوند. برنامه macro به کاربر این امکان را نیز می دهد که از برنامه خارج شود و تحلیل یک مجموعه تصویر را در زمان دیگری ادامه دهد.

تحلیلگر یک تصویر را باز می کند و می تواند برای تصویرسازی بهتر، تباین و درخشانی را تنظیم کند. سپس یک پروفایل در طول محور بلند اولین ذره ای که باید تحلیل شود، رسم می شود. پس از کلیک کردن برای ثبت مقدار طول، یک پروفایل خطی عمود بر پروفایل نشانگر طول ظاهر می شود و کاربر می تواند موقعیت و طول را تنظیم و برای ثبت داده ها (در یک فایل CSV) کلیک کند. این فرایند برای هر ذره در تصویر تکرار می شود و برای داشتن تصویر بهتری از نانوبلورهای سلولزی مجزا نیز می توان به داخل یا خارج زوم کرد. سپس تصویر یادداشت نویسی شده ذخیره می شود. مثالی از یک فایل تصویری ذخیره شده در شکل ت-۱-الف، نشان داده شده است و شکل های ت-۱-ب، و پ، حالت زوم را برای دو CNC نشان می دهند.

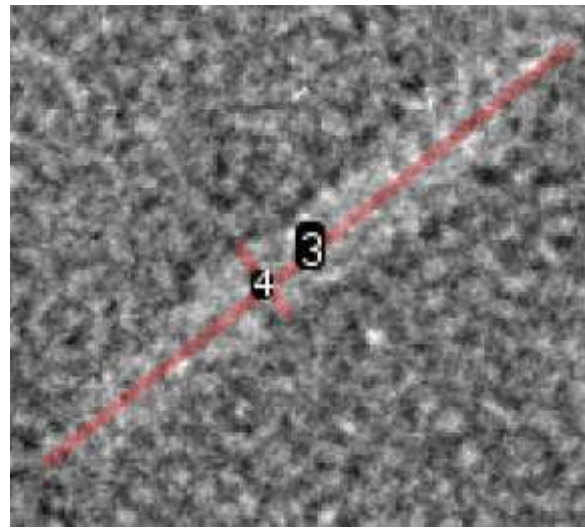
1- Polygon outlining
2- Feret
3- Comma separated value



الف- تصویر TEM که در آن دو نانوبلور سلولوزی اندازه‌گیری شده با خطوط قرمز نشانه‌گذاری شده‌اند



پ- تصویر بزرگنمایی شده یک ذره CNC که طول و پهنای آن به رنگ قرمز نشانه‌گذاری شده‌اند

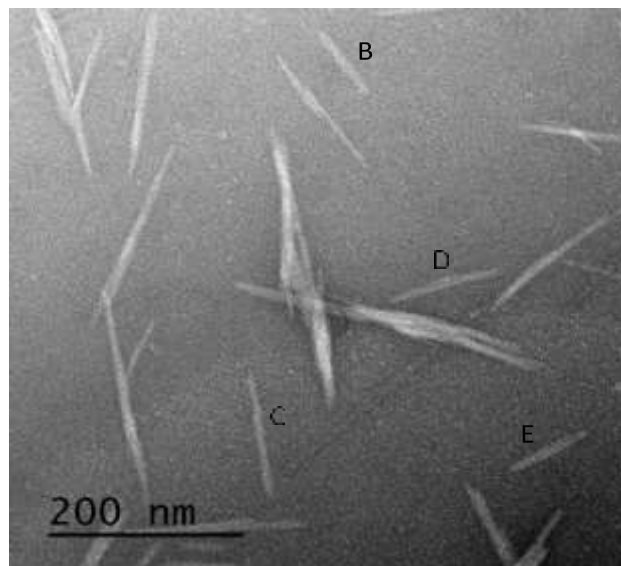


ب- تصویر بزرگنمایی شده یک ذره CNC که طول و پهنای آن با خطوط قرمز نشانه‌گذاری شده‌اند

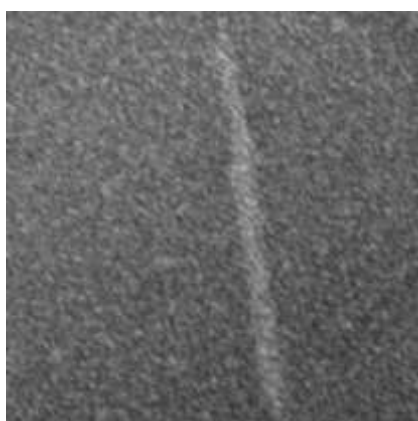
منبع: مرجع [31]. با اجازه نویسندگان بازنشر شده‌است.

شکل ت-۱- تصویر تحلیل شده TEM به همراه تصاویر بزرگنمایی شده دو CNC اندازه‌گیری شده

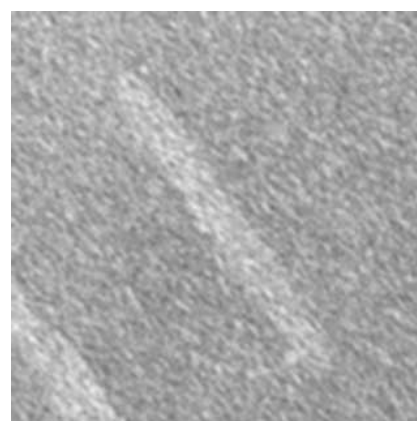
روش اجرایی بالا برای تمامی تصاویر مجموعه داده تکرار می‌شود. شکل‌های ت-۲ و ت-۳ مثال‌هایی از تصاویر نانوبلورهای سلولزی تحلیل‌پذیر (به شکل ت-۲ مراجعه شود) و ذراتی که بهتر است تحلیل نشوند (به شکل ت-۳ مراجعه شود) ارائه می‌کنند.



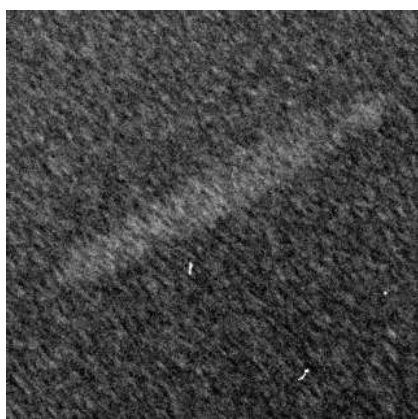
الف - تصویر TEM از نانوبلورهای سلولزی



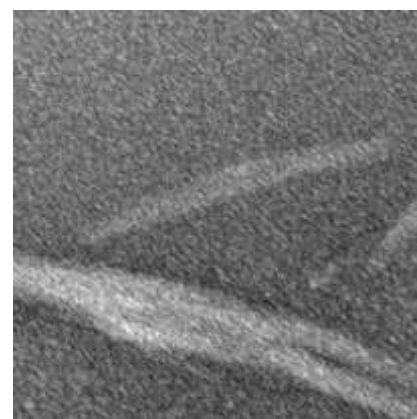
پ - تصویر بزرگنمایی شده یک ذره تحلیل پذیر



ب - تصویر بزرگنمایی شده یک ذره تحلیل پذیر



ث - تصویر بزرگنمایی شده یک ذره تحلیل پذیر

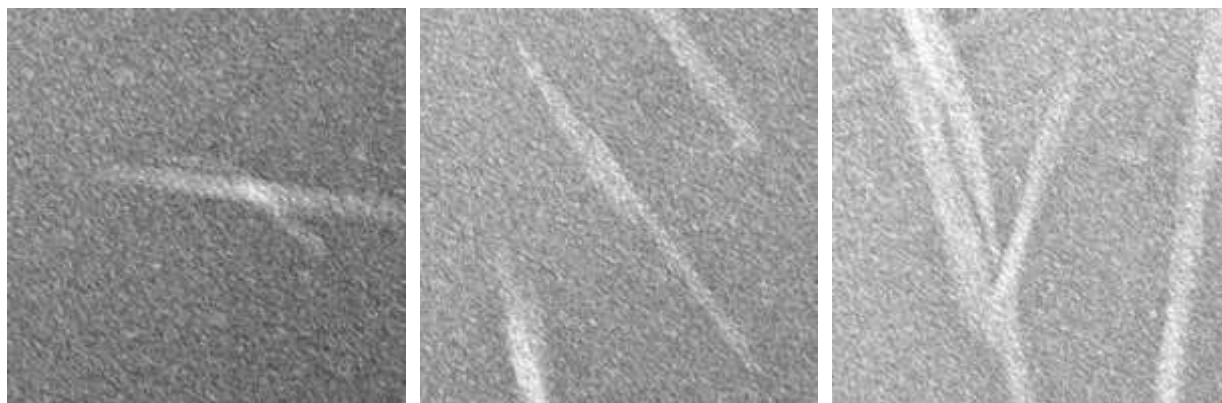


ت - تصویر بزرگنمایی شده یک ذره تحلیل پذیر (شاخصه بالایی)

یادآوری - ذرات روی هم افتاده در لبه سمت چپ شکل ت-۲- الف، تحلیل نشده‌اند.

منبع: مرجع [31]، با اجازه نویسندگان بازنشر شده است.

شکل ت-۲- تصویر TEM از چهار ذره CNC تحلیل پذیر (الف) و تصاویر زوم شده آن‌ها [(ب) تا (ث)]



پ- ذرات انبوه‌شده، ناحیه ۳

ب- ذرات انبوه‌شده، ناحیه ۲

الف- ذرات انبوه‌شده، ناحیه ۱



ج- خط مقیاس روی نانوبلور سلولزی را پوشانده‌است

ث- دو ذره سر به سر

ت- شاخصه بی‌قاعده‌ای که به نظر می‌رسد دو ذره باشند

یادآوری- ذرات روی هم افتاده و یا ذراتی که با هم در تماس هستند، در شکل‌های ت-۳، الف، و ث، کنار گذاشته شده‌اند. البته بسته به سوگیری^۱ کاربر و تباین/ تفکیک‌پذیری تصویر، برخی تحلیلگرها می‌توانند چنین ذراتی را انتخاب کنند.

منبع: مرجع [31]، با اجازه نویسنده‌گان بازنشر شده‌است.

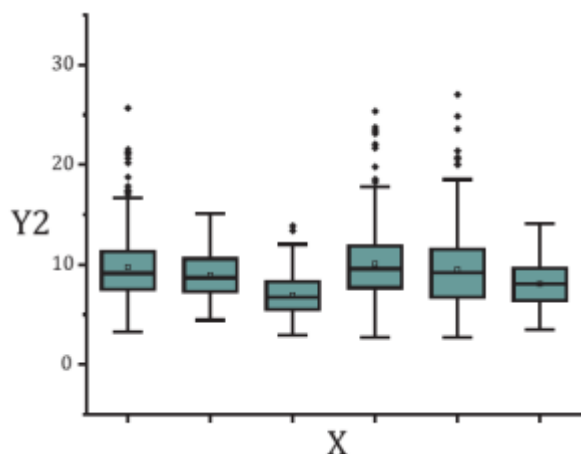
1- Bias

شکل ت-۳- مثال‌هایی از نانوبلورهای سلولزی تحلیل نشده

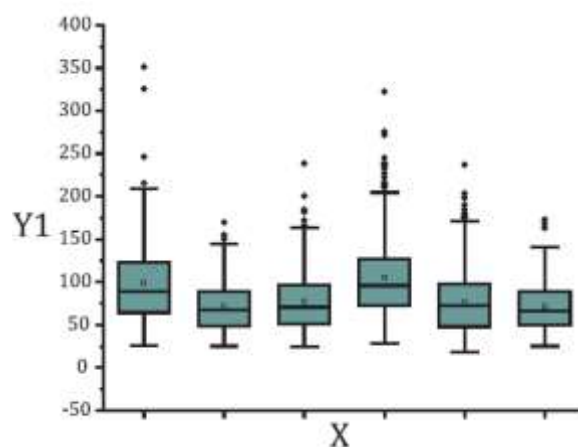
ت-۲-۳ نتایج

شش مجموعه داده (داده‌های اصلی CNCD-1 برای این تصاویر به علاوه داده‌های چهار آزمایشگاه که یکی از آن‌ها نتایجی از دو تحلیلگر را ثبت کرده‌است) نشان دادند که شرکت‌کنندگان دستورات پروتکل را کمی متفاوت تفسیر کرده‌اند. مبنای این نتیجه‌گیری پراکندگی در تعداد نانوبلورهای سلولزی تحلیل‌شده که در گستره‌ای از ۱۲۸ تا ۴۴۰ قرار داشتند و گستردگی داده‌ها آن گونه که نمودارهای جعبه‌ای شکل ت-۴ نشان می‌دهند، است. آنالیز کولموگوروف- اسمیرنوف مجموعه داده‌های مجزا نشان داد که فقط دو جفت از ۱۵ جفت ممکن برای طول، به میزان قابل توجهی متفاوت نبودند. تغییرپذیری مشابهی برای پهنا نیز مشاهده شد.

بر پایه نتایج این آزمون اولیه و بازخورد از شرکت کنندگان، پروتکل تحلیل تصویر اصلاح شد و دستورات با جزئیات بیشتری در آن ارائه شد. تصاویری با مثال‌هایی از نانوبلورهای سلولزی تحلیل پذیر و نانوبلورهایی که بهتر است از تحلیل اندازه کنار گذاشته شوند (به ترتیب، شکل‌های ت-۲ و ت-۳) نیز به صورت یک پیوست به پروتکل اضافه شدند.



الف- نمودار جعبه‌ای که تغییرپذیری داده‌های دریافتی طول از آزمون‌های تحلیل تصویر TEM را نشان می‌دهد



ب- نمودار جعبه‌ای که تغییرپذیری داده‌های دریافتی پهنا از آزمون‌های تحلیل تصویر TEM را نشان می‌دهد

راهنما:

X1	کد آزمایشگاه (از چپ به راست): آزمایشگاه ۱، تحلیلگر ۱؛ آزمایشگاه ۲، تحلیلگر ۲؛ آزمایشگاه ۳؛ آزمایشگاه ۴؛ آزمایشگاه ۵
Y1	طول (nm)
Y2	پهنا (nm)

یادآوری - پایین و بالای جعبه‌های رنگی بیست و پنجمین و هفتاد و پنجمین صدک (وسط، ۵۰٪ داده‌ها) را نمایش می‌دهند؛ میانگین و میانه، به ترتیب با یک مربع توخالی و یک خط ممتد نشان داده شده‌اند. میله‌های عمودی یک و نیم برابر دامنه میان‌چارکی هستند، QR (از $Q1 - 1.5 IQR$ تا $Q3 + 1.5 QR$)، نقاطی که خارج از این دامنه قرار می‌گیرند با لوزی‌های توپر نشان داده شده‌اند.

منبع: مرجع [31]، با اجازه نویسندگان بازنشر شده‌است.

شکل ت-۴ - نمودارهای جعبه‌ای که تغییرپذیری داده‌های دریافتی طول و پهنا از آزمون‌های تحلیل تصویر TEM را نشان می‌دهند

ت-۳ فاز دو

ت-۳-۱ کلیات

در فاز دو، آزمایشگاه‌های شرکت‌کننده نمونه‌های ازپیش‌نهشت‌یافته CNC را برای داده‌برداری TEM و تحلیل با استفاده از یک پروتکل استاندارد، دریافت کردند. شرکت‌کنندگان مجموعه داده‌هایی با اطلاعاتی که در ادامه می‌آید، ثبت کردند: یک قالب اکسل حاوی اطلاعات کلی راجع به دستگاه و شرایط عملیاتی، داده‌های طول و پهنا برای تمامی ذرات تحلیل‌شده، بافت‌نگاشت‌هایی برای طول، پهنا و نسبت منظری به‌همراه میانگین و انحراف معیار هریک، فایل‌های تصویری اولیه و تصاویر پردازش‌شده که در آن‌ها ذرات تحلیل‌شده، شماره‌گذاری شده‌اند.

ت-۳-۲ آماده‌سازی نمونه

آزمایشگاه راهبر پراکنه‌های CNC با کسر جرمی ۲٪ را با استفاده از پروتکل استاندارد امواج‌دهی صوتی (به زیربند ۲-۵ مراجعه شود) [16] آماده کرد، نانوبلورهای سلولزی را روی توری‌های مسی پوشش‌دهی‌شده با کربن، نهشت داد و نمونه را با اورانیل استات لکه‌زایی کرد (به زیربند ۳-۶ مراجعه شود). برای هر آزمایشگاه شرکت‌کننده دو توری فرستاده شد، توری دوم به‌عنوان توری پشتیبان در صورت بروز مشکل فرستاده شد. در NRC، از حداقل یک نمونه از هر دسته تصویربرداری شد تا پیش از ارسال توری‌ها برای شرکت‌کنندگان، از کیفیت قابل قبول نمونه اطمینان حاصل شود. روش‌اجرایی آماده‌سازی نمونه بهینه‌سازی شد تا انبوهش ذرات به حداقل برسد و لکه‌زایی بهینه شود. با این حال، پراکنش و لکه‌زایی نمونه هر دو، تا حدی ناهمگن هستند و نیاز است چندین ناحیه بررسی شوند. به‌علاوه، همان‌طور که در تصویربرداری اولیه TEM برای CNCD-1 مشاهده شد، تباین بین نانوبلورهای سلولزی و پس‌زمینه به‌نسبت ضعیف است (به زیربند ت-۲ مراجعه شود).

ت-۳-۳ داده‌برداری و تحلیل تصویر

در پروتکل، استفاده از یک میکروسکوپ الکترونی عبوری با ولتاژ شتاب‌دهنده بین ۸۰ kV تا ۳۰۰ kV تصریح شده‌است. از شرکت‌کنندگان خواسته شد که میکروسکوپ را در همان بزرگنمایی مورد استفاده برای نمونه CNC کالیبره کنند و از بزرگنمایی تقریباً ۳۰۰۰۰ استفاده کنند، به‌گونه‌ای که تفکیک‌پذیری $\leq 0.3 \text{ nm/pixel}$ باشد. توصیه شده بود که تصاویر بزرگ‌مقیاس‌تر (برای مثال $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ یا بزرگ‌تر) از چندین موقعیت مختلف در توری اندازه‌گیری شوند تا نواحی مناسب برای تصویری که تفکیک‌پذیری بالایی داشته باشد، موقعیت‌یابی شوند. تعداد کافی تصویر برای تحلیل حداقل ۵۰۰ ذره درخواست شد، این تصاویر باید از نواحی مختلف توری تهیه می‌شدند.

شرکت‌کنندگان از دستگاه‌هایی از سه سازنده مختلف، با ولتاژهای شتاب‌دهنده در گستره درخواست‌شده و از انواع مختلفی از استانداردهای کالیبراسیون استفاده کردند. تفکیک‌پذیری در گستره‌ای از تقریباً 0.2 nm/pixel تا 0.6 nm/pixel قرار داشت و داده‌برداری بیشتر آزمایشگاه‌ها در تفکیک‌پذیری که

بیش از ۲۰٪ از مقدار توصیه شده $0.3 \text{ nm/pixel} \leq$ کمتر نبود، انجام شد. تعداد ۹ شرکت کننده همان طور که درخواست شده بود برای ۵۰۰ یا بیشتر نانوبلور سلولزی تحلیل شده، داده گزارش کردند؛ بزرگترین مجموعه داده ۱۱۷۸ ذره داشت و کوچکترین آن‌ها ۳۲۳ ذره داشت.

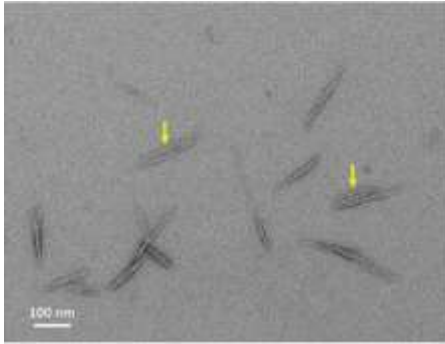
تعداد به نسبت کوچک نانوبلورهای سلولزی مجزا به ازای هر تصویر (نوعاً بین ۵ تا ۱۲) به این معنی است که تمامی آزمایشگاه‌ها بیش از ۵۰ تصویر تهیه کرده‌اند. تعداد کم نانوبلورهای سلولزی مجزا به ازای هر تصویر مقایسه تکرارپذیری درون آزمایشگاهی بر مبنای روش تصویر به تصویر را غیر عملی می‌سازد.

در پروتکل توصیه شده بود که شرکت کنندگان از ImageJ macro که در دسترس آن‌ها قرار گرفته، استفاده کنند، اما استفاده از دیگر نرم‌افزارهای جایگزین نیز مادامی که در انتخاب نانوبلورهای سلولزی مجزا برای تحلیل، از رهنمودهای یکسانی پیروی شده باشد، قابل پذیرش بود. یک مجموعه تصویر با هر یک از نرم‌افزارهای Digital Micrograph^۱ و Olympus iTEM^۱ تحلیل شد.

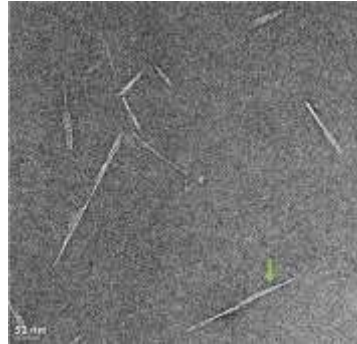
ت-۳-۴ تحلیل داده

مجموعه داده‌ها برای اطمینان از این که تمام اطلاعات مورد نیاز، تهیه شده باشد و تصاویر نیز برای ارزیابی انتخاب ذره بازبینی شدند، در مواردی که بخشی از اطلاعات ناقص بود و به توضیحات بیشتر در مورد جزئیات نیاز بود، پیگیری مجزا با هر شرکت کننده برای دریافت اطلاعات انجام شد. تصاویر نماینده در شکل ت-۵ نشان داده شده‌اند. بررسی اولیه بافت‌نگاشت‌ها، نمودارهای جعبه‌ای و نمودارهای توزیع تجمعی مجموعه داده‌های مختلف نشان دادند که شکل، پهنا و عدم تقارن توزیع‌های ذره به میزان قابل توجهی با هم تفاوت دارند؛ این مطلب با نمودارهای چندکی که در شکل ت-۶ نشان داده شده، به تصویر کشیده شده‌است. تلاش‌های اولیه برای برآزش مجموعه داده‌ها به مدل‌های توزیع استاندارد (مانند نرمال، لگ نرمال، وایبول، گاما) که در دیگر مطالعات به کار رفته بود، نشان داد که یک تک‌توزیع دوپارامتره که بتواند برآزش‌های قابل قبولی برای تمامی مجموعه داده‌ها ارائه کند، برای هیچ یک از داده‌های طول و یا پهنا وجود ندارد. همانگونه که در پیوست پ توضیح داده شد، انتخاب یک مدل توزیع که بتواند بهترین نتیجه را برای هر مجموعه داده ارائه کند، غیر عملی است؛ بنابراین همان طور که در شکل ت-۷ برای چند مجموعه داده نشان داده شده‌است، از یک توزیع چوله نرمال برای برآزش به هر یک از مجموعه داده‌های مجزا استفاده شد.

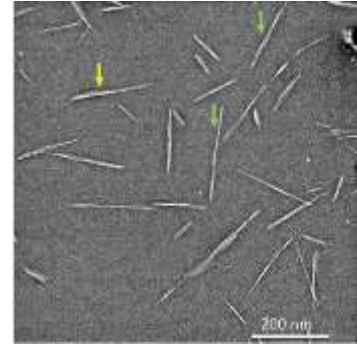
۱- نرم‌افزار Olympus iTEM مثالی از یک محصول مناسب و از لحاظ تجاری در دسترس است. این اطلاعات به منظور راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده است و به معنی تأیید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.



الف- تصویر نماینده سه شاخصه
شاخصه‌های که به نظر می‌رسد یک
CNC سر به سر باشد



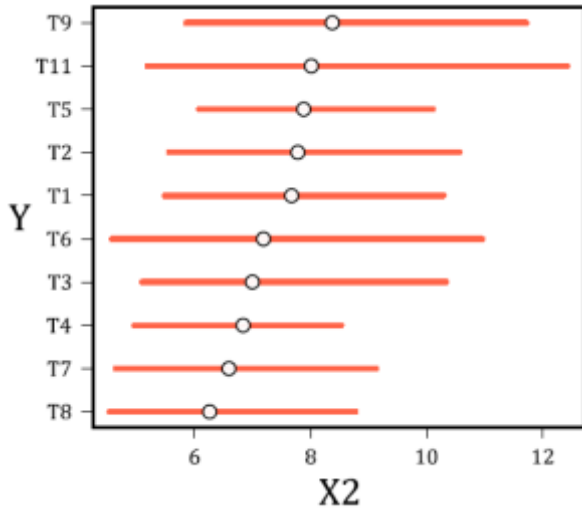
ب- تصویر بزرگنمایی شده
شاخصه‌هایی که به نظر می‌رسد از
پیکان‌های سبز
شاخصه‌هایی که به نانوبلورهای سلولزی
منتسب شده‌اند



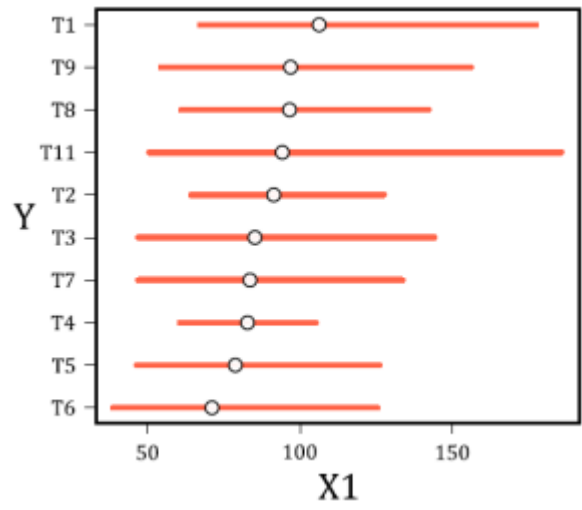
یادآوری- پیکان‌های زرد شاخصه‌هایی را نشان می‌دهند که به نانوبلورهای سلولزی به‌طور جانبی کلوخه‌شده، منتسب شده‌اند. پیکان‌های سبز شاخصه‌هایی را مشخص می‌کنند که به نظر می‌رسد نانوبلورهای سلولزی سر به سر باشند.

منبع: مرجع [31]، با اجازه نویسندگان بازنشر شده‌است.

شکل ت-۵- تصاویر نماینده از سه آزمایشگاه شرکت‌کننده



ب- نمودارهایی که ۱۰ مجموعه داده پهنای TEM را مقایسه می کنند



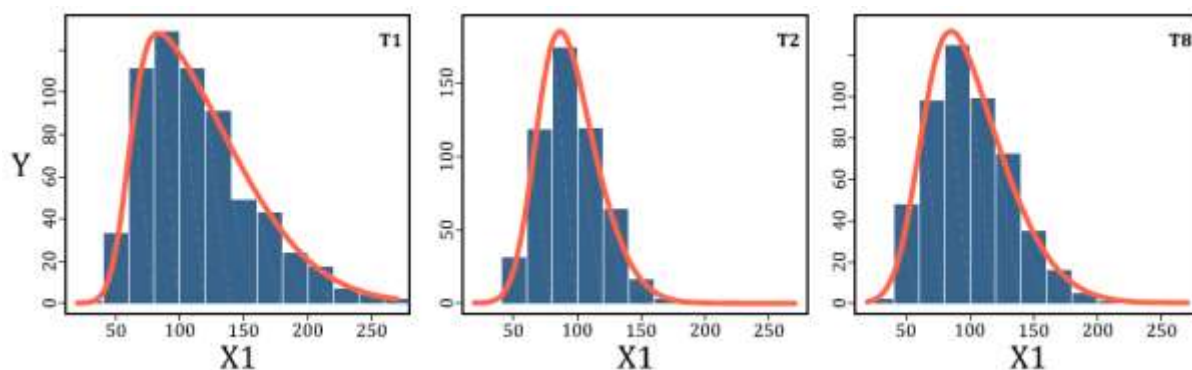
الف- نمودارهایی که ۱۰ مجموعه داده طول TEM را مقایسه می کنند

راهنما:

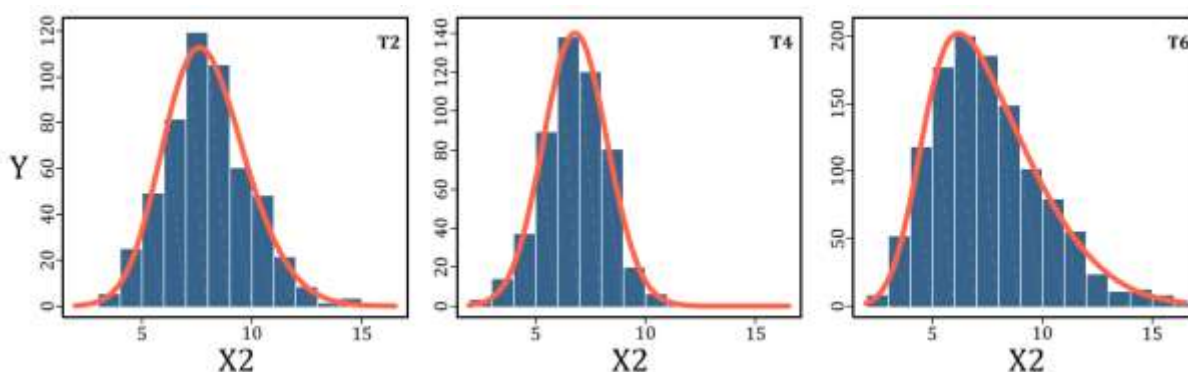
- X1 طول (nm)
- X2 پهنای (nm)
- Y کد آزمایشگاه

یادآوری- خطوط قرمز ۱۰٪ تا ۹۰٪ داده‌ها را نمایش می‌دهند و مقدار ۵۰٪ (میانه) با یک دایره نشان داده شده‌است. آزمایشگاه‌ها به ترتیب افزایش مقدار میانه مرتب شده‌اند.

شکل ت-۶- نمودارهای مقایسه ۱۰ مجموعه داده طول و پهنای TEM



الف - مجموعه داده‌های طول مربوط به آزمایشگاه‌های منتخب



ب - مجموعه داده‌های پهنا مربوط به آزمایشگاه‌های منتخب

راهنما:

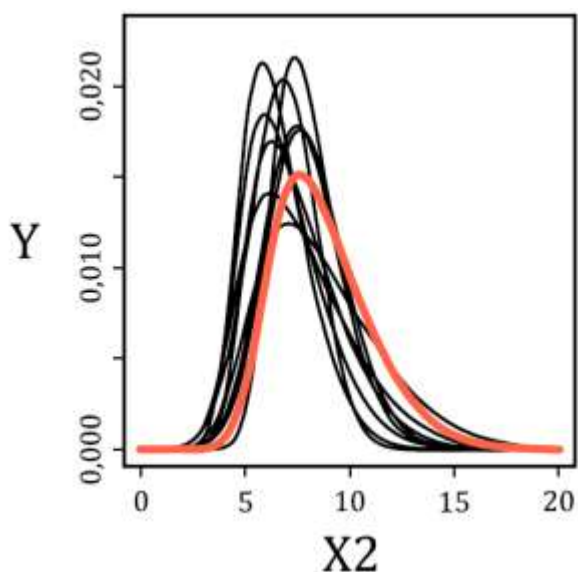
X1	طول (nm)
X2	پهنا (nm)
Y	فراوانی

یادآوری - داده‌های خام به صورت بافت‌نگاشت‌هایی نشان داده شده‌اند که برازش‌های چوله نرمال قرمز رنگ روی آن‌ها قرار گرفته‌اند. کد آزمایشگاه روی هر تصویر نشان داده شده‌است.

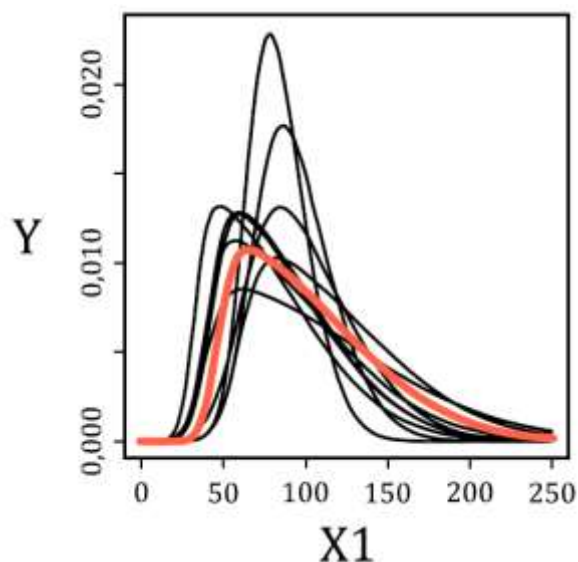
منبع: مرجع [31]، با اجازه نویسندگان بازنشر شده‌است.

شکل ت-۷ - مجموعه داده‌های طول و پهنا مربوط به آزمایشگاه‌های منتخب

همانگونه که در زیربند پ-۳-۳ توضیح داده شده، از برازش‌های چوله نرمال مربوط به طول و پهنا هر یک از آزمایشگاه‌ها برای تولید یک توزیع توافقی استفاده شد. شکل ت-۸ مقایسه‌ای بین توزیع‌های چوله نرمال مجزای پهنا و طول مربوط به هر آزمایشگاه با توزیع توافقی نهایی (قرمز رنگ) ارائه می‌کند. مقادیر و عدم قطعیت‌های مرتبط با آن‌ها، که با روش‌های بیزین به دست آمده، در جدول ت-۱ آمده‌است. پراکندگی بین میانگین نتایج آزمایشگاهی نیز به عنوان معیاری از تغییرپذیری بین ده آزمایشگاه ارائه شده‌است.



ب- مقایسه توزیع توافقی (قرمز) با برازش‌های چوله نرمال مجزا مربوط به هر مجموعه داده (سیاه) برای پهنای TEM



الف- مقایسه توزیع توافقی (قرمز) با برازش‌های چوله نرمال مجزا مربوط به هر مجموعه داده (سیاه) برای طول TEM

راهنما:

X1	طول (nm)
X2	پهنای (nm)
Y	چگالی احتمال

منبع: مرجع [31]، با اجازه نویسندگان بازنشر شده است.

شکل ت-۸- مقایسه توزیع توافقی (قرمز) با برازش‌های چوله نرمال مجزا مربوط به هر مجموعه داده (سیاه) برای طول و پهنای TEM

جدول ت-۱- پارامترهای توزیع چوله نرمال برای توزیع‌های توافقی طول و پهناى CNC حاصل از اندازه‌گیری‌های TEM

فاکتور شکل α	انحراف معیار nm	میانگین nm		
۴٫۸ (۰٫۲)	۳۹٫۰ (۰٫۳)	۹۵٫۸ (۰٫۴)	مقدار توافقی (عدم قطعیت استاندارد)	طول
		۱۲٫۳ (۰٫۵)	پراکندگی (عدم قطعیت استاندارد)	
۲٫۸ (۰٫۱)	۲٫۲ (۰٫۰۲)	۷٫۶۵ (۰٫۰۲)	مقدار توافقی (عدم قطعیت استاندارد)	پهنا
		۰٫۷۸ (۰٫۰۳)	پراکندگی (عدم قطعیت استاندارد)	

مقایسه نتایج هر یک از آزمایشگاه‌ها نشان می‌دهد که تفاوت در تفکیک‌پذیری تصویربرداری، در پراکندگی مقادیر اندازه‌گیری شده پهنا نقش دارد. باین‌حال، چنین نتیجه‌گیری شد که عوامل اصلی تغییرپذیری در مقادیر اندازه‌گیری شده طول و پهنا، ذهنیت آزمونگر در انتخاب نانوبلورهای سلولزی مجزا برای تحلیل و ناهمگنی کلوخگی و لکه‌زایی نانوبلورهای سلولزی نهشت‌یافته روی توری‌های TEM است. مقایسه داده‌های AFM (به پیوست پ مراجعه شود) و TEM توافق بسیار خوبی بین طول‌های CNC اندازه‌گیری شده با این دو روش نشان می‌دهد. این مساله در تضاد با اختلاف‌های کوچکی است که در مطالعات پیشین بین این دو روش گزارش شده بود [16]. پهناى TEM همان‌گونه که قبلا مشاهده شده، تقریبا دو برابر ارتفاع AFM است و این مساله تا حدی به کلوخگی جانبی قابل توجهی که نمی‌توان به‌آسانی در تصاویر TEM تشخیص داد، ربط داده شده‌است [16]، [35].

کتابنامه

- [1] ISO Guide 30: 2015, Reference materials – Selected terms and definitions
- [2] ISO/IEC Guide 98-3: 2008, Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM: 1995)
- [3] ISO 11952, Surface chemical analysis – Scanning-probe microscopy – Determination of geometric quantities using SPM: Calibration of measuring systems
- یادآوری – استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۹۲۲: سال ۱۳۹۹، آنالیز شیمیایی سطح – میکروسکوپی پروبی (کاوندی) روبشی (SPM) – تعیین مقادیر هندسی با استفاده از SPM: کالیبراسیون سامانه‌های اندازه‌گیری، با استفاده از استاندارد ISO 11952: 2019 تدوین شده است.
- [۴] استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۰۹۹: سال ۱۳۹۵، آنالیز اندازه ذرات – روش‌های آنالیز تصویری – قسمت ۱: روش‌های آنالیز تصویری ایستا
- [5] ISO/TR 19716: 2016, Nanotechnologies – Characterization of cellulose nanocrystals
- [۶] استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۶۰۲: سال ۱۳۹۸، فناوری نانو – اصطلاحات استاندارد و تعاریف آن برای نانومواد سلولزی
- [۷] استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۶، آنالیز اندازه ذره – پراکندگی نور دینامیک (DLS)
- [8] ISO/TR 22814: 2020, Good practice for dynamic light scattering (DLS) measurements
- [9] ISO 29301, Microbeam analysis – Analytical electron microscopy – Methods for calibrating image magnification by using reference materials with periodic structures
- یادآوری – استاندارد ملی ایران شماره ۷۳۹۸: سال ۱۳۹۹، تحلیل میکروباریکه – میکروسکوپی الکترونی تحلیلی – روش‌های کالیبراسیون بزرگ‌نمایی تصویر با استفاده از مواد مرجع دارای ساختارهای متناوب، با استفاده از استاندارد ISO 29301: 2017 تدوین شده است.
- [10] Shatkin J. A., Wegner T. H., Bilek E. M., Cowie J. Market projections of cellulose nanomaterial-enabled products- part 1: Applications. TAPPI J. 2014, **13**, pp 9-16.
- [11] Miller J., Nanocellulose challenges and opportunities: End user perspectives. 2018, TAPPI Press 0101R352: USA
- [12] Beck S., Bouchard J., Berry R. Dispersibility in water of dried nanocrystalline cellulose. Biomacromolecules. 2012, **13**, pp 1486-1494.
- [13] Beuguel Q., Tavares J. R., Carreau P. J., Heuzey M. –C. Ultrasonication of spray- and freeze-dried cellulose nanocrystals in water. J. Colloid Interface Sci. 2018, **516**, pp 23-33.
- [14] Foster E. J., Moon R. J., Agarwal U. P., Bortner M. J., Bras J., Camarero-Espinosa S., Chen K. J., Clift M. J. D., Cranston E. D., Eichhorn S. J., Fox D. M., Hamad W. Y., Heux L., Jean B., Korey M., Nieh W., Ong K. J., Reid M. S., Renneckar S., Roberts R., Shatkin J. A., Simonsen J., Stinson-Bagby K., Wanasekara N., Youngblood J. Current characterization methods for cellulose nanomaterials. Chem. Soc. Rev. 2018, **47**, pp 2609-2679.

- [15] Mukherjee A., Hackley V. A. Separation and characterization of cellulose nanocrystals by multi-detector asymmetric flow field-flow fractionation. *Analyst*. 2017, **143**, pp 731-740.
- [16] Jakubek Z. J., Chen M., Couillard M., Leng T., Liu L., Zou S., Baxa U., Clogston J. D., Hamad W., Johnston L. J. Characterization challenges for a cellulose nanocrystal reference material: Dispersion and particle size distributions. *J. Nanopart. Res.* 2018, **20**, pp 98.
- [17] Taurozzi J.S., Hackley V. A., Wiesner M. R. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. *Nanotoxicology*, 2011, **5**, pp 711-729.
- [18] Moon R. J., Pohler T., Tammelin T. Microscopic characterization of nanofibers and nanocrystals, in *Handbook of green materials*, Oksman K. et al., Editors. 2014, World Scientific: Singapore. p. 159-180.
- [19] Hoo C. M., Doan T., Starostin N., West P. E. Optimal sample preparation for nanoparticle metrology (statistical size measurements) using atomic force microscopy. *J. Nanopart. Res.* 2010, **12**, pp 939-949.
- [20] Brinkmann A., Chen M., Couillard M., Jakubek Z. J., Leng T., Johnston L. J. correlating cellulose nanocrystal particle size and surface area. *Langmuir*. 2016, **32**, pp 6105-6114.
- [21] Ogawa Y., Putaux J. –L. Transmission electron microscopy of cellulose. Part 2: Technical and practical aspects. *Cellulose*. 2019, **26**, pp 17-34
- [22] Stinson-Bagby K. L., Roberts R., Foster E. J. Effective cellulose nanocrystal imaging using transmission electron microscopy. *Carbohydr. Poly.* 2018, **186**, pp 429-438
- [23] Kaushik M., Fraschini C., Chauve G., Putaux J. –L., Moores A. Transmission electron microscopy for the characterization of cellulose nanocrystals, in *The transmission electron microscope – theory and applications*, Maaz K., Editor. 2015, Intech. p. 129-163.
- [24] Postek M. T., Vladar A., Dagata J., Farkas N., Ming B., Wagner R., Raman A., Moon R. J., Sabo R., Wegner T. H., Beecher J. Development of the metrology and imaging of cellulose nanocrystals. *Meas. Sci. Tech.* 2011, **22**, pp 024005.
- [25] ISO 4750, Practical dimensional calibration of AFMs
- [26] Sader J. E. *Rev. Sci. Inst.* 2016, **87**, pp 093711.
- [27] Lahiji R. R., Xu X., Reifengerger R., Raman A., Rudie A., Moon R. J. Atomic force microscopy characterization of cellulose nanocrystals. *Langmuir*. 2010, **26**, pp 4480-4488.
- [28] Elazzouzi-Hafraoui S., Nishiyama Y., Putaux J. –L., Heux L., Dubreuil F., Rochas C. The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules*. 2008, **9**, pp 57-65.
- [29] Usov I., Nystrom G., Adamecik J., Handschin S., Schutz C., Fall A., Bergstrom L., Mezzenga R. Understanding nanocellulose chirality and structure-properties relationship at the single fibril level. *Nature Comm.* . 2015, **6**, pp 7564

- [30] Montoro Bustos A. R., Petersen E. J., Possolo A., Winchester M. R. Post hoc interlaboratory comparison of single particle ICP-MS size measurements of NIST gold nanoparticle reference materials. *Anal. Chem.* . 2015, **87**, pp 8809-8817.
- [31] Meija J., Bushell M., Couillard M., Beck S., Bovenich J., Cui K., Foster J., Will J., Fox D., Cho W., Heidelmann M., Park B. C., Park Y. C., Ren L., Xu L., Stefaniak A., Knepp A. K., Theissmann R., Purwin H., Wang Z., De Val N., Johnston L. J. Particle size distributions for cellulose nanocrystals measured by transmission electron microscopy: An interlaboratory comparison. *Anal. Chem.* 2020, **92**, pp 13434-13442.
- [32] [Http://www.nrc.ca/crm](http://www.nrc.ca/crm).
- [33] Bushell M., Meija J., chen M., Batchelor W., Browne C., Cho J. -Y., Clifford C. A., Al-Rekabi Z., Vanderfleet O., Cranston E., Lawn M., Coleman V. A., Nystrom G., Arcari M., Mezzenga R., Park B. C., Ren L., Saito T., Kaku Y., Wagner R., Johnston L. J. Particle size distributions for cellulose nanocrystals measured by atomic force microscopy: An interlaboratory comparison. *Cellulose*. 2012, **28**, pp 1387-1403.
- [34] Usov I., Mezzenga R. Fiberapp: An open source software for tracking and analyzing polymers, filaments, biomacromolecules and fibrous objects. *Macromolecules*. 2015, **48**, pp 1269-1280.
- [35] Chen M., Parot J., Mukherjee A., Couillard M., Zou S., Hackley V. A., Johnston L. J. Characterization of size and aggregation for cellulose nanocrystal dispersions separated by asymmetrical-flow field-flow fractionation. *Cellulose*. 2020, **27**, pp 2015-2028.