



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران
۲۲۷۷۸

چاپ اول

۱۳۹۹

INSO

22778

1st Edition

2020

Identical with
ISO CEN/TS
17273: 2018

فناوری نانو - رهنمود آشکارسازی و
شناسایی نانو اشیاء در ماتریس‌های
پیچیده

**Nanotechnologies – Guidance on
detection and identification of nano –
objects in complex matrices**

ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۷۷۸ (چاپ اول): سال ۱۳۹۹

سازمان ملی استاندارد ایران

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

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۳۹ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۳۱۵۸۵-۱۶۳ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

Iranian National Standardization 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@isiri.gov.ir

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

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به 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، نهادهای 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 استاندارد 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 for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- رهنمود آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده»

رئیس:

تاج‌آبادی، مریم
(دکتری مهندسی پزشکی - بیومواد)

دبیر:

میرکاظمی، سید محمد
(دکتری مهندسی مواد و متالورژی)

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اسلامی پور، الهه
(کارشناسی ارشد زیست شناسی)

پوی‌پوی، حسن
(کارشناسی ارشد شیمی)

دباغ کاشانی، فاطمه
(دکتری فیزیک)

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

میرزاجانی، فاطمه
(دکتری فیتوشیمی)

نجم‌الدین، نجمه
(دکتری مهندسی مواد)

ویراستار:

سیفی، مهوش
(کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)

سمت و/یا محل اشتغال:

عضو هیئت علمی - دانشگاه علم و صنعت ایران

عضو هیئت علمی - دانشگاه علم و صنعت ایران

کارشناس - گروه استاندارد و ایمنی ستاد فناوری نانو

دبیر - کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIR/TC 229

عضو هیئت علمی - دانشگاه علم و صنعت ایران

نایب رئیس - کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIR/TC 229

عضو هیئت علمی - دانشگاه شهید بهشتی

عضو هیئت علمی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

نایب رئیس - کمیته فنی متناظر فناوری نانو ISIR/TC 229

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ط	پیش‌گفتار
ی	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۳	۳ اصطلاحات و تعاریف
۴	۴ نمادها و کوتاه‌نوشت‌ها
۷	۵ روش‌های اندازه‌گیری و کارهای قابل‌انجام
۷	۵-۱ مثال‌هایی برای کارهای آشکارسازی و شناسایی در ماتریس‌های پیچیده
۸	۵-۲ مروری بر روش‌های اندازه‌گیری
۹	۶ رهنمود آماده‌سازی نمونه، آشکارسازی ذره و شناسایی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده
۹	۶-۱ رهیافتی برای «آشکارسازی و شناسایی یک جمعیت مرتبط نانواشیاء بر پایه دانش قبلی» (نمودار رهنمود)
۱۳	۶-۲ اطلاعات در مورد نانواشیاء موردنظر
۱۳	۶-۳ اطلاعات در مورد ماتریس نمونه
۱۴	۶-۴ ارزیابی کیفیت فرایند آماده‌سازی نمونه
۱۴	۶-۴-۱ تعلیقه، پراکنش با ارزشیابی بازیابی و ارزیابی خاصیت
۱۴	۶-۴-۲ اندازه‌گیری توزیع اندازه اولیه و اندازه‌گیری غلظت جرمی همه نانواشیاء مجزا
۱۶	۶-۵ اندازه‌گیری نانواشیاء موردنظر و ارزشیابی
۱۷	۷ روش‌های اندازه‌گیری انتخابی برای آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء
۱۷	۷-۱ روش جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان (FFF)
۱۷	۷-۱-۱ کلیات
۱۷	۷-۱-۲ نظریه و اصل جزء‌جزء کردن - اصل جزء‌جزء کردن
۱۹	۷-۱-۳ اصل آشکارسازی
۲۱	۷-۱-۴ عملکرد
۲۲	۷-۱-۵ آماده‌سازی نمونه
۲۳	۷-۱-۶ گزارش آنالیز و تفسیر نتایج
۲۴	۷-۲ روش میکروسکوپی الکترونی (EM)

صفحه	عنوان
۲۴	۱-۲-۷ کلیات
۲۵	۲-۲-۷ اصول اندازه‌گیری میکروسکوپی الکترونی
۲۷	۳-۲-۷ عملکرد میکروسکوپی الکترونی
۲۹	۴-۲-۷ آماده‌سازی نمونه میکروسکوپی الکترونی
۳۰	۵-۲-۷ تفسیر نتایج میکروسکوپی الکترونی
۳۲	۳-۷ پلاسمای جفت‌شده القائی تک ذره- طیف‌سنجی جرمی (spICP-MS)
۳۲	۱-۳-۷ اساس سنجش
۳۳	۲-۳-۷ عملکرد
۳۵	۳-۳-۷ آماده‌سازی نمونه
۳۷	۴-۳-۷ تفسیر نتایج
۳۹	۸ فهرست الزامات گزارش‌دهی آماده‌سازی نمونه، آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده
۳۹	۱-۸ گزارش‌دهی عمومی
۳۹	۲-۸ گزارش‌دهی آماده‌سازی نمونه، شرح‌داده‌شده در بند ۶
۴۰	۳-۸ گزارش‌دهی اندازه‌گیری، شرح‌داده‌شده در بند ۷
۴۱	پیوست الف (آگاهی‌دهنده) بازه‌های نشانگر اندازه و غلظت روش‌های اندازه‌گیری انتخابی
۴۳	پیوست ب (الزامی) نظریه جدایش‌های F_4 ، احتیاط‌ها هنگام جداسازی توزیع‌های گسترده اندازه ذره و آماده‌سازی نمونه
۴۳	ب-۱ نظریه جدایش‌های F_4
۴۴	ب-۲ کالیبراسیون F_4 با استفاده از نظریه F_4 یا مراجع خارجی
۴۶	ب-۳ رهیافت‌های آماده‌سازی نمونه‌های پیچیده برای FFF
۴۹	پیوست پ (آگاهی‌دهنده) مثال: آنالیز رهائش ذرات از پوشش نقره‌ای رنگ مرورابدها به‌وسیله ترکیبی از آنالیز TEM توصیفی، پراش الکترون، TEM تحلیلی و TEM کمی
۴۹	پ-۱ رهیافت و روش‌شناسی
۵۰	پ-۲ نتایج
۵۴	پیوست ت (آگاهی‌دهنده) مثال: ICP-MS تک‌ذره برای اندازه‌گذاری و تعیین کمی نانونقره در گوشت جوجه

صفحه	عنوان
۵۴	ت-۱ مقدمه
۵۴	ت-۲ توصیف روش
۵۴	ت-۲-۱ مواد و روش‌ها
۵۵	ت-۲-۲ آماده‌سازی نمونه
۵۵	ت-۲-۳ آنالیز ابزاری
۵۶	ت-۲-۴ پردازش داده‌ها
۵۶	ت-۳ نتایج و بحث
۵۶	ت-۳-۱ هضم زی‌مایه‌ای نمونه، شرایط ملایم برای حفظ مشخصات ذره
۵۷	ت-۳-۲ طراحی مطالعه و نتایج صحنه‌گذاری
۵۸	ت-۳-۳ تکرارپذیری، تجدیدپذیری و صحت
۵۹	ت-۳-۴ خطی بودن و LOD/LOQ، تحمل‌پذیری، ویژگی / گزینش‌پذیری
۶۱	پیوست ث (آگاهی‌دهنده) مروری بر روش‌های آشکارسازی جایگزین
۶۱	ث-۱ کلیات
۶۳	ث-۲ آنالیز ردگیری ذره (PTA)
۶۴	ث-۳ روش‌های ردیاب با استفاده از نانوآشپاء برچسب‌دار ایزوتروپی پایدار
۶۵	ث-۴ سامانه تصویربرداری فراطیفی (HSIS) به‌وسیله پراکندگی در پس‌زمینه میدان تاریک
۶۶	ث-۵ ارزیابی اندازه به‌وسیله طیف‌سنجی فرابنفش مرئی (UV-Vis)
۶۶	ث-۶ اندازه‌گیری نانوآشپاء در مایعات با استفاده از سامانه آنالیز تحرک تفاضلی (DMAS)
۶۷	ث-۷ آشکارسازی فروشکست القائی - لیزری (LIBD)
۶۸	ث-۸ ICP-MS کروماتوگرافی هیدرودینامیکی (HDC-ICP-MS) و ICP-MS اندازه‌گزین (SEC-ICP-MS)
۷۰	کتاب‌نامه

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- رهنمود آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ تهیه و تدوین شده، در هشتاد و ششمین اجلاس کمیته ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۳۹۹/۰۳/۰۶ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس 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 منطقه‌ای 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/منطقه‌ای مزبور است:

CEN /TS 17273: 2018, Nanotechnologies — Guidance on detection and identification of nano-objects in complex matrices

مقدمه

فناوری نانو، یک حوزه علمی و فناوری به سرعت در حال توسعه است که بر روی فرایندها و مواد در اندازه نانومقیاس (ابعاد ذره تقریباً ۱ nm تا ۱۰۰ nm) متمرکز شده است. این حوزه چند رشته‌ای با بازه وسیعی از مواد و کاربردها، همچون مراقبت‌های بهداشتی، فناوری اطلاعات و ارتباطات، تولید و ذخیره‌سازی انرژی، علم مواد/ مهندسی شیمی، ساخت، محافظت زیست‌محیطی، محصولات مصرفی (به‌طور مثال، غذا، لوازم آرایشی و غیره) است. بنابراین، محصولات حاصل که شامل مواد نانومقیاس است، از نظر خواصشان بسیار متنوع و مختلف هستند.

استاندارد CEN/TS 17010 رهنمودهایی برای شناسایی اندازه‌ده‌ها^۱ فراهم می‌کند تا نانواشیاء، کلوخه‌ها و انبوهه‌های آن‌ها مشخصه‌یابی شوند و خواص ویژه مربوط به عملکرد مواد حاوی آن‌ها را تعیین کنند. این استاندارد اندازه‌ده‌هایی برای مشخصه‌یابی نانواشیاء بر پایه روش‌های جاری متداول مشخصه‌یابی آن‌ها را توضیح می‌دهد. به دلیل تداخل‌های ماتریس (های) گوناگون، یک پروتکل آماده‌سازی نمونه ویژه- روش^۲ برای جداسازی ذرات مطلوب از ماتریس‌های مربوط به آن‌ها اجباری است.

تولید و استفاده از نانومواد ممکن است، بین سایر عوارض، به افزایش رهایش نانواشیاء به محیط‌زیست به‌طور مثال به‌وسیله ضایعات مایع و جریان‌های تولید منجر شود. به‌منظور حصول اطمینان از استفاده پایدار و توسعه فناوری نانو، به کنترل و پایش سامانه‌های نانوماده مطابق کاربرد آن (به‌طور مثال ارزیابی ریسک) نیاز است. به این دلیل، ضروری است که روش‌های اندازه‌گیری مفیدی برای آشکارسازی و مشخصه‌یابی نانواشیاء در ماتریس‌های به‌اصطلاح پیچیده همچون مایعات طبیعی، فاضلاب، غذا و لوازم آرایشی شناسایی شوند [1]. مهم است که مشخصات ویژه نانواشیاء شناخته شود تا (کاربران) قادر به شناسایی آن‌ها باشند.

روش‌های متعددی برای جزء‌جزء کردن^۳ نانواشیاء بر پایه، به‌طور مثال، ته‌نشینی مایع سانتریفیوژ، یا روش‌های جدایش برپایه جریان، همچون جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان (FFF)^۴، کروماتوگرافی هیدرودینامیکی و کروماتوگرافی اندازه‌گزین وجود دارند. معمولاً، توزیع‌های اندازه ذره به‌وسیله اندازه‌گیری غلظت ذره از جزء‌های اندازه مختلف به‌دست می‌آید.

روش‌های تصویربرداری همچون میکروسکوپی الکترونی بعد از آماده‌سازی مناسب نمونه، آشکارسازی/ تصویربرداری ذرات تکی را مطابق چندین شاخصه به‌طور مثال مساحت تابش، بلندترین یا کوتاه‌ترین بعد خارجی (نمونه) مجاز می‌سازد.

1 - Measurands

2 - Method- specific sample preparation protocol

3 - Fractionation

4 - Field Flow Fractionation (FFF)

در مورد روش‌های شمارش، بعد از رقیق‌سازی زیاد و معین جریان ذره، فقط ذرات تکی در منطقه آشکارسازی وجود دارند و به‌طور مثال سیگنال‌های وابسته به حجم ذره یا محل تابش ذره می‌توانند اندازه‌گیری و با روش شمارش پراکندگی نور به تعداد ذرات مرتبط شوند.

هنگامی که ذرات بسیار متفاوتی در ناحیه آشکارسازی حضور دارند، روش‌های همادی^۱، همچون روش‌های پراکندگی نورپویا و نور ایستا می‌توانند مورد استفاده قرارگیرند، به‌شرطی که بس‌پراکندگی ذرات محدود باشند. برای مثال، آنالیز پراکندگی نورپویا (DLS)^۲، طیف‌های سیگنالی با مولفه‌های وابسته به اندازه تولید می‌کند. روش DLS می‌تواند این طیف‌ها را به توزیع‌های اندازه ذره وزن‌دهی‌شده - شدت اولیه تجزیه کند، ولی این مورد فقط برای سامانه‌های نمونه ساده، با حالت‌های اندازه ذره خوب جدایش‌یافته و با کمک الگوریتم‌های پیشرفته صادق است.

روش‌های به‌خوبی تثبیت‌شده آنالیز اندازه ذره که تاکنون ذکر شده‌است، شناسایی شیمیایی نانوشیاء را پوشش نمی‌دهد. این استاندارد، آشکارسازی نانوشیاء در ماتریس‌های مایع پیچیده‌ای را مطرح می‌کند که ممکن است حاوی میزان بالای نمک‌های معدنی، آلودگی‌های آلی و ذرات معدنی و آلی بزرگ‌تر و همچنین نانوشیاء پس‌زمینه طبیعی باشند. بنابراین، مهم است که برای هر ذره، دو اندازه‌ده ترکیب شود: نه‌تنها اندازه (برای طبقه‌بندی به‌عنوان نانوشیء)، بلکه ترکیب‌بندی عنصری (برای تمایز قائل شدن ذرات هدف با یک ترکیب‌بندی عنصری یا ریخت‌شناسی از قبل شناخته شده، از ذرات پس‌زمینه و ماتریس) نیاز هستند.

هدف این استاندارد آن است که کاربران را راهنمایی کند تا چگونه اندازه‌گیری اندازه ذره را با شناسایی شیمیایی آن ترکیب کنند.

استاندارد، استفاده از سه روش مشخصه‌یابی اصلی را پیشنهاد می‌دهد:

- جزء جزء کردن جریان بر پایه میدان^۳ به همراه سامانه آشکارسازی چندگانه که اطلاعات مربوط به اندازه و همچنین شناسایی ماده را ارائه می‌دهد.

- میکروسکوپی الکترونی مجهز به طیف‌سنجی پرتوی ایکس بر اساس توزیع انرژی (EDX)^۴ برای تعیین ترکیب‌بندی عنصری ذرات و همچنین مقیاس‌های هندسی آن‌ها.

- پلاسمای جفت‌شده القائی تک‌ذره - طیف‌سنجی جرمی به‌عنوان سامانه آشکارسازی ویژه عنصری به همراه اطلاعات مربوط به اندازه.

برای شناسایی نانوشیاء، این استاندارد به دانش قبلی از طبیعت آن‌ها، به‌طور مثال ترکیب‌بندی عنصری آن‌ها نیاز دارد.

1- Ensemble

2- Dynamic Light Scattering

2- Field Flow Fractionation (FFF)

4- Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)

همه روش‌های پیشنهادی حاضر، اجازه مشخصه‌یابی درجا^۱ را نمی‌دهند ولی فقط مشخصه‌یابی
دگرجا^۲ را ممکن می‌سازند.

1- In situ
2- Ex situ

فناوری نانو- رهنمود آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین الزامات نمونه‌برداری و عمل‌آوری^۱ ماتریس‌های پیچیده به‌منظور دستیابی به یک پراکنه مایع با غلظت بالای مناسب از نانواشیاء مطلوب است. این استاندارد، راهنمایی‌هایی برای آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء ویژه در ماتریس‌های پیچیده، همچون بخش‌های زیست‌محیطی مایع، فاضلاب و محصولات مصرفی (مانند غذا، لوازم آرایشی) فراهم می‌کند. در این استاندارد برای شناسایی، به یک دانش قبلی از طبیعت نانواشیاء همچون ترکیب‌بندی شیمیایی آن‌ها نیاز است. آشکارسازی گزینشی و روش‌های شناسایی، برپایه ترکیب طبقه‌بندی اندازه و آنالیز ترکیب‌بندی شیمیایی هستند. همچنین شناسایی نانواشیاء می‌تواند به‌طور مثال با مشخصه‌یابی افزوده ریخت‌شناسی پشتیبانی شود. در حال حاضر، فقط روش‌های جزء جزء کردن جریان بر پایه میدان، میکروسکوپی الکترونی و پلاسمای جفت‌شده القائی تک‌ذره-طیف‌سنجی جرمی، این شرط ترکیبی را برآورده می‌کند.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده‌است. بدین ترتیب آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند. در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده‌باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام آور نیست، در مورد مراجعی که بدون ذکر انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است. همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام آور است. استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است.

۱-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵- فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۱: اصطلاحات اصلی

۲-۲ استاندارد ملی ایران- ایزو ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵- فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۲: نانواشیاء

2-3 ISO 9276-2, Representation of results of particle size analysis- Part 2: Calculation of average particle size/diameters and moment from particle size distributions.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۲-۸۲۰۱: سال ۱۳۹۵، - ارائه نتایج دانه‌بندی- قسمت ۲: محاسبه میانگین اندازه/ قطر و گشتاور دانه‌ها از توزیع‌های اندازه دانه، با استفاده از استاندارد ISO 9276-2: 2014 تدوین شده‌است.

2-4 ISO 9276-3, Representation of results of particle size analysis — Part 3: Adjustment of an experimental curve to a reference model

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۳-۸۲۰۱: سال ۱۳۹۲، نمایش آنالیز اندازه‌ده - قسمت ۳: تطبیق منحنی تجربی با مدل مرجع، با استفاده از استاندارد ISO 9276-3: 2008 تدوین شده است.

2-5 ISO 9276-4, Representation of results of particle size analysis- Part 4: Characterization of a classification process

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۴-۸۲۰۱: سال ۱۳۸۴، ارائه دانه‌بندی - قسمت ۴: توصیف فرایند طبقه‌بندی، با استفاده از استاندارد ISO 9276-4: 2001 تدوین شده است.

2-5 ISO 9276-5, Representation of results of particle size analysis — Part 5: Methods of calculation relating to particle size analyses using logarithmic normal probability distribution

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۵-۱۱۶۱۷: سال ۱۳۸۷، نمایش نتایج اندازه‌ده - قسمت ۵: روش‌های محاسبه مربوط به «آنالیزهای اندازه‌ده» که از توزیع احتمال نرمال لگاریتمی استفاده می‌کنند، با استفاده از استاندارد ISO 9276-5: 2005 تدوین شده است.

2-6 ISO 9276-6, Representation of results of particle size analysis— Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology

2-7 ISO 14488, Particulate materials — Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۲۹۲۲: سال ۱۳۸۸، مواد ذره‌ای - نمونه‌برداری و تقسیم نمونه برای تعیین خواص - چاپ اول، با استفاده از استاندارد ISO 14488: 2007 تدوین شده است

2-8 ISO 17010:2016, Nanotechnologies — Guidance on measurands for characterising nano-objects and materials that contain them

2-9 ISO 17025:2017, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

یادآوری - استاندارد ملی ایران - ایزو- آی ای سی شماره ۱۷۰۲۵: سال ۱۳۹۵، الزامات عمومی برای احراز صلاحیت آزمایشگاه‌های آزمون و کالیبراسیون - با استفاده از استاندارد ISO /IEC 17025: 2005 تدوین شده است.

2-10 ISO 13322-1, Particle size analysis— Image analysis methods- Part 1: Static image analysis methods.

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱-۱۰۰۹۹: سال ۱۳۹۵، آنالیز اندازه ذرات- روش‌های آنالیز تصویری- قسمت ۱: روش‌های آنالیز تصویری ایستا، با استفاده از استاندارد ISO 13322-1: 2014 تدوین شده است.

2-11 ISO/DIS 19749, Nanotechnologies— Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy

2-12 ISO/ TS 21362, Nanotechnologies— Analysis of nano- Objects using asymmetrical-flow and centrifugal field- flow fractionation

2-13 ISO 21363, Nanotechnologies- Measurements of particle size and shape distributions by transmission electron microscopy

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، علاوه بر اصطلاحات و تعاریف ارائه شده در استانداردهای ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵ و ۲-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز بکار می‌رود^۱.

۱-۳

نانومقیاس

nanoscale

گستره اندازه بین تقریباً ۱ nm تا ۱۰۰ nm است.

یادآوری- خواصی را که از اندازه‌های بزرگ‌تر، برون‌یابی می‌شوند، غالباً در این گستره اندازه نشان داده می‌شوند.

[منبع: زیربند ۲-۱۱، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۲-۳

نانوشیء

nano-object

هر قطعه مجزا از ماده با یک، دو و یا سه بعد خارجی در نانومقیاس (۱-۳) است.

یادآوری- ابعاد خارجی دوم و سوم عمود بر بعد اول و همچنین عمود بر یکدیگر هستند.

[منبع: زیربند ۲-۵، استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۱-۸۰۰۰۴: سال ۱۳۹۵]

۳-۳

ماده مرجع

Reference material

RM

ماده‌ای به اندازه کافی همگن و پایدار که با توجه به یک یا چند خاصیت ویژه ایجاد شده‌است تا برای استفاده موردنظر در یک فرایند اندازه‌گیری مناسب باشد.

یادآوری ۱- RM یک اصطلاح عمومی است.

یادآوری ۲- خواص می‌تواند کمی یا کیفی باشد، به‌طور مثال، هویت مواد یا گونه‌ها.

یادآوری ۳- استفاده‌ها ممکن است شامل کالیبراسیون یک سامانه اندازه‌گیری، ارزیابی روش اجرای اندازه‌گیری، تخصیص مقادیر به مواد دیگر و کنترل کیفی باشد.

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کار رفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های <http://www.iso.org/obp> و <http://www.electropedia.org/> قابل دسترسی است.

یادآوری ۴- راهنمای (VIM) ISO/IEC Guide 99:2007 توصیف مشابه (۵-۱۳) دارد، اما اصطلاح «اندازه‌گیری» را به‌منظور کاربرد برای مقادیر کمی محدود کرده‌است. هرچند، یادآوری ۳ در زبید 5-13 استاندارد ISO/IEC Guide 99:2007، مشخصاً شامل خواص کیفی است که به آن «خواص نامی» می‌گویند.

[منبع: زیربند 2.1.1، راهنمای ISO Guide 30:2015]

۴-۳

ماده مرجع گواهی شده

Certified reference material

CRM

ماده مرجع (RM) مشخصه‌یابی شده به‌وسیله یک روش اجرایی معتبر از نظر اندازه‌شناسی، برای یک یا چند خاصیت تعیین‌شده، همراه با یک گواهی RM است که مقدار خاصیت معین، عدم قطعیت مربوط به آن و شرح قابلیت ردیابی اندازه‌شناختی را فراهم می‌کند.

یادآوری ۱- مفهوم مقدار شامل خاصیت نامی یا یک شاخصه کیفی همچون هویت یا توالی است. عدم قطعیت برای چنین شاخصه‌هایی ممکن است به‌صورت احتمالات یا سطوحی از اطمینان بیان شود.

یادآوری ۲- روش‌های اجرایی معتبر از لحاظ اندازه‌شناختی برای تولید و گواهی RM ها، به‌طور مثال، در استاندارد EN ISO 17034 و راهنمای ISO Guide 35 ارائه شده‌است.

یادآوری ۳- راهنمای ISO Guide 31 رهنمودهایی را برای محتوای گواهی‌های RM ارائه می‌دهد.

یادآوری ۴- راهنمای ISO/IEC Guide 99:2007 تعریف مشابه (۵-۱۴) دارد.

[منبع: زیربند 2.1.2 راهنمای ISO Guide 30:2015 تغییر یافته- یک مرجع در انتهای یادآوری ۲، تغییر یافته است]

۴ نمادها و کوتاه‌نوشت‌ها

برای اهداف این استاندارد، نمادها و کوتاه‌نوشت‌های زیر به‌کار می‌رود.

واحد SI	کمیت	نمادها
m^{-3}	غلظت عددی نانوشیء	c_n
$m^2 s^{-1}$	ضریب نفوذ	D
m	ضخامت میانگین ابرذره ^۱	L
بدون بعد	ضریب اصطکاک	F
$J.K^{-1}$	ثابت بولتزمن	K

بدون بعد	نسبت ماند (F_4)	R
بدون بعد	نسبت جرم به بار	m/z
m	شعاع ژیراسیون	r_g
m	شعاع هیدرودینامیکی	r_h
K	دما	T
s	زمان شویش (F_4)	$t_{elution}$
s	زمان تهی مجرای جریان حامل ^۲	t_0
m^3	حجم مجرا/ حجم تهی مجرا	V_0
$m^3 s^{-1}$	نرخ جریان چلیپایی ^۳	\dot{V}_C
m^3	حجم شویش (F_4)	$V_{elution}$
m^3	حجم تهی مجرای جریان حامل	V_{void}
m	ارتفاع مجرا	W
بدون بعد	پارامتر ماند (F_4)	λ

کوتاه‌نوشت	اصطلاح	معادل فارسی
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	طیف‌سنجی جذب اتمی
AF ₄	Asymmetric Flow- Field Flow Fractionation	جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان - جریان نامتقارن
BF	Bright Field	میدان روشن
BSA	Bovine Serum Albumine	آلبومین سرم گاوی
BSE	Back Scattered Electron	الکترون‌های برگشتی
CCD	Charge- Coupled Device	افزاره جفت‌شده بار
CLS	Centrifugal Liquid Sedimentation	ته‌نشینی مایع سانتریفیوژی
DLS	Dynamic Light Scattering	پراکندگی نور پویا
DRI	Differential Refractive Index	ضریب شکست تفاضلی
ECD	Equivalent Circular Diameter	قطر دایره‌ای معادل
EDX	Energy Dispersive X- ray Spectroscopy	طیف‌سنجی پرتوی ایکس بر اساس توزیع

		انرژی
EELS	Electron Energy Loss- Spectroscopy	طیف‌سنجی اتلاف انرژی الکترون
EM	Electron Microscopy	میکروسکوپی الکترونی
FFF	Field Flow Fractionation	جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان
F ₄	Flow- Field Flow Fractionation	جریان- جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان
HAADF	High- Angle Annular Dark- Field	میدان تاریک حلقوی زاویه بزرگ
HDC	Hydrodynamic Chromatography	کروماتوگرافی هیدرودینامیکی
hF5	Hollow- Fiber Flow- Field Fractionation	جریان لیف توخالی- جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان
ICP- MS	Inductively Coupled Plasma- Mass spectrometry	پلاسمای جفت‌شده القائی- طیف‌سنجی جرمی
ICP- TofMS	Inductively Coupled Plasma- Time of Flight Mass Spectroscopy	پلاسمای جفت‌شده القائی- طیف‌سنجی جرمی زمان پرواز
ICP- OES	Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry	پلاسمای جفت‌شده القائی- طیف‌سنجی نشرنوری
LC	Liquid Chromatography	کروماتوگرافی مایع
LIBD	Laser- Induced Breakdown Detection	آشکارسازی فروشکست القائی- لیزری
LOD	Limit Of Detection	حد آشکارسازی
LOQ	Limit Of Quantification	حد کمی‌سازی
MALS	Multi- Angle Light Scattering	پراکندگی نور چند زاویه‌ای
MWCO	Molecular Weight Cut- Off	قطع وزن مولکولی
NOAA	Nano- Objects and their Aggregates and Agglomerates	نانواشیاء و انبوهه‌ها و کلوخه‌های آن‌ها
MS	Mass Spectrometry	طیف‌سنجی جرمی
PTA	Particle Tracking Analysis	آنالیز ردگیری ذره
RSD _R	Relative Standard Deviation for Reproducibility	انحراف استاندارد نسبی برای تجدیدپذیری
RSD _r	Relative Standard Deviation for Repeatability	انحراف استاندارد نسبی برای تکرارپذیری
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate	سولفات دودسیل سدیم

SE	Secondary Electrons	الکترون‌های ثانویه
SEC	Size Exclusion Chromatography	کروماتوگرافی اندازه‌گزین
SEM	Scanning Electron Microscopy	میکروسکوپی الکترونی روبشی
spICP-MS	Single Particle Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry	پلاسمای جفت‌شده القائی تک‌ذره- طیف‌سنجی جرمی
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy	میکروسکوپی الکترونی عبوری روبشی
TEM	Transmission Electron Microscopy	میکروسکوپی الکترونی عبوری
TOC	Total Organic Carbon	کربن آلی کل
UPW	Ultrapure Water	آب فوق خالص
UV-Vis	Ultraviolet and Visible light	نور مرئی و فرابنفش
XRF	X-ray Fluorescence	فلورسانس پرتوی ایکس
1- Particle cloud 2- Channel void time of carrier flow 3- Cross-flow rate		

۵ روش‌های اندازه‌گیری و کارهای قابل انجام^۱

۵-۱ مثال‌هایی برای کارهای آشکارسازی و شناسایی در ماتریس‌های پیچیده

از آنجاکه ارزیابی ریسک نانوآشیا، در بین سایر موارد، به مشخصه‌یابی نانوآشیا و کلوخه‌های آن‌ها در بخش‌های مختلف زیست‌محیطی نیاز دارد، روش‌های آنالیزی مناسب باید به کار رود تا تعیین توزیع اندازه و غلظت نانوشیء امکان‌پذیر شود.

طبق هدف این استاندارد، توصیه می‌شود خواص شناخته‌شده قبلی، همچون ترکیب‌بندی شیمیایی مقدماتی و/یا ریخت‌شناسی این نانوآشیا ساخته‌شده استفاده شوند تا آن‌ها از نانوآشیا پس‌زمینه طبیعی متمایز شوند. همچنین، روش‌های آنالیزی کمی موردنیاز است تا نانوآشیا در غلظت‌های زیست‌محیطی را تعیین کند و ارزیابی مواجهه و اثر را مقدور سازد.

اطمینان حاصل شود که این روش‌ها از نظر حداقل اندازه ذرات و غلظت مواد به اندازه کافی حساس هستند. بیان بازه‌های اندازه و غلظت چندین ماده نمونه در پیوست الف ارائه شده است.

حین مطالعه ایمنی فراورده یا ارزشیابی ریسک، چندین مثال آشکارسازی (نانو) مواد در ماتریس‌های پیچیده بررسی شده است، به‌طور مثال، سیلیکا در سوپ گوجه فرنگی، تیتانیوم دی‌اکسید در کرم ضد آفتاب، نانوذرات

1 - Possible tasks

نقره در فاضلاب، نانوذرات رنگدانه‌دار و پرکننده در پوشش‌ها و چندسازه‌های بسیار و همچنین نانولوله‌ها در چندسازه‌ها.

چندین رهیافت عمومی برای آماده کردن یک نمونه پیچیده برای آنالیز FFF در پیوست ب خلاصه شده است.

مثال‌هایی برای آنالیز نانوذرات نقره در تزیین شیرینی (به‌وسیله EM) و در گوشت جوجه (به‌وسیله spICP-MS) در پیوست‌های پ و ت ارائه شده است.

۵-۲ مروری بر روش‌های اندازه‌گیری

روش‌های جزء جزء کردن جریان بر پایه میدان (FFF)، میکروسکوپی الکترونی (EM) و پلاسمای جفت‌شده القائی تک‌ذره- طیف‌سنجی جرمی (spICP-MS) که در این استاندارد در بند ۷ توصیف شده است، در زمره جدیدترین رهیافت‌های محقق‌شده است که قادر به آشکارسازی و شناسائی نانواشیاء در تعدادی از ماتریس‌های پیچیده (به‌طور مثال فاضلاب، قسمت‌های زیست‌محیطی) است. این روش‌ها به‌خوبی شناخته‌شده هستند ولی کاربردهای آن‌ها، به‌خصوص برای آشکارسازی انواع جدیدتر نانواشیاء به‌طور مثال آب و غذا هنوز در دست تدوین است. تجارب می‌توانند از حوزه‌هایی همچون شیمی زیست‌محیطی، شیمی غذا، پژوهش نانوماده طبیعی و شیمی کلئوئید بنیادی به‌دست آید. این روش‌ها بر پایه پدیده‌ها و اصول مختلف فیزیکی هستند و برای آنالیز اندازه ذره، نتایج مختلف می‌تواند (به‌طور مثال قطر هیدرودینامیکی، قطر کروی معادل، طول / شعاع) حاصل شود.

روش‌های FFF، یک خانواده از روش‌های جداسازی جریان پایه هستند که قادرند به‌صورت فیزیکی مطابق جرم و اندازه مولکولی، درشت مولکول‌ها و ذرات را از یکدیگر جدا کنند. روش‌های FFF برای اندازه‌گیری توزیع اندازه ذره به‌کار می‌روند، فکیکت^۱ ویژه ذرات ناشی از ترکیب‌بندی شیمیایی آن‌ها فقط در اتصال با سامانه‌های آشکارسازی به همراه جداسازی در FFF به‌دست می‌آید.

به‌شرط آنکه نانواشیاء بتوانند به‌صورت نماینده‌ای از یک پراکنه پایدار به حامل نمونه مناسب (به‌طور مثال توری‌های TEM) منتقل شوند، می‌توان از روش‌های میکروسکوپی الکترونی روبشی و عبوری (TEM/SEM) استفاده کرد تا نانواشیاء بر پایه پراکندگی ناکشسان و کشسان یک باریکه الکترونی موازی یا همگرا مرئی شوند. آنالیز تصاویر EM، تخمین توزیع‌های تعداد- پایه ابعاد خارجی تصاویر دوبعدی نانواشیاء را ممکن می‌سازد. نانواشیاء ویژه می‌توانند بر پایه خواص مشخصه، همچون ریخت‌شناسی، ساختار بلورنگاشتی^۲ و در ترکیب با روش‌هایی همچون EDX یا EELS، ترکیب‌بندی عنصری با تفکیک‌پذیری فضایی بالا، شناسایی شوند.

1- Discrimination
2 - Crystallographic

نانواشیاء در کلوخه‌ها و انبوهه‌ها (NOAA)، که در اثر آماده‌سازی نمونه پراکنش نیافته‌اند، با این وجود، در حالت‌های ویژه به‌وسیله EM بدون جداسازی فیزیکی می‌توانند آشکار شوند.

از روش spICP-MS می‌توان برای آشکارسازی و مشخصه‌یابی نانواشیاء با برجسب‌های عنصری قابل رؤیت با ICP-MS در تعلیق‌های آبی استفاده کرد. روش spICP-MS مزیت عالی دارد، زیرا امکان تعیین غلظت عددی ذرات، و تخمین اندازه ذره و توزیع ذره اندازه- پایه را فراهم می‌کند. غلظت‌های عددی ذره می‌تواند در تعلیق‌های آبی در بازه‌ای از 10^6 تا 10^9 ذره بر لیتر تعیین شود و بنابراین رقیق‌سازی نمونه نیاز است. رقیق‌سازی نمونه اغلب مزیتی همچون کاهش اثر تداخل ماتریس و سیگنال‌های پس‌زمینه را دارد.

علاوه بر روش‌های آشکارسازی شناخته‌شده، روش‌های جایگزین کمتر شناخته‌شده یا روش‌هایی که هنوز در دست تدوین هستند، در پیوست ت توصیف شده‌اند. این روش‌ها ممکن است برای نیازهای خاصی به‌کار برده‌شوند که به‌طور کامل بر غلظت ذره، اندازه ذره یا ترکیب‌بندی ذره تمرکز ندارند.

برخی از روش‌های آشکارسازی جایگزین و روش‌های در دست تدوین برای کاربردهای خاصی در حوزه علمی طراحی شده‌اند. در برخی موارد، روش برای نانواشیاء خاصی است که راحت‌تر طراحی و ردیابی شوند. برای مثال، نانواشیائی که با عنوان خاص ایزوتوپ برای مطالعات زی‌انباشت^۱ و مطالعات زیست‌محیطی پویا که نیاز به تمایز قائل‌شدن بین محتوی نانومواد هدف^۲ و غلظت‌های پس‌زمینه عنصری را دارند، طراحی شده‌اند و همچنین انجام آزمون با غلظت‌های واقع‌گرایانه زیست‌محیطی را امکان‌پذیر می‌کنند.

۶ رهنمودهای آماده‌سازی نمونه، آشکارسازی ذره و شناسایی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده

۶-۱ رهیافتی برای «آشکارسازی و شناسایی یک جمعیت مرتبط نانواشیاء بر پایه دانش قبلی» (نمودار رهنمود)

کاربرد توسعه سامانمند روش‌های اجرایی آماده‌سازی نمونه و اندازه‌گیری‌های نهایی برای آشکارسازی، مشخصه‌یابی و کمی‌سازی نانواشیاء معدنی از قبل شناخته‌شده، به‌جای ارزشیابی «یکجا»^۳ به ارزشیابی مرحله‌ای نیاز دارد. توصیه می‌شود این ارزشیابی مرحله‌ای، به‌منظور به‌دست آوردن اطلاعات مطلوب اندازه‌ها و غلظت‌های ذره، با یک عدم قطعیت (اندازه‌گیری) مرتبط با هر گام یا روش به‌کاربرده شده همراه شود. آماده‌سازی نمونه، علیرغم استفاده از ابزارهای آنالیزی قوی، احتمالاً چالش برانگیزترین بخش فرایند آنالیزی است. بنابراین، به‌منظور ارزشیابی هرگام مقدماتی منفرد و رهیافت (چندگانه) روشمند برای دستیابی به یک ارزشیابی پی‌درپی برای هر گام تک، یک الگوی پروتکل می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. این الگوی پروتکل برای آشکارسازی، مشخصه‌یابی و کمی‌سازی نانواشیاء معدنی از قبل شناخته‌شده، پیاده‌سازی می‌شود [1].

1 - Bio-accumulation

2 - Targeted

3- All-in-once

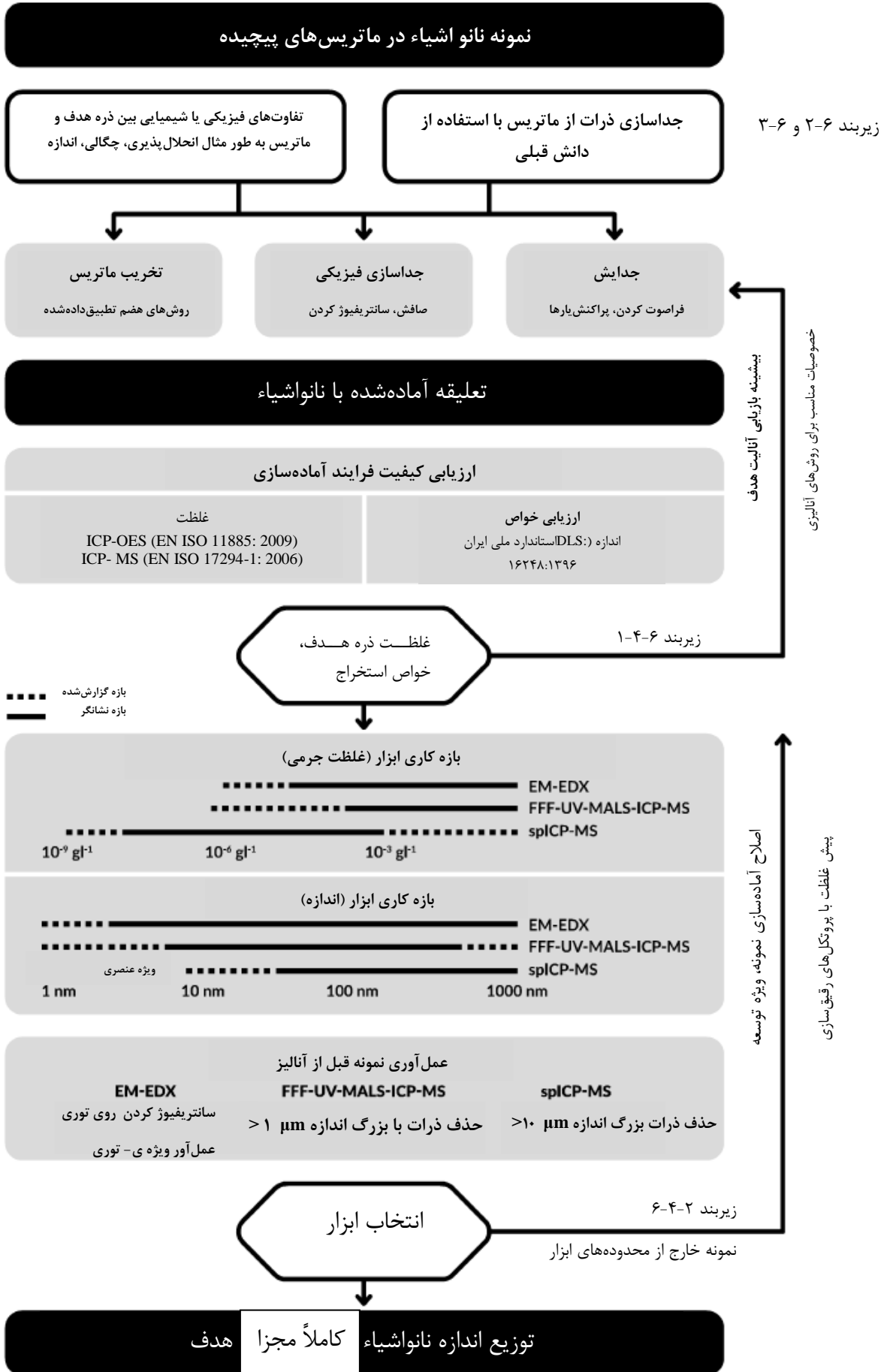
از یک الگوی پروتکل می‌توان به‌منظور ارزشیابی هر گام مقدماتی منفرد و رهیافت (چندگانه) روشمند برای آشکارسازی، آنالیز اندازه و کمی‌سازی مقدار نانوآشیاء معدنی شناخته‌شده قبلی، استفاده کرد.

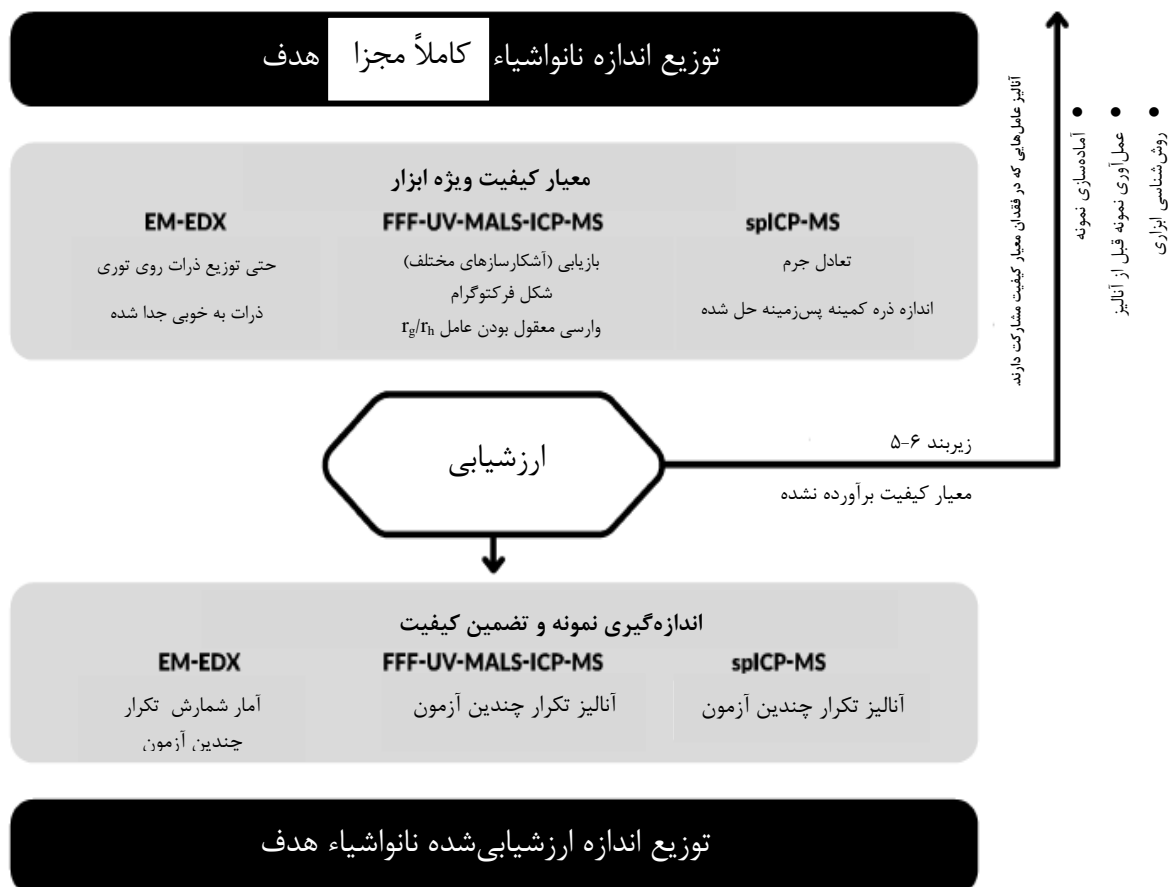
توصیه می‌شود کاربر از الزاماتی مانند بازیابی غلظت ذره، توزیع اندازه و الزامات مربوط به حساسیت روش اندازه‌گیری به‌کاربرده‌شده و همچنین تفسیر داده‌های حاصل در طی فرایند آماده‌سازی نمونه/فرایند پایدارسازی، آگاه باشد.

براساس اطلاعات خواص فیزیکوشیمیایی ذرات هدف و ماتریس، یک راهبرد آماده‌سازی نمونه مناسب، انتخاب می‌شود (شکل (۱)). یک راهبرد تخریب ماتریس، جداسازی فیزیکی و/یا جدایش نانوشیء و پایدارسازی، بسته به برهم‌کنش محتمل ذرات هدف با اجزای ماتریس، انتخاب می‌شود.

پایدارسازی نانوذرات پس از هضم/جداسازی برای به‌دست آوردن پراکنه پایدار ضروری است. این موضوع ممکن است به تنظیم مقدار یک pH ویژه و/یا افزودن عامل‌های پراکنش نیاز داشته باشد. کیفیت تعلیقه حاصل با بیشینه کردن بازیابی ذرات هدف (از طریق مقایسه غلظت‌های شناسانه^۱ مناسب در نمونه استخراج شده و در نمونه اصلی) بهینه می‌شود، درحالی‌که انتظار می‌رود بار ماتریس به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یابد.

علاوه بر آن، توزیع اندازه ذره تعلیقه حاصل اندازه‌گیری می‌شود، تا حضور ذرات در بازه میکرومتر و نانومتر و همچنین پتانسیل زتای ماده ذره‌ریز در نمونه شناسایی شود. پیرو بهینه‌سازی پراکنش (بازیابی، بازه اندازه ذره، پایداری) مناسب‌ترین ابزار(های) برپایه بازه اندازه ذره، بازه غلظت و عمل‌آوری ضروری قبل از آنالیز خاص برای هر روش انتخاب می‌شود (می‌شوند).





شکل ۱- طرح رهنمود برای راهبرد آماده‌سازی نمونه

برای روش‌های اندازه‌گیری در شکل ۱ به استانداردهای زیر مراجعه شود:

1- EN ISO 11885, water quality-Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۸۴۸: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- اندازه‌گیری عناصر انتخاب‌شده به روش اسپکترومتری نشر نوری با پلاسمای جفت‌شده‌ی القایی، با استفاده از استاندارد ISO 11885: 2007 تدوین شده‌است.

2- ISO 17294-1, Water quality- — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS)– Part 1: General guidelines

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۱۴۹۴۵: سال ۱۳۹۲، کیفیت آب- کاربرد طیف‌سنجی جرمی پلاسمای جفت‌شده القایی- قسمت اول: راهنمایی‌های کلی، با استفاده از استاندارد ISO 17294-1: 2004 تدوین شده‌است.

3- ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۶، آنالیز اندازه ذره - پراکندگی نور دینامیک (DLS)، با استفاده از استاندارد ISO 22412: 2017 تدوین شده است.

4- ISO 19430, Particle size analysis- Particle tracking analysis (PTA) method.

۲-۶ اطلاعات در مورد نانواشیاء مورد نظر

از آنجاکه در این استاندارد فرض می‌شود که دانش قبلی از نانواشیاء مورد نظر وجود دارد، توصیه می‌شود چندین پارامتر فیزیکوشیمیایی از قبل شناخته شده باشد. پارامترهایی همچون چگالی ذره، کرووی بودن، توزیع اندازه و ضریب شکست می‌تواند به وسیله اندازه‌گیری نانوماده خالص یا اجزای نانومقیاس، یا به وسیله اندازه‌گیری نانوذرات در تعلیق خالص (تمیز) از قبل ارزشیابی شود. در صورتی که روش اندازه‌گیری با ماتریس تداخل نکند، اطلاعات عنصری باید از قبل دانسته شود (ICP-OES, XRF, ICP-MS و غیره)، زیرا لازم است تحلیلگر در حالت استفاده از spICP-MS و TEM توسعه یافته به وسیله روش‌های آنالیزی، یک جرم (ایزوتوپی برای پایش) را انتخاب کند.

وقتی که نانواشیاء بر پایه آلیاژهای فلزی باشند، توصیه می‌شود استوکیومتری و همچنین اطلاعات در مورد ذرات پوشش داده شده سطح شناخته شود. اطلاعات پیشرفته شکل‌گیری کلوخه و حضور انبوهه می‌تواند موضوع دیگری باشد که در طی توسعه یک راهبرد نمونه‌برداری در نظر گرفته می‌شود. توصیه می‌شود هنگام انتخاب نانواشیاء مورد نظر، حساسیت پتانسیل اکسایش - کاهش ذرات در نظر گرفته شود (به طور مثال، ذرات Ag). تأثیرات عنصری یا تأثیرات مورد انتظار دیگر نانواشیاء به کار برده شده / ارائه شده (به طور مثال تداخل‌های ذرات بزرگ) ممکن است رخ دهد. اسپایک کردن^۱ نمونه (افزودن غلظت و نوع تعریف شده آنالیت، به راهنمای ISO Guide 35 مراجعه شود) می‌تواند در هر یک از سطوح مرتبط واقعی که نیاز به گام غلظت دارد یا در هر سطح بازه کاری اندازه‌گیری ابزار انجام شود.

۳-۶ اطلاعات در مورد ماتریس نمونه

ماتریس نمونه باید از قبل به خوبی تعریف شده باشد. پارامترهایی همچون pH، میزان نمک، TOC، ماده خشک، رسانندگی، میزان چربی و میزان (پس‌زمینه) عنصری ممکن است به منظور تصمیم‌گیری مناسب بودن ماتریس برای اسپایک کردن، بحرانی باشد. غالباً ذرات در ماتریس جاسازی شده‌اند و نظر به این که ماتریس ممکن است حین رقیق‌سازی رسوب کند، ممکن است حین هر گام آماده‌سازی نمونه، اتلاف (ذرات) علاوه بر جذب سطحی برگشت‌ناپذیر^۲ ظاهر شود. نیاز است که همگنی ماتریس مورد توجه قرار گیرد، همانگونه که پایداری در بازه زمانی (تجربی) بیشتری مورد نیاز است. داشتن دانش قبلی از نانواشیاء و ماتریس باید اجازه انتخاب یک راهبرد آماده‌سازی نمونه را بدهد.

1- Spiking
2- Irreversible adsorption

۴-۶ ارزیابی کیفیت فرایند آماده‌سازی نمونه

۱-۴-۶ تعلیقه، پراکنش با ارزشیابی بازیابی^۱ و ارزیابی خاصیت^۲

گام‌های آماده‌سازی نمونه بسته به کاربرد انتخاب شده و ممکن است: هضم اسیدی، استخراج کلونیدی (با استفاده از یک سطح‌فعال مناسب برای این کاربرد)، جداسازی (با ملاحظه خاص بازیابی همچون جداسازی کامل از یک ماتریس پیچیده ممکن است بحرانی باشد)، هضم زی‌مایه^۳، استخراج حلال یا سانتریفیوژ کردن (مرکزگریزی) یا ته‌نشینی برای دستیابی به یک پراکنه پایدار باشد. اولتراسانتریفیوژ کردن برای یک نمونه با غلظت یونی بالا، ممکن است کمک کند.

در هر نقطه از ارزشیابی، بازیابی عنصری کلی را می‌توان انجام داد (پایه‌سازی عمل هضم در ترکیب با اندازه‌گیری‌های ICP-MS و ICP-OES). بازیابی باید آزموده شود.

مقادیر در بازه ۷۰٪ تا ۱۲۰٪ هستند. بازیابی مقادیر کمتر فقط زمانی می‌تواند پذیرفته شود که تکرارپذیری به‌خوبی تعریف شده و کافی باشد و نشان داده‌شود که بازیابی مستقل از اندازه ذره است. در صورت تردید، بازیابی با یک نمونه اسپایک یا محیط‌های شاهد (به‌طور مثال آب) می‌تواند برای ارزشیابی روش مفید باشد.

پروتکل باید همه پارامترهای روش‌های اجرای مورد استفاده و عوامل را توضیح دهد. علاوه بر آن، در این استاندارد گزارش کیفیت فرایند آماده‌سازی الزامی است. بنابراین، بازیابی ذرات مورد نظر (به‌وسیله مقایسه غلظت‌های یک شناسانه مناسب در نمونه استخراج‌شده و در نمونه اولیه به‌وسیله ICP-MS یا ICP-OES) باید در پروتکل کمی‌سازی شود.

پراکنش و پایدارسازی نانوذرات پس از هضم/ جداسازی به‌وسیله تنظیم یک مقدار خاص pH و/یا افزودن عوامل پراکنش و عمل‌آوری فراصوت، با توزیع اندازه ذره و پتانسیل زتای محتمل به‌عنوان خواص نهایی محصول استخراج باید گزارش شود [4]. علاوه بر آن پس از تخریب ماتریس، پراکنش و پایدارسازی (ذرات) برای گام صافش یا سانتریفیوژ کردن مورد نیاز است و ممکن است به‌عنوان بخشی از توصیف این فرایند میانی آماده‌سازی نمونه گزارش شود.

۲-۴-۶ اندازه‌گیری توزیع اندازه اولیه و اندازه‌گیری غلظت جرمی همه نانواشیاء مجزا

بسته به نمونه آزمون تحت بررسی، ممکن است راهبرد آماده‌سازی نمونه خیلی پیچیده باشد. بنابراین در توسعه روش، معیار کیفیت هر گام آماده‌سازی نمونه باید ارزشیابی شود.

همانگونه که در جدول ۱ نشان داده شده‌است، این ارزشیابی می‌تواند به‌عنوان بازیابی، تکرارپذیری، تجدیدپذیری، LOD، تحمل‌پذیری و پایداری (محصولات استخراج/ تعلیقه‌ها) انجام شود.

1- Recovery evaluation
2- Property assessment

جدول ۱- توضیح پارامترهای مورد استفاده در ارزشیابی یک گام آماده سازی نمونه

پارامتر	توصیف
بازیابی (عدد/جرم)	مقادیر در بازه ۷۰٪ تا ۱۲۰٪ هستند. بازیابی (مقادیر) کمتر فقط زمانی می تواند پذیرفته شود که تکرارپذیری به خوبی تعریف شده و کافی باشد و نشان داده شود که بازیابی مستقل از اندازه ذره است.
تکرارپذیری (جرم)	توصیه می شود که معادله هورویتز برای تعیین یک مقدار حدی استفاده شود. $RSD_r = C^{-0.15} \quad (1)$ که در آن C غلظت جرمی الف است که به صورت کسر اعشاری اعتبارسنجی شده است [6] [7].
تجدیدپذیری (جرم)	توصیه می شود که معادله هورویتز برای تعیین یک مقدار حدی استفاده شود: $RSD_R = 2C^{-0.15} \quad (2)$ که در آن C غلظت جرمی الف است به صورت کسر اعشاری اعتبارسنجی شده است.
حد آشکارسازی (تعداد)	برای spICP-MS، حد آشکارسازی، بر پایه تعداد پیک ها در آماده سازی نمونه شاهد است. $LOD_c = 3.29 \times (N)^{0.5} + 2.72 \quad (3)$ که در آن N تعداد پیک ها در آماده سازی نمونه شاهد است.
تحمل پذیری (انواع مختلف ماتریس های مرتبط)	ضروری است حداقل سه نوع مختلف ماتریس درج شود (به طور مثال، خاک شامل شن، کاه گل، رس)
پایداری محصولات استخراج نمونه با توجه به توزیع اندازه و غلظت نانوشیء	پس از آماده سازی نمونه، محصولات استخراجی / تعلیق ها به مدت یک تا چهارده روز برای تعیین پایداری ذخیره شوند
الف- هنگامی که اندازه ذره و ترکیب بندی شناخته شده باشد، غلظت های عددی ممکن است به غلظت های جرمی و برعکس تبدیل شوند. 1- Horwitz 2- Robustness	

گام های آماده سازی نمونه ممکن است توزیع اندازه را تغییر دهد، همانگونه که به عنوان مثال فرایند هضم اسید ممکن است بسیار تهاجمی باشد؛ تغییر در حالت کلوخگی یا انبوهش به وسیله سونیک کردن^۱ و

1 - Sonication

همچنین اثر پیرسازی^۱ نانواشیاء در ماتریس (واکنش‌های اکسایش- کاهش) ممکن است اتفاق بیفتد. همچنین توصیه می‌شود ارزشیابی شود که آیا نگهداری نمونه ممکن است بر توزیع اندازه ذره و همچنین غلظت یونی (که ممکن است در موارد خاص با گذشت زمان افزایش یابد) تأثیر بگذارد [5].

غربالگری اولیه می‌تواند بازتاب‌کننده عملکرد تحلیلی همه گام‌های آماده‌سازی نمونه شامل اطلاعات مطلوب به‌طور مثال شناسایی ماده و بازه اندازه (ذرات) باشد. غلظت‌های ذره به حذف ماتریس مرتبط است و این اندازه‌گیری اولیه ممکن است غلظت‌های ذره را ارزشیابی کند.

توصیه می‌شود تحلیلگر، معیارهای کیفی را ارزشیابی و پی‌درپی بررسی کند که آیا ذرات با خصوصیات ماده موردنظر (ترکیب‌بندی عنصری، ریخت‌شناسی) تطبیق می‌کند، توزیع اندازه ذره چیست، مقدار ذرات چقدر است. ضروری است دستور زیر رعایت شود: در ابتدا شناسایی ماده و به دنبال آن اندازه‌گیری اندازه و داده کمی. تعداد ذرات (تعداد ذرات نماینده برای نمونه باشند) که با EM اندازه‌گیری شده‌است، باید طبق استاندارد ISO 14488 ارزشیابی شود.

رقیق‌سازی پیاپی ده‌برابری، ممکن است به ارزشیابی خطی‌بودن رقیق‌سازی، اتلاف نانواشیاء ناشی از برجذب دیوارهای ویال شیشه‌ای کمک کند. همچنین ممکن است این عمل کمک کند به اینکه آیا استخراج نقطه ابری، غنی‌سازی نمونه یا سانتریفیوژ کردن برای رسیدن به بازه عملکرد دستگاه، موردنیاز است یا خیر.

اگر خواص تعلیقه، بازه‌های غلظت و اندازه مجاز برای انتخاب روش مناسب را برآورده کند، سپس به زیربند ۵-۶ مراجعه کنید، درغیراین‌صورت زیربند ۴-۶-۱ را دوباره انجام دهید و معیار کیفیت از پیش انتخاب‌شده را دوباره بررسی کنید.

جدول الف- ۱ در پیوست الف، شرحی از بازه غلظت و اندازه وابسته به ماده را برای روش‌های انتخابی ارائه می‌کند.

۵-۶ اندازه‌گیری نانواشیاء موردنظر و ارزشیابی

نمونه با ابزار انتخابی اندازه‌گیری می‌شود و توزیع اندازه ذره حاصل در برابر معیارهای خاص ابزار ارزیابی می‌شود.

انتخاب ابزار یا آماده‌سازی نمونه بسته به عوامل مربوط به معیارهای کیفی برآورده نشده، باید بهینه شود. معیارهای کیفیت مربوط به اندازه‌گیری نمونه و تضمین کیفیت برای هر روش اندازه‌گیری با جزئیات در بند ۷ توضیح داده می‌شود.

اگر این معیارها برآورده شود، ابتدا تغییرات دستگاه با تکرار اندازه‌گیری روی نمونه مشابه تعیین شود. سپس، همه مراحل آماده‌سازی نمونه دوباره تکرار شده و تاکید شود که دو آزمون تکراری باید کاملاً مستقل از یکدیگر باشند، یعنی آماده‌سازی نمونه برای هر آزمایش تکراری باید به‌صورت جداگانه انجام شود.

1 - Aging

برای کنترل کیفی کل روش اجرای اندازه‌گیری، سه تکرار آزمون شامل آماده‌سازی نمونه با استفاده از تطبیق با ماده مرجع گواهی‌شده (CRM) یا ماده مرجع گواهی‌نشده (RM) انجام شود. لازم است این CRM ها یا RM ها، در حالت ایده‌آل، موازی با نمونه‌های آزمون روش اجرا آنالیز شوند.

آماده‌سازی نمونه (به زیر بند ۶-۴-۱ مراجعه شود)، اندازه‌گیری توزیع اندازه اولیه و اندازه‌گیری غلظت جرمی همه نانواشیاء مجزا (به زیر بند ۶-۴-۲ مراجعه شود) یا اندازه‌گیری نانواشیاء موردنظر (به زیر بند ۶-۵ مراجعه شود)، بسته به معیارهای کیفی برآورده نشده، لازم است که دوباره انجام شود.

۷ روش‌های اندازه‌گیری انتخابی برای آشکارسازی و شناسایی نانواشیاء

۱-۷ روش جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان (FFF)

۱-۱-۷ کلیات

روش جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان، یک خانواده از روش‌های جداسازی بر پایه جریان است که قادر است به صورت فیزیکی درشت‌مولکول‌ها و ذرات را جدا کند درشت‌مولکول‌ها «ذرات» نامیده می‌شوند، مگر این که مشخص نشده باشد. اعضای خانواده FFF مطابق نیروی میدان خارجی به کار برده شده برای دستیابی به جداسازی ذره طبقه‌بندی شده‌اند. در اینجا، فقط روی روش جزء‌جزء کردن جریان بر پایه میدان (F₄)، تمرکز شده است که در حال حاضر موفق‌ترین روش معرفی شده است. همچنین، فقط حالت براونی جزء‌جزء کردن که برای نانوذرات به کار می‌رود، مورد توجه قرار خواهد گرفت. تدوین استانداردسازی گسترده‌تر روش FFF، از جمله سانتریفیوژ را می‌توان در استاندارد ISO/TS 21362 یافت.

همچون ستون جداسازی در روش کروماتوگرافی، FFF فقط یک افزاره برای جداسازی ذرات از یکدیگر است، آنالیز ذره، به طور مثال، اندازه ذره، توزیع اندازه ذره یا تفکیک ویژه ذرات ناشی از ترکیب‌بندی شیمیایی آن‌ها فقط با سامانه‌های آشکارسازی همراه با جداسازی به وسیله FFF به دست می‌آید. بنابراین، نتایج به دست آمده به وسیله FFF به صورت بحرانی وابسته به آشکارسازهای جفت‌شده با سامانه FFF و توانایی آن‌ها است تا پارامتر(های) مطلوب به صورت کمی گزارش شود. نمونه باید یک پراکنه پایدار در حلال‌های آبی یا آلی باشد و قطر هیدرودینامیکی بیشینه ذرات در نمونه از ۱ μm افزونتر نباشد. بازه پویا (نسبت بین بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین قطر هیدرودینامیک ذره که می‌تواند به صورت کمی در F₄ جداسازی شود) در اغلب حالات کوچک‌تر از ۲۰ است. بازه اندازه بزرگ پوشش داده شده به وسیله سازگار کردن شرایط جداسازی نیاز به تلاش مضاعف دارد تا اطمینان حاصل شود که روش کماکان اندازه‌های صحیح ذره را برای همه بخش‌های نمونه تولید می‌کند.

۲-۱-۷ نظریه و اصل جزء‌جزء کردن - اصل جزء‌جزء کردن

روش F₄ به صورت مشابه به عنوان سامانه‌های جداسازی کروماتوگرافی مایع (LC) ارائه شده است که در آن مجرای جداسازی F₄ جایگزین ستون کروماتوگرافی شده است و یک مدول کنترل جریان اضافی، عملیات F₄ را با کنترل جریان‌های شارش برای گام‌های مختلف آنالیز: تزریق، متمرکزسازی و جداسازی اداره می‌کند.

بخش کوچکی از نمونه (در بازه میکرولیتر پراکنه پایدار، حاوی ذرات با مقادیر نانوگرم تا میکروگرم) به مجرای F_4 تزریق می‌شود و در میان مجرا به‌وسیله شارش حامل (در بازه میلی‌متر بر دقیقه) حمل (ترابرد) می‌شود. در F_4 ، ذرات به‌وسیله ماند مربوط به اندازه ذره، در مجرای باز فیلم مانند F_4 و بر خلاف روش LC جدا می‌شوند و هیچ فاز ساکنی اعمال نمی‌شود. جریان حامل اولیه (قابل مقایسه با محلول حامل در LC) در میان مجرای باریک، پروفایل جریان سهموی را با بیشترین سرعت جریان در مرکز مجرا و کمترین سرعت‌ها (به‌صورت نظری صفر) در دیوار انباشت می‌سازد. ماند ذرات مربوط به جریان حامل به دلیل خود نفوذی ذرات و برهم‌کنش آن‌ها با میدان خارجی است که در F_4 یک جریان متقاطع است و عمود بر حرکت ذرات در میان مجرا عمل می‌کند و ناشی از جریان حامل اولیه است (به شکل ۲ مراجعه شود). در مجرا، جریان متقاطع، ذرات را به سمت دیوار توده حرکت می‌دهد. دیوار توده یک غشاء فراصافش^۱ با قطع وزن مولکولی (MWCO)^۲ بین 300 g mol^{-1} و 100 g mol^{-1} است. غشای MWCO به‌گونه‌ای انتخاب می‌شود که کوچک‌ترین ذره موردنظر را در مجرا نگه دارد درحالی‌که سیال شارش متقاطع می‌تواند از غشاء بگذرد. در حالت تعادل، نفوذ به عقب ذرات از دیوار انباشت، در مقابل جریان متقاطع عبورکننده از غشاء، منجر به ابرهای نفوذی یازش‌ها^۳ می‌شود که به‌طور مستقیم به ضریب نفوذ ذرات مرتبط است. در پروفایل شارش سهموی حامل، ارتفاع‌های ابر میانگین کوچک‌تر از ذرات بزرگ منجر به حمل آهسته‌تر نسبت به ذرات نفوذی بزرگ‌تر می‌شود. این ذرات بزرگ‌تر ابرهای بالاتری را می‌سازد. پارامتری که در F_4 تعیین می‌شود، ماند یک ذره در مجرا در مقایسه با ماده غیرتأخیری است. تأخیر می‌تواند به ضریب نفوذ ذره مربوط باشد. برای گره جامد همگن، ماند در مجرا همچنان می‌تواند مربوط به شعاع هیدرودینامیکی آن گره از نظر معادله استوکس- انیشتین باشد. دقت عملیات F_4 و نظریه ماند با جزئیات، به‌طور مثال، در هاسلوف^۴ [6]، نظریه و کاربرد FFF با جزئیات در استاندارد ISO/TS 21362 ارائه شده‌است. شکل ۲ طرحواره یک چیدمان F_4 را نشان می‌دهد که می‌تواند با طراحی هر مجرای F_4 جریان همچون جزء جزء کردن جریان بر پایه میدان- جریان نامتقارن^۵ یا جزء جزء کردن جریان بر پایه میدان- جریان لیف توخالی (hF_5) تبادل شود.

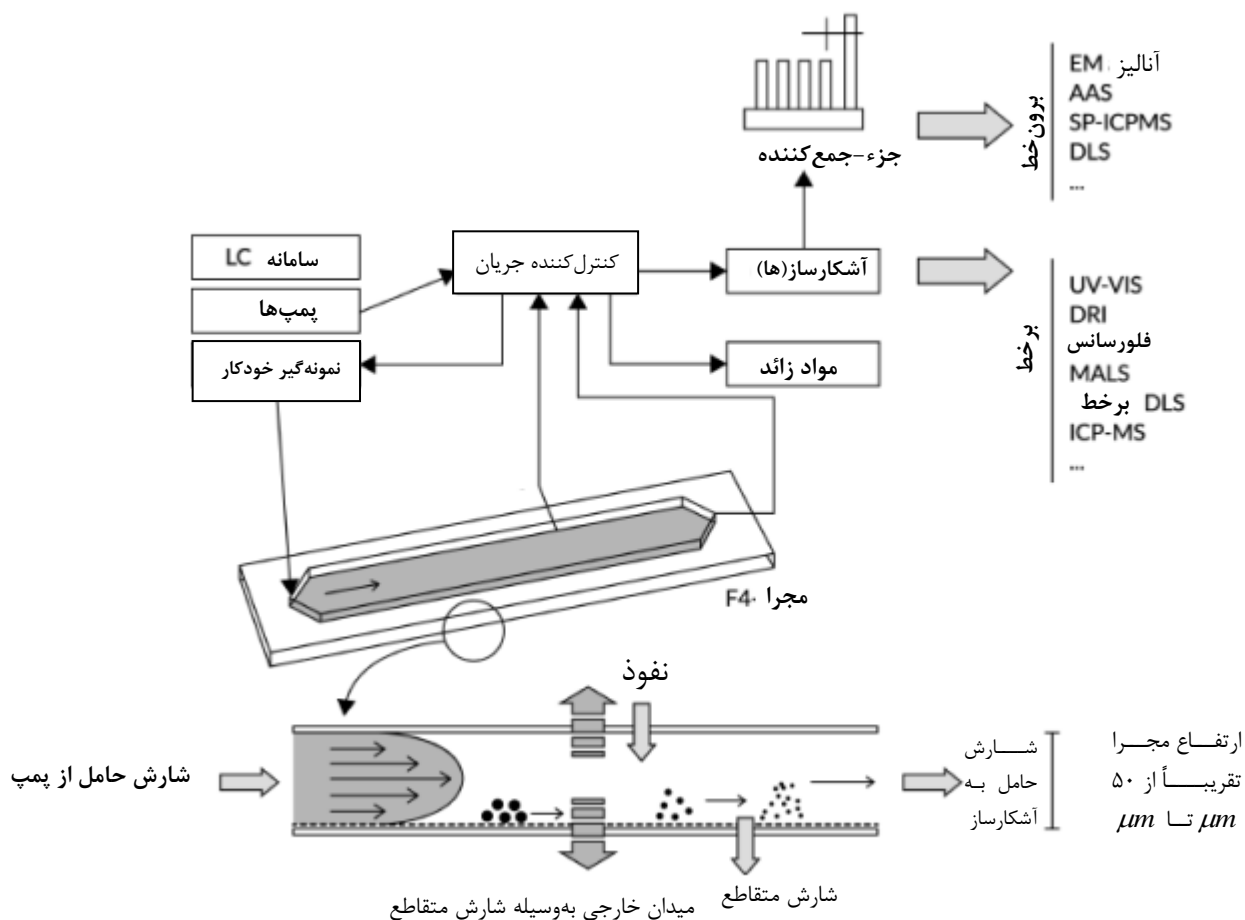
1 - Ultrafiltration

2 - Molecular Weight Cut-Off (MWCO)

3 - Extension

4 - Hasselov

5 - Asymmetric Flow- Field Flow Fractionation (aF₄)



شکل ۲- چیدمان و اصل جداسازی F4

۳-۱-۷ اصل آشکارسازی

پس از جداسازی مطابق ضریب نفوذ/ قطر هیدرودینامیکی به وسیله ماند در مجرای F4، ذرات شستشونده باید کمی سازی شوند تا توزیع اندازه ذره به دست آید. روش کمی سازی به طور اساسی نوع و شیوه وزن دهی توزیع اندازه حاصل را تعیین می کند (چگالی عددی ذره، چگالی جرمی ذره و ترکیب بندی عنصری روی اندازه). برای به دست آوردن توزیع های اندازه کمی، ضروری است که بازیابی ذره کل تعیین شده و بالا باشد (بزرگ تر از ۹۰٪) و رابطه کمی بین سیگنال اندازه گیری شده و ذرات شستشونده (بتواند) ایجاد شود. این رابطه باید مستقل از خواص ذرات مختلف بوده و حداقل مستقل از اندازه ذره باشد. این پیش نیازها در بسیاری از حالات برآورده نمی شوند.

الف- در میزان جذب UV-Vis، سیگنال حاصل از ذرات که فقط نور را در طول موج گزیده پراکنده می کنند، نه تنها تابعی از غلظت جرمی ذره هستند، بلکه وابسته به اندازه ذره و ضریب شکست ماده نیز هستند. مدرن ترین LC ها بر پایه آشکارسازهای UV-Vis بهینه شده اند تا اثر نور سرگردان را کاهش دهند، که

در این حالت نور سرگردان، سیگنال استفاده شده برای آشکارسازی است. اثر این سنجش‌ها آن است که ذراتی که فقط نور را پراکنده می‌کنند، با نسبت بسیار پایین سیگنال به جرم آشکار می‌شوند [10].

ب- با استفاده از طیف‌سنجی جذب UV-Vis برای آشکارسازی ذرات جاذب نور در نمونه‌های همگن، رابطه سیگنال به جرم ذره (کالیبراسیون جرمی) اغلب می‌تواند روی نمونه کامل، جزء جزء نشده، انجام شود. چون نمونه ممکن است حاوی انواع گوناگون ذرات با اندازه‌ها و جذب ویژه مختلف باشند، این مقدار می‌تواند برای ذراتی که باید کمی‌سازی شوند، بی‌فایده باشند. کالیبراسیون‌های جرمی به‌دست‌آمده از کل نمونه، اغلب برای مؤلفه‌های جداسازی شده نمونه منفرد صحیح نیست.

پ- در آشکارسازی پراکندگی نور پویا (DLS) یا ایستا (MALS)، هنگامی که شدت نور پراکنده شده برای آشکارسازی استفاده می‌شود، اثر اندازه ذره و ضریب شکست روی رابطه سیگنال به جرم ذره حتی قوی‌تر از جذب UV-Vis فقط برای ذرات پراکنده کننده نور است [10]. هرچند نظریه پراکندگی نور می‌تواند برای محاسبه غلظت‌های جرمی ذرات شستشوشده استفاده شود، اگر ذرات الزامات نظریه به‌کاربرده شده را برآورده کنند و خصوصیات اپتیکی آن‌ها شناخته شده باشد. این مورد به‌ندرت حالتی برای نمونه‌های ناهمگن است. اصولاً سیگنال حاصل از آشکارسازی پراکندگی نور باید قادر به تولید یک شدت وزن‌دهی شده توزیع اندازه ذره بوده و قابل مقایسه با آشکارسازی پراکندگی نور پویا نمونه‌های جزء جزء نشده باشد. این مورد تاکنون برای نمونه‌های ناهمگن تدوین نشده است.

ت- آشکارسازی ویژه عنصری همانگونه که به‌وسیله پلاسمای جفت شده القائی - طیف‌سنجی جرمی (ICP-MS)، پلاسمای القائی - طیف‌سنجی نشر نوری (ICP-OES)، طیف‌سنجی جذب اتمی (AAS) در جزء‌های جمع‌آوری شده به‌دست می‌آید، ذرات نمونه باید فقط شامل عنصر آشکارسازی شده باشد یا استوکیومتری باید معلوم و ثابت بر حسب اندازه باشد [8] [9]، تا توزیع اندازه ذره کمی را فراهم کند. هرچند جرم ذره کل را اغلب نمی‌توان با این روش‌ها به دست آورد. این روش‌ها برای برخی از عناصر اصلی که کسر مرتبط با بسیاری از ذرات را تشکیل می‌دهند و با این ابزارها قابل دستیابی نیستند، همانند کربن، اکسیژن، هیدروژن و نیتروژن، کاربرد ندارد.

کاربرد سامانه‌های آشکارسازی مناسب و ترکیب آن‌ها می‌تواند تفکیک انواع ذره مختلف را فراهم کند، اگرچه آن‌ها توزیع اندازه ذره کمی صحیحی به‌دست نمی‌دهند.

برای تعیین کمی جزء اندازه کوچک، غشاء مورد استفاده به‌عنوان دیوار انباشت باید قطع اندازه‌ای (MWCO) داشته باشد که کمتر از ۵۰٪ اندازه کوچک‌ترین ذره/ مولکولی بوده و به‌وسیله F₄ آنالیز می‌شود.

۴-۱-۷ عملکرد

درستی توزیع اندازه اندازه‌گیری شده، به ترکیبی از فرایند جداسازی و اندازه‌دهی صحیح در F_4 و کمی‌سازی صحیح ذرات در آشکارسازهای پیرو بستگی دارد. اگر فقط رفتار ذرات در مجرا ایده‌آل باشد، زمان / حجم ماند می‌تواند به صورت صحیح به ضریب نفوذ یا قطر هیدرودینامیکی از منظر نظریه FFF یا کالیبراسیون خارجی مرتبط شود. تداخل‌های جزئی از شکل ذره، دافعه الکترواستاتیکی (ایستابرقی) یا استریکی (ریختاری) از غشاء، اثرات غلظت ذره و ذرات با شکل و اندازه بزرگ، نتیجه جزء‌جزء کردن را بی‌معنا می‌سازد. بدون اندازه‌گیری ذره مستقل (همانگونه که به وسیله آشکارسازهای پراکندگی نور برخط یا بررسی‌های EM در جزء‌های نمونه‌برداری شده به دست می‌آید)، آنالیز F_4 یک نمونه ناشناخته، می‌تواند بسیار نادرست باشد. بنابراین ضروری است که سنجش‌های کنترل کیفیت که اندازه‌گیری صحیح و کمی‌سازی صحیح را اثبات می‌کند، در توسعه روش برای یک نمونه ناشناخته، استفاده شود.

این سنجش‌ها به شرح زیر هستند:

الف - تعیین بازیابی از آشکارسازهای مختلف (UV-Vis)، شدت در زاویه پراکندگی 90° و برابر با یا کمتر از 25° (ICP-MS). دلیل استفاده از زوایای پراکندگی مختلف آن است که بر بخش‌های مختلف اندازه ذره نمونه تأکید دارند: زاویه پراکندگی 90° می‌تواند به عنوان نمایش «کلی» ذرات در نمونه و زاویه پراکندگی $<25^\circ$ حساس‌تر به ذرات بزرگ‌تر دیده شود. بازیابی کمتر روی 25° نسبت به 90° اتلاف ذرات بزرگ‌تر را آشکار می‌کند.

ب- همانگونه که برپایه نظریه FFF انتظار می‌رود، اثبات می‌شود که نظریه جزء‌جزء کردن با تغییر شرایط جاری واکنش نشان می‌دهد.

پ- اندازه مستقل به وسیله پراکندگی نور چندزاویه‌ای (MALS) یا DLS برخط یا برون خط (در اجزای جمع‌آوری شده) آنالیز شود. ساخت پراکندگی نور بر پایه اندازه ذره برحسب قطر هیدرودینامیکی رسم می‌شود. برای شکل ذره و نمونه، I_g/I_h ، در بازه‌های عددی متفاوت می‌تواند معنی‌دار باشد. توصیه می‌شود برای ذرات تقریباً کروی و انبوهه‌های فشرده، بین 0.775 و 1 و برای ذرات تقریباً کروی و انبوهه‌های فشرده، یا بین 1 و 1.5 برای ذرات کشیده مانند صفحات، میله‌ها یا انبوهه‌های نامنظم در نظر گرفته شود.

ت- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)، ذرات شستشوشده در اجزاء حجم‌های ماند زیاد، متوسط و کم را آنالیز می‌کند.

نکات (الف) و (ب)، الزام کمینه است، از نکات باقی‌مانده (ت) و (ث) حداقل یکی باید انجام شود.

آنالیز سه‌گانه استاندارد اندازه ذره تک‌پراکنده^۱ با توجه به حالت^۱ توزیع باید در بازه $\pm 3\%$ انجام شود.

حساسیت و همچنین حدود آشکارسازی (DL) یا حدود کمی‌سازی (LOQ) فقط می‌تواند برای سامانه‌های منفرد یا نمونه‌های معین داده‌شود. این پارامترها با پهنای توزیع، جرم تزریقی مجاز بیشینه، شرایط جداسازی و سامانه‌های آشکارسازی به‌کار برده‌شده، تغییر می‌کنند. در متون علمی معمول نیست که حدود کمی‌سازی (LOQ) یا (DL) گزارش شود. معمولاً بار مجرا تقریباً $10 \mu\text{g}$ از ذرات است، بدون غلظت روی-مجرا یا پیش-مجرا^۲، LOQ در آشکارسازی ICP-MS حدود مقادیر $1 \mu\text{g L}^{-1}$ است. تکرارپذیری از نظر حالت توزیع اندازه ذره و مساحت پیک معمولاً $\pm 5\%$ است. این دقت با روش بهینه از بازیابی‌های خوب و پس از تعادل مناسب غشاء با محلول حامل و چندین (دفعه) تزریق نمونه به‌دست می‌آید.

انتخابی بودن برای ذرات موردنظر روی مولفه‌های ماتریس وابسته به استفاده و ترکیب مناسب سامانه‌های آشکارسازی و سازگار با مشخصه‌های ذرات موردنظر و ماتریس نمونه است. استفاده از آشکارساز طیف‌سنج (UV-Vis، فلورسانس، ICP-MS)، انتخابی‌بودن برای مشخصه‌های خاص یک نمونه (جذب تشدیدی پلاسمون برای ذرات فلزی، ترکیب‌بندی عنصری و غیره) را مقدور می‌سازد.

اگر یک برنامه‌سازی میدان استفاده شود، واپاشی خطی نرخ جریان متقاطع بر حسب زمان باید ارجح باشد. از توابع واپاشی با شیب تند ($< -0.05 \text{ mL/min}^2$) باید اجتناب شود و نرخ جریان متقاطع در بخشی از برنامه میدان که از آن، توزیع‌های اندازه ذره استخراج می‌شود، هرگز نباید به صفر کاهش یابد.

۷-۱-۵ آماده‌سازی نمونه

نمونه واردشده به F_4 باید حاوی ذرات در پراکنه پایدار باشد. فقط در حالتی که اجزای ماتریس نمی‌تواند به‌وسیله روش آشکارسازی از ذرات موردنظر متمایز شود (به‌طور مثال، اگر فقط شدت سیگنال آشکارساز MALLS مورد استفاده قرار می‌گیرد) یا اگر اجزای ماتریس با فرایند جزء‌جزء کردن تداخل کنند، آن‌ها تا جایی که ممکن است باید خارج شوند. ذرات (در راستای بلندترین محور) نباید اندازه‌ای بزرگ‌تر از $1 \mu\text{m}$ داشته باشند. ترکیب‌بندی حامل مورد استفاده در F_4 برای حمل ذرات میان مجرا باید با مشخصه‌های ذرات و غشای مورد استفاده به‌عنوان دیوار انباشت، سازگار باشد. چسبیدن ذرات به غشاء و سطوح سامانه باید به‌وسیله انتخاب حامل، کمینه نگه داشته شود. در زمان یکسان پیش شستشوی ذرات به‌وسیله دافعه استریکی یا ایستا برقی از غشاء، همچنین باید کنترل‌شده و به‌وسیله ترکیب‌بندی حامل کمینه شود. برای هر نوع از نمونه آزمون، فرایند جزء‌جزء‌کردن باید بهینه شده و تناسب آن برای هدف به‌وسیله داده‌های تحلیلی نشان داده شود. یک نمونه که برای تزریق مستقیم به F_4 مناسب نیست (ذرات خیلی بزرگ، ساختارهای انبوهیده یا اجزای ماتریس نامناسب برای F_4) نیاز به آماده‌سازی نمونه دارد. این روش باید به‌گونه‌ای اجزای تداخلی ماتریس ذرات با اندازه‌های بزرگ‌تر از اندازه (مطلوب) را خارج کنند و ذرات مطلوب در انبوهش را پایدار سازند. روش اجرا و تغییرات ممکن نمونه باید در گزارش آزمون مستندسازی شود.

1- Mode

2 - Pre-or on-channel

حذف ماتریس می‌تواند با رهیافت‌های متفاوتی به‌دست آید:

الف- استخراج ذرات از ماتریس به‌وسیله روش‌های سانتریفیوژ کردن، صافش، ستون یا استخراج نقطه ابر اگر مناسب باشد؛

ب- تخریب ماتریس به‌وسیله حاکای شیمیایی. اگر ذرات، نسبت به حمله شیمیایی مقاوم باشند (به‌طور مثال ذرات TiO_2 ، Au ، SiO_2)، ماتریس پایه آلی حاصل از عمل‌آوری پساب می‌تواند به‌وسیله $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ یا هضم زی‌مایه‌ای^۱ نابود شود

پیشاپیش باید سازگاری روش اجرا با خصوصیات ذرات موردنظر آزموده شود. باقی‌مانده‌های اجزای ماتریس اگر با فرایند جزء‌جزء کردن تداخل نکند و همچنین حالت انبوهش و خصوصیات ذرات را تغییر ندهند و سامانه آشکارسازی انتخابی در دسترس باشد، می‌تواند پذیرفته شوند.

۶-۱-۷ گزارش آنالیز و تفسیر نتایج

ماند نمونه در F_4 به ضریب نفوذ ذرات آنالیزشده بستگی دارد و می‌تواند به قطر هیدرودینامیکی تبدیل شود. داده‌های خام به‌دست‌آمده از F_4 زمان ماند، سیگنالی است که به‌وسیله یکی از آشکارسازها گزارش شده‌است. اگر مدت زمان ماند بتواند به قطر هیدرودینامیکی یک ذره از راه‌های زیرمرتبط شود:

الف- نظریه ماند FFF؛

ب- کالیبراسیون خارجی با استانداردهای اندازه ذره؛

پ- اندازه خارجی ذره گزارش‌شده به‌وسیله آشکارسازهای پراکندگی نور جفت‌شده با مجرای F_4 (DLS فقط قطر هیدرودینامیکی را گزارش خواهد داد، MALS هنگامی که مدل ذره کروی استفاده شده‌است، قطر هندسی را گزارش خواهد داد و هنگامی که سایر مدل‌ها به‌کاربرده شوند، ریشه میانگین مربعی شعاع یا شعاع چرخش^۲ را گزارش خواهد داد)؛

و اگر سیگنال آشکارساز بتواند به جرم یا غلظت عددی ذره مرتبط شود، یک توزیع اندازه ذره مرتبط می‌تواند ایجاد شود. این توزیع اندازه ذره در جایی است که هر نقطه داده^۳ (برش)^۴ گزارش‌شده از طریق آشکارساز، به‌وسیله زمان ماند یا حجمش به قطر ذره مرتبط است. این امر در بعضی موارد با نرم‌افزار تهیه‌شده توسط سازنده سامانه F_4 قابل‌دستیابی است. در بیشتر موارد و به سبب انواع مختلف آشکارسازها و سیگنال‌ها که می‌توانند استفاده شوند، پردازش داده‌ها در نرم‌افزار صفحه گسترده^۵ انجام می‌شود. این عمل پس از بازیابی

1 - Enzymatic digestion
2- Gyration
3- Datapoint
4 - Slice
5- Spread software

داده‌های خام یا کالیبره‌شده از نرم‌افزار کنترل آشکارساز مربوطه، صورت می‌گیرد. ضروری است که داده‌های خام فراهم‌شده به‌وسیله آشکارسازها، عاری از تأثیر پس‌زمینه باشند و برای مشخصه‌یابی ذره که می‌تواند در ایجاد یک توزیع اندازه مورد استفاده قرار گیرد، کالیبره شوند.

آنالیز F₄ یک تک‌پراکنه یا مخلوطی از چندین جمعیت ذره تک‌پراکنه، به‌صورت ایده‌آل توزیع‌های تک‌مودال^۱ (یک نوع ذره) تا چند مودال از پیک‌های توزیع‌شده گوسی به‌خوبی تفکیک‌شده را تولید می‌کند. درمقابل، آنالیز نمونه‌های چندپراکنه می‌تواند فراکتوگرام‌ها^۲ و توزیع‌های اندازه مرتبط با هندسه‌های مختلف را تولید کند. برای مورد اول در بالا و در صورتی که پیک‌ها به‌خوبی تفکیک شده باشند، میانگین (های) اندازه ذره می‌تواند از حالت‌های توزیع به‌دست آید. پهنای یک پیک نه تنها به‌وسیله تغییر در اندازه ذره در نمونه، بلکه به‌وسیله اثرات پهن‌شدگی باند^۳ حین آنالیز، تحت تأثیر قرار می‌گیرد، از این‌رو، توزیع واقعی (اندازه ذره) پیرامون میزان اندازه متوسط معمولاً در دسترس نیست. برای مورد دوم در بالا، تولید میانگین اندازه ذره می‌تواند از طریق آنالیز پیک به‌دست آید (برای مثال از یک نمونه توزیع‌شده به‌صورت لگاریتم طبیعی)، یا حتی می‌تواند بی‌معنی باشد، هنگامی که یک فراکتوگرام پهن بدون پیک‌های برجسته حاصل شود.

نیازمندی‌های گزارش‌دهی در استاندارد ISO / TS 21362 به تفصیل شرح داده شده‌است.

۷-۲ روش میکروسکوپی الکترونی (EM)

۷-۲-۱ کلیات

رهیافت پیشنهادی مستلزم این است که ماتریس پیچیده حاوی نانواشیاء به‌گونه‌ای عمل‌آوری شود که پراکنش از نانواشیاء موردنظر به‌دست آید. این تغییرات نمونه باید در گزارش آزمون نهایی مستند شود. آزمون‌های مناسب برای آنالیز EM به‌وسیله در تماس قراردادن این پراکنه با حامل نمونه (توری TEM)، آماده می‌شوند. بخشی از نانواشیاء که به‌صورت بهینه نانواشیاء موجود در ماتریس را نشان می‌دهد و اجازه آشکارسازی مجزای نانواشیاء را می‌دهد، می‌تواند روی توری‌ها نشانده شود. بر اساس معیارهای ویژه‌ای از قبیل اندازه، شکل، ساختار بلورشناختی و ترکیب‌بندی عنصری، نانواشیاء مجزای مطلوب در میکروسکوپ الکترونی شناسایی و قابل‌رویت می‌شوند. آنالیز تصویر اجازه آشکارسازی تصاویر^۴ دوبعدی نانواشیاء و اندازه‌گیری اندازه‌ده‌های چندگانه را برای هر ذره مجزا می‌دهد. نانواشیاء با توزیع‌های مبتنی بر تعداد آن‌ها و آمار توصیفی مربوط به اندازه‌ده‌های انتخابی، مشخصه‌یابی می‌شوند. به‌دلیل تفکیک‌پذیری فضایی بالای آن در دو بعد، آنالیز EM بازه ۱ nm تا ۱۰۰۰ nm را پوشش می‌دهد. تا حدودی، ذرات سازنده می‌توانند در

1- Modal
2- Fractogram
3- Band
4- Projections

نانواشیاء انبوهه‌ها و کلوخه‌های شناسایی شوند. رهنمود در مورد تعیین و گزارش‌دهی شکل و توزیع‌های اندازه ذرات) بر پایه تصاویر SEM و TEM از هر دو (گروه) ذرات نانومقیاس و ذرات بزرگتر از نانومقیاس در استانداردهای ISO / DIS 19749 و ISO 21363 ارائه شده‌است.

۲-۲-۷ اصول اندازه‌گیری میکروسکوپی الکترونی

۱-۲-۲-۷ کلیات

روش‌های مختلف EM قابل‌استفاده است. روش TEM معمول، الکترون‌های عبوری از یک (نمونه) روشن‌سازی شده (به‌وسیله باریکه الکترونی) موازی را آشکارسازی می‌کند. در SEM و STEM، یک باریکه الکترونی متمرکز، روی نمونه روبش می‌شود و سیگنال‌های ویژه‌ای (پراکندگی کشسان ناهمدوس الکترون‌های پراکنده‌شده رو به جلو در STEM و الکترون‌های ثانویه و الکترون‌های برگشتی در SEM) ثبت می‌شوند.

آنالیز تصویر و داده‌های تصاویر SEM و TEM یکسان هستند. توصیه می‌شود بین تصاویر TEM (روشنایی موازی)، SEM (روبش یک باریکه متمرکز و آشکارسازی الکترون‌های ثانویه (SE) یا الکترون‌های برگشتی (BSE)) و STEM (روبش یک باریکه متمرکز و آشکارسازی الکترون‌های عبوری) تفاوت گذاشته شود.

۲-۲-۲-۷ میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)

علاوه بر تصویربرداری میدان روشن (BF)^۱ معمول، TEM شامل روش‌های مختلف آشکارسازی از جمله TEM با تفکیک‌پذیری بالا و پراش الکترونی است. روش‌های پیشرفته اخیر فقط می‌توانند به‌طور موثر برای شناسایی نانواشیاء بلوری موردنظر، به‌کار روند.

آنالیز تصاویر BF-TEM اجازه آشکارسازی تمامی نانواشیاء قابل‌رویت مجزا را می‌دهد. تصویربرداری میدان روشن معمول نسبت به حالات تصویربرداری پیشرفته‌تر دارای این مزیت است که به‌طورگسترده‌ای در دسترس است و می‌تواند به روش نیمه خودکار اعمال شود. در حالت تصویربرداری میدان روشن، بخشی از باریکه الکترونی عبوری به‌طور معمول در یک دوربین CCD ثبت می‌شود. تباین تصویر ناشی از جذب و پراکندگی الکترون‌ها در نمونه به‌دلیل ضخامت و ترکیب‌بندی ماده (یعنی تباین جرم- ضخامت) و ناشی از جهت‌گیری بلور (یعنی تباین پراش) است.

ذرات موجود در نمونه‌های تولیدشده از نانواشیاء در پراکنه، به‌اندازه کافی نازک هستند تا یک باریکه الکترونی را عبور دهند به نحوی که یک سیگنال از الکترون‌های عبوری بتواند ثبت شود.

1 - Bright field (BF)

با ترکیب تصویربرداری TEM میدان روشن با آنالیز تصویر، اعداد بر پایه توزیع‌های اندازه و خواص شکل نانواشیاء تصویربرداری شده را می‌توان برای مقادیر زیادی از نانواشیاء به‌دست آورد. اگرچه می‌توان خواص سه بعدی ذرات را با استفاده از روش توموگرافی الکترونی در حال توسعه تخمین زد، این روش اجرا نیاز به گام‌های آماده‌سازی نمونه، تصویربرداری، روش بازسازی، بخش‌بندی تصویر و آنالیز دارد که در حال حاضر، اندازه‌گیری دقیق مقادیر زیادی از ذرات، به‌دلیل زمانبر بودن و کار زیاد^۱ محدود می‌شود.

۷-۲-۳ میکروسکوپی الکترونی روبشی شامل میکروسکوپی الکترونی عبوری روبشی

در میکروسکوپ الکترونی روبشی؛ یک پروب (کاوند) الکترونی متمرکز باریک روی آزمون را روبش می‌کند. برهم‌کنش پروب الکترونی با آزمون (پراکندگی ناکشسان و کشسان) منجر به مجموعه‌ای از سیگنال‌ها می‌شود که می‌توانند با آشکارسازهای مربوطه ثبت شوند. آشکارسازها برای الکترون‌های ثانویه، برگشتی و عبوری در دسترس هستند. علاوه‌براین، اطلاعات عنصری در مورد نمونه را می‌توان یا با آنالیز انرژی پرتوهای ایکس (آنالیز پرتو ایکس بر اساس توزیع انرژی، EDX) و یا با انرژی الکترون‌های عبوری (طیف‌سنجی اتلاف انرژی الکترون (EELS)) به‌دست آورد. الکترون‌های SE، الکترون‌هایی هستند که به‌وسیله باریکه الکترونی اولیه (ورودی) از پوسته‌های خارجی یک اتم به بیرون رانده می‌شوند. الکترون‌های کم انرژی (با انرژی کمتر از ۵۰ eV) هستند و از سطحی بسیار نزدیک به سطح خارجی آزمون نشأت می‌گیرند. بنابراین از SE برای تصویرسازی توپوگرافی آزمون استفاده می‌شود.

الکترون‌های BSE الکترون‌های اولیه‌ای هستند که به‌دلیل مجموعه‌ای از فرایندهای پراکندگی کشسان (و ناکشسان) از آزمون بازپس‌زده^۲ می‌شوند. انرژی BSE از SE بالاتر است و می‌تواند به اندازه انرژی الکترون‌های اولیه باشد. بازده (تصویربرداری با) BSE به شدت وابسته به عدد اتمی آزمون است و بنابراین می‌توان از BSE برای تصویرسازی یک تباین عنصری^۳ استفاده کرد.

یک جایگزین برای تصویربرداری معمول با استفاده از الکترون‌های ثانویه، استفاده از یک آشکارساز عبوری است که الکترون‌های نفوذکننده به نمونه را آشکارسازی می‌کند. الکترون‌های عبوری، الکترون‌های اولیه‌ای هستند که از میان نمونه عبور می‌کنند. بسته به میزان پراکندگی، الکترون‌های عبوری به‌وسیله یک آشکارساز BF (پراکنده‌نشده و پراکنده‌شده در زوایای بسیار کوچک)، یک آشکارساز میدان تاریک حلقوی (پراکنده‌شده در زوایای متوسط) یا یک آشکارساز میدان تاریک حلقوی زاویه بالا (HAADF)، پراکنده‌شده در زوایای بسیار بالا) آشکارسازی می‌شوند. برای بزرگنمایی‌های اعمال‌شده برای اندازه‌گیری خواص اندازه و شکل نانو مواد، سیگنال ثبت‌شده به‌وسیله آشکارساز BF، یک تباین جرم- ضخامت را نشان می‌دهد، سیگنال

1- Time and labor-intensive limiting
2 - Ejected back
3 - Elemental contrast

میدان تاریک حلقوی نه تنها به وزن اتمی وابسته است بلکه شامل پراش براگ نیز می‌باشد و سیگنال HAADF به شدت وابسته به وزن اتمی (تقریباً متناسب با Z^2) است و شامل پراش براگ نمی‌شود. بنابراین، آشکارساز HAADF ترجیحاً برای آشکارسازی نانوآشیاء متشکل از عناصر سنگین استفاده می‌شود.

آنالیز EDX: فرایندهای پراکندگی ناکشسان باریکه الکترونی اولیه با آزمونه، منجر به تولید پرتوهای ایکس می‌شود. در بسترهای برم‌اشترالانگ^۱ پیوسته، هنگامی که یک الکترون از پوسته درونی یک اتم به بیرون رانده می‌شود و یک الکترون از پوسته بیرونی به جای خالی در پوسته درونی فرو می‌افتد، پرتوهای ایکس مشخصه ایجاد می‌شوند. اختلاف انرژی بین این دو تراز انرژی ویژه هر عنصر است و به صورت پرتو ایکس نشر می‌شود. بنابراین، ترکیب عنصری نانوآشیاء تکی می‌تواند با اندازه‌گیری انرژی پرتوهای ایکس نشرشده تشخیص داده شود.

آنالیز EELS: فرایندهای پراکندگی ناکشسان منجر به اتلاف انرژی الکترون‌های اولیه می‌شوند. الکترون‌های پراکنده رو به جلو مقدار انرژی مشخصی را از دست داده‌اند اما فقط در زوایای بسیار کوچکی پراکنده شده‌اند و بنابراین تقریباً در محور نوری باقی می‌مانند. میزان انرژی اتلافی در اثر پراکندگی ناکشسان به عناصر آزمونه بستگی دارد و با به دست آوردن تفاضل انرژی اندازه‌گیری شده الکترون‌های عبوری از نمونه (با استفاده از یک طیف‌سنج اتلاف انرژی الکترونی) و انرژی اولیه الکترون می‌تواند تعیین شود. بنابراین، ترکیب عنصری نانوآشیاء را می‌توان با استفاده از EELS به دست آورد.

۳-۲-۷ عملکرد میکروسکوپی الکترونی

مقادیر شاخص عدم قطعیت‌های اندازه‌گیری آنالیزهای TEM مواد مرجع به وسیله یک رهیافت بالا-به-پایین در مراجع [13] و [14] گزارش شده‌است. این مواد مرجع تقریباً تک‌پراکنه و تقریباً کروی تخمین زده شده‌اند. نتایج زیر به عدم قطعیت‌های مرتبط با آماده‌سازی آزمونه، تصویربرداری و آنالیزهای تصویر EM اشاره دارد و عدم قطعیت‌های مرتبط با نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه‌ای را که کاملاً وابسته به ماده و ماتریس هستند، شامل نمی‌شود. یک عدم قطعیت ترکیبی (سطح اطمینان ۶۸٪) از مرتبه ۳٪، برای اندازه‌گیری‌های TEM اندازه‌ده‌های تک بعدی، مانند قطر، گزارش شده‌است. بیشترین سهم در عدم قطعیت داده‌های قطر دایره‌ای معادل (ECD)، از ارزیابی صحت روش ناشی می‌شود. این عدم قطعیت بزرگتر از عدم قطعیت درون-آزمایشگاهی است که با ترکیب تکرارپذیری، دقت متوسط و عدم قطعیت کالیبراسیون محاسبه می‌شود. تکرارپذیری بزرگترین عامل عدم قطعیت در عدم قطعیت ترکیبی درون-آزمایشگاهی بود. عدم قطعیت کالیبراسیون به روش کالیبراسیون به کاربرده شده در بازه‌ای از ۰٫۱٪ تا ۱٪ بستگی دارد. برای

اندازه‌گیری‌های اندازه ذرات اولیه نانواشیاء برخال‌مانند^۱، عدم قطعیت‌های درون- آزمایشگاهی‌ای (سطح اطمینان ۶۸٪) از مرتبه ۵٪ گزارش شده‌اند.

برای آشکارسازی و اندازه‌گیری انتخابی نانواشیاء موردنظر، شناسانه‌های منحصر به فردی همانند شکل و ترکیب عنصری لازم است.

برای اطمینان از اینکه روش پیشنهادی، ذاتاً با تغییر کارور (اپراتور) TEM تغییر نمی‌کند، خودکارسازی انتخاب ذره و جنبه‌های آنالیز تصویر نیاز است.

بازه کاری مفید EM به‌وسیله حدود پایین‌تر و بالاتر کمی‌سازی اندازه تعریف شده‌است. حد پایین‌تر کمی‌سازی اندازه بر اساس معیار مرکوس^۲ [15] محاسبه می‌شود. او نشان داد اگر مساحت سطح ذره حداقل از صد پیکسل تشکیل شده‌باشد، که متناظر با یک قطر دایره تقریباً ۱۱ پیکسلی است، از انحراف‌های سامانمند بزرگ (< ۱۰٪) در اندازه‌گیری‌های اندازه می‌توان اجتناب کرد. برای ذرات غیرکروی مانند میله‌ها و الیاف، یک بعد خارجی کمینه ۱۰ پیکسلی پیشنهاد شده‌است. براساس این معیار می‌توان با درنظر گرفتن اندازه پیکسل دوربین CCD، بزرگنمایی کمینه را محاسبه کرد.

براساس کوچکترین و بزرگترین اندازه ذره تخمین‌زده شده در یک آنالیز کیفی از آزمونه، می‌توان ارزیابی کرد که آیا حدود تفکیک‌پذیری پیکربندی میکروسکوپ/ دوربین اجازه اندازه‌گیری دقیق اندازه را می‌دهد یا خیر.

حد بالاتر کمی‌سازی اندازه به‌وسیله میدان دید محدود شده‌است و همان‌طور که در استاندارد ISO 13322-1 پیشنهاد شده‌است، در یک‌دهم اندازه تصویر تنظیم می‌شود. بازه کمی‌سازی اندازه مفید می‌تواند از حدود بالاتر و پایین‌تر کمی‌سازی اندازه محاسبه شود.

رابطه بین تعداد ذرات اندازه‌گیری‌شده و عدم قطعیت اندازه‌گیری برای هر اندازه‌ده مرتب (و در حالت ماده چندگانه^۳، برای هر زیرجمعیت) را می‌توان به‌عنوان مثال از طریق یک مطالعه اعتبارسنجی تعیین کرد. تعداد ذرات موردنیاز برای تخمین اندازه‌ده ویژه با عدم قطعیت معین را می‌توان از این رابطه تخمین زد [13]. این رابطه در شکل ت-۱ نشان داده شده‌است. در صورتی که اندازه‌ده توزیع (زیر) جمعیت موردنظر در مقیاس لگاریتمی، متقارن باشد، متناوباً تعداد ذراتی که اندازه‌گیری می‌شوند را می‌توان با پیروی از روش پیشنهادی ماسودا^۴ و گوتو^۵ [16] در استاندارد ISO 13322-1 محاسبه کرد.

1- Fractal-like
 2- Merkus
 3- Multimodal material
 4- Masuda
 5- Gotoh

آنالیز موادی که نسبت به باریکه الکترون و شرایط خلاء بالا حساس هستند، چالش برانگیز است و به تجهیزات پیشرفته‌ای نیاز دارد که برای این نوع از آنالیزها به سختی در دسترس است.

اندازه‌گیری ابعاد خارجی کمینه نانوصفحه‌ها در آنالیز EM، با توجه به جهت‌یافتگی ترجیحی آنها روی حامل نمونه، سوگیری شده‌است.

۴-۲-۷ آماده‌سازی نمونه میکروسکوپی الکترونی

رهیافت پیشنهادی مستلزم این است که ماتریس پیچیده شامل نانواشیاء به‌گونه‌ای عمل‌آوری شود که پراکنه حاوی نانواشیاء موردنظر با غلظت به‌اندازه کافی بالا به‌دست آید. استفاده از توری‌های TEM برای همه انواع آنالیزهای EM (TEM، STEM و SEM) توصیه می‌شود.

آزمونه‌های مناسب برای آنالیز EM، با در معرض تماس قراردادن این پراکنه با حامل نمونه (توری TEM) آماده می‌شوند. بخشی از نانواشیاء از طریق انواع مختلف برهمکنش‌ها (ایستابرقی، غیرقطبی، واندروالس، ...) به توری (TEM) متصل می‌شوند. بخشی از نانواشیاء به‌صورت بهینه، نشان‌دهنده نانواشیاء موردنظر در ماتریس هستند و اجازه آشکارسازی نانواشیاء را به‌صورت جداگانه می‌دهند. این نانواشیاء به‌وسیله تطبیق دادن غلظت نانواشیاء و نوع و بار توری TEM روی آن‌ها نهشته می‌شوند (رسوب می‌کنند).

برهمکنش نانوماده با یک توری TEM به‌شدت به‌وسیله بار توری تعیین می‌شود. به‌طور کلی، توری‌های پوشش‌دار کربنی تازه آماده‌شده، آب‌گریز هستند یا بار منفی بسیار کمی دارند. بسته به زمان آماده‌سازی و انبارش توری، این بارها تمایل به ترک سطح آب‌گریز و ناپدیدشدن دارند. برای ذرات بدون بار و محیط‌های آب‌گریز، توری‌های عمل‌آوری‌نشده توصیه می‌شود. برای ذرات باردار در محیط‌های قطبی، توری‌های آب‌دوست مورد نیاز است. آب‌دوستی توری‌های TEM با پیش‌عمل‌آوری آن‌ها با (رنگ) آلکیان^۱ آبی می‌تواند افزایش یابد. بار مثبت حاصل به‌شدت اتصال نانوماده با بار منفی را افزایش می‌دهد [17]. در عوض، بارهای منفی را می‌توان با تخلیه درخشی^۲ (به توری TEM) وارد کرد که به‌شدت اتصال نانوماده با بار مثبت را افزایش می‌دهد. در حالت ناشناخته بودن بار نانوماده، ارزشیابی رهیافت‌های متفاوت عاقلانه است.

بازیابی نانوذرات از پراکنه، به‌طور کلی با شناورکردن توری روی یک قطره پراکنه (توری روی قطره) [18]، [19] یا با قرار دادن یک قطره پراکنه روی توری (قطره روی توری) [20]، [21]، [22] انجام می‌شود.

1- Alcian
2- Glow

اولتراسانتریفیوژ کردن مستقیم روی توری یک روش اضافی برای نهشت (رسوب) نانواشیاء در توری‌های TEM است. اولتراسانتریفیوژ کردن اجازه بازیابی کمی نانوذرات از محیط مایع را می‌دهد [23]. مزیت روش این است که نانوذرات به صورت فعال غلیظ شده و به طور کمی روی توری TEM سانتریفیوژ می‌شوند.

غلظت نانواشیاء باید طوری تنظیم شود که تعداد ذرات در هر میکروگراف (ریزننگار)^۱ برای آنالیز بعدی بهینه باشد. ذرات نباید با یکدیگر در تماس بوده یا با هم، همپوشانی داشته باشند. غلظت‌های بهینه، همانطور که در پیوست پ نشان داده شده است، از نمونه‌ای به نمونه دیگر تغییر می‌کند. غلظت‌های بالا را با در نظر گرفتن سازگاری رقیق‌کننده با بارهای ذره، می‌توان به راحتی با رقیق‌سازی کاهش داد. برای افزایش انتخابی غلظت نانواشیاء در پراکنه، روش‌های آماده‌سازی نمونه باید تنظیم شود.

برای نمونه‌های چندپراکنه، روش توری روی قطره ممکن است منجر به پیوند ترجیحی بخشی از ذرات کوچک‌تر شود، در حالی که روش قطره روی توری ممکن است منجر به یک پیوند ترجیحی بخشی از ذرات بزرگ‌تر شود. در چنین مواردی، به منظور اجتناب از سوگیری، اولتراسانتریفیوژ کردن روی توری توصیه می‌شود.

برای جلوگیری از ایجاد رسوبات نمکی از مایعات در حال خشک شدن، باید مایع روی توری TEM خارج شده و توری‌های TEM در آب شسته شوند.

مراحل اضافی شستشو، سیگنال پس‌زمینه توری را با خروج نمک‌های اضافی و مواد آلاینده کاهش می‌دهد. شستشوی گسترده ممکن است منجر به اتلاف انتخابی ذرات بزرگ‌تر از توری شود که توصیه می‌شود از آن اجتناب شود.

در اصل، میکروسکوپی الکترونی کرایو^۲ [24]، می‌تواند جهت آماده‌سازی نمونه‌ها و اندازه‌گیری نانوذرات در محیط آبی استفاده شود. این روش به خلوص و غلظت بسیار بالای ذرات پراکنه نیاز دارد که به ندرت می‌توان هنگام آشکارسازی و شناسایی نانوذرات در یک ماتریس پیچیده به آن دست یافت.

۷-۲-۵ تفسیر نتایج میکروسکوپی الکترونی

نانواشیاء مورد نظر روی میکروگراف‌های EM براساس مقدار (رنگ) خاکستری آنها به طور نیمه خودکار شناسایی و اندازه‌گیری می‌شوند. اندازه‌دهی چندگانه به طور همزمان برای هر تک‌ذره اندازه‌گیری می‌شوند. توضیحات با جزئیات بیشتر در مورد اندازه‌دهی در استاندارد CEN / TS 17010: 2016، بند ۶ ارائه شده است.

1- Micrograph

2- Cryo-TEM

مثال‌هایی از مجموعه‌های پارامترها در کتاب‌نامه ارائه شده‌است [22]. آنالیز همبستگی متقابل (چلیپایی)^۱ می‌تواند برای رده‌بندی اندازه‌دهایی با همبستگی بالا استفاده شود. ارائه حداقل یک اندازه‌دهی از هر رده به صورت کارآمد اطلاعات را نمایش می‌دهد. برای هر پارامتر می‌توان آمار توصیفی با جزئیات بیشتر ارائه داد. برای اندازه‌دهایی که به طور عادی توزیع شده‌اند، پارامترهای پارامتری^۲ مانند میانگین، انحراف استاندارد و خطای استاندارد از مقدار میانگین مناسب هستند، درحالی‌که برای اندازه‌دهای به طور غیرعادی توزیع شده، پارامترهای غیرپارامتری از قبیل میانه^۳ و تخمین‌های صدک ۲۵ و ۷۵ مناسب هستند. علاوه بر این، می‌توان با برآزش منحنی، توزیع بر پایه عدد هر اندازه‌دهی را تعیین و به صورت کمی توصیف کرد. دسترسی به اندازه‌دهی چندگانه امکان انتخاب یک اندازه‌دهی بر حسب تابعی از یک هدف ویژه را فراهم می‌کند. تخمین قطر دایره‌ای معادل^۴ (محاسبه شده از مساحت سطح تصویرسازی شده در EM)، برای مثال برای ارتباط نتایج EM با نتایج روش‌هایی با فرض ریخت‌شناسی ذره کروی‌وار (مانند سانتیفریوژ کردن دیسکی و پراکندگی نور پویا) مفید است. تخمین اندازه‌دهایی از قبیل کمینه فرت^۵ و قطر دایره محاطی بیشینه، وابسته به ارزیابی ابعاد خارجی کمینه یک ذره در مفاد تعریف نانوماده است.

خواص ذره با آنالیز تصویر تعیین می‌شود. استاندارد ISO 13322-1 یک توصیف استاندارد شده از روش مورد استفاده برای آنالیز ذرات، از جمله نانواشیاء، در تصاویر ایستا، شامل تصاویر میکروسکوپ الکترونی را ارائه می‌دهد.

استاندارد ISO 21363، فناوری نانو- اندازه‌گیری‌های توزیع‌های اندازه و شکل ذره به وسیله میکروسکوپی الکترونی عبوری، شامل مراحل پروتکل بسیار خودکار برای تصویربرداری، گرفتن ذره، ارزیابی‌های کیفیت داده، گردش‌های کار، مقایسه داده توزیع با مدل‌های مرجع؛ ارزیابی‌های عدم قطعیت اندازه‌گیری و ابزارهای دیداری‌سازی داده می‌باشد. براساس یافته‌های مطالعات مقایسه میان آزمایشگاهی^۶ روی عمل‌آوری ذرات تماسی، کمینه مساحت ذره برای دقت توصیف‌کننده، کمینه تعداد ذرات برای آنالیز و تصویربرداری خودکار و آنالیز قالب گنجانده شده‌است.

آنالیز تصویر به طور معمول شامل مراحل زیر است:

- آماده‌سازی تصویر: برای بهسازی جداسازی ذرات مورد نظر از پس‌زمینه، روشنایی ناهمگن تصویر اصلاح می‌شود، نوفه تصاویر کاهش می‌یابد و تباین تصویر با استفاده از فیلترهای تصویری مناسب بهینه می‌شود.

-
- 1 - Cross correlation
 - 2 - Parametric parameters
 - 3 - Median
 - 4 - Equivalent circle diameter (ECD)
 - 5- Feret Min
 - 6 - Interlab

- تنظیم و میزان‌سازی مقدار آستانه: ذرات با بهینه‌سازی مقدار قطع جامع، به‌وسیله آستانه‌گذاری موضعی یا فیلترهای آشکارسازی لبه، از پس‌زمینه جدا می‌شوند.
- تعیین سطح آشکارسازی: همانطور که در استاندارد ISO 13322-1 شرح داده شده‌است، با تنظیم فریم اندازه‌گیری، از آشکارسازی ترجیحی ذرات اجتناب می‌شود.
- تنظیم پارامترهای آشکارسازی و آشکارسازی نانوآشیاء: بر اساس دانش قبلی، ذرات در آنالیز گنجانده و یا از آن خارج می‌شوند.
- انتخاب اندازه‌دهها و اندازه‌گیری نانوآشیاء: مطابق با استاندارد ISO 9276-6، اندازه‌دههای شکل و ریخت‌شناسی بر حسب تابعی از هدف آنالیز انتخاب می‌شوند.
داده‌ها برای پردازش آماری بیشتر ثبت می‌شوند:
- نتایج آنالیز اندازه ذره مطابق با استانداردهای ISO 9276-2 و ISO 9276-5 نشان داده می‌شود.
- شکل و ریخت‌شناسی ذره توصیف شده و از نظر کمی مطابق با استاندارد ISO 9276-6 ارائه می‌شود.
- یک منحنی تجربی براساس داده‌های یک مدل مرجع همانند استاندارد ISO 9276-2 تنظیم می‌شود.
- ذرات مطابق با استاندارد ISO 9276-4 رده‌بندی می‌شوند.

۷-۳ پلاسمای جفت‌شده القایی تک ذره - طیف‌سنجی جرمی (spICP-MS)

۷-۳-۱ اساس سنجش

در پلاسمای جفت‌شده القایی تک ذره - طیف‌سنجی جرمی (spICP-MS)، نانوذرات با برچسب‌های عنصری قابل‌مشاهده برای ICP-MS در یک تعلیقه نمونه وارد ICP-MS شده، یک پَرشار^۱ از یون‌های عنصر در مشعل پلاسما تولید می‌کنند. این پَرشار به‌عنوان یک پالس سیگنال در طیف‌سنج جرمی آشکارسازی می‌شود و در نانوذراتی که به‌صورت جداگانه آشکارسازی شده‌اند، امکان تعیین غلظت ذره در تعلیقه را همانند جرم عنصر می‌دهد. براساس جرم ذره، ترکیب‌بندی، چگالی و شکل ذره مفروض، می‌توان اندازه ذره را تخمین زد. تفکیک‌پذیری زمانی کافی (به‌طور معمول در بازه ۱۰۰ μs تا ۱۰ ms) و غلظت ذره لازم است تا اطمینان حاصل شود که هر پالس سیگنال فقط از یک ذره سرچشمه می‌گیرد و این روش به نام ICP-MS «تک ذره» نامیده می‌شود. در نتیجه، نمونه‌ها برای دستیابی به یک غلظت عددی ذره به اندازه کافی کم، باید عموماً رقیق شوند تا اطمینان حاصل شود که از احتمال آشکارسازی دو یا چند ذره به‌طور همزمان، می‌توان

1- Plume

صرف نظر کرد. از آنجا که رقیق‌سازی نمونه ممکن است منجر به رقیق‌سازی ماتریس نیز شود، تداخل‌های ماتریس کمینه می‌شود. این روش، جایگزین سریع و آسان برای اغلب روش‌های پیچیده‌تر آماده‌سازی نمونه است [25]. هرچند، هنگام رقیق کردن نمونه‌ها در چیزی غیر از ماتریس اصلی، توصیه می‌شود که دقت شود تا از تغییرات در خصوصیات ذره از جمله لیگاندهای سطحی اجتناب شود. مفهوم بهره‌برداری از ICP-MS برای آنالیز تک ذره و تعلیقه‌های کلئیدی برای اولین بار توسط مک‌کارتی^۱ و دگولدر^۲ [26] منتشر شد و برای مجموعه‌ای از ذرات در تعلیقه‌های آبی مورد آزمایش قرار گرفت. اخیراً، spICP-MS به‌عنوان ابزاری برای تعیین نانوذرات [27] و کاربردهای مختلفی توصیف شده‌است: طلا در نمونه‌های زیست-تحلیلی [28]، [29]، سرب در ذرات هوابرد [30]، نقره محلول و ذره‌ریز [31]، [32]، [33]. اخیراً، روش‌های آنالیز کاملاً معتبر با استفاده از spICP-MS منتشر شده‌است [34]، مناسب بودن این روش در آزمون‌های میان آزمایشگاهی^۳ آزموده شده‌است [35]، [36]، نرم‌افزار پردازش داده‌ها در دسترس قرار گرفته‌است [37] و استاندارد ISO 19590 در مورد این روش منتشر شده‌است

استفاده از زمان‌های انتظار کوتاه‌تر ($50 \mu s$) اخیراً توسعه یافته‌است که امکان آشکارسازی دقیق‌تر و یکپارچگی سیگنال نانوذره را فراهم می‌آورد. در نتیجه می‌توان اندازه‌های ذره کوچک‌تر (کوچک‌تر از 10 nm) را تعیین کرد و آشکارسازی چند عنصری امکان‌پذیر می‌شود [38]، [39]. آشکارسازی چندگانه صحیح با استفاده از یک ICP ترکیب‌شده با یک طیف‌سنج جرمی زمان پرواز (ICP-TOFMS) در حالت تک ذره امکان‌پذیر است. در حالی که اخیراً چنین دستگاهی توسعه یافته‌است، حساسیت کمتر آن در مقایسه با یک دستگاه چهارقطبی، برآورد اندازه ذره را به 50 nm محدود می‌کند.

۷-۳-۲ عملکرد

LOD_{SIZE} کوچکترین نانوذره قابل آشکارسازی با استفاده از spICP-MS، با حساسیت سامانه ICP-MS و امکان تمایز سیگنال‌های ذره از نوفه پس‌زمینه تعیین می‌شود. برای نانوآشیا Au و Ag ، با استفاده از یک چهارقطبی استاندارد ICP-MS، کوچک‌ترین اندازه ذره قابل اندازه‌گیری معمولاً از 15 nm تا 20 nm است [41]. ذرات اندازه‌شده کوچک‌تر ممکن است با استفاده از طیف‌سنج‌های جرمی با هندسه‌ای که امکان بازده‌های عبور بالاتر را می‌دهد، اندازه‌گیری شود. به‌عنوان مثال، با استفاده از یک ICP-MS میدان قطاعی^۴ می‌توان نانوآشیا طلا به کوچکی 10 nm را آشکارسازی کرد. برای نانوذرات TiO_2 و SiO_2 با نوفه پس‌زمینه بالا در ICP-MS، **LOD_{SIZE}** به ترتیب 50 nm و 200 nm است، اگرچه توسعه‌های فنی اخیر مانند ICP-MS چهار قطبی سه‌گانه، امکان آشکارسازی اندازه‌های کوچک‌تر این ذرات را فراهم می‌کند. با استفاده از یک

1 - McCarthy
2 - Degueldre
3 - Intra-Labatory
4 - Sector field

ICP-MS دارای طیف‌سنج جرمی با تفکیک‌پذیری بالا، LOD_{SIZE} برای TiO_2 می‌تواند تا 20 nm کاهش یابد.

با تعویض لوله مشعل پلاسمائی کوارتز با نوع سرامیکی و با استفاده از یک واکنش یا محفظه برخورد^۱ با متان به‌عنوان گاز واکنشی، ذرات SiO_2 کوچک‌تر از 100 nm اندازه‌گیری شده‌است [38]. اخیراً روشی برای تخمین LOD_{SIZE} توصیف شده و برای نانوذرات متشکل از 40 عنصر مختلف به‌کار رفته‌است [42].

LOD_{CONC} از آنجا که غلظت به تعداد پالس‌های سیگنال مشاهده‌شده ارتباط دارد، این حد آشکارسازی به تعداد پالس‌های سیگنال در زمان شاهد و زمان کلی داده‌گیری مرتبط است. در غیاب آلاینده‌های نانوذره و اثرات حافظه، حد آشکارسازی یک فرایند شمارش رایج همانند spICP-MS، سه پالس در طول کل زمان داده‌برداری است [43]. براساس تنظیمات تجربی و بازده مه‌پاشی 2% ، LOD_{CONC} در حدود 150 ذره در هر میلی‌لیتر است. هرچند، در عمل این به‌دلیل اثرات حافظه و سیگنال‌های پس‌زمینه واقعی نیست و LOD_{CONC} واقعی در حدود 500 ذره در هر میلی‌لیتر است. برای نانواشیاء Au و Ag 60 نانومتری این LOD_{CONC} معادل است با غلظت‌های جرمی 1 ng l^{-1} و 5 ng l^{-1} برای نانواشیاء TiO_2 150 نانومتری و SiO_2 500 نانومتری به ترتیب معادل با غلظت‌های جرمی 50 ng l^{-1} و 100 ng l^{-1} است.

بازه دینامیکی غلظت. بازه دینامیکی غلظت به‌وسیله تعریف تک ذره محدود می‌شود، به این معنا که در هر رویداد، نیاز به اجتناب از ذرات متعدد است. چون ذرات به‌طور مستقل از یکدیگر وارد می‌شوند، می‌توان از آمارهای پواسون^۲ برای تخمین احتمال ورود یک یا چند نانوذره به پلاسما در طی یک دوره زمانی انتظار و آشکارسازی به‌عنوان تک ذره استفاده کرد. در عمل، بازه غلظت دینامیکی در حدود یک عامل از 100 است و اگر تعداد رویدادهای چندین نانوذره‌ای قابل‌توجه باشد، با افزایش غلظت ذره انحراف از خطی‌بودن قابل مشاهده خواهد بود. لابورد^۳ و همکارانش احتمال وقوع چنین رویدادهایی را محاسبه کردند و انتخاب یک غلظت بحرانی عددی نانوذره، برای کمینه‌سازی وقوع رویدادهای چندنانوذره‌ای را بحث کردند [44].

بازه دینامیکی اندازه. جدا از بیشینه تعداد ذرات، از آنجا که تبخیر ذرات بزرگ هنگام پرواز در پلاسما ممکن است فقط جزئی باشد، دانستن آن‌که بیشینه اندازه ذره چقدر می‌تواند باشد، مهم است. دگالدره^۴ و همکاران این مسئله را با محاسبه زمان تبخیر ذرات UO_2 به‌عنوان تابعی از اندازه ذرات و زمان ماندگاری در

1- Collision cell
2- Poisson
3- Laborda
4- Degueldre

پلازما ارزشیابی کرده‌اند [45]. محاسبات آن‌ها نشان می‌دهد که بزرگ‌ترین اندازه ذره تقریباً ۲۰۰۰ nm خواهد بود که به وسیله سایر اندازه‌گیری‌ها تأیید شده‌است [46]، [47]. بنابراین به نظر می‌رسد که پذیرش یک بیشینه اندازه ذره ۱۰۰۰ nm قابل اطمینان است، اگرچه باید در نظر داشت که ذرات ریزاندازه^۱ ممکن است یک شدت سیگنال را خارج از بازه خطی آشکارساز، تولید کنند.

تکرارپذیری. تکرارپذیری به‌عنوان انحراف استاندارد نسبی در تحلیل تکرار چندین آزمون^۲ تعلیقه‌های آبی تعیین شده‌است. تکرارپذیری غلظت (و جرم) ذره برای نانواشیای طلا و نقره ۶۰ نانومتری در یک غلظت جرمی 50 ng l^{-1} از ۱۰٪ تا ۱۵٪ بود. به‌طور کلی انتظار می‌رود که تکرارپذیری غلظت (یا جرم) ذره کمتر از ۲۵٪ باشد. به‌طور کلی تکرارپذیری برای تعیین اندازه یعنی ارتفاع پالس‌های سیگنال کمتر از ۱۰٪ است. (این مقدار) همچنین به‌عنوان انحراف استاندارد نسبی در تحلیل تکرار چندین آزمون تعلیقه‌های آبی تعیین شده‌است.

صحت^۳. تعیین اندازه ذره در spICP-MS، به تعدادی از فرضیات متکی است. خاصیت اندازه‌گیری‌شده اصلی ذره، شدت سیگنال است که از آن جرم ذره با استفاده از منحنی‌های آماده استاندارد تهیه‌شده از استانداردهای یون، محاسبه می‌شود. براساس فرضیات استوکیومتری، چگالی و شکل، اندازه ذره محاسبه می‌شود. بنابراین صحت باید با استفاده از مواد مرجع گواهی‌شده مناسب، مواد مرجع یا استانداردهای درون آزمایشگاهی با اندازه‌های ذره به‌خوبی تعریف شده، تعیین شود. مثال‌هایی از مواد مرجع مبتنی بر نانوذره طلا که به‌طور گسترده برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته‌است، می‌توانند در متون علمی یافت شوند [48]. در یک آزمایشگاه مجرب بر اساس فُطرهای اسمی ذره، سوگیری کمتر از ۹۰٪ خواهد بود.

تحمل‌پذیری. نمونه‌ها اغلب باید تا حد زیادی رقیق شوند تا با بازه دینامیکی spICP-MS سازگار شوند و ماتریس نمونه نیز به‌تبع آن رقیق شده و در نتیجه تداخلات ماتریس بالقوه کاهش می‌یابد. هرچند، اجزا یا ترکیبات ماتریس اضافه‌شده برای پایداری تعلیقه، ممکن است هنوز هم با غلظت ذره تداخل داشته باشند، به‌ویژه هنگامی که ترکیبات شبه‌صابون منجر به یک بازده مه‌پاشی افزایش‌یافته می‌شوند. هنگامی که ترکیب رقیق‌کننده مشابه ماتریس نمونه باشد، ممکن است تداخلات کاهش نیابند.

۳-۳-۷ آماده‌سازی نمونه

اندازه‌گیری با spICP-MS مستلزم آن است که ماتریس پیچیده حاوی نانوذرات عمل‌آوری‌شده باشد، به‌گونه‌ای که تعلیقه‌ای شامل نانوذرات حاصل شود. علاوه‌براین، توصیه می‌شود غلظت عددی نانوذرات در

1 - Micro sized particles
2 - Replicate
3 - Trueness

بازه spICP-MS، به طور معمول از 10^4 particles ml⁻¹ تا 10^6 particles ml⁻¹، تنظیم شود. در صورت نیاز به پایداری ذره، تعلیقه‌های با غلظت‌های بالا را می‌توان با رقیق کردن در آب یا در محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS) (با غلظت) ۰٫۱ mM کاهش داد. تعلیقه‌های نانوذره که از قبل پایدار شده‌اند (به‌عنوان مثال استانداردهای نانوذره) به‌خوبی به‌وسیله رقیق‌کننده با ترکیب مشابه ماتریس رقیق می‌شوند. فقط اطلاعات محدودی راجع به روش‌های آماده‌سازی نمونه در متون علمی موجود است. به‌طور کلی، توصیه می‌شود آماده‌سازی نمونه، دستیابی به یک پراکنه رقیق‌شده پایدار را تضمین کند و از تغییر مشخصات ذره (یعنی شکل، اندازه و حالت انبوهش) اجتناب کند. برخی از رهنمودهای کلی در اینجا آورده شده‌است.

نمونه‌های آبی. به‌طور کلی، نمونه‌های آبی شامل نانوذرات، فقط به آماده‌سازی محدود نمونه نیاز دارند زیرا قبل از آنالیز ابزاری، رقیق‌سازی زیادی انجام می‌شود. معمولاً رقیق‌سازی ساده با آب خالص شده (به‌طور معمول آب با مقاومت (ویژه) $< 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ و نمک‌های محلول $> 5 \text{ ppb}$) کافی است. در موارد دیگر، نمونه برای چند دقیقه (به‌وسیله پروب) سونیک می‌شود درحالی‌که به‌منظور اجتناب از افزایش دمای تعلیقه ذره، لوله یا ظرف نمونه با آب-یخ خنک می‌شود. ممکن است این روش اجرا در فاضلاب و محیط‌های کشت آبی آزمون‌های سم‌شناسی استفاده شود. برای پایداری تعلیقه‌های نانوذرات، ممکن است شوینده‌هایی مانند SDS یا پروتئین‌هایی مانند آلبومین سرم گاوی (BSA) افزوده شود، اگرچه باید درک کرد که این ممکن است بر بازده مه‌پاشی ICP-MS تأثیر بگذارد.

نمونه‌های زیستی و غذایی. هضم زی‌مایه‌ای یک روش نرم برای پردازش چنین نمونه‌هایی است. جزئیات آماده‌سازی در جای دیگر گزارش می‌شود [49]. هضم زی‌مایه‌ای نمونه‌ها به بهترین نحو در دو مرحله انجام می‌شود. ابتدا بافر هضم در یک لوله به نمونه اضافه می‌شود، در حالی‌که لوله خنک می‌شود، بافر و نمونه مخلوط و سونیک می‌شوند. دوم، زی‌مایه اضافه شده و لوله برای مدت معینی در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد در گرم‌خانه^۱ نگهداری می‌شود. پس از خنک‌سازی به دمای اتاق، هضم با آب خالص رقیق می‌شود.

محصولات غیرغذایی. محصولات غیرغذایی مانند محصولات آرایشی ممکن است با آماده‌سازی تعلیقه‌های ذره از این محصولات آنالیز شوند. برای این منظور، مقدار کمی از محصول در یک حلال با قطبایی^۲ معتدل، به‌عنوان مثال اتانول، پراکنده می‌شود. به‌منظور پایداری تعلیقه ذره، این پراکنه اولیه در اتانول و درنهایت در آب خالص شده یا ۰٫۱ mM SDS، بیشتر رقیق می‌شود. توصیه می‌شود برای پیشگیری از تداخلات ماتریس، میزان اتانول محلول نهایی بیش از ۱٪ نباشد. اخیراً یک رهیافت مبتنی بر رقیق‌سازی مستقیم گرم

1 - Incubated

2 - Polarity

ضدآفتاب در ۱٪ Triton X-100 و رقیق‌سازی بیشتر نمونه در آب فراخالص [50] برای اندازه‌گذاری ذرات تیتانیا به وسیله spICP-MS گزارش شده است.

۴-۳-۷ تفسیر نتایج

به‌طور کلی نرم‌افزار ارزیابی داده هنوز موجود نیست. فقط اخیراً تأمین‌کنندگان ICP-MS شروع به ضمیمه کردن چنین نرم‌افزاری در سامانه‌های جدید ICP-MS نمودند. اطلاعات مربوط به محاسبه و ارزشیابی داده را می‌توان در منابع علمی [27]، [37]، [47] پیدا کرد و یک صفحه گسترده^۱ برای انجام محاسبات لازم را می‌توان از طریق اینترنت بارگیری کرد [51].

مراحل و محاسبات زیر برای تعیین اندازه ذره ذرات موجود در تعلیق آبی مورد نیاز است:

مرحله ۱: کالیبراسیون سامانه. بازده مه‌پاشی یا انتقال سامانه ICP-MS را با استفاده از یک نانوذره به‌خوبی مشخصه‌یابی شده، تعیین کنید. عامل پاسخ آشکارساز را برای آنالیت موردنظر با استفاده از مواد مرجع یونی گواهی شده برای کالیبراسیون تعیین کنید. بازده انتقال را به شرح زیر محاسبه کنید:

$$\eta_n = \frac{N_p}{c_n} \cdot \frac{1000}{V} \quad (۴)$$

که در آن:

η_n بازده انتقال است؛

N_p تعداد ذرات آشکارسازی شده در زمان روبش (min^{-1}) است؛

c_n غلظت عددی ذره (l^{-1}) است؛

V شار ورودی نمونه (ml min^{-1}) است.

مرحله ۲: غلظت عددی ذره. غلظت عددی ذره را از تعداد پیک‌های مشاهده شده در زمان روبش ثبت شده به وسیله ابزار ICP-MS تعیین کنید. غلظت عددی ذره را به صورت زیر محاسبه کنید:

$$c_n = \frac{N_p}{\eta_n} \cdot \frac{1000}{V} \quad (۵)$$

که در آن:

c_n غلظت عددی ذره (l^{-1}) است؛

N_p تعداد ذرات آشکارسازی شده در زمان روبش (min^{-1}) است؛

η_n بازده مه‌پاشی است؛

V شار ورودی نمونه (ml min^{-1}) است.

مرحله ۳: اندازه ذره. با فرض یک شکل کروی، اندازه ذره استفاده از جرم ذره تعیین می‌شود. اگر شکل ذره شناخته شده باشد، شکل واقعی می‌تواند در محاسبه در نظر گرفته شود. این موضوع منجر به (تعیین) دقیق‌تر اندازه ذره می‌شود. جرم ذره از ارتفاع یا مساحت پیک در زمان روبش ثبت شده به وسیله ابزار ICP-MS محاسبه می‌شود. جرم ذره به شکل زیر محاسبه می‌شود:

$$m_p = \frac{I_p t_d}{RF_{ion}} \cdot \frac{V \eta_n}{60} \cdot \frac{M_p}{M_a} \quad (۶)$$

که در آن:

m_p جرم ذره (ng) است؛

I_p شدت سیگنال ذره در نمونه (cps) است؛

RF_{ion} پاسخ ICP-MS برای استاندارد یون ($\text{cps } \mu\text{g}^{-1} \text{ l}^{-1}$) است؛

t_d زمان انتظار^۱ (s) است؛

V شار ورودی نمونه (ml min^{-1}) است؛

η_n بازده مه‌پاشی است؛

M_p جرم مولی ماده نانوذره است؛

M_a جرم مولی آنالیت اندازه‌گیری شده است.

با فرض یک شکل کروی، اندازه ذره به صورت زیر محاسبه می‌شود:

$$d_p = \sqrt[3]{\frac{6m_p}{\pi\rho_p}} \cdot 10^4 \quad (۷)$$

که در آن:

d_p قطر ذره در نمونه (nm) است؛

m_p جرم ذره (ng) است؛

ρ_p چگالی ذره (g ml^{-1}) است.

میانگین اندازه ذره و توزیع اندازه ذرات در تعلیق نمونه را می‌توان از نتایج ذرات، جداگانه محاسبه کرد.

۸ فهرست الزامات گزارش‌دهی برای آماده‌سازی نمونه، آشکارسازی و شناسایی نانوشیاء در

ماتریس‌های پیچیده

۱-۸ گزارش‌دهی عمومی

نتایج اندازه‌گیری و داده‌های عملکرد و کنترل کیفیت مرتبط، باید به‌طور کلی مطابق با استاندارد

EN ISO / IEC 17025: 2017 و به‌طور خاص به شرح زیر باشد:

الف- عنوان به‌طور مثال، گزارش آزمون؛

ب- نام و آدرس آزمایشگاه و مشتری؛

پ- شماره سریال یا شناسایی منحصر به فرد مشابه برای گزارش که لازم است در هر صفحه ظاهر شود؛

ت- جزئیات شناسایی مشتری برای نمونه‌ها و شناسانه‌های مورد استفاده در آزمایشگاه؛

ث- تاریخ تحویل اقلام و تاریخ آزمایش؛

ج- ارجاع به این استاندارد؛

چ- نام، سمت و امضای شخص مسئول و تاریخ گزارش؛

ح- بیان اینکه نتایج فقط در مورد اقلام آزموده شده استفاده شود؛

خ- شناسایی (معرفی) روش آنالیز مورد استفاده؛

د- توضیح اینکه کدام شناسانه فیزیکی یا شیمیایی برای نانوشیاء هدف انتخاب شده است؛

ذ- نتایج نهایی آزمون با واحدها و یک بیانیه عدم قطعیت اندازه‌گیری.

۲-۸ گزارش‌دهی آماده‌سازی نمونه، شرح داده‌شده در بند ۶

الف- تفاوت‌های فیزیکی یا شیمیایی بین ذرات هدف و ماتریس؛

ب- روش اجرایی که اجزا، عوامل و پارامترهای تداخلی ماتریس را حذف می‌کند؛

پ- تحمل‌پذیری (قابلیت اجرای روش اجرا برای انواع مختلف ماتریس‌های مرتبط)؛

ت- روش اجرایی که ذرات بیش از اندازه بزرگ را حذف می‌کند (صافش یا سانتریفیوژ کردن) و پارامترهای (آن)؛

ث- روش اجرای پراکنش، عوامل پراکننده و عمل‌آوری فراصوت (چگالی انرژی، به‌عنوان مثال بر حسب $J\ ml^{-1}$)؛

ج- روش اجرای پایدارسازی، برقراری یک مقدار pH خاص و/یا افزودن عوامل (به‌علاوه، پیش از این پراکنش و پایدارسازی برای صافش یا سانتریفیوژ کردن لازم هستند و باید به‌عنوان بخشی از این فرایند میانی آماده‌سازی نمونه گزارش شود).

چ- توزیع اندازه ذره، غلظت و پتانسیل زتای محتمل، به‌عنوان خواص نهایی محصول استخراجی؛

ح- ثبات توزیع اندازه نانوشیء و غلظت آن در نمونه پایدارشده؛

خ- بازیابی ذرات هدف (از طریق مقایسه غلظت یک شناسانه مناسب در محصول استخراجی و در نمونه اصلی، به‌عنوان مثال از طریق ICP-MS یا ICP-OES).

۳-۸ گزارش‌دهی اندازه‌گیری شرح‌داده‌شده در بند ۷

الف- اطلاعات مربوط به ماده اسپایک‌شده و یا مواد مرجع مورد استفاده؛

ب- حد آشکارسازی (تعداد/جرم)؛

نتایج ارزیابی اندازه‌گیری، با استفاده از تحلیل تکرار چند آزمایش یا آمار شمارش:

پ- تکرارپذیری (تعداد/جرم)؛

ت- تجدیدپذیری (تعداد/جرم).

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

بازه‌های نشانگر اندازه و غلظت روش‌های اندازه‌گیری انتخابی

جدول الف ۱- شرح کاربردهای روش‌های اندازه‌گیری، بر اساس نانوآشیاء انتخابی*

spICP-MS		TEM یا EDX ^ث		SEM		FFF		مواد
غلظت ^ب [mg l ⁻¹]	بازه اندازه [nm]	غلظت ^{سب} [mg l ⁻¹]	اندازه کمینه [nm]	غلظت الف [mg l ⁻¹]	اندازه کمینه [nm]	غلظت ^ت [mg l ⁻¹]	اندازه ^پ [nm]	
۰/۰۵-۵	۵۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۱ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	اکسید آلومینیوم
غیر کاربردی	غیر کاربردی	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۵ ^{ف۳} ، ۱ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	کربن سیاه
۰/۰۰۵-۰/۵	۲۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۱ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	اکسید سریم
۰/۰۰۵-۰/۵	۵۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۱ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	نانوذرات طلا
۰/۰۰۵-۵	۵۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۵ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	نانوذرات آهن
غیر کاربردی	غیر کاربردی	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۵ ^{ا۳} ، ۱۰ ^{ف۳}	۱-۱۰۰۰	پلی استایرن
۰/۰۰۵-۵	۱۰۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۱۰ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	دی‌اکسید سیلیکون گرم‌زا رسوب‌دهی شده کلوئیدی
۰/۰۰۵-۰/۵	۲۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۱ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	نانوذرات نقره
۰/۰۰۵-۵	۵۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۵ ^{ع۳}	۱-۱۰۰۰	دی‌اکسید تیتانیوم

۰/۰۵-۵	۵۰-۱۰۰۰	۱-۵۰۰	۱-۳	۱-۵۰۰	۵-۱۰	۵ ^۳	۱-۱۰۰۰	اکسید روی
<p>* براساس نظر متخصص برای تجهیزات موجود به‌طور گسترده.</p> <p>الف- غلظت نمونه به‌کار رفته در آزمایش‌ها. برای غلظت کمتر، غنی‌سازی توصیه می‌شود. برای مشخصه‌یابی دقیق، ۵ ذره تا ۱۰ ذره در هر میدان دید، هدف قرار گرفته‌اند. بازه غلظت وسیع پراکنه‌های کاری ناشی از وابستگی شدید به اندازه ذره است.</p> <p>ب- غلظت نمونه قبل از رقیق‌سازی نهایی.</p> <p>پ - بازه اندازه ذره با استفاده از قدرت‌های میدان مختلف. گستره‌ای از بازه دینامیکی (از کوچک‌ترین ذره جدا شده از پیک تهی‌جا تا بزرگ‌ترین ذره‌ای که هنوز از وارونگی استریکی تحت‌تأثیر قرار نگرفته‌است) معمولاً در حدود ۲۰ است (به‌طور مثال ۱۰ nm تا ۲۰۰ nm) و فقط با بهینه‌سازی دقیق روش، امکان گسترش است.</p> <p>ت- غلظت‌های بالاتر می‌تواند با رقیق‌سازی نمونه آنالیز شود، (مسئله) بحرانی بیشتر، جرم کل نمونه است و غلظت آن کم اهمیت‌تر است. محدودیت‌ها درباره غلظت‌های بالاتر از بیشینه بارگذاری مجرا ناشی می‌شود و به پارامترهای عملیاتی از قبیل چگالی شار- متقاطع (↓)، بار کمتر به همراه چگالی شار- متقاطع بالاتر، ارتفاع مجرا (↑)، زمان تمرکز (↓) و نرخ شار تمرکز (↓) به اضافه اندازه ذره (↑) و ضخامت لایه مضاعف (↓) بستگی دارد. به‌طور کلی هر چه مقدار پارامتر بزرگتر باشد، بیشینه بار کمتر (↓) یا بیشتر (↑) می‌شود. بیشینه بارگیری را که منجر به اضافه بار و پیش‌شویب شدید نشود، می‌توان از طریق مقایسه آنالیزها با بارگیری‌های مختلف یافت. یک تخمین خوب این است که اضافه بار مجرا تقریباً از حدود ۱۰ μg جرم تزریقی کلی (ذرات هدف و اجزای ماتریس) ظاهر می‌شود اما بسیار زیاد به سامانه وابسته است.</p> <p>کمینه غلظت‌ها به نمونه، سامانه و روش وابسته است و یک عدد کلی را نمی‌توان در نظر گرفت. مقادیر داده‌شده برای تجهیزات استاندارد در کار معمول با حجم نمونه ۱۰۰ μl و پهنای پیک حجم شویب ۲۰ ml تخمین زده می‌شود. همه سامانه‌های آشکارسازی پراکندگی نورپایه (UV-Vis, DLS, MALS) در حالت کدوری دارای حساسیت‌های وابسته به اندازه ذره، ضریب‌شکست و تجهیزات هستند. مقادیر داده‌شده برای ذرات ۱۰۰ nm تخمین زده می‌شود.</p> <p>ث- مقادیر مشخص‌شده به قابل‌رویت ساختن ذره با استفاده از EM اشاره دارد. شناسایی ذره بر اساس آنالیز عنصری EDX نیازمند ذراتی در مرتبه (اندازه) ۵ nm تا ۱۰ nm است. حتی اندازه‌های بزرگ‌تر ذره در مرتبه ۲۰ nm تا ۵۰ nm به‌طور مثال در مورد نانوذرات کربن سیاه، پلی‌استایرن و سیلیکا می‌تواند مورد نیاز باشد. ذرات کربن سیاه و پلی‌استایرن نیازمند زیرلایه‌های عاری از کربن می‌باشند (به‌طور مثال توری‌های TEM از جنس Si₃N₄)</p>								

پیوست ب

(الزامی)

نظریه جدایش‌های F_4 ، احتیاط‌ها هنگام جداسازی توزیع‌های گسترده اندازه ذره

و آماده‌سازی نمونه

ب-۱ نظریه جدایش‌های F_4

در F_4 ، ذرات در مقایسه با سرعت حامل، تاخیری را در حرکتشان در راستای مجرا تجربه می‌کنند. برای ذراتی که تحت حالت جزء‌جزء شدن معمولی یا براونی قرار دارند، تاخیر با ضریب نفوذ ذره کاهش می‌یابد. مقایسه میانگین سرعت حامل با سرعت ذره، نسبت ماند را می‌دهد. این نرخ ماند R از یک ذره به وسیله رابطه زیر) داده می‌شود:

$$R = \frac{t_0}{t_{elution}} = \frac{v_0}{v_{elution}} = 6\lambda \coth\left(\frac{1}{2\lambda}\right) - 12\lambda^2 \quad (\text{ب-۱})$$

که در آن زمان تهی‌جا یا حجم تهی‌جا، شویش یک جزء غیرمتاخر را نشان می‌دهد و در نتیجه حجم داخلی مجرا، λ ، پارامتر ماند (ضخامت ابر میانگین بدون بعد) است که به وسیله $\lambda = l/w$ داده می‌شود. (در این رابطه) l ضخامت میانگین ابر ذره نفوذی و w ارتفاع مجرا است. برخی از تقریب‌های غالباً کاربردی R عبارتند از:

$$R = 6\lambda - 12\lambda^2 \quad (\text{ب-۲})$$

$$R = 6\lambda \quad (\text{ب-۳})$$

یکی از تقریب‌های بسیار دقیق که اغلب به کار برده نمی‌شود (رابطه زیر) است:

$$\lambda = \frac{R}{6\sqrt[3]{(1-R)}} \quad (\text{ب-۴})$$

شکل ب-۱ نشان می‌دهد که تقریب (ب-۲) فقط برای $R > 0.7$ از راه حل صحیح منحرف می‌شود، که تقریباً مربوط به یک ذره غیرتاخیری است. شویش نزدیک به پیک تهی‌جا، ممکن است ذراتی که به نظر می‌رسد از تهی‌جا جدا شده‌اند را تحت تأثیر قرار دهد. درحالی‌که تقریب (ب-۳) که پیش از این برای $R > 0.3$ برابر با $3/3$ حجم‌های تهی‌جا است، منحرف و تقریب (ب-۴) حتی با ماند بسیار کم $R > 0.7$ با راه‌حل صحیح کاملاً مطابقت دارد.

پارامتر λ را می‌توان مستقیماً از نیروی اصطکاک ذرات، ابعاد مجرا و نرخ‌های شار متقاطع به‌صورت زیر بدست آورد:

$$\lambda = \frac{kTV_0}{fw^2 V_c} \quad (\text{ب-۵})$$

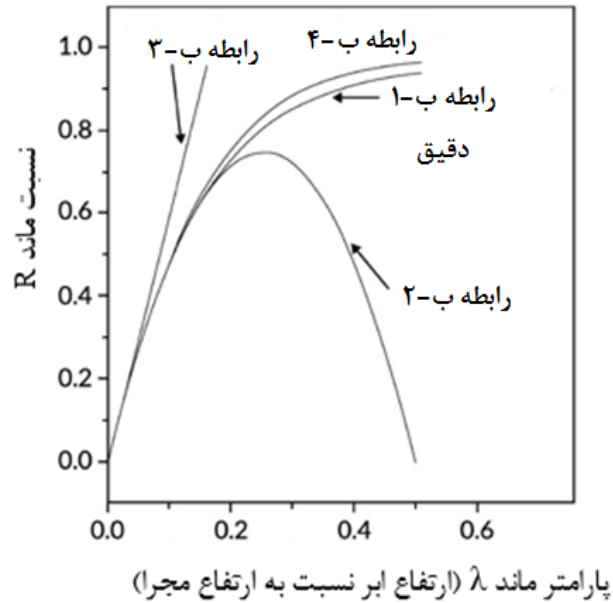
ضریب اصطکاک f با استفاده از قانون استوک یا معادله انیشتین می‌تواند به خواص فیزیکوشیمیایی ترکیبات نمونه مربوط شود. با n گرانروی دینامیکی سیال حامل و d قطر ذره، دو معادله اساسی برای F_4 بازیابی می‌شوند:

$$\lambda_{stokes} = \frac{kTV_0}{3\pi n V_c w^2 d} \quad (\text{ب-۶})$$

$$\lambda_{einstein} = \frac{V_0 D}{V_c w^2} \quad (\text{ب-۷})$$

ب-۲ کالیبراسیون F_4 با استفاده از نظریه F_4 یا مراجع خارجی

نسبت ماند اندازه‌گیری شده R به‌صورت ایده‌آل و بدون کالیبراسیون خارجی، می‌تواند با استفاده از اصول اولیه، به‌طور مستقیم به ضریب نفوذ یا قطر هیدرودینامیکی تفسیر شود. هرچند برای این رهیافت، ابعاد مجرا باید دقیقاً شناخته شده و ثابت باشند. از سوی دیگر، تبدیل زمان یا حجم ماند به قطر هیدرودینامیک یا وزن مولکولی می‌تواند به‌وسیله کالیبراسیون با استانداردهای اندازه ذره یا استانداردهای وزن مولکولی انجام شود (در صورت در دسترس بودن از مواد مرجع گواهی شده استفاده شود). حداقل سه کالیبره‌کننده موردنیاز است؛ توصیه می‌شود که آن‌ها از نظر اندازه برابر باشند و لازم است همه بازه اندازه‌های ذرات که به‌وسیله نمونه پوشش داده شده‌است، گسترده شوند. استفاده از کالیبره‌کننده‌ها با یک منحنی کالیبراسیون خطی حاصل، یک خطای مشابه در حجم‌های ماند کم، همانند رابطه (ب-۳) را معرفی می‌کند. باید تأکید شود که به‌کاربردن نظریه F_4 با رابطه (ب-۳) و ابعاد مجرا که از اجرای یک استاندارد اندازه ذره منفرد بازیابی می‌شود، همسان با یک کالیبراسیون منفرد استاندارد با منحنی کالیبراسیون خطی است.

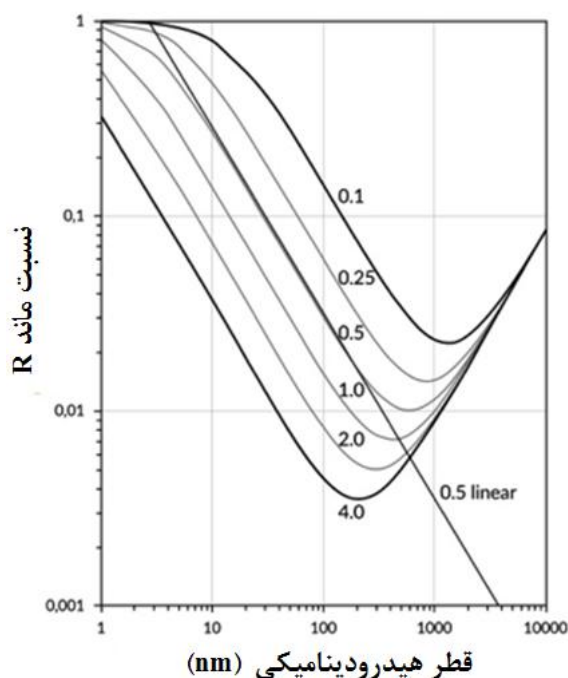


شکل ب-۱- عامل ماند R بر حسب تابعی از پارامتر ماند (ضخامت ابر نسبی به دست آمده از راه حل دقیق)، تقریب‌های عمومی یا کالیبراسیون خطی خارجی با استانداردهای اندازه ذره

درحالی‌که نظریه FFF و فرمول (ب-۱) به‌طور دقیق غیرخطی بودن ماند ذرات در زمان ماند کم و متوسط را توصیف می‌کنند، آن‌ها در توصیف غیرخطی بودن در زمان ماند بالا موفق نیستند. هر چه ذرات بزرگ‌تر شوند، حرکت آن‌ها در مجرا کاهش می‌یابد. حرکت این ذرات به‌وسیله نفوذ و بیشتر با ابعاد فیزیکی‌شان کنترل می‌شود. این ناحیه گذار، وارونگی استریک نامیده می‌شود و با معکوس شدن (وارونگی) ترتیب شویس همراه است. به‌طور معمول این وارونگی با شویس زودهنگام ذرات بزرگ‌تر آغاز می‌شود، زمانی‌که این وارونگی به‌وسیله یک تابع کالیبراسیون خطی اصلاح شود. محدودیتی که روی وارونگی مشاهده می‌شود به اندازه ذره، شکل و چگالی و همچنین ارتفاع مجرا و نرخ‌های شار متقاطع بستگی دارد. از این رو با استفاده از استانداردهای اندازه کروی به‌راحتی قابل‌پیش‌بینی و استنباط نیست. برای ذرات کروی پارامتری ماند R به‌عنوان تابعی از قطر هیدرودینامیکی در شکل ب-۲ داده شده‌است. واضح است که ماند فقط برای یک بازه اندازه حدوداً ۱/۵ برابر اندازه خطی است و به‌صورت خاص نرخ‌های شار متقاطع بزرگ، باعث وارونگی استریک می‌شود. این وارونگی برای ذراتی که خیلی بزرگ‌تر از ۱۰۰ nm نیستند، اتفاق می‌افتد. این یکی از دلایلی است که کاهش شار متقاطع در هنگام اجرای جداسازی، انحرافات غیرقابل‌پیش‌بینی از رفتار ایده‌آل ذرات در مجرا را معرفی می‌کند و منجر به توزیع‌های نادرست اندازه برای نمونه‌های دارای توزیع اندازه ذرات گسترده خواهد شد.

در شکل زیر، ب-۲، غیرخطی بودن در ماند کم و در وارونگی استریکی، محاسبه‌شده برای کره‌های همگن ایده‌آل، نشان داده شده‌است. برای مقایسه، نتیجه کالیبراسیون خطی یا استفاده از فرمول (ب-۳) برای یک

شار متقاطع 0.5 ml min^{-1} نشان داده شده است. ابعاد مجرای F_4 متقارن شبیه‌سازی شده عبارتند از: طول 20 cm ، عرض 1.5 cm ، ارتفاع $350 \mu\text{m}$.



شکل ب-۲- وابستگی ماند ذره به قطر هیدرودینامیکی در نرخ‌های شار متقاطع مختلف بر حسب واحد میلی لیتر در دقیقه

همچنین از شکل ب-۲ کاملاً مشخص است که برای هر نرخ شار متقاطع داده شده، یک بیشینه ماند برای یک بیشینه معین اندازه ذره می‌تواند حاصل شود (مقدار حدی، به‌عنوان مثال 100 حجم مجرا در 1 ml/minute برای بیشینه قطر هیدرودینامیکی ذره 700 nm) و ذرات بزرگ‌تر، از میان ذرات کوچک‌تر در حجم‌های مجرای کم شستشو می‌شوند. هنگامی که نمونه شامل ذراتی است که در سرتاسر بازه مقدار حدی توزیع می‌شوند، افزایش نرخ جریان متقاطع، جزء جزء کردن را بهبود نخواهد داد. محاسبات ارائه شده در شکل ب-۲ بر پایه بعد ذرات کروی است، با ذرات غیرکروی شبیه پودر پولکی، مقدار حدی، کم تعریف می‌شود و ممکن است به جای قطر هیدرودینامیکی پودر پولکی، به بیشینه ابعاد خارجی بسیار مرتبط باشد (به‌طور مثال قطر پودر پولکی).

ب-۳ رهیافت‌های آماده‌سازی نمونه‌های پیچیده برای FFF

آنالیز نانوذرات در جزء جزء کردن جریان بر پایه میدان (FFF) به نمونه‌ای به‌عنوان یک پراکنه مایع نیاز دارد که در آن ذرات هدف در برابر کلوخه شدن پایدار باشند. همچنین ماتریس نمونه ممکن است شامل (نانو-) ذرات باشد تا زمانی که نانوذرات از جزء جزء شدن صحیح ذرات هدف در مجرای FFF جلوگیری نکنند و از آشکارسازی استفاده شود که برای ذرات هدف انتخاب شده باشد و به‌وسیله ذرات یا اجزای ماتریس مختل

نشود. این پیش‌نیازها یک ضرورت مهم در آماده‌سازی نمونه را مطرح می‌کنند. از آنجایی که به‌منظور دستیابی به یک توزیع اندازه ذره، زمان‌های شویش ذرات هدف با آن استانداردهای اندازه ذره مقایسه می‌شود، شرایط اجرا در FFF همانند ترکیب حامل و انتخاب غشاء باید بهینه شود تا جداسازی مناسب ذرات در FFF امکان‌پذیر باشد. شویش غیرایده‌آل ذرات استاندارد یا ذرات هدف منجر به تعیین نادرست توزیع اندازه و اندازه خواهد شد. استفاده از یک روش اندازه‌گذاری مستقل برخط نوری MALS یا DLS، برای حصول اطمینان یک جزء‌جزء کردن صحیح و اندازه‌گذاری ذرات هدف، حداقل حین توسعه روش توصیه می‌شود.

چندین رهیافت کلی برای آماده‌سازی یک نمونه پیچیده برای آنالیز FFF وجود دارد:

الف- ماتریس با جزء‌جزء کردن و آنالیز تداخلی ندارد.

این وضعیت ممکن است هنگامی رخ دهد که ماتریس حاوی مواد و/یا ذراتی باشد که به شیوه یکسان با ذرات هدف، جزء‌جزء شوند و سامانه‌های آشکارسازی به‌صورت انتخابی و بدون مداخله اجزای ماتریس می‌تواند آن‌ها را آشکارسازی و کمی‌سازی کند. در اینجا ممکن است سونیک‌کردن و آمیختگی/رقیق‌سازی با مایع حامل برای مطابقت با ترکیب‌بندی حامل کافی باشد. یک مثال، رقیق‌سازی یک کرم آرایشی مخلوط با سطح‌فعال مناسب که ذرات هدف را پایدار می‌کند و ترکیبات ماتریس روغن/آب به اشیائی (در نهایت مایسل‌ها (ریشال‌ها) که با جزء‌جزء کردن تداخل نمی‌کنند و در آشکارساز رویت نمی‌شوند، را «حل» و یا پراکنده می‌کنند (ICP-MS اغلب مناسب است، ولی MALS همیشه مناسب نیست، زیرا مایسل‌ها را آشکارسازی خواهد کرد). احتمال دیگر این است که اجزای ماتریس بسیار کوچک‌تر از ذرات هدف باشند از این‌رو یک قطع غشایی انتخاب می‌شود که ذرات هدف را در مجرا نگه دارد، در حالی که اجزای ماتریس حین تزریق و تمرکز از مجرا شسته می‌شوند. یک مثال می‌تواند یک نوشیدنی غیرالکلی یا یک بستنی یخی (شکرپایه) حاوی نانوذره باشد که می‌تواند در آب فراخالص حل شود. در اینجا اجزای ماتریس شامل قندها و الکترولیت‌هایی است که به‌طور مثال از یک غشاء با MWCO 10 kg mol^{-1} عبور می‌کنند، درحالی‌که ENP های بزرگ‌تر از ۳ nm تا ۵ nm به‌صورت کمی در مجرا نگه داشته می‌شوند.

ب- ماتریس شامل ترکیباتی است که وقتی به همراه ذره هدف تزریق می‌شود از جزء‌جزء شدن مناسب جلوگیری می‌کند.

۱- ذره هدف را می‌توان از ماتریس استخراج کرد (استخراج کلوئیدی).

به‌طور کلی یک تفاوت در خواص شیمیایی و/یا فیزیکی بین ترکیبات ماتریس و ذره هدف ضروری است. در جداسازی چگالی به‌منظور بهبود جداسازی می‌توان با استفاده از سانتریفیوژ کردن ساده، جمع‌آوری و

بازپراکنش پودر پولکی یا به کمک مایعات سنگین (گرادپان ساکارز، محلول پلی‌تنگستات سدیم^۱) از چگالی دیگری بهره جست. در اینجا ضروری است که ذرات هدف برهم‌کنش نداشته باشند/ به اجزای نمونه از قبیل لخته‌ها در فاضلاب و آب‌های سطحی و یا ذرات خاک در خاک شدیداً متصل شوند. اگر این حالت باشد، یک اصلاح شیمیایی سطوح ذره با افزودن یک ماده سطح‌فعال، تغییر pH یا (در مورد خاک) تبادل متوالی کاتیونی و شستشو/ لخته‌زدایی می‌تواند ذرات هدف را از اجزای ماتریس تداخلی جدا کند. البته در این موارد، ریسک بازیابی‌های کم باقی می‌ماند.

۲- به منظور فعال‌سازی یک پراکنه پایدار برای آنالیز، حذف ماتریس ضروری است.

روش‌های اجرایی کلاسیک آنالیز شیمیایی، ممکن است در اینجا به کار رود، هرچند ذرات باید در برابر حمله شیمیایی مقاومت کنند درحالی‌که توصیه می‌شود ماتریس تخریب شود/ کاهش یابد^۲/ تبدیل شود تا حدی که آنالیز FFF بتواند انجام شود. از این رو یک روش اجرایی باید به کار برده شود که از یک اختلاف فیزیکی یا شیمیایی بین ذرات و ماتریس استفاده کند. یک ماتریس متشکل از اجزای غالباً آلی (لخته‌های لجن فاضلاب، نامیزه روغن و آب) در برابر حملات اکسیدکننده با مخلوطی از اسیدها و پراکسید هیدروژن آسیب‌پذیر است. در ضمن ممکن است ذرات در مقابل آن حملات مقاوم باشند. یک نمونه، ذرات سیلیس (E551) در سوپ گوجه فرنگی است. در چنین موردی، ماتریس می‌تواند کاملاً تخریب شود درحالی‌که ذرات، توزیع اندازه‌شان را حفظ می‌کنند. هضم زی‌مایه می‌تواند برای ذرات بسیار آسیب‌پذیرتر مورد استفاده قرار گیرد، به‌عنوان مثال AgNP در گوشت. حتی توزیع اندازه ذرات TiO_2 در کرم ضدآفتاب در برابر حمله HNO_3 / H_2O_2 تغییر نمی‌کند. البته این روش اجرا باید با احتیاط زیاد به کار برده شود، چون خواص دیگر ذرات و همچنین پوشش‌دهی ممکن است به شدت به وسیله آن حملات شدید تغییر کند.

روش‌های اجرای فوق با موفقیت به کار برده شده‌اند و صحه‌گذاری موفقیت‌آمیزی (درون آزمایشگاهی، آزمون چرخشی رابین^۳ با تعداد اندکی از آزمایشگاه‌ها) از جمله مقایسه با مواد اصلی موجود در نمونه‌های پیچیده را پشت‌سر گذاشته است. اطلاعات با جزئیات بیشتر در کتاب‌نامه در دسترس است [52-57].

1 - Sodium polytungstate solution
2 - Reduced
3 - Round robin

پیوست پ

(آگاهی دهنده)

مثال: آنالیز رهایش ذرات از پوشش نقره‌ای رنگ مرواریدها به وسیله ترکیبی از آنالیز TEM توصیفی، پراش الکترون، TEM تحلیلی و TEM کمی

پ-۱ رهیافت و روش‌شناسی

نقره فلزی، یک افزودنی غذایی مورد تأیید اتحادیه اروپا (EU)^۱ است که به‌عنوان E174 ارجاع داده می‌شود. به‌طور کلی فرض بر این است که نقره فقط به شکل توده در زنجیره غذایی وجود دارد. اهداف این مثال نمایش آن است که عمل‌آوری ساده با آب «مرواریدهای نقره‌ای» به‌منظور تزئین شیرینی منجر به رهایش ریز جزء نانوذرات نقره از ماتریس به‌وسیله ترکیبی از آنالیز توصیفی TEM، پراش الکترون، TEM تحلیلی و TEM کمی می‌شود.

نمونه‌های شامل «مرواریدهای» نقره‌ای که برای تزئین شیرینی به‌کار برده می‌شوند از یک فروشگاه محلی به‌دست آمده، در حالی که مواد آزمون نماینده NM-300K [52] به‌عنوان یک کنترل مثبت، تحت شرایط آزمایشگاهی مشابه مورد آنالیز قرار می‌گیرند.

پوشش نقره مرواریدها با وارد کردن آنها در قطرات آب از بخش داخلی جدا می‌شود. نمونه‌های TEM از پراکنه حاصل و پراکنه NM-300K به‌وسیله روش توری روی قطره آماده می‌شوند [53]. برای آنالیز نانوذرات نقره، ضروری است که نمونه‌ها در همان روز آماده و آنالیز شوند، زیرا واکنش‌پذیری نانوذرات نقره با پایداری نمونه سازگار است [54].

برای آنالیز کیفی، میکروگراف‌های TEM میدان روشن، در بازه بزرگنمایی‌هایی از ۲۰۰۰ برابر تا ۱۰۰۰۰۰ برابر و در حدود ۵۰۰ nm کمتر از کمینه شرایط تباین ثبت می‌شوند. همگنی، پایداری و توزیع مواد روی توری بر اساس این تصاویر صحنه‌گذاری می‌شود.

آنالیز عنصری ذرات با استفاده از TEM تحلیلی پیشرفته‌ای انجام می‌شود که اجازه دستیابی به اطلاعات تحلیلی با تفکیک‌پذیری به اندازه کافی بالا به‌منظور تعیین ترکیب‌بندی عنصری هر کدام از نانوذرات مجزا را می‌دهد.

1 - European Union

برای آنالیزهای کمی TEM، با انتخاب یک بزرگنمایی بر اساس اندازه کوچک‌ترین ذرات موردنظر مشاهده شده حین آنالیز کیفی TEM (تقریباً ۳ نانومتر)، از انحراف‌های سامانمند در اندازه‌گیری‌های اندازه‌گیری می‌شود. این مقدار که براساس معیار مرکوس [15] برای بزرگنمایی ۴۹۰۰۰ برابری و اندازه پیکسل متناظر ۰/۲۲ نانومتری محاسبه شده است، بیش از کوچک‌ترین حد ۲/۴ nm کمی‌سازی است. برای دوربین 4x4 K به کاربرده شده، این حاکی از آن است که حد بالای کمی‌سازی اندازه ۸۸ nm، یک دهم اندازه تصویر مشابه آنچه که در استاندارد ISO 13322-1 ارائه شده و یک بازه کاربردی کمی‌سازی اندازه از ۲/۴ nm تا ۸۸ nm است. یک روش اجرای انتخاب میکروگراف سامانمند، انتخاب تصویر تصادفی بدون سوگیری را همانگونه که در منبع [13] شرح داده شده است، تضمین می‌کند. برای به دست آوردن نتایج کمی، آشکارسازی آستانه-پایه بر اساس جرم- ضخامت ذرات موجود در تصویر با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر به کار می‌رود. این نرم‌افزار از رهیافت معرفی شده توسط دی‌تیمرن و همکارانش [55] و ورلیزن و همکارانش [56] پیروی می‌کند.

عدم قطعیت‌های اندازه‌گیری وابسته به اندازه‌گیری TEM کمی خواص ذره، با استفاده از یک رهیافت بالا به پایین، براساس اندازه‌گیری‌های نقره نماینده ماده آزمون NM-300K تخمین زده می‌شود. به دلیل عدم دسترسی به مقادیر گواهی شده برای NM-300K، صحت و عدم قطعیت صحت را نمی‌توان ارزیابی کرد. اندازه میانه میانگین، انحراف معیار متناظر، دقت درون آزمایشگاهی، عدم قطعیت کالیبراسیون و عدم قطعیت‌های ترکیب شده آزمایشگاهی مطابق با استاندارد ISO 5727-2 تعیین می‌شوند. به‌طور خاص، تکرارپذیری (تغییرپذیری در مدت یک روز) و دقت متوسط (تغییرپذیری روز به روز) برای اندازه‌گیری‌ها روی NM-300K به روش شرح داده شده توسط دی‌تیمرن و همکارانش، تخمین زده می‌شود [57]. سه ویال مختلف در پنج روز یک هفته آنالیز می‌شوند. در هر روز، سه آزمون TEM از یک ویال آماده می‌شود. از هر آزمون TEM، میکروگراف‌های ده ناحیه روی توری ثبت و آنالیز می‌شوند. کالیبراسیون بزرگنمایی میکروسکوپ با استفاده از روش توری-مقاطع به کمک یک روش کار کالیبراسیون خودکار با پیروی از رهنمودهای ASTM-E766 انجام می‌شود [58]. عدم قطعیت کلی درون آزمایشگاهی، تکرارپذیری، دقت متوسط و عدم قطعیت کالیبراسیون را ترکیب می‌کند و بر اساس میانگین اندازه‌ده میانه هر یک از پارامترهای انتخابی، محاسبه می‌شود.

پ-۲ نتایج

نتایج جامع شامل میکروگراف‌های نماینده، الگوهای پراش، نقشه‌های عنصری، توصیف‌های ذرات مشاهده شده و شکل‌ها و جداول نشان داده شده را می‌توان در [59] مورد ارجاع قرار داد.

بازرسی کیفی TEM نشان می‌دهد که یک عمل‌آوری ساده با آب، ذرات نانومقیاس را از پوشش مرواریدها رها می‌کند. ذرات منفرد اغلب یک ساختار کروی سه بعدی را نمایش می‌دهند، درحالی‌که ذرات کلوخه شده

و انبوهیده یک ریخت‌شناسی پیچیده را نشان می‌دهند. بر اساس تباین پراش، حتی ذرات منفرد نیز به‌گونه‌ای نشان داده می‌شوند که شامل چندین بلورک هستند. قند در همه آزمون‌ها، روی هر بخش از توری EM یافت شده و باعث ایجاد نوسانات شدت در پس‌زمینه تصاویر TEM می‌شود. کوچکترین ذرات مشاهده‌شده از مرتبه ۳ nm هستند. به علاوه، ذرات خیلی کوچک ($> 10 \text{ nm}$) از ذرات بزرگ‌تر ($< 10 \text{ nm}$ نانومتر) بیشتر مشاهده می‌شوند. ظاهر کلی و ریخت‌شناسی‌های مشاهده‌شده ذرات شویس‌شده از مرواریدهای نقره‌ای شبیه به ظاهر و ریخت‌شناسی مواد آزمون نماینده NM-300K است. میکروگراف‌های TEM، یک توزیع یکنواخت ذرات روی توری را نشان می‌دهند که با استفاده از روش اجرای انتخاب میکروگراف سامانمند، امکان جمع‌آوری تصویر تصادفی بدون سوگیری برای آنالیز کمی را می‌دهد. نتایج یکسانی در آزمایش‌های تکراری به‌دست می‌آید.

الگوهای پراش نشان‌دهنده ذرات شویس‌شده از مرواریدهای نقره‌ای با الگوی پراش نقره (NM-300K) مطابقت داشته که دلالت بر حضور ذرات نقره دارد. هرچند بخش بزرگی از شدت در الگوی پراش از ذرات (توده) بزرگ‌تر ناشی می‌شود، این سیگنال در الگوی پراش نمی‌تواند فقط به ذرات نانو مقیاس نسبت داده شود.

مقایسه نقشه‌های عنصری EDX نقره با تصاویر HAADF-STEM نشان می‌دهد که توزیع نقره منطبق بر موقعیت ذرات روی تصاویر HAADF-STEM است. وجود دیگر عناصر شیمیایی مشاهده شده، مانند مقادیر اندک اکسیژن و کربن، می‌تواند به سیگنال‌های پس‌زمینه نامشخص نسبت داده شود. مقایسه توری‌های مس و نیکل، سیگنال‌های مس و نیکل طیف EDX سرچشمه‌گرفته‌شده از نمونه را مستثنی می‌کند. در نتیجه، آنالیزهای HAADF-STEM و EDX تایید می‌کنند که ذرات نقره موردنظر، ذراتی هستند که می‌توانند براساس تباین جرم- ضخامت در تصاویر BF-TEM معمول به سهولت از پس‌زمینه متمایز شوند و در BF-TEM معمول کمی‌سازی شوند.

رهیافت آنالیز کمی TEM با استفاده از آشکارسازی نیمه خودکار و اندازه‌گیری ذرات نقره شویس‌شده روی تصاویر BF-TEM بر اساس تباین جرم- ضخامت آن‌ها، اندازه‌گیری مجموعه‌ای از اندازه‌دهی‌های اندازه و شکل را به‌طور همزمان ممکن می‌سازد. جدول ت-۱ مقادیر میانه اندازه‌دهی‌های انتخابی اندازه و شکل را نشان می‌دهد. این اندازه‌دهی‌ها ذرات نقره‌ای شویس‌شده را مشخصه‌یابی می‌کنند. آمارهای توصیفی بیشتر برای ۲۳ پارامتر در [59] ارائه شده‌است. اندازه‌دهی اندازه کمینه فرت، کمینه مسافت خط مماس‌های موازی در مرزهای ذره مخالف را تخمین زده و کمینه بعد خارجی ذره مشخص‌شده در تعریف EC نانومواد را تقریب می‌زند [60]. در این حالت، توزیع کمینه فرت ذرات شویس‌شده از مرواریدها، تقریباً در سرتاسر بازه مفید ۰٫۲۴ تا ۸۸ نانومتر قرار می‌گیرد. مقدار کمینه فرت کوچک‌تر از ۱۰۰ nm، برای ۹۴٫۷٪ ذرات شویس‌شده از مرواریدها اندازه‌گیری می‌شود؛ این‌گونه مواد بر طبق تعریف EC به‌عنوان نانومواد توصیف

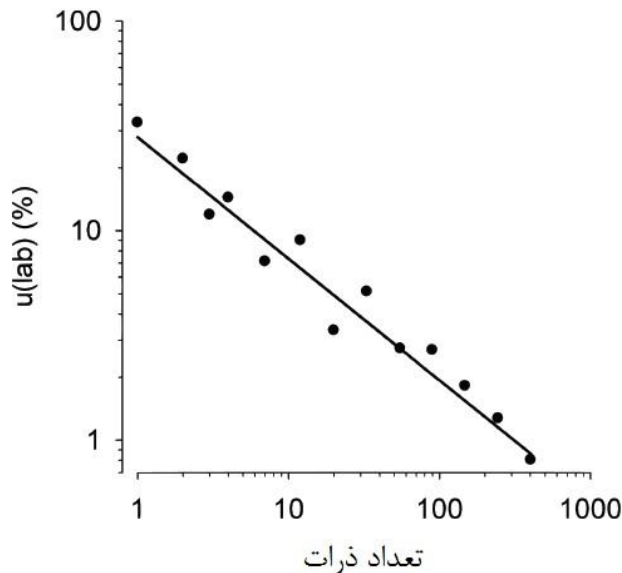
می‌شوند. بخش کوچکی از ذرات بالاتر از حد بالای کمی‌سازی ۸۸ nm شامل کلوخه‌ها و انبوهه‌ها هستند. ذرات شوی‌شده براساس حالت کروی بودن آن‌ها، می‌توانند مطابق با کرومبین و اسلاس^۱ [61] به‌عنوان ذراتی با کروییت متوسط رده‌بندی شوند. این مشاهده فرضیه کروی بودن ذرات را پشتیبانی می‌کند که پایه و اساس محاسبات آنالیز اندازه به‌وسیله spICP-MS است.

از آنجا که ذرات شوی‌شده دارای خواص مشابهی با ذرات مواد آزمون نماینده NM-300K هستند، فرض بر این است که عدم‌قطعیت‌های اندازه‌گیری آنالیز کمی TEM ذرات شوی‌شده را می‌توان با عدم قطعیت اندازه‌گیری تعیین‌شده در یک مطالعه صحه‌گذاری از آنالیز کمی TEM NM-300K (خلاصه‌شده در جدول پ-۱) تقریب زد.

از مطالعه اعتبارسنجی NM-300K، رابطه بین تعداد ذرات اندازه‌گیری‌شده و عدم‌قطعیت اندازه‌گیری کمینه فرت تعیین می‌شود. شکل پ-۱ رابطه بین عدم‌قطعیت درون‌آزمایشگاهی (U_{lab} ، ۶۸٪) میانگین میانه کمینه فرت و تعداد ذرات اندازه‌گیری‌شده محاسبه‌شده برای زیر مجموعه داده N ذره را نشان می‌دهد. همانطور که قبلاً هم برای آنالیز TEM ذرات سیلیکای تقریباً کروی و تقریباً تک‌مودال مشاهده شده بود، هنگامی که تعداد ذرات بیش‌تر از ۱۰۰ باشد، عدم‌قطعیت اندازه‌گیری فقط تا حدودی با تعداد ذرات کاهش می‌یابد [62]. فرض بر این است که دقت تخمین میانه اندازه کمینه فرت از ۳۰۰ ذره شوی‌شده از مرورایدهای نقره‌ای به همان مرتبه بزرگی اندازه ذرات NM-300K است. بنابراین هنگامی که تعداد بسیار بیشتر از ۳۰۰ ذره آنالیز شوند، اندازه‌گیری‌های خواص ذرات شوی‌شده بسیار دقیق نخواهد بود.

جدول پ-۱- مقادیر میانه اندازه‌ده‌های انتخابی که ذرات نقره شویس شده را با استفاده از عدم قطعیت استاندارد و گسترده‌شده مشخصه‌یابی می‌کنند

u_{lab} الف، ب	عدم قطعیت استاندارد نوع B الف u_{cal}	عدم قطعیت استاندارد نوع A الف			مقادیر میانه برای ذرات شویس شده	
		u_{lab}	u_{ip}	u_r		
۰٫۵۵	۰٫۲۲	۰٫۵۰	۰٫۱۲	۰٫۴۹	۲۶٫۰	ECD (nm)
۰٫۵۵	۰٫۲۱	۰٫۵۱	۰٫۱۲	۰٫۵	۲۳٫۳	کمینه فرت (nm)
۳٫۱۳	۰٫۷۷	۳٫۰۳	۰٫۶۴	۲٫۹۶	۶۷٫۶	محیط (nm)
۱۳٫۸۵	۶٫۰۵	۱۲٫۴۶	۲٫۴۴	۱۲٫۲۲	۹۴٫۳	مساحت (nm ²)
۰٫۰۰۶	N/A	۰٫۰۰۶	۰٫۰۰۴	۰٫۰۰۵	۶۸۷	نسبت منظری ^۳
۰٫۰۰۶	N/A	۰٫۰۰۶	۰٫۰۰۲	۰٫۰۰۵	۱٫۲۸۰	کوژی ^۳
۰٫۰۰۵	N/A	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۵	۰٫۰۰۳	۰٫۸۸۸	کرویت ^۳
<p>u_r عدم قطعیت مرتبط با تکرارپذیری که در استاندارد ISO 5725-2 تعریف شده است.</p> <p>u_{ip} عدم قطعیت مرتبط با دقت متوسط که در استاندارد ISO 5725-2 تعریف شده است.</p> <p>u_{lab} عدم قطعیت درون آزمایشگاهی که در استاندارد ISO 5725-2 تعریف شده است.</p> <p>u_{cal} عدم قطعیت کالیبراسیون که در استاندارد ISO 5725-2 تعریف شده است.</p>						
<p>الف- عدم قطعیت‌های اندازه‌گیری بر اساس یک مطالعه اعتبارسنجی اندازه‌گیری NM-300k با TEM کمی تخمین زده می‌شود.</p> <p>ب- عدم قطعیت درون آزمایشگاهی ۶۸٪ گسترده شده</p> <p>پ- اندازه‌ده بدون بعد</p>						



شکل پ-۱- رابطه بین عدم قطعیت درون آزمایشگاهی ($u_{lab,68\%}$) میانگین میانه کمینه فرت و تعداد ذرات اندازه‌گیری شده در هر زیر مجموعه داده

پیوست ت

(آگاهی دهنده)

مثال: روش ICP-MS تک ذره برای اندازه‌گذاری و تعیین کمی نانونقره در گوشت جوجه

ت-۱ مقدمه

در اینجا یک روش اعتباردهی شده برای اندازه‌گذاری و کمی‌سازی نانونقره در گوشت جوجه با استفاده از پلاسما جفت‌شده القایی تک ذره- طیف‌سنجی جرمی (spICP-MS) توصیف می‌شود [63]. نمونه‌ها با استفاده از هضم زی‌مایه پردازش می‌شوند. این روش از رقیق‌سازی هضم و آنالیز ابزاری هضم رقیق‌شده به‌وسیله spICP-MS پیروی می‌کند. این روش مطابق روش اجرا برای تعیین پس‌مانده‌ها در مواد غذایی با منشأ حیوانی و تصمیم کمیسیون اروپایی EC/675/2002، صحه‌گذاری شده‌است [64]. ضروریات توصیف روش و نتایج اعتباردهی در زیر ارائه شده‌است، با این وجود توصیه می‌شود به متن اصلی مراجعه شود [63].

ت-۲ توصیف روش

ت-۲-۱ مواد و روش‌ها

نانوذرات طلا (RM8013) کروی شکل با قطر اسمی ۶۰ nm و با غلظت جرمی 50 mg I^{-1} پایدار شده در یک بافر سترات برای تعیین بازده مه‌پاشی مورد استفاده قرار گرفته‌است. یک استاندارد پایه به غلظت $50 \mu\text{g I}^{-1}$ ، با رقیق‌سازی $50 \mu\text{l}$ از RM8013 تا 50 ml با آب فراخالص (UPW) آماده شده‌است. استاندارد، پیش از استفاده به مدت ۱۰ دقیقه در یک حمام فراصوتی قرار داده‌شد. برای تعیین بازده مه‌پاشی، یک استاندارد کاری 50 ng I^{-1} به‌صورت روزانه با رقیق‌سازی $50 \mu\text{l}$ از استاندارد پایه تا 50 ml با استفاده از UPW آماده می‌شود. این استاندارد به‌صورت روزانه آماده می‌شود، اگرچه این استاندارد در دمای اتاق برای چندین روز پایدار می‌ماند.

یک استاندارد نقره یونی، 100 mg Ag I^{-1} ، برای کالیبراسیون جرم مورد استفاده قرار گرفته‌است. استانداردهای کالیبراسیون در بازه غلظت $0.2 \mu\text{g I}^{-1}$ - $5 \mu\text{g I}^{-1}$ در UPW آماده شده‌است.

پروتئیناز 1 K ، 822 U ml^{-1} ، برای هضم زی‌مایه استفاده شده‌است. بافر هضم شامل 10 mM بافر Tris، 1% تریتون X-100 و 1 mM استات کلسیم در pH (معادل) ۹٫۵ بود. بافر هضم با انحلال 600 mg بافر Tris و 90 mg استات کلسیم منوهیدرات در 200 ml آب فراخالص (UPW) آماده شده‌است. 5 ml تریتون X-100

به محلول اضافه شده و با یک همزن مغناطیسی تا انحلال کامل مخلوط شد. این محلول با استفاده از UPW تا حجم نهایی ۵۰۰ ml بیشتر رقیق شد.

ت-۲-۲ آماده سازی نمونه

گوشت جوجه از فروشگاه‌های محلی خریداری شد. مقدار ۲۰۰ mg گوشت جوجه با یک چاقوی جراحی به قطعات کوچک بریده شده و داخل یک لوله پلی اتیلن (PE) ۱۰ میلی لیتری قرار داده شد. هضم زی‌مایه در دو مرحله انجام شد:

- مرحله ۱) افزودن ۴ ml بافر هضم (۱۰ mM بافر Tri، ۱٪ تریتون X-100 و ۱ mM استات کلسیم در pH (معادل) ۹/۵)، به مدت ۱ دقیقه به شدت هم‌زده و با توان ۴ وات به مدت ۵ دقیقه سونیک شد (سونیک کردن پروبی در حمام یخ)؛

- مرحله ۲) افزودن ۲۵ μl زی‌مایه (پروتئیناز) 822 U ml^{-1} K و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از سرمایش تا دمای اتاق، هضم از ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر در آب فراخالص رقیق شده و به وسیله spICP-MS آنالیز شد.

ت-۲-۳ آنالیز ابزاری

یک دستگاه ICP-MS مدل Thermo Scientific Xseries 2 مجهز به یک مه‌پاش مخروطی شیشه هم‌مرکز و یک محفظه افشانه مهره برخوردی کوارتز^۱ استفاده شد. داده‌برداری با استفاده از نرم‌افزار Thermo PlasmaLab در حالت آنالیز تفکیک زمانی انجام شد. زمان انتظار در ۳ ms با زمان کل داده‌برداری ۶۰ ثانیه در هر اندازه‌گیری تنظیم شد. ایزوتوپ‌های اندازه‌گیری شده برای طلا و نقره به ترتیب m/z ۱۹۷ و m/z ۱۰۷ بودند. تداخل‌های چند اتمی (بس‌اتمی) امکان‌پذیر است، به‌عنوان مثال $^{91}\text{Zr}^{16}\text{O}$ برای ^{107}Ag ؛ هرچند، با توجه به این که تداخل یک NP نیست، این منجر به یک سیگنال پس‌زمینه پیوسته خواهد شد و بنابراین می‌تواند از سیگنال‌های NP ناپیوسته متمایز شود. به‌طور معمول یک مجموعه نمونه از نمونه‌های شاهد سامانه، استاندارد نانوذره طلا (50 ng I^{-1}) (برای تعیین بازده مه‌پاشی)، $0.2-5 \mu\text{g I}^{-1}$ استانداردهای نقره یونی برای کالیبراسیون و تعلیقه‌های رقیق‌شده نمونه استفاده می‌شود. تعلیقه‌های رقیق‌شده شامل نمونه‌های شاهد روش و یک نمونه شاهد پردازش‌شده (که آنالیت دقیقاً قبل از آنالیزهای ابزاری به آن اضافه شده‌است) هستند (ماتریس تطبیق یافته با استاندارد بازیابی).

1 - Quartz impact bead spray chamber

ت-۲-۴ پردازش داده‌ها

داده‌های خام شمارش شده با واحد تعداد بر ثانیه برحسب شدت از نرم‌افزار Thermo PlasmaLab استخراج شده و برای انجام محاسبه غلظت‌های ذره، اندازه‌های ذره و توزیع‌های اندازه ذره به یک صفحه‌گسترده منتقل می‌شود [51]. محاسبه بازه انتقال و جرم و اندازه ذره همانند روش شرح داده شده در زیربند ۷-۳-۴ این استاندارد است.

ت-۳ نتایج و بحث

ت-۳-۱ هضم زی‌مایه‌ای نمونه: شرایط ملایم برای حفظ مشخصات ذره

به‌طور کلی، یک روش مناسب آماده‌سازی نمونه به‌منظور جداسازی نانوذرات از یک ماتریس پیچیده اساسی است. این روش برای دستیابی به یک تعلیق پایدار ذره جهت آنالیز ابزاری به اندازه کافی پایدار است. مزیت spICP-MS نسبت به سایر روش‌های تحلیلی در آشکارسازی فوق‌العاده حساس سطح کمتر از 1 ng I^{-1} تکیه دارد و امکان کاربرد یک فاکتور رقیق‌سازی بالا را فراهم می‌کند. رقیق‌سازی بالا به‌طور طبیعی در کاهش اثر ماتریس سهیم است (در مورد نانوذرات نقره ۶۰ نانومتری، غلظت جرمی مناسب نوعی نمونه‌های اندازه‌گیری شده از 20 ng I^{-1} تا 50 ng I^{-1} است). تعداد بسیار کمی پروتکل کلی آماده‌سازی نمونه از یک ماتریس پیچیده برای نانومواد (و به‌صورت ویژه از میان انواع ماتریس‌های جامد)، به‌طور کلی با ویژگی یک ماتریس بزرگ ذره توصیف شده است. مثال‌هایی از جداسازی فیزیکی برای مایسل‌ها در نوشیدنی‌ها [62]، استفاده از شرایط سخت مانند اسیدهای قوی و دماهای بالا برای هضم ماتریس در ماتریس‌های غذایی حاوی ذرات تیتانیا [66] ارائه شده است. هرچند، رهیافت نام‌برده شده در مورد نانوذرات نقره نامناسب است، زیرا نانوذرات نقره (AgNPs) نسبت به ذرات تیتانیا آسیب پذیرتر هستند و می‌توانند دستخوش تغییرات متعددی از جمله تجزیه به‌وسیله اکسیژن مولکولی و پروتون‌ها [67]، واکنش‌ها با گونه‌های گوگرد کاهش‌یافته و کلراید [68]، [69]، و پیوند به پروتئین‌ها [70] شوند. هضم زی‌مایه‌ای با استفاده از پروتئیناز K که در اینجا ارائه شده است به‌عنوان یک روش هضم ملایم انتخابی است تا از شرایط سخت، هضم‌های مبتنی بر اسید مرسوم نوعی برای تعیین عنصر سنگین و کمیاب در مواد غذایی و از واکنش‌های مضر برای یکپارچگی آنالیت موردنظر اجتناب شود. برای تسهیل فرایند هضم، نمونه قبل از افزودن پروتئیناز K سونیک می‌شود و از استفاده از کلرین در بافر زی‌مایه اجتناب می‌شود. پس از (عملیات) هضم، به‌منظور آنالیز با spICP-MS، هضم با آب فراخالص رقیق می‌شود.

یک مشکل کلی در توسعه و صحت‌گذاری روش، عدم دسترسی به مواد مرجع نماینده برای نانومواد در ماتریس‌های پیچیده است. در زمانی که این مطالعه انجام شده، هیچ مواد مرجع گواهی شده‌ای یا ماده مرجعی برای تعیین نانوذرات نقره در گوشت جوجه یا هر ماده غذایی دیگر وجود نداشته است؛ از این رو در سرتاسر

این مطالعه برای صحت‌گذاری از نمونه‌های اسپایک‌شده استفاده شد. اسپایک‌ها شامل تعلیق‌هایی از نانوذرات نقره Ag NP به خوبی مشخص‌یابی شده بودند و در شروع روش اجرای تحلیلی، به‌طور کلی گوشت جوجه بریده‌شده به ماتریس نمونه اضافه می‌شود. در این مطالعه [71] کمینه اندازه نمونه تحلیلی جهت دستیابی به دقت تحلیلی مشخص با استفاده از رابطه Gy تعیین شد. محاسبات نظری نشان می‌دهند یک اندازه نمونه که فقط ۰/۰۱ g از یک نمونه حاوی نانوذرات نقره (با اندازه) ۱۰۰ nm با غلظت جرمی ذره 1 mg kg^{-1} است برای دستیابی به دقت تحلیلی بهتر از ۱۰٪ کافی است. علاوه بر این، ۰/۰۱ g نمونه از این ماده شامل ۱۰ ng از ۱۰۰ nm نانوذرات نقره (با اندازه) ۱۰۰ nm است که هر کدام دارای جرم مجزایی در حدود ۵ fg هستند. بنابراین تعداد ذرات موجود در نمونه 2×10^6 بود.

ت-۳-۲ طراحی مطالعه و نتایج صحت‌گذاری

روشی که در اینجا ارائه شده است با تبعیت از روش کار صحت‌گذاری برای تعیین پسماند در مواد غذایی با منشاء حیوانی، شرح داده شده در سند تصمیم کمیسیون اتحادیه اروپا EC /657/2002، صحت‌گذاری شد [64]. هفت تکرار آنالیز در سه سطح غلظت و در سه روز مختلف انجام شد. برای تعیین خطی بودن، یک منحنی غلظت هفت نقطه‌ای از استانداردهای نانوذره نقره Ag NP تطبیق شده ماتریسی در هر یک از این روزها گنجانده شده است. یک طرحواره از چیدمان صحت‌گذاری استفاده شده در جدول ت-۱ ارائه شده است. سطح صحت‌گذاری 10 mg kg^{-1} بود.

جدول ت-۱- طراحی تجربی برای مطالعه صحت‌گذاری اندازه‌گذاری و تعیین کمی نانوذرات نقره در گوشت جوجه به وسیله ICP-MS تک ذره‌ای (اقتباس شده از مرجع [60])

روز	خطی بودن	صحت / تکرار پذیری / تجدید پذیری	بازیابی	گزینش پذیری / ویژگی	آنالیز کل
۱	۷ نقطه‌ای	۳ سطحی (۰/۵ VL، ۱/۰ VL، ۲/۵ VL) ۷ تکراری	۱	۷ نمونه شاهد	۳۶
۲	۷ نقطه‌ای	۳ سطحی (۰/۵ VL، ۱/۰ VL، ۲/۵ VL) ۷ تکراری	۱	۷ نمونه شاهد	۳۶
۳	۷ نقطه‌ای	۳ سطحی (۰/۵ VL، ۱/۰ VL، ۲/۵ VL) ۷ تکراری	۱	۷ نمونه شاهد	۳۶
یادآوری- سطح صحت‌گذاری (VL) 10 mg kg^{-1} بود.					

تعداد بیشتری نمونه برای تعیین گزینش‌پذیری، تحمل‌پذیری و پایداری مورد آنالیز قرار گرفت. گزینش‌پذیری میزان حد مداخله سایر مواد در تعیین آنالیت یعنی نانوذره نقره Ag NP است. برای تعیین گزینش‌پذیری در برابر اجزای اصلی ماتریس، تمامی ۲۱ نمونه شاهد با گنجاندن هفت ماتریس شاهد در هر

روز صحنه‌گذاری، مورد تحلیل قرار می‌گیرند. نیازی به تعیین گزینش‌پذیری نسبت به سایر NP‌های غیرنقره‌ای نیست، زیرا به دلیل آن که در spICP-MS، ابزار فقط به مقدار 1 m/z تنظیم شده‌است، خود آشکارسازی ICP-MS بسیار انتخابی است. در واقع، به دلیل تفکیک‌پذیری زمانی بالا، فقط می‌توان مقدار 1 m/z را با استفاده از ابزارهای ICP-MS در دسترس حاضر اندازه‌گیری کرد. این روش همچنین نسبت به حضور اشکال غیرنانون از همان عنصر به‌طور مثال یون‌های نقره انتخابی است زیرا برای مشاهده ذرات تک باید رقیق‌سازی بیشتری به‌کار رود. اگر یون‌های نقره Ag در غلظت‌های بالایی وجود داشته باشند، ذرات هنوز هم می‌توانند در زمان روبش به‌عنوان اسپایک‌ها روی یک سیگنال پیوسته پس‌زمینه یون‌ها برهم‌نهاده شوند. تحمل‌پذیری روش با تغییر تعدادی از پارامترهایی که گمان می‌رود بر نتایج اندازه‌گیری اثر می‌گذارند، تعیین می‌شود. متغیرهای مورد آزمایش در این مطالعه، زمان سونیک‌کردن، زمان و دمای هضم و عامل رقیق‌سازی قبل از آنالیز ابزاری بودند. پایداری به دوام مواد نمونه آماده‌شده (در زمان نگهداری)، هضم‌ها و هضم‌های رقیق‌شده اشاره دارد و با اعمال زمان‌های مختلف تعادل پس از اسپایک‌کردن و آنالیز مجدد مواد آماده‌شده در اولین روز و دومین روز صحنه‌گذاری تعیین می‌شود.

ت-۳-۳ تکرارپذیری، تجدیدپذیری و صحت

تکرارپذیری، تجدیدپذیری و صحت به‌وسیله اسپایک‌کردن نمونه‌های شاهد در سه سطح غلظت تعیین شد: $0/5$ برابر سطح صحنه‌گذاری (VL)، $1/0$ برابر VL و $2/5$ برابر VL. VL در 10 mg kg^{-1} تنظیم شد. نمونه‌ها در هفت مرحله در سه روز مختلف آنالیز شدند. هر یک از این سه روز بیش از یک هفته از هم جدا بودند. داده‌های اندازه‌گیری برای قطر ذرات و غلظت تعداد- پایه ذره و غلظت جرم- پایه ذره با استفاده از آنالیز ANOVA ارزیابی می‌شوند. نتایج تکرارپذیری، تجدیدپذیری و صحت در جدول ت-۲ آورده شده‌است.

نتایج صحت نشان می‌دهد که مقادیر میانگین به‌دست آمده برای پارامترها در هر سه سطح صحنه‌گذاری نزدیک به مقادیر مورد انتظار است. تکرارپذیری و تجدیدپذیری هر دو به‌عنوان انحراف معیارهای نسبی استاندارد بیان شده‌اند. این مقادیر با استثناهایی برای غلظت‌های عددی و جرمی ذره، به اندازه 10% است. این تعجب‌آور نیست زیرا در همه موارد از همان عامل رقیق‌سازی‌ای استفاده شده‌است که قبل از آنالیزهای spICP-MS منجر به تعداد ذرات کمتر در سطح $0/5 \text{ VL}$ و از این رو تکرارپذیری کمتری می‌شود. از آنجاکه در این مطالعه نانومواد توزیع اندازه نسبتاً باریکی دارند، میانگین قطر ذره به تعداد ذرات مشاهده‌شده بستگی ندارد. از این رو، تکرارپذیری و تجدیدپذیری در کلیه سطوح صحنه‌گذاری قابل مقایسه هستند. اختلاف نسبتاً زیاد بین RSD_R و RSD_{RL} از این واقعیت ناشی می‌شود که نتایج در روزهای مختلف، تفاوت‌های بزرگ‌تری را نشان می‌دهند.

جدول ت-۲- نتایج صحه‌گذاری برای تکرارپذیری، تجدیدپذیری و صحت برای نانوذرات نقره با اندازه ۶۰nm در گوشت جوجه، تغییر یافته از [63]

قطر ذره تعیین شده به وسیله spICP-MS (n=۲۱)			
۲۵ mg kg ⁻¹ (۲,۵ VL)	۱۰ mg kg ⁻¹ (۱,۰ VL)	۵ mg kg ⁻¹ (۰,۵ VL)	پارامتر
۹۹٪	۹۸٪	۹۸٪	صحت
۱,۸٪	۱,۲٪	۰,۸٪	تکرارپذیری (RSD _r)
۵,۰٪	۵,۶٪	۵,۲٪	تجدیدپذیری (RSD _R)
غلظت عددی ذره به وسیله spICP-MS (n=۲۱)			
۲۵ mg kg ⁻¹ (۲,۵ VL)	۱۰ mg kg ⁻¹ (۱,۰ VL)	۵ mg kg ⁻¹ (۰,۵ VL)	پارامتر
۹۱٪	۹۵٪	۹۲٪	صحت
۱۲٪	۹,۶٪	۱۴٪	تکرارپذیری (RSD _r)
۷,۵٪	۱۲٪	۱۸٪	تجدیدپذیری (RSD _R)
غلظت جرمی ذره به وسیله spICP-MS (n=۲۱)			
۲۵ mg kg ⁻¹ (۲,۵ VL)	۱۰ mg kg ⁻¹ (۱,۰ VL)	۵ mg kg ⁻¹ (۰,۵ VL)	پارامتر
۱۰۰٪	۹۸٪	۱۰۱٪	صحت
۹,۹٪	۷,۲٪	۱۱٪	تکرارپذیری (RSD _r)
۸,۹٪	۹,۹٪	۱۶٪	تجدیدپذیری (RSD _R)

ت-۳-۴ خطی بودن و LOD/LOQ، تحمل پذیری، ویژگی/گزینش پذیری

خطی بودن با آنالیز نانوذرات با اندازه ۶۰ nm تطبیق یافته با ماتریس در بازه بین ۰,۵ mg kg⁻¹ و ۵۰ mg kg⁻¹ تعیین شد. اگرچه اختلاف‌هایی در پاسخ در طی سه روز صحه‌گذاری وجود داشت، خطی بودن با نشان دادن ضرایب همبستگی < ۰,۹۹ نشان داده شد. در هنگامی که عامل رقیق‌سازی ۱۰^۵ استفاده شد، حد آشکارسازی گزارش شده (LOD) و حد کمی‌سازی گزارش شده (LOQ) به ترتیب برابر با ۰,۶۵ mg kg⁻¹ و ۱,۰ mg kg⁻¹ بودند. هنگامی که عامل رقیق‌سازی ۱۰^۴ به کار برده می‌شود، LOD و LOQ ممکن است به ۰,۰۷ mg kg⁻¹ و ۰,۱ mg kg⁻¹ کاهش یابد. تحمل‌پذیری با تغییر تعدادی از شرایط از جمله زمان سونیک کردن (۵ دقیقه تا ۱۰ دقیقه)، زمان (۱ ساعت تا ۲۴ ساعت) و دمای (۲۷ درجه سانتیگراد تا ۴۷ درجه سانتیگراد) هضم زی‌مایه‌ای و عامل رقیق‌سازی قبل از آنالیز spICP-MS آزموده شد. آزمایش‌ها روی نمونه‌های اسپایک شده با غلظت ۱۰ mg kg⁻¹ و در سه تکرار انجام شد. نتایج برای قطر ذرات همانند غلظت عددی و جرمی ارزیابی شد.

نتیجه کلیدی مطالعه این است که زمان‌های متفاوت سونیک کردن از ۵ دقیقه تا ۱۵ دقیقه منجر به نتایج مختلف برای اندازه میانگین ذرات، تعداد ذرات مشاهده شده در زمان روبش و غلظت جرمی ذره نشده است؛

زمان هضم از ۱ ساعت تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد اثرات قابل توجهی را بر میانگین قطر ذره و غلظت جرمی ذره نشان نداده است. درحالی که نتایج نشان می‌دهند که زمان هضم یک ساعت کافی است، زمان هضم ۳ ساعت برای روش نهایی انتخاب شد تا این احتمال را نیز تضمین کند که اختلاف در ساختارهای گوشت ممکن است نیازمند زمان‌های هضم طولانی‌تر باشد. سرانجام، در بررسی اثر دما بر هضم، اختلافی در قطر ذرات گسترده شده در بازه ۶۱ nm تا ۶۲ nm با انحراف استاندارد حدود ۰٫۵ نانومتر در همه موارد، مشاهده نشد.

هرچند غلظت جرمی ذره یک کاهش جزئی از 11.5 mg kg^{-1} در (دمای) ۲۷ درجه سانتیگراد به 9.0 mg kg^{-1} در (دمای) ۴۷ درجه سانتیگراد نشان می‌دهد، ولی دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای روش نهایی انتخاب شد. تأثیر عامل رقیق‌سازی با رقیق کردن هضم یک نمونه ۱٫۰ VL (از) ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ برابر آزموده شد. نتایج هیچ تاثیری روی غلظت جرمی و عددی ذره و روی میانگین اندازه ذره را نشان نداد. گزینش‌پذیری با استفاده از آنالیز ۲۱ نمونه شاهد گوشت جوجه، آشکارسازی کمتر از ۵ پیک در هر زمان روبش در همه وضعیت‌ها و قابل مقایسه بودن با یافته‌های UPW تعیین شد. نتایج عمل‌آوری داده‌ها با استفاده از توسعه صفحه محاسبه اکسل، غلظت‌های جرمی ذره را ذیل روش LOD برای تمامی ۲۱ نمونه شاهد نمایان می‌کند و قطرهای ذره‌ای را که به‌طور قابل توجهی کوچکتر از ذرات ۶۰ نانومتری مورد استفاده در این مطالعه هستند، نشان می‌دهد. بنابراین نویسندگان نتیجه گرفتند که این روش ویژه و انتخابی است. آزمایش‌های اضافی نشان داد که این روش قوی است و هضم‌ها به مدت ۳ هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد پایدار هستند. زمانی که رقیق‌سازی برای آنالیز ICP-MS تک ذره انجام می‌شود، پایداری محدود است.

پیوست ث

(آگاهی دهنده)

مروری بر روش‌های آشکارسازی جایگزین

ث-۱ کلیات

علاوه بر روش‌های انتخابی مشخصه‌یابی نانوشیء در بند ۷ این استاندارد، می‌توان روش‌های تحلیلی مختلف دیگری برای آشکارسازی نانواشیاء شناخته‌شده در ماتریس‌های پیچیده انتخاب کرد. هرچند، همه این روش‌ها قادر به مشخصه‌یابی کامل نانواشیاء موجود به معنی: شناسایی کردن، شمارش یا ویژگی اندازه نانواشیاء نیستند. کاربرد آن‌ها به وسیله اساس آشکارسازی آن‌ها (به‌طور مثال، خواص نوری، قطر هیدرودینامیکی، غلظت پایه‌ای، جنبش الکتریکی و غیره) به پارامترهای هدف بستگی دارد و می‌توانند برای ارزشیابی بازده روش آماده‌سازی نمونه از روشی مشابه توضیح ارائه‌شده در بند ۶ این استاندارد استفاده کنند.

با به‌کارگیری این روش‌ها، بازیابی ذره نیز (به‌عنوان مثال LIBD) همانند بازیابی خاصیت (به‌عنوان مثال توزیع اندازه، میزان ایزوتوپی) برای بازیابی متقابل توسعه داده‌های به‌دست آمده از روش‌های دیگر، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. بسیاری از این روش‌های توصیف‌شده در اینجا، هنوز در حال توسعه هستند و در انتظار پیشرفت‌هایی در ابزارهای تحلیلی یا طراحی ویژه نانوشیء (ردیاب) هستند. در جدول ث-۱ مروری بر روش‌های آشکارسازی جایگزین و کاربرد آن‌ها ارائه شده‌است.

جدول ت-۱- مروری بر تعداد محدودی از روش‌های جایگزین و کاربرد آن‌ها

معایب	مزایا	اطلاعات	آنچه که اندازه‌گیری می‌شود	روش
تمایز دشوار ذرات از مواد دیگر. ذره پراکننده ضعیف‌تر، ناچیز پنداشته می‌شود.	داده‌برداری سریع	توزیع اندازه تعدادپایه. (بازه ۳۰ nm تا ۱۰۰۰ nm وابسته به ضریب شکست نانواشیاء)	قطر هیدرودینامیکی	آنالیز ردیابی ذره (PTA) (به ت-۲ مراجعه شود)
فقدان اطلاعات اندازه؛ فقط میزان ایزوتوپی کلی به دست می‌آید.	توانایی استفاده جهت فهم مطالعات حتی در حضور غلظت‌های پس‌زمینه بیشتر	ردیابی شامل عناصری از نانواشیاء برچسب‌دار ایزوتوپی پایدار به‌عنوان میزان عنصری در غلظت‌های مرتبط (کم) (بازه ppb-ppt به جای بازه ppm)	میزان ایزوتوپی عنصری	روش‌های ردیابی با استفاده از نانواشیاء برچسب‌دار ایزوتوپی پایدار (به ت-۳ مراجعه شود)
دانش طیفی برای تفسیر مورد نیاز است.	داده‌برداری سریع	توزیع فضایی و مشخصات طیفی (۱۰ nm تا ۲۰۰ nm)	توانایی اندازه گرفتن و شناسایی نانواشیاء معین (UV-Vis)	سامانه تصویربرداری فراطیفی (HSIS) به‌وسیله پراکندگی در یک پس‌زمینه میدان-تاریک (به ت-۴ مراجعه شود)
توصیه می‌شود غلظت نانواشیاء موردنظر به اندازه کافی بالا باشد تا آشکارسازی شود. جهت‌گیری: اندازه‌گیری اندازه به‌عنوان تشدید پلاسمون سطحی به‌وسیله چندین عامل تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد.	درجا انجام می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یک آشکارساز پساتونی ^۱ برای اندازه‌گیری برخط استفاده شود.	طلا، نقره و مس (تقریباً ۱۰ nm)	اندازه‌گیری جذب UV-Vis برای اندازه‌گیری اندازه یا آشکارسازی	طیف‌نگاری UV-Vis (به زیربند ت-۵ مراجعه شود)

غلظت‌های بالای نمک ممکن است تولید هواسل را تحت‌تاثیر قرار دهد.	تعلیق‌ها می‌توانند معرفی شوند، اگرچه باید با استفاده از یک مولد هواسل افشانه الکتریکی (EAG) به‌صورت هواسل درآیند.	بازیابی اندازه (ارزیابی خاصیت) در یک بازه ۵ nm تا ۱۰۰۰ nm	اندازه‌شده از طریق تحرک الکتریکی شان (توانایی پیمایش در یک میدان الکتریکی)	اندازه‌گیری نانوآشیاء در مایعات با استفاده از سامانه آنالیز تحرک تفاضلی (DMAS) (به زیربند ث-۶ مراجعه شود)
هنوز به‌صورت تجاری به‌طور گسترده در دسترس نیست.	حساسیت بالا	اندازه (تقریباً ۵nm) و غلظت (بازه ngl^{-1})	روش آشکارسازی چندعنصری، اندازه ذره، آشکارسازی/ شمارش ذره،	آشکارسازی فروشکست القایی- لیزری (LIBD) (به زیربند ث-۷ مراجعه شود)
برهمکنش‌های فاز متحرک، برجذب عنصری برگشت‌ناپذیر	می‌تواند به‌صورت پسااستونی با آشکارسازهای متعددی جفت شود.	جداسازی اندازه (۵nm تا ۱۲۰۰nm) / اطلاعات عنصری	جداسازی اندازه/ اطلاعات عنصری	ICP-MS کروماتوگرافی هیدرودینامیکی (HDC) و ICP-MS اندازه‌گزین (SEC) (به زیربند ث-۷ مراجعه شود)

ث-۲ آنالیز ردگیری ذره (PTA)

آنالیز ردیابی ذره (PTA) یک روش میکروسکوپ-پایه بوده که قادر به شمارش و اندازه‌گیری نانوآشیاء در تعلیق‌های مایع رقیق‌شده است. هنگامی که ذرات به‌وسیله یک چشمه نور لیزری قوی روشن می‌شوند، می‌توان به‌دلیل پراکندگی نور مکان آن‌ها را مشاهده کرد. باریکه نور لیزر در یک صفحه عمود بر محور نوری میکروسکوپ قرار دارد، ذرات باعث پراکندگی نور شده و منجر به ایجاد نقاط روشن قابل آشکارسازی می‌شود. به دلیل حرکت براونی در محیط آبی، حرکت ذرات را می‌توان در طی یک دوره زمانی با استفاده از یک دوربین جفت‌شده بار (CCD) با حساسیت بالا ثبت کرد که امکان محاسبه ضریب نفوذ مربوط به قطر هیدرودینامیکی ذره را می‌دهد (رابطه استوکس - انیشتین). سپس از نرم‌افزار برای ردیابی حرکت هر کدام از ذرات از فریمی به فریم دیگر استفاده می‌شود. دقت اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی ذره تک با کل زمان ردیابی ذره، تعیین می‌شود. برای زمان طولانی‌تر ردیابی ذره، دقت اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیکی ذره- به ذره افزایش خواهد یافت. نرم‌افزار تخصصی پردازش داده با توجه ویژه به گذر زمان‌های بهینه‌شده مورد نیاز است و الگوریتم‌های ردیابی ذره هدف در هنگام ثبت را بهبود می‌بخشد.

علیرغم این واقعیت که PTA در بسیاری از آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، نیاز است که نتایج با دقت تفسیر شوند، زیرا این روش برای هر نانوشیء (وابسته به خاصیت نوری) به همان اندازه انتخابی نیست و از حساسیت کمتری برای قطرهای ذره کم‌تر (طلا و TiO_2 با قطر) ۲۵ nm تا ۳۰ nm را می‌توان مشاهده کرد، دیگر ذرات با ضریب شکست کم‌تر مشکل‌ساز هستند) برخوردار است. روش PTA برای آشکارسازی نانواشیاء در ماتریس‌های پیچیده، به‌عنوان مثال فاضلاب، اشکال دارد. در این ماتریس‌های پیچیده ذرات با پراکندگی ضعیف‌تر متمایز شده و ردیابی آن‌ها دشوارتر می‌شود.

روش PTA، اندازه‌های ذره هیدرودینامیکی نظری را از تعداد مرتبط آماری نانواشیاء شمارش می‌کند. ممکن است در مقایسه با ابعاد واقعی، انحرافات در دقت، به‌طور مثال برای ذرات با یک هندسه/ کرویت درهم‌ریخته، ظاهر شود. در چنین مواردی، یک کالیبراسیون با ترکیبات مرجع آزموده‌شده توصیه می‌شود. سخت‌افزار بسیار ساده PTA دلیل پیشرفت این روش است و مبتنی بر یک عنصر نوری فلزی، یک باریکه لیزر، یک میکروسکوپ نوری معمولی مجهز به دوربین رقمی (دیجیتال) و یک رایانه ردیابی/ پردازش داده است. هرچند، برای محاسبه قطر هیدرودینامیکی، لازم است پارامترهای دقیقی شناخته شده‌باشند؛ به‌عنوان مثال گرانروی حلال و دما که روی فرایند نهایی پردازش داده تأثیر دارند. این روش برای اندازه‌گیری ذرات بس‌پراکنه مناسب است و می‌تواند در طی مرحله آماده‌سازی نمونه برای ارزیابی خاصیت استفاده شود [72-77].

ث-۳ روش‌های ردیاب با استفاده از نانواشیاء برچسب‌دار ایزوتوپی پایدار

نانواشیاء برچسب‌دار ایزوتوپی برای مطالعات زی‌انباشت یا زیست‌محیطی پویا طراحی شده‌اند، که اندازه‌گیری‌ها برای تعیین مقدار ذره انباشته‌شده در ماتریس‌های پیچیده، مانند نمونه‌های بافت یا آب مورد نیاز است. برچسب زدن ایزوتوپی، تفاوت بین میزان عنصری پس‌زمینه و غلظت‌های عنصری تازه انباشته‌شده همانند ذرات یا نشأت گرفته از نانواشیاء برچسب‌دار را ممکن می‌سازد. با برچسب زدن ایزوتوپی نانواشیاء، یعنی با اصلاح ترکیب‌بندی ایزوتوپی، حتی در غلظت‌های زیست‌محیطی واقع‌بینانه (کم)، ردیابی عناصر آب شوی‌شده مطلوب امکان‌پذیر است.

داده تحلیلی می‌تواند با اندازه‌گیری غلظت‌های ایزوتوپی ویژه در نمونه به‌وسیله ICP-MS پس از هضم اسید به‌دست آید. با استفاده از غلظت‌های ایزوتوپی و مقایسه آن با فراوانی‌های ایزوتوپی طبیعی، می‌توان غلظت/ میزان عنصری ویژه نانوذره در هر ماتریس موردنظر را محاسبه کرد. هرچند هیچ عنصری نمی‌تواند بدین منظور مورد استفاده قرارگیرد، به‌منظور بهبود دقت اندازه‌گیری، توصیه می‌شود عنصر انتخاب بین دو ایزوتوپ انتخاب‌شده از نسبت بالایی برخوردار باشد. بنابراین، در عمل، عناصری همانند Ag، Zn و Cu با امکان ایجاد ردیاب‌هایی با نسبت ایزوتوپی افزایش‌یافته، می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (به‌عنوان مثال ذرات نقره‌ای پوشیده‌شده با سیترات با ^{109}Ag غنی‌شده ۹۹٪ دارای فراوانی طبیعی ۴۸/۲٪؛ ذرات ZnO با

٪ ۹۰ ^{67}Zn دارای فراوانی طبیعی ٪ ۴/۱؛ ذرات CuO با ^{65}Cu غنی شده ٪ ۹۹/۴ دارای فراوانی طبیعی ٪ ۳۰/۸. به عنوان یک مزیت، مس Cu و روی Zn به راحتی در طبیعت انباشته می شوند و عناصر مربوطه برای مطالعات پایش مواجهه هستند.

این روش تحلیلی مستلزم دانش پس زمینه ایزوتوپی در نمونه و ماده مرجع پایدار با نسبت های ایزوتوپی شناخته شده است. مزیت این روش این است که تقریباً هر ماتریس نمونه ای می تواند برای آنالیز شدن انتخاب شود، چون این روش از هضم اسید به عنوان مرحله آماده سازی نمونه استفاده می کند، حداقل اگر نیازی نباشد به تمایز بین ایزوتوپ های موجود در ذرات و ایزوتوپ هایی که به عنوان یون های محلول وجود دارند. توصیه می شود گزینش برای ایزوتوپ های انتخابی به وسیله کمینه احتمال متاثر شدن از تداخل های چنداتمی و هم فشار (جرم برابر) به صورت فزاینده ای تحریک شود. بنابراین، به منظور کاهش تداخل های چنداتمی توصیه می شود که از یک ابزار ICP-MS مجهز به محفظه برخورد و یا بهره مند از تفاوت انرژی جنبشی^۱ استفاده شود. استفاده از برچسب زدن ایزوتوپی پایدار نانو اشیاء به منظور مطالعه درک عناصر رها شده از نانوذرات مهندسی شده در محیط زیست و درون اندامگان در مقایسه با نانو اشیاء برچسب زده شده غیر ایزوتوپی از نظر حساسیت دارای مزایا است. به عنوان مثال با استفاده از ZnO (۲۰ nm) اصلاح شده با ^{67}Zn ، حدود آشکارسازی پایین تر قابل دستیابی است؛ $5000 \mu\text{g g}^{-1}$ برای مواجهه رژیم غذایی Zn به $15 \mu\text{g g}^{-1}$ افزایش یافت. با استفاده از نانو کره های CuO اصلاح شده با ^{65}Cu برای مطالعات زیست انباشتی^۲ در آب های شیرین، سطوح مس آشکارسازی شده حاصل از $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ تا $30 \mu\text{g l}^{-1}$ بهبود می یابد. قبلاً، این سطح آشکارسازی بدون ردیاب های برچسب زده شده ایزوتوپی در چنین غلظت هایی غیر ممکن بود (بازه بالاتر 1 mg l^{-1}) [78-80].

ث-۴ سامانه تصویربرداری فراطیفی (HSIS) به وسیله پراکندگی در پس زمینه میدان - تاریک

سامانه تصویربرداری فراطیفی (HSIS) یک روش میکروسکوپی است که نور پراکنده شده در ناحیه مرئی و فروسرخ نزدیک (VNIR) (۴۰۰ نانومتر تا ۱۰۰۰ نانومتر) را مشخصه یابی می کند. این نور از نانو اشیاء در یک پس زمینه میدان - تاریک می آید. HSIS نیاز به یک طیف سنج تصویربرداری فراطیفی قرار گرفته روی یک میکروسکوپ میدان - تاریک تقویت شده دارد. این طیف سنج بر اساس مختصات درخواست شده، پیکسل به پیکسل تصویر را آنالیز می کند که منجر به یک طول موج تعریف شده از نور پراکنده شده می شود (اطلاعات شیمیایی). هر پیکسل حاوی مشخصات طیفی و داده توزیع فضایی است که پس از پردازش تصویر می تواند به یک تصویر فراطیفی تبدیل شود. اطلاعات اندازه برای ذرات معین از طول موج های نور پراکنده شده آن ها و اصولاً بر اساس اثر پلاسمونیک استخراج می شود.

1 - Kinetic energy discrimination

2- Bioaccumulation

برای آشکارسازی و مشخصه‌یابی اندازه نانوذرات مهندسی‌شده در نمونه‌های آب فراخالص و پیچیده، HSIS می‌تواند همانند آب بوم‌سازگان تالاب شبیه‌سازی‌شده و فاضلاب استفاده شود. روش HSIS برای اندازه‌گیری‌ها در بازه ۱۰ نانومتر تا ۲۰۰ نانومتر قابل به‌کارگیری است [81-82].

ث-۵ ارزشیابی اندازه به‌وسیله طیف‌سنجی UV-Vis

طیف‌سنجی UV-Vis یک روش بسیار مفید است که به‌دلیل تشدیدهای پلاسمون سطحی (SPR) از چندین نانوشیء (به‌عنوان مثال طلا، نقره و مس)، تخمین اندازه‌های ذره را ممکن می‌کند. SPR نوسانات الکترون‌های باند رسانایی نانوشیء در پاسخ به امواج الکترومغناطیسی است که منجر به یک باند جذابی مشخصه در بازه UV-Vis می‌شود. جذابی دارای یک طول‌موج بیشینه (SPR_{max}) است که به اندازه نانوشیء بستگی دارد. به‌عنوان یک عامل بحرانی، این روش نیاز به تفسیر مناسبی از داده جذب SPR_{max} به‌دست‌آمده دارد به‌نحوی که نتیجه به‌وسیله عوامل چندگانه‌ای (خواص دی‌الکتریک محیط، برهم‌کنش‌های سطحی فیزیکی و شیمیایی، بار سطحی، فاصله بین ذره‌ای، شکل و انبوهش) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به‌طور کلی SPR_{max} با اندازه نانوشیء افزایش می‌یابد و برای اشیاء خارج از منطقه اندازه نانومتر ناپدید می‌شود. از آنجاکه طیف‌سنجی UV-Vis مستلزم یک آماده‌سازی نمونه زمانبر نیست، در صورتی که غلظت نانوشیء برای آشکارسازی به اندازه کافی بالا باشد می‌توان از این روش برای ماتریس‌های پیچیده استفاده کرد. این روش از اثرات ماتریس دستخوش تغییر می‌شود و در مورد مقادیر بالاتر کلوخه‌ای، سیگنال جذب می‌تواند منحرف شود [83-85].

ث-۶ اندازه‌گیری نانواشیاء در مایعات با استفاده از سامانه آنالیز تحرک تفاضلی (DMAS)

سامانه آنالیز تحرک تفاضلی (DMAS) روشی پیوندی است که یک طبقه‌بندی‌کننده تحرک تفاضلی (DMC; استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۸۳۰: سال ۱۳۸۹) [۱۰۲]، را به یک شمارنده ذره‌چگال (CPC; ISO 27891) ^۱ به‌عنوان آشکارساز جفت کرده‌است.

در ابتدا با استفاده از یک هواسل‌ساز افشانه الکتریکی (EAG) نانواشیاء از حالت یک تعلیق به یک هواسل باردار تبدیل می‌شوند. اصل این روش افشانه الکتریکی مبتنی بر مه‌پاشی تعلیق کلوئیدی است. این مه‌پاشی از طریق یک موینه است که هواسل باردار را در جریان گاز (به‌عنوان مثال هوا و CO_2) باقی‌مانده پس از تبخیر ذرات مایع (نانواشیاء) ایجاد می‌کند. این ذرات از طریق تحرک الکتریکی‌شان (توانایی پیمایش یک میدان الکتریکی) اندازه‌گیری می‌شوند که منجر به اندازه‌گیری قطر تحرک الکتریکی مربوطه (EMD) می‌شود. این عامل عملکرد اساسی در اندازه ذره است.

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۷۲۷: سال ۱۳۹۴، تراکم ذرات آبروسل - کالیبراسیون شمارشگرهای ذرات چگال‌شده، با استفاده از استاندارد ISO 27891:2015 تدوین شده‌است.

برای آشکارسازی نانوشیا در ماتریس‌های پیچیده، این روش از این مزیت برخوردار است که دقت مطلق آنالیز تحرکی اساساً مبتنی بر فیزیک و ریاضیات است. نظر به اینکه این روش مستقل از چگالی ذرات است، بنابراین هیچ کالیبراسیون اندازه و یا آنالیت‌های کالیبراسیون لازم نیست. پاسخ اندازه‌گیری شده ابزار، تحرک الکتریکی است که کاملاً متفاوت از پراکندگی نور معمول یا روش‌های حرکت نفوذی است. اندازه‌گیری اندازه تحت‌تأثیر به‌عنوان مثال حضور ذرات بزرگ یا حباب‌های هوا در کلئوئید قرار نمی‌گیرد. این روش نسبت به بسیاری از روش‌های دیگر به مقدار کمی از نمونه ($20 \mu\text{m}$) نیاز دارد و دارای توانایی آشکارسازی تغییرات کوچک در مقیاس توزیع اندازه است و در بازه اندازه معمول از 5 nm تا 1000 nm کارایی دارد. در نتیجه، این روش قادر به اندازه‌گیری دقیق بی‌نظمی‌ها در محلول‌های کلئوئیدی است و امکان آشکارسازی تغییرات کوچک در توزیع‌های اندازه را به‌دلیل سازوکارهایی همانند انحلال یا کلوخه‌سازی فراهم می‌آورد.

الگوریتم‌های پیچیده تصحیح داده برای اندازه‌گیری بسیار دقیق توزیع‌ها بر اساس جنبش الکتریکی نیاز نیست و به‌عنوان یک مزیت، هر اندازه‌گیری به‌طور کلی حاوی تعداد قابل‌توجهی از ذرات اندازه‌گیری شده است که یک توزیع نماینده اندازه را تدارک می‌بیند. توصیه می‌شود احتمال اینکه قطره‌ای حاوی دو یا چند ذره باشد، کم نگه داشته‌شود و بنابراین توصیه می‌شود نمونه‌های رقیق‌شده به‌طور متوسط، اندازه‌گیری شوند. به‌عنوان یک کنترل، چندین رقیق‌سازی می‌تواند اندازه‌گیری شود تا ظهور کلوخه‌های القاء‌شده بالقوه را تایید کند. علیرغم این حقیقت که چندین نانوشیء مانند Au ، Ag ، SiO_2 ، TiO_2 و Cu قابل‌سنجش و اندازه‌گیری هستند اما با این روش شناسایی مواد امکان‌پذیر نیست و روش مستقل از خواص نوری نانوشیء، وجود افزودنی‌ها (بافرها، پراکنده‌سازها و غیره) یا حلال‌های مورد استفاده/ارائه شده است. اگر نمونه حاوی غلظت بالایی از نمک‌های مختلف باشد، باید توجه ویژه‌ای شود زیرا این امر ممکن است در بازه افشانه الکتریکی تأثیر بگذارد. مه‌پاشی الکتریکی - DMAS می‌تواند برای ارزشیابی بازبایی توزیع اندازه طی مراحل آماده‌سازی نمونه یا مقایسه توزیع‌های به‌دست‌آمده اندازه از سه روش آشکارسازی و شناسایی انتخابی شرح داده‌شده در بند ۷ استفاده شود [86-92].

ث-۷ آشکارسازی فروشکست القایی - لیزری (LIBD)

آشکارسازی فروشکست القایی - لیزری (LIBD)، یک روش تحلیلی بر اساس وقایع منحصر به فرد پلاسمائی است که حین برخورد باریکه متمرکز لیزر پالسی به یک نانوشیء در حال عبور رخ می‌دهد. فرایند فروشکست ناشی از لیزر هنگامی اتفاق می‌افتد که یک نانوشیء جامد از میان حجم کانونی سلول نوری عبور می‌کند. در این مرحله گرمایش قوی نمونه منجر به احتراق یک گاز یونیزه‌شده گرم و درخشان (پلاσμα) می‌شود. پلاσμα با توجه به ترکیب‌بندی عنصری نانوشیء در حال عبور، نور گسیل می‌کند. لیزر متمرکز پالسی با یک جت مایع به‌عنوان یک افزاره نمونه‌گیری از تعلیق‌های نانوشیء ترکیب می‌شود. علاوه بر سامانه معرفی نمونه جت

مایع، همچنین روش‌های نمونه‌برداری رسوبی کووت^۱ یا فیلتر امکان‌پذیر است. با استفاده از حسگرهای صوتی (همانطور که نانواشیاء با انبساط انفجاری تبخیر می‌شوند) و دوربین‌های CCD (برای ثبت وقایع پلاسما) با اندازه‌گیری انرژی برخورد و پالس‌های لیزر، می‌توان رویدادهای منحصربه‌فرد پلاسما را ثبت کرد. ثبت این رویداد، با توجه به این که LIBD یک روش طیفی است، با استفاده از یک طیف‌سنج برای اندازه‌گیری طول‌موج‌های منتشرشده از عنصر خاص از یک میکرو-پلاسمای تولیدشده از لیزر انجام می‌شود. روش LIBD با استفاده از آشکارسازی طیف‌سنجی نشر، امکان آشکارسازی همزمان تمامی عناصر موجود در نانوشیء را فراهم می‌کند.

پارامتر اندازه‌گیری‌شده، احتمال فروشکست^۲ (BP) است که در واقع نسبت تعداد وقایع پلاسما به تعداد پالس‌های اعمال شده است. در BP (برای انرژی خاص لیزر)، همانند اندازه ذره به غلظت ذره نیز بستگی دارد. توصیه می‌شود، حتی با استفاده از یک چیدمان، انرژی لیزر اعمال‌شده براساس اندازه نانوشیء موردنظر تنظیم شود. با استفاده از LBS، نانواشیاء مختلف دارای احتمال‌های فروشکست متفاوتی هستند که منجر به استفاده توصیه‌شده از استانداردهای کالیبراسیون ویژه آنالیت هدف می‌شوند. BP برای ذرات بزرگ‌تر دارای حد آستانه‌ای در انرژی لیزر کم‌تر از نانو اشیاء کوچک‌تر است.

شیب‌های منحنی‌های انرژی BP به غلظت‌های معین نانوشیء ساخته‌شده به‌وسیله استانداردهای کالیبراسیون ویژه آنالیت هدف بستگی دارد. LIBD یک روش تخصصی است که هنوز به‌صورت تجاری در دسترس نیست و چندین نویسنده از چیدمان‌های مختلفی استفاده می‌کنند. تاکنون، علاوه بر نتایج نویدبخش، LIBD دارای پاسخ‌های مختلفی برای نانواشیاء متفاوت است، بنابراین، کالیبراسیون با پارامترهای بهینه‌شده برای عملکرد آن بسیار مهم است.

روش LIBD به عنوان روشی برای آشکارسازی نانوشیء بسیار نویدبخش است زیرا قادر اندازه‌گیری اندازه نانواشیاء است و غلظت ذره را در تعلیق‌ها اندازه‌گیری می‌کند. این روش این مزیت را دارد که برای ذرات کوچک حساس است و یک مرحله رقیق‌سازی نمونه به‌منظور ثبت سیگنال‌های نانوشیء به‌طور جداگانه الزامی است. به‌طور کلی، محدودیت‌های اندازه‌گذاری آشکارسازی در حدود ۵ nm با غلظت‌های جرم ذره در بازه 1 ng l^{-1} پیش‌بینی می‌شود [93-95].

ث-۸ ICP-MS کروماتوگرافی هیدرودینامیکی (HDC-ICP-MS) و ICP-MS اندازه‌گزين (SEC-ICP-MS)

کروماتوگرافی هیدرودینامیکی - (پلاسمای) جفت‌شده القایی - طیف‌سنجی جرمی (HDC-ICP-MS) برای مشخصه‌یابی نانواشیاء در ماتریس‌های آبی استفاده می‌شود و یک جایگزین نوظهور برای کروماتوگرافی

1- Cuvette

2 -Breakdown probability

اندازه‌گزین (SEC-ICP-MS) است که هر دو توزیع‌های اندازه نانوآشياء را ارائه می‌دهند. مزیت پیوند به ICP-MS، آن است که اطلاعات عنصری استوکيومتری و کیفی را ارائه می‌دهد. ستون HDC، ذرات را بر اساس شعاع هیدرودینامیکی‌شان از هم جدا می‌کند. ستون HDC موجود از مهره‌های غیرمتخلخل، مجراهای شاری را ایجاد می‌کند که در آن‌ها ذرات به‌وسیله سرعت شار و سرعت شار در اطراف ذره با بزرگترین ذره در اولین مرتبه از شویش از هم جدا می‌شوند. ذرات بزرگ‌تر به‌دلیل دافعه‌های استریکی به نواحی دیواره مجرا نزدیک نمی‌شوند و بنابراین در مقایسه با ذرات کوچک‌تر سرعت متوسط بالاتری خواهند داشت. روش SEC براساس تفاوت‌ها در حجم‌های هیدرودینامیکی نانوشیء بنا شده‌است. این روش با استفاده از مهره‌های متخلخل فشرده‌شده با فاز ثابت (که در آن تخلخل‌ها، ذرات را بر اساس اندازه و شکل خود حفظ می‌کنند) عمل می‌کند.

برخی از مشکلات ذاتی ممکن است با SEC و HDC به‌دلیل واجذب غیرقابل بازگشت نانوآشياء به مرحله فاز ثابت یا انبوهه ذره با بازیابی (اندازه) ضعیف به‌عنوان یک نتیجه ایجاد شود؛ هرچند، ممکن است با افزودن مواد سطح‌فعال در فاز متحرک شمارش‌شده با تفکیک‌پذیری جدایش کاهش‌یافته اجتناب شود. علاوه بر ICP-MS، این روش‌های جداسازی را می‌توان به‌صورت پاستونی با سایر آشکارسازها، به‌عنوان مثال UV-Vis جفت کرد [96-100].

کتابنامه

- [1] Retamal Marín R. R., Babick F., Stintz M., Physico-chemical separation process of nanoparticles in cosmetic formulations. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 838 (2017), 012004 (4 pp.); doi: 10.1088/1742- 6595 /838/1/012004
- [2] LINSINGER T., ROEBBEN G., SOLANS C., RAMSCH R. Reference materials for measuring the size of nanoparticles. *Trends Analyt. Chem.* 2011, **30** (1) pp. 18–27
- [3] VON DER KAMMER F., FERGUSON P.L., HOLDEN P.A., MASION A., ROGERS K.R., KLAINÉ S.J. et al. Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012, **31** pp. 32–49
- [4] RETAMAL MARÍN R.R., BABICK F., STINTZ M. Ultrasonic Dispersion of nanostructured materials with probe sonication - Practical aspects of sample preparation. *Powder Technol.* 2017, **318C** pp. 451–458. DOI:10.1016/j.powtec.2017.05.049
- [5] BABICK F. Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates. Particle Technology Series: Springer Verlag GmbH, Heidelberg (2016). - ISBN 978-3-319-30661-2, doi:10.1007/978-3-319-30663-6
- [6] Horwitz W., Albert R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J. AOAC Int.* 2006, **89** pages.1095-1109
- [7] THOMPSON M. The amazing Horwitz function. *AMC Technical Brief.* 2004, **17** pp. 1–2
- [8] CURRIE L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Chem.* 1995, **67** pp. 1699–1723
- [9] HASSELLÖV M., READMAN J.W., RANVILLE J.F., TIEDE K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology.* 2008, **17** (5) pp. 344–361
- [10] v.d. Kammer F., Baborowski M., Friese, K. Application of HPLC fluorescence detector as a nephelometric turbidity detector following field-flow fractionation to analyse size distributions of environmental colloids. 2005. *Journal of Chromatography A*, **1100** pages 81-89
- [11] MEERMAN B. Field flow fractionation coupled to ICP-MS: separation at the nanoscale, previous and recent application trends. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, **407** pp. 2665–2674
- [12] Bartczak D., Vincent P., Goenaga-Infante H. Determination of Size- and Number-Based Concentration of Silica Nanoparticles in a Complex Biological Matrix by Online Techniques. *Analytical Chemistry.* 2015, **87** (11) pages 5482-5485
- [13] DE TEMMERMAN P.-J., LAMMERTYN J., DE KETELAERE B., KESTENS V., ROEBBEN G., VERLEYSSEN E. et al. Measurement uncertainties of size, shape, and surface measurements using transmission electron microscopy of near-monodisperse, near-spherical nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2014, **16** (1) pp. 1–22
- [14] DE TEMMERMAN P.-J., VERLEYSSEN E., LAMMERTYN J., MAST J. Size measurement uncertainties of nearmonodisperse, near-spherical nanoparticles using transmission electron microscopy and particle-tracking analysis. *J. Nanopart. Res.* 2014, **16** (10) pp. 1–17
- [15] MERKUS H.G. Particle size measurements: fundamentals, practice, quality. Pijnacker. Springer, 2009, 533 p.
- [16] MASUDA H., GOTOH K. Study on the sample size required for the estimation of mean particle diameter. *Adv. Powder Technol.* 1999, **10** (2) pp. 159–173
- [17] STIRLING J., CURRY A., EYDEN B. Diagnostic Electron Microscopy: A Practical Guide to Tissue Preparation and Interpretation. John Wiley & Sons, 2012
- [18] DE TEMMERMAN P.-J., VAN DOREN E., VERLEYSSEN E., VAN DER STEDE Y., FRANCISCO M., MAST J. Quantitative characterization of agglomerates and aggregates of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanomaterials by transmission electron microscopy. *J. Nanobiotechnology.* 2012, **10** (24)

- [19] VERLEYSSEN et al. Quantitative characterization of aggregated and agglomerated titanium oxide nanomaterials by transmission electron microscopy. *Powder Technol.* 2014, **258** pp. 180–188
- [20] KAISER D.L., WATTERS R.L. Reference Material 8012: Gold Nanoparticles, Nominal 30 nm Diameter. In: Report of Investigation. National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, 2007
- [21] KAISER D.L., WATTERS R.L. Reference Material 8011: Gold Nanoparticles, Nominal 10 nm Diameter. In: Report of Investigation. National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, 2007
- [22] KAISER D.L., WATTERS R.L. Reference Material 8013: Gold Nanoparticles, Nominal 60 nm Diameter. In: Report of Investigation. National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD, 2007
- [23] LIENEMANN C.-P., HEISSENBERGER A., LEPPARD G.G., PERRET D. Optimal preparation of water samples for examination of colloidal material by transmission electron microscopy. *Aquat. Microb. Ecol.* 1998, **14** pp. 205–213
- [24] FRANKEN L.E., BOEKEMA E.J., STUART M.C.A. Transmission electron microscopy as a tool for the characterization of soft materials: application and interpretation. *Adv. Sci.* 2017, **•••** p. 1600476
- [25] LABORDA F., BOLEA E., JIMÉNEZ-LAMANA J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. *Anal. Chem.* 2014, **86** pp. 2270–2278
- [26] MCCARTHY J., DEGUELDRE C. Characterisation of Environmental Particles. Chapter 6. Lewis Publishers, Chelsea, MI, Vol. 2, 1993, pp. 247–315.
- [27] PACE H.E., ROGERS N.J., JAROLIMEK C., COLEMAN V.A., HIGGINS C.P., RANVILLE J.F. Determining transport efficiency for the purpose of counting and sizing nanoparticles via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2011, **83** pp. 9361–9369
- [28] SCHEFFER A., ENGELHARD C., SPERLING M., BUSER W. ICP-MS as a New Tool for the Determination of Gold Nanoparticles in Bioanalytical Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, **390** pp. 249–252
- [29] YU L., ANDRIOLA A. Quantitative gold nanoparticle analysis methods: A review. *Talanta.* 2010, **82** pp. 869–875
- [30] SUZUKI Y., SATO H., HIKIDA S., NISHIGUCHI K., FURUTA N. Real-time monitoring and determination of Pb in a single airborne nanoparticle. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, **25** pp. 947–949
- [31] LABORDA F., JIMENEZ-LAMANA J., BOLEA E., CASTILLO J.R. Selective identification, characterization and determination of dissolved silver (I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, **26** pp. 1362–1371
- [32] MITRANO D.M., LESHNER E.K., BEDNAR A., MONSERUD J., HIGGINS C.P., RANVILLE J.F. Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 2011, **719**. DOI:10.1002/etc
- [33] GRAY E.P., COLEMAN J.G., BEDNAR A.J., KENNEDY A.J., RANVILLE J.F., HIGGINS C.P. Extraction and analysis of silver and gold nanoparticles from biological tissues using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 2013, **47** (24) pp. 14315–14323
- [34] PETERS R.J.B., HERRERA-RIVERA Z., VAN BEMMEL G., MARVIN H.J.P., WEIGEL S., BOUWMEESTER H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, **406** (16) pp. 3875–3885
- [35] LINSINGER T.P.J., PETERS R., WEIGEL S. International interlaboratory study for sizing and quantification of Ag nanoparticles in food simulants by single-particle ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, **406** pp. 3835–3843
- [36] PETERS R.J.B., HERRERA-RIVERA Z., BOUWMEESTER H., WEIGEL S., MARVIN H.J.P. Advanced analytical techniques for the measurement of nanomaterials in complex samples: a comparison. *Qual. Assur. Saf. Crops Foods.* 2014, **6** pp. 281–290

- [37] PETERS R., HERRERA-RIVERA Z., UNDAS A., VAN DER LEE M., MARVIN H., BOUWMEESTER H. et al. Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *J. Anal. At. Spectrom.* 2015, **30** pp. 1274–1285
- [38] STEPHAN C., NEUBAUER K. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Understanding How and Why. White paper (application note). www.perkinelmer.com, 2014
- [39] SANNAC S. Single particle analysis of nanomaterials using the Agilent 7900 ICP-MS. Application note. www.agilent.com, 2014
- [40] BOROVINSKAYA O., HATTENDORF B., TANNER M., GSCHWIND S., GÜNTHER D. A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets. *J. Anal. At. Spectrom.* 2013, **28** pp. 226–233
- [41] AURELI F., D'AMATO M., DE BERARDIS B., RAGGI A., TURCO A.C., CUBADDA F.J. Investigating agglomeration and dissolution of silica nanoparticles in aqueous suspensions by dynamic reaction cell inductively coupled plasma-mass spectrometry in time resolved mode. *Anal. At. Spectrom.* 2012, **27** pp. 1540–1548
- [42] LEE S., BI X., REED R.B., RANVILLE J.F., HERCKES P., WESTERHOFF P. Nanoparticle size detection limits by single particle ICP-MS for 40 elements. *Environ. Sci. Technol.* 2014, **48** pp. 10291–10300
- [43] CURRIE L.A. Limits for qualitative detection and quantitative determination. *Anal. Chem.* 1968, **40** (3) pp. 586–593
- [44] LABORDA F., JIMÉNEZ-LAMANA J., BOLEA E., CASTILLO J.R. Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *Anal. At. Spectrom.* 2013, **28** pp. 1220–1232
- [45] DEGUELDRE C., FAVALGER P.Y., ROSSÉ R., WOLD S. Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta.* 2006, **68** pp. 623–628
- [46] AESCHLIMAN D.B., BAJIC S.J., BALDWIN D.P., HOUK R.S. High-speed digital photographic study of an inductively coupled plasma during laser ablation: Comparison of dried solution aerosols from a microconcentric nebulizer and solid particles from laser ablation. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, **18** pp. 1008–1014
- [47] GARCIA C.C., MURTAZIN A., GROH S., HORVATIC V., NIEMAX K. Characterization of single Au and SiO₂ nano- and microparticles by ICP-OES using monodisperse droplets of standard solutions for calibration. *J. Anal. At. Spectrom.* 2010, **25** pp. 645–653
- [48] MURPHY K.E., LIU J., MONTORO BUSTOS A.R., JOHNSON M.E., WINCHESTER M.R. Characterization of nanoparticle suspensions using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. NIST Special Publication 1200-21, version 1.0, December 2015, available at <http://dx.doi.org/10.6028/NIST.SP.1200-21>, last visited 31-05-2016
- [49] GROMBE R., ALLMAIER G., CHAROUD-GOT J., DUDKIEWICZ A., EMTEBORG H., HOFMANN T. et al. Feasibility of the development of reference materials for the detection of Ag nanoparticles in food: neat dispersions and spiked chicken meat. *Anal. Chim. Acta.* 2014, **20** (1) pp. 3–16
- [50] DAN Y., SHI H., STEPHAN C., LIANG X. Rapid analysis of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Microchem. J.* 2015, **122** pp. 119–126
- [51] <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/rikilt/Software-and-downloads.htm>
- [52] Klein C.L., Comero S., Stahlmecke B., Romazanov J., Kuhlbusch T.A.J., Van Doren E., De Temmerman P-J, Mast J., Wick P., Krug H.F. et al. NM-Series of representative manufactured nanomaterials: NM-300 silver - Characterisation, stability, homogeneity - 2011. In: JRC Scientific and Technical Reports; 2011: 86
- [53] MAST J., DEMEESTERE L. Electron tomography of negatively stained complex viruses: application in their diagnosis. *Diagn. Pathol.* 2009, **4** p. 5
- [54] MCMAHON M., LOPEZ R., MEYER H., FELDMAN L., HAGLUND R. JR. Rapid tarnishing of silver Nanoparticles in Ambient Laboratory Air. *Appl. Phys. B.* 2005, **80** pp. 915–921

- [55] DE TEMMERMAN P.-J., VAN DOREN E., VERLEYSSEN E., VAN DER STEDE Y., FRANCISCO M., MAST J. Quantitative characterization of agglomerates and aggregates of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanomaterials by transmission electron microscopy. *J. Nanobiotechnology*. 2012, **10** (24)
- [56] VERLEYSSEN E., DE TEMMERMAN P.-J., VAN DOREN E., ABI DAOUD FRANCISCO M., MAST J. Quantitative characterization of aggregated and agglomerated titanium oxide nanomaterials by transmission electron microscopy. *Powder Technol.* 2014, **258** pp. 180–188
- [57] DE TEMMERMAN P.-J., LAMMERTYN J., KETELAERE B., KESTENS V., ROEBBEN G., VERLEYSSEN E. et al. Measurement uncertainties of size, shape, and surface measurements using transmission electron microscopy of near-monodisperse, near-spherical nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* 2013, **16** (1) pp. 1–22
- [58] ASTM. Standard Practice for Calibrating the Magnification of a Scanning Electron Microscope. ASTM INTERNATIONAL, 2014, pp. 6.
- [59] VERLEYSSEN E., VAN DOREN E., WAEGENEERS N., DE TEMMERMAN P.-J., ABI DAOUD FRANCISCO M., MAST J. TEM and SP-ICP-MS analysis of the release of silver nanoparticles from decoration of pastry. *J. Agric. Food Chem.* 2015, **63** (13) pp. 3570–3578. DOI:10.1021/acs.jafc.5b00578
- [60] EC: Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Official Journal of the European Union 2011(275):38-40
- [61] KRUMBEIN AND SLOSS. Stratigraphy and Sedimentation. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA, 1963
- [62] DE TEMMERMAN P.-J., VERLEYSSEN E., LAMMERTYN J., MAST J. Size measurement uncertainties of nearmonodisperse, near-spherical nanoparticles using transmission electron microscopy and particle-tracking analysis. *J. Nanopart. Res.* 2014, **16** (10) pp. 1–17
- [63] PETERS R.J.B., HERRERA-RIVERA Z., VAN BEMMEL G., MARVIN H.J.P., WEIGEL S., BOUWMEESTER H. Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, **406** (16) pp. 3875–3885
- [64] Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of analytical methods and the interpretation of results. Decision 2002/657/EC. Official Journal of the European Communities L 221/8. 2002
- [65] HELSPER J.P., PETERS R.J., BROUWER L., WEIGEL S. Characterisation and quantification of liposometype nanoparticles in a beverage matrix using hydrodynamic chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, **405** pp. 1181–1189
- [66] WEIR A., WESTERHOFF P., FABRICIUS L., HRISTOVSKI K., VON GOETZ N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* 2012, **46** pp. 2242–2250
- [67] LIU J., HURT R.H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.* 2010, **44** pp. 2169–2175
- [68] LIU J., PENNELL K.G., HURT R.H. Kinetics and mechanisms of nano-silver oxysulfidation. *Environ.Sci. Technol.* 2011, **45** pp. 7345–7353
- [69] KAEGI R., VOEGELIN A., SINNET B., ZULEEG S., HAGENDORFER H., BURKHARDT M. et al. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 2011, **45** pp. 3902–3908
- [70] RAVINDRAN A., SINGH A., RAICHUR A.M., CHANDRASEKARAN N., MUKHERJEE A. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with bovine serum albumin (BSA). *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2010, **76** pp. 32–37
- [71] PETERS R., HELSPER H., WEIGEL S. (2011) NanoLyse EU project. nanoparticles in food: analytical methods for detection and characterisation. Deliverable D4.1a. Sampling of nanoparticles: Relation between sample size and sampling error. <http://www.nanolyse.eu/default.aspx>

- [72] FILIPE V., HAWE A., JISKOOT W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* 2010, **27** (5) pp. 796–810
- [73] KESTENS V., BOZATZIDIS V., DE TEMMERMAN P.J., RAMAYE Y., ROEBBEN G. Validation of a particle tracking analysis method for the size determination of nano- and microparticles. *J. Nanopart. Res.* 2017, (19) p. 271
- [74] LINSINGER T., ROEBBEN G., GILLILAND D., CALZOLAI L., ROSSI F., GIBSON N. et al. 2012. Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term “nanomaterial”. Joint Research Centre of the European Commission. EUR 25404 EN, <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC73260>
- [75] Malloy A., Carr B. Nanoparticle tracking analysis – the Halo System. *Particle and Particle systems characterization.* 2006, **23**(2) pages 197-204
- [76] SAVEYN H., BAETS B.D., THAS O., HOLE P., SMITH J.V.D., MEEREN P. Accurate particle size distribution determination by nanoparticle tracking analysis based on 2-D Brownian dynamics simulation. *J. Colloid Interface Sci.* 2010, **352** pp. 593–600
- [77] Gallego-Urrea J.A., Tuoriniemi J., Hassellöv M. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2011, **30**(3) pages 473-483
- [78] DYBOWSKA A.D., CROTEAU M.-N., SUPERB K., BERHANU D., SAMUEL N., O'BRIEN C.P. et al. Synthesis of isotopically modified ZnO nanoparticles and their potential as nanotoxicity tracers. *Environ. Pollut.* 2011, **159** (1) pp. 266–273
- [79] DYBOWSKA A.D., MISRA S.K., BERHANU D., CROTEAU M.-N., LUORMA S., VALSAMI-JONES E. Stable isotope labelling - a way forward for enhanced detection in monitoring exposure to nanoparticles. 9th International Symposium on Environmentally Geochemistry
- [80] MISRA S.K., DYBOWSKA A.D., BERHANU D., CROTEAU M.-N., LUOMA S.N., BOCCACCINI A.R. et al. Isotopically modified nanoparticles for enhanced detection in bioaccumulation studies. *Environ. Sci. Technol.* 2012, **46** (2) pp. 1216–1222
- [81] BADIREDDY A.R., WIESNER M.R., LIU J. Detection, characterization, and abundance of engineered nanoparticles in complex waters by hyperspectral imagery with enhanced darkfield microscopy. *Environ. Sci. Technol.* 2012, **46** (18) pp. 10081–10088
- [82] Tseng TY., Lai PJ. Sung KB. High-throughput detection of immobilized plasmonic nanoparticles by a hyperspectral imaging system based on Fourier transform spectrometry. *Opt Express.* 2011, **19**(2) pages 1291-1300
- [83] AMENDOLA V., MENEGHETTI M. Size evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C.* 2009, **113** pp. 4277–4285
- [84] ASHARANI P.V., WU Y.L., GONG Z., VALIYAVEETIL S. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology.* 2008, **19** p. 255102
- [85] DANIEL M.C., ASTRUC D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size related properties, and applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* 2004, **104** (1) pp. 293–346
- [86] KAUFMAN S.L., SKOGEN J.W., DORMAN F.D., ZARRIN F., LEWIS K.C. Macromolecule Analysis Based on Electrophoretic Mobility in Air: Globular Proteins. *Anal. Chem.* 1996, **68** pp. 1895–1904
- [87] ELZEY S., GRASSIAN V.H. Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *J. Nanopart. Res.* 2010, **12** (5) pp. 1945–1958
- [88] ELZEY S., GRASSIAN V.H. Nanoparticle Dissolution from the Particle Perspective: Insights from Particle Sizing Measurements. *Langmuir.* 2010, **26** (15) pp. 12505–12508
- [89] ABBAS Z., HOLMBERG J.P., HELLSTRÖM A.K., HAGSTRÖM M., BERGENHOLTZ J., HASSELLÖV M. et al. Synthesis, characterization and particle size distribution of TiO₂ colloidal nanoparticles. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2011, **384** (1-3) pp. 254–261

- [90] GRASSIAN V.H. When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments. *J. Phys. Chem. C.* 2008, **112** (47) pp. 18303–18313
- [91] INCORPORATED T.S.I. 2012. Sizing nanoparticles and macromolecules in liquids using an electrospray and scanning mobility particle sizer™ spectrometer. Application note: es-001. www.TSI.com
- [92] EFTHYMIOS A.K., SPIROS A.P. Size and elemental composition of nanoparticles using ion mobility spectrometry with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, **27** pp. 21–24
- [93] THANG N.M., KNOPP R., GECKEIS H., KIM J.I., BECK H.P. Detection of nanocolloids with flow-field flow fractionation and laser-induced breakdown detection. *Anal. Chem.* 2000, **72** (1) pp. 1–5
- [94] LÓPEZ-SERRANO A., MUÑOZ OLIVAS R., SANZ LANDALUZZA J., CÁMARA C. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. *Anal. Methods.* 2014, **6** pp. 38–56
- [95] AMODEO T., DUTOUQUET C., LE BIHAN O., ATTOUI M., FREJAFON E. On-line determination of nanometric and sub-micrometric particle physicochemical characteristics using spectral imaging-aided Laser-Induced Breakdown Spectroscopy coupled with a Scanning Mobility Particle Sizer. *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.* 2009, **64** pp. 1141–1152
- [96] HASSELLÖV M., READMAN J.W., RANVILLE J.F., TIEDE K. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology.* 2008, **17** (5) pp. 344–361
- [97] Influence of dispersion agents on particle size and concentration determined by laser-induced breakdown detection. *Spectrochim. Acta B At. Spectrosc.* 2015, **103** pp. 92–98. Available at: Fedotova N. and Kaegi R. and Koch J. and Günther D.
- [98] TIEDE K., BOXALL A.B.A., TEAR S.P., LEWIS J., DAVID H., HASSELOV M. *Food Addit. Contam.* 2008, **25** (7) pp. 795–821
- [99] BLOM M., CHMELA E., OOSTERBROEK R., TIJSEN R., VAN DEN BERG A. On-chip hydrodynamic chromatography separation and detection of nanoparticles and biomolecules. *Anal. Chem.* 2003, **75** pp. 6761–6768
- [100] Williams A., Varela E., Meehan E., Tribe K. Characterisation of nanoparticulate systems by hydrodynamic chromatography. *International Journal of Pharmaceutics.* 2002, 242(1–2) pages 295–299
- [101] ISO 5725-2, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method
- یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۴۲-۲: سال ۱۳۸۴، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری - قسمت دوم - روش پایه برای تعیین تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش اندازه‌گیری استاندارد، با استفاده از استاندارد ISO 5725-2: 1994 تدوین شده است
- [۱۰۲] استاندارد ملی ایران شماره ۱۳۸۳۰: سال ۱۳۸۹، تعیین توزیع اندازه ذره - تحلیل قابلیت حرکت الکتریکی تفاضلی برای ذرات ابروسل
- [103] ISO 22412, Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS)
- یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۲۴۷: سال ۱۳۹۶، آنالیز اندازه ذره - پراکندگی نور دینامیک (DLS) با استفاده از استاندارد ISO 22412:2017 تدوین شده است.
- [104] ISO 27891, Aerosol particle number concentration — Calibration of condensation particle counters

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۷۲۷: سال ۱۳۹۴، تراکم تعداد ذرات آيروسسل - کالیبراسیون شمارشگرهای ذرات چگال شده با استفاده از استاندارد ISO 27891:2015 تدوین شده است.

- [105] EN ISO 17034, General requirements for the competence of reference material producers (ISO 17034)
[106] ISO/TS 19590, Nanotechnologies — Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۲۲۳۲۶: سال ۱۳۹۶، فناوری نانو- توزیع اندازه و غلظت نانوذرات معدنی در محیط آبی با استفاده از طیفسنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی تک ذره‌ای با استفاده از استاندارد ISO/TS 19590:2017 تدوین شده است.

- [107] ISO Guide 30:2015, Reference materials — Selected terms and definitions
[108] ISO Guide 31, Reference materials — Contents of certificates, labels and accompanying documentation
[109] ISO Guide 35, Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability
[110] ISO/IEC Guide 99:2007, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM)
[111] EN ISO 11885, Water quality — Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (ISO 11885)

یادآوری - استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۸۴۸: سال ۱۳۸۷، کیفیت آب- اندازه‌گیری عناصر انتخاب شده به روش اسپکترومتری نشر نوری با پلاسمای جفت شده القایی با استفاده از استاندارد ISO 11885: 2007 تدوین شده است.

- [112] EN ISO 17294-1, Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 1: General guidelines (ISO 17294-1)

یادآوری - استاندارد ملی ایران ۱-۱۴۹۴۵: سال ۱۳۹۲، کیفیت آب- کاربرد طیفسنجی جرمی پلاسمای جفت شده القایی - قسمت ۱: راهنمایی‌های کلی با استفاده از استاندارد ISO 17294-1: 2004 تدوین شده است.

- [113] ISO 19430, Particle size analysis — Particle tracking analysis (PTA) method