

„CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA METODELOR DE MĂSURARE A NANOPARTICULELOR PRIN MICROSCOPIE ELECTRONICĂ ÎN CADRUL PROIECTULUI DE CERCETARE: JRP T3 J1.1- TRACEABLE CHARACTERISATION OF NANOPARTICLES SIZE” - proiect cofinanțat din fonduri europene iMERA PLUS

„SOME CONTRIBUTIONS ON THE DEVELOPMENT OF THE ELECTRONIC MICROSCOPY METHODS OF NANOPARTICLES IN THE FRAME OF RESEARCH PROJECT JRP T3 J1.1- TRACEABLE CHARACTERISATION OF NANOPARTICLES SIZE”-project co-financed from the European iMERA PLUS funds

Alexandru DUȚĂ, Steluța DUȚĂ

INSTITUTUL NAȚIONAL DE METROLOGIE
NATIONAL INSTITUTE OF METROLOGY

Rezumat: *Lucrarea prezintă câteva rezultate obținute în cadrul proiectului iMERA-Plus JRP T3 J1.1 “Traceable characterisation of nanoparticles size” referitoare la dezvoltarea și utilizarea metodelor de măsurare prin microscopie electronică pentru caracterizarea metrologică a nano-particulelor de diferite mărimi și forme. Sunt prezentate rezultatele cercetărilor obținute de INM prin microscopie electronică de transmisie (TEM) și prin microscopie electronică de scanare (SEM). Materialele supuse investigațiilor au fost obținute de la NIST, IRMM și DUKE și sunt pe bază de aur, silice și polistiren. După dezvoltarea metodelor de măsurare, într-un exercițiu de comparare interlaboratoare organizat între șapte parteneri ai proiectului, au fost comparate rezultatele măsurărilor obținute de participanți prin utilizarea metodei de măsurare dezvoltată de fiecare partener în etapa anterioară a proiectului. Intervalul de măsurare investigat, în nanometri, a fost de la 10 nm la 200 nm folosind următoarele tehnici AFM, DLS, SAXS, SEM și TSEM etc. În total, au fost raportate un număr de 48 rezultate independente. Compatibilitatea rezultatelor a fost evaluată utilizând criteriul Birge, testul statistic Birge precum și scorul En ($|En_{95}| \leq 1$). Ca urmare a comparării interlaboratoare, s-a stabilit o valoare de referință și incertitudinea asociată acesteia pentru fiecare tip de material investigat, valori de referință care să permită compararea rezultatelor tuturor metodelor utilizate. Lucrarea de față prezintă rezultatele raportate de INM în cadrul comparării interlaboratoare și compararea lor cu rezultatele raportate de ceilalți parteneri ai proiectului.*

Cuvinte cheie: *Microscopie electronică, Microscopie electronică prin transmisie (TEM), Microscopie electronică prin scanare (SEM), Metrologia nanoparticulelor, Comparări interlaboratoare*

Abstract: *This paper presents some results within iMERA-Plus project JRP T3 J1.1 “Traceable characterisation of nanoparticles size” regarding the development and use of electronic microscopy techniques for traceable characterisation of different size and shape nanoparticles. The materials under investigation are gold, silica and polystyrene materials which are provided by NIST, IRMM and DUKE. INM results by TEM (Transmission Electron Microscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy) techniques are discussed. After methods development, an inter-laboratories comparison exercise was organized between seven project partners, the results obtained by all participants were compared, each national institute used its own previous developed method. The nanoscale range investigated was from 10 nm to 200 nm by various available techniques AFM, DLS, SAXS, SEM, and TSEM etc. In total 48 independent results were reported by all partners involved in the inter-laboratory comparison. The data consistency was verified using the Birge criterion, the statistical Birge test as well as the En score ($|En_{95}| \leq 1$). A reference value within the associated uncertainty was provided in such a way to allow the cross-comparison between the measurement methods used applied. This paper presents the INM results reported in the interlaboratory comparison exercise as well as all project partners' results.*

Key words: *Electron microscopy techniques, Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning Electron Microscopy (SEM), Nanoparticles Metrology, Interlaboratory comparisons*

1. INTRODUCERE

Nano-particulele sunt folosite astăzi într-o gamă largă de aplicații (de exemplu, sunt conținute în vopsele, loțiuni, haine de protecție, medicamente, etc). Există discuții referitoare la posibile efecte periculoase ale nano-particulelor asupra sănătății omului și/sau mediului, discuții ce privesc în egală măsură și standardizarea în domeniul nano-particulelor, elaborarea legislației corespunzătoare, și, fără îndoială aspecte de măsurare, adică metrologia nano-particulelor. În acest sens, datorită dezvoltării micro și nano-tehnologiilor, metrologia dimensională a nano-particulelor este considerată a fi o prioritate în domeniu. În acest context, Uniunea Europeană, în cadrul Programul Cadru 7 (FP7), prin proiectul EURAMET iMERA Plus: JRP T3 J1.1 “Traceable characterisation of nanoparticles size” a susținut și finanțat inițiativa mai multor institute naționale de metrologie europene, care și-au unit eforturile lor științifice și tehnice pentru a studia și dezvolta metode de măsurare trasabile pentru măsurarea dimensiunii și formei nano-particulelor, metode prin care să se asigure comparabilitatea rezultatelor măsurărilor furnizate de acestea.

2. PARTENERIAT ȘI OBIECTIVELE PROIECTULUI

Proiectul de cercetare științifică comun „T3 J1.1 Caracterizarea trasabilă a nano-particulelor” a fost derulat de opt institute naționale de metrologie, membre EURAMET, în cadrul programului European iMERA Plus.

Consortiul proiectului a fost format numai din institute naționale de metrologie, și anume:

- NPL - Laboratorul Național de Fizică, Regatul Unit al Marii Britanii, coordonator de proiect;
- PTB - Institutul Federal de Fizică Tehnică, Germania;
- CMI - Institutul Ceh de Metrologie, Republica Cehă ;
- METAS - Institutul Federal de Metrologie, Elveția;
- INRIM - Institutul Național de Cercetare în Metrologie, Italia;
- BRML – INM - Biroul Român de Metrologie Legală-Institutul Național de Metrologie, România;
- CEM - Centrul Spaniol de Metrologie, Spania;
- MIKES - Centrul de Metrologie și Acreditare, Finlanda.

Obiectivul general al proiectului este de a dezvolta metode trasabile de măsurare a

1. INTRODUCTION

The nanoparticles are already in use today in a large series of applications (e.g. there are nanoparticles paints containing nanoparticles, lotions, protective clothes, drugs, etc). There is public discussion on possible hazardous effects of nanoparticles on the human health and/or environment, which has to be equally addressed to standardisation in the nanoparticles field, to the adequate legislation in place, and, for sure to the measurement aspects, therefore, to the nanoparticles metrology. In this frame due to the micro- and nano- technologies development, the nanoparticles dimensional metrology is considered a priority in the field. As a consequence of these aspects, the European Union in the frame of the Seventh Framework Programme by the EURAMET iMERA-Plus project: “Traceable characterization of nanoparticles size” was supported and funded the initiative of more European national institutes of metrology in their scientific and technical efforts to study and develop traceable measurement methods for size and shape nanoparticles investigations, the methods which could ensure the comparability of their measurement results.

2. JRP T3 J1.1-CONSORTIUM AND PROJECT OBJECTIVES

The joint research project ‘T3 J1.1 “Traceable characterization of nanoparticle size” was carried out by eight national institutes of metrology, members of EURAMET, within the framework of the European iMERA Plus.

The **project consortium** was built only by national institutes of metrology, such as:

- NPL- National Physical Laboratory, Great Britain, the project coordinator
- PTB- Physikalisch Technische Bundesanstalt, Germany
- CMI-Czech Metrology Institute, Czech Republic
- METAS-The Federal Institute of Metrology, Switzerland
- INRIM-Instituto Nazionale di Ricerca Metrologica, Italy
- BRML-INM-Romanian Bureau of Legal Metrology- National Institute of Metrology, Romania
- CEM-Centro Español de Metrologia, Spain
- MIKES-Centre for Metrology and Accreditation, Finland

The general objective of the project is to develop traceable measurement methods for size measurement of as well as the nanoparticles’

dimensiunii nano-particulelor și analiza formei și a distribuției lor.

Obiectivele specifice ale proiectului se referă la studiul teoretic privind aplicarea metodelor de măsurare specifice și a conceptelor metrologice în domeniul nano-particulelor precum și identificarea modalităților practice privind asigurarea comparabilității rezultatelor măsurărilor efectuate prin aceste metode.

Proiectul, cu o durată de 36 de luni a fost structurat pe șase pachete de lucru, astfel:

WP1 – Managementul și coordonarea proiectului;

WP2 – Prepararea probelor pentru diferite metode de măsurare;

WP3 – Măsurarea de nano-particule în stare de aerosoli;

WP4 – Măsurarea mărimii nano-particulelor sferice și a distribuției lor;

WP5 – Măsurarea mărimii și formei nano-particulelor de altă formă;

WP6 – Impactul proiectului.

Fiecare partener al consorțiului a studiat, dezvoltat și utilizat metoda de măsurare proprie, astfel încât să se asigure complementaritate utilizării mai multor tehnici de măsurare disponibile în cadrul consorțiului.

Experimentările s-au efectuat pe un set de șapte materiale de referință furnizate de producători consacrați: NIST- Institutul Național de Standarde și Tehnologie din SUA, IRMM-JRC-EC- Institutul pentru Materiale și Măsurări de Referință - Centrul Comun de Cercetare al Comisiei Europene și Corporația Științifică DUKE, din California, SUA.

Pentru studiul comparabilității rezultatelor măsurărilor furnizate prin aceste metode, între partenerii proiectului s-a efectuat o comparație pe aceste materiale, studiu care a permis analiza rezultatelor raportate de fiecare partener prin aplicarea metodelor de măsurare studiate.

3. METODE DE MĂSURARE ȘI MATERIALE UTILIZATE

În cele ce urmează, sunt prezentate succint metodele de măsurare frecvent utilizate la măsurarea dimensiunilor nano, tehnici ce sunt descrise detaliat în [1], lucrare elaborată ca urmare a activităților desfășurate în cadrul proiectului.

Literatura de specialitate descrie mai multe tehnici de măsurare performante care sunt utilizate la măsurarea dimensiunii nano-particulelor. Aceste metode de măsurare se bazează pe principii diferite și, ca urmare, deseori dau rezultate diferite. În general, acestea pot fi separate în două grupe: grupa metodelor

shape and distribution.

The specific objectives of the project refers to theoretical study how to apply of specific measurement methods and the metrological concepts in the nanoparticles field as well as how to ensure in practice the comparability of measurement results of these methods.

The project was carried on 36 month period and it was structured in six work packages:

WP1 – JRP Management și coordonarea proiectului

WP2 – Sample preparation for various measurement methods

WP3 – Measurements of aerosols nanoparticles

WP4 – Dimensional measurements of the spherical nanoparticles and their distribution

WP5 – Other dimensional and shape measurements

WP6 – Project impact

Each partner of the consortium has developed and applied its own measurement method, in such a way to ensure the complementarity of more consortium available techniques.

Experiments were conducted on a set of 7 reference materials which were supplied by recognized manufacturers, such as: NIST- National Institute for Standards and Technology, SUA, IRMM-JRC-EC- Institute for Reference Materials and Measurements-Joint Research Center -European Commission and DUKE Scientific Corporation, California, USA.

The project partners studied as well the comparability of measurement results provided by these methods based on an interlaboratory comparison exercise using all available materials; the study allowed the cross-comparison between the measurement results reported by each partner that used its various previously developed methods.

3. MEASUREMENT METHODS APPLIED TO NANOPARTICLES SIZE INVESTIGATIONS

In the following paragraphs the measurement methods frequently used in the nano-scale measurements are summarised; these techniques are detailed described in [1], paper issued as the project activities result.

The literature describes various measuring techniques that are able and used to measure the nanoparticles size. They are based on different principles and, as a consequence, often give different results. These techniques could mainly be broadly separated in two groups: one is dominated by the high resolution electronic

de măsurare prin microscopie electronică de înaltă rezoluție prin care se analizează particule singulare, și grupa metodelor prin care se măsoară grupuri de particule, caz în care sunt analizate simultan mai multe mii de particule.

Grupa metodelor de măsurare a *unei particule singulare* include:

- Microscopie electronică de transmisie (TEM);
- Microscopie electronică de scanare (SEM);
- Microscopie prin scanare, cu sondă (ProbeSEM);
- Analiză prin „urmărire” a nanoparticulelor.

În cazul acestor metode de măsurare, incertitudinea de măsurare relativă este în mare parte limitată de numărul de particule ce se pot vizualiza și investiga în condiții optime.

Cealaltă grupă de metode de măsurare, include acele metode ce analizează simultan un număr mare de particule, aceste metode sunt denumite *tehnici de grup*, respectiv:

- Difuzia dinamică a luminii (DLS);
- Sedimentare prin centrifugarea lichidului (CLS);
- Difuzia de raze X în unghiuri mici (SAXS);
- Scanarea mobilității particulelor;
- Metoda fracționării fluxului câmpului;
- Metoda centrifugării cu disc de raze X.

Aceste tehnici sunt, de obicei, tehnici indirecte, în sensul că acestea nu măsoară dimensiunea particulelor direct, ci, mai degrabă, permit modelarea efectului schimbărilor de dimensiune asupra altei proprietăți.

În cadrul proiectului, INM în colaborare cu UPB (Universitatea Politehnică din București) a folosit două tehnici de măsurare de înaltă rezoluție, și anume, TEM și SEM. Pentru investigații prin tehnica TEM, INM a utilizat microscopul electronic Tecnaï F30 al UPB-București fabricat de firma FEI, echipat cu tun de emisie de electroni și cu rezoluție liniară de 1,2 Å. Pentru investigațiile prin tehnica SEM, a fost utilizat microscopul electronic al UPB tip Quanta Inspect F fabricat de firma FEI, echipat cu tun de emisie de electroni cu filament de wolfram, cu o rezoluție liniară de 5 nm.

Principalele etape experimentale ale procesului de măsurare prin TEM și SEM sunt:

- (i) Pregătirea nanoprobei de analizat;
- (ii) Optimizare parametrilor de lucru,
- (iii) Investigarea probelor,
- (iv) Efectuarea de imagini a probelor investigate;
- (v) Evaluarea datelor și raportarea rezultatelor.

La măsurările prin TEM, eșantionul supus analizei este aplicat în strat foarte subțire pe

microscopie methods where the single particles are analysed, and the other, is dominated by the ensemble measurement methods where many thousands of particles are simultaneously analysed.

The measurement techniques of a *single particle* could be:

- Transmission electron microscopy (TEM)
- Scanning electron microscopy (SEM)
- Scanning probe microscopy (ProbeSEM)
- Nanoparticles „tracking” analysis

It can be mentioned that the relative measurement uncertainty is mostly limited by the number of particles that can be observed and measured in the optimal conditions.

The other group of measurement methods includes those methods where many thousands of particles are simultaneously analysed, the methods are called *ensemble techniques*, such as:

- Dynamic light scattering (DLS)
- Centrifugal liquid sedimentation (CLS)
- Small angle X-ray scattering (SAXS)
- Scanning mobility particle
- Field Flow Fractionation
- X-ray Disc Centrifuge

These techniques are usually indirect techniques, that means they do not measure directly the size of particles, rather the modelling effect on the size change on another parameter.

Two measurement techniques were used by INM in collaboration with UPB (Polytechnic University of Bucharest), respectively, TEM (Transmission Electron Microscopy) and SEM (Scanning Electron Microscopy) techniques. For TEM investigations, INM used the UPB's electronic microscope TECNAI F30 Electron Microscope, instrument manufactured by FEI Company, equipped within gun beam in emission field and with a linear resolution of 1.2 Å.

For SEM investigations, the Quanta Inspect F Electron Microscope of UPB was used, instrument manufactured by FEI Company, equipped within gun beam in emission field, with wolfram filament and with a linear resolution of 5 nm.

The main experimental steps of the measurement process by TEM and SEM consist in:

- (i) Preparation of nanoparticles samples for analyses;
- (ii) Optimisation of instrumental parameters
- (iii) Samples investigation;
- (iv) Direct imaging of samples nanoparticles
- (v) Data evaluation and reporting results

grile specifice TEM, care sunt expuse apoi unui fascicul de electroni; electronii transmiși prin eșantion sunt proiectați pe filme fotografice sau pe o cameră foto, unde se formează și se înregistrează imaginea nano-particulei. Contrastul imaginii obținute depinde de proprietatea nano-particulelor de a difuza electroni, fenomen care depinde de compoziția chimică a probei și de structura cristalină a acesteia. Aplicarea probelor de analizat pe grilele TEM este un aspect tehnic important în măsurările prin microscopie electronică; de exemplu, în cazul în care nano-particule sunt suficient de bine dispersate într-un mediu neposori într-un mediu cu concentrație de săruri ridicată, trebuie să se pipeteze pe grilă o cantitate mică de suspensie (5-10 μl), pentru a se realiza o uscare corespunzătoare, fără aglomerări de nano-particule pe suprafața grilei.

Măsurările prin SEM se bazează pe interacțiuni ale unui fascicul focalizat de electroni de mare energie cu eșantionul de analizat, interacțiuni care generează o varietate de semnale. În funcție de mișcarea fasciculului de electroni de-a lungul eșantionului, se înregistrează și se determină intensitatea electronilor secundari și/sau a celor împrăștiați. Microscopia electronică prin scanare permite examinarea detaliilor cu o magnitudine și o rezoluție mare, care este funcție de calitatea instrumentului și de natura probei precum și de celelalte elemente tehnice încorporate în echipament. Și în măsurătorile SEM, rezultatele variază funcție de mai mulți factori referitori la pregătirea probelor cum ar fi: proprietățile fizico-chimice ale probei, interacțiunile dintre particule datorate concentrației ridicate de particule, divizări de particule datorate tehnicilor utilizate pentru dispersia particulelor, etc. Aplicarea probelor de analizat pe grilele SEM este, de asemenea, un aspect tehnic important. În comparație cu TEM, pregătirea probei pentru SEM necesită efort și timp mai mare pentru a asigura introducerea adecvată a probei în instrument.

Nano-probele utilizate în experimentări sunt prezentate în Tabelul 1, iar modul lor de prezentare este ilustrat în Figura 1.

Aceste nano-probe (materialele de referință) conțin nano-particule de aur, silice și polistiren, alte informații despre caracteristicile lor sunt indicate în [2,3,4].

By TEM measurements a very thin layer of sample is applied on the specific TEM grids and exposed to an electrons beam; the transmitted electrons through the sample are then projected onto the photographic films or onto a camera, where the nanoparticles image is formed and captured. The image contrast depends on the nanoparticles characteristic to scatter electrons, phenomena which depends of the chemical composition of sample and of its crystalline structure. An important technical aspect in electron microscopy measurements there is the sample deposition on TEM grids; for instance, if nanoparticles are sufficiently well dispersed in a non-aqueous solution or into a high concentration of salts, the small amount of the suspension (5-10 μl) pipetted on the grid a to get adequate drying step, without particles' agglomerates on the grid surface, is requested.

The SEM technique is based on interactions of the high-energy electrons focused beam with the sample under investigation, interactions which generate a variety of signals. As the beam moves across the sample, the backscattered or secondary electrons are collected and their intensity is measured. Scanning electron microscopy enables examination of details at high magnification and resolution, depending on the quality of the instrument as well as of the nature of the sample, the instrument operational parameters as well as on the state of technology incorporated in the instrument. The SEM results are also affected by many factors, such as, the sample preparation factors, the physico-chemical properties of the specimen; the particle-to-particle interactions due to high particles concentration, the divisions of particles due to the dispersion techniques used etc. The sample deposition on SEM grids is also an important technical aspect. Comparing with TEM technique, sample preparation for SEM requires greater effort and time consuming to ensure suitable mounting of the sample in the instrument.

The nanosamples used in experiments are presented in Table 1 and their general description is presented in Figure 1.

The nano-samples (reference materials) contain gold, silica and polystyrene nanoparticles, respectively, more information regarding their characteristics are indicated in [2,3,4].

Produs/Product	Tip/Type	Dimensiune/Dimension
NIST RM 8011	Aur/Gold	10 nm
NIST RM 8012	Aur/Gold	30 nm
NIST RM 8013	Aur/Gold	60 nm
IRMM-304	Silice/Silica	40 nm
Duke 3050A	Polistiren	50 nm
Duke 3100A	Polistiren	100 nm
Duke 3200A	Polistiren	200 nm

Tabel 1: Nanoprobe utilizate în experimentări
Table 1: *Nanosamples used in experiments*



Fig. 1: Prezentarea nanoprobe
Fig. 1: *Nanosamples presentation*

4. REZULTATE EXPERIMENTALE OBȚINUTE DE INM

În cadrul acestui proiect INM a studiat și experimentat tehnicile TEM și SEM pe toate cele 7 probe și la compararea efectuată între partenerii proiectului a raportat rezultatele măsurărilor obținute prin tehnica SEM.

În Figura 2a este prezentată imaginea de înaltă rezoluție preluată prin tehnica TEM pentru o particulă de silice din nano-proba IRMM-304. Pentru distribuția dimensiunilor particulelor de silice (Figura 2b) s-a măsurat diametrul a peste 100 de particule iar evaluarea datelor s-a efectuat prin calcularea valorii medii a diametrelor nano-particulelor și a altor parametri ai distribuției, precum diametrul minim, mediana, diametrul maxim. În Figura 2c este prezentată imaginea de înaltă rezoluție preluată prin tehnica TEM pentru o particulă de polimer din nano-proba Duke 3100A. După cum se poate observa în Figurile 2a și 2c, la măsurarea diametrului nano-particulelor non-conductoare, respectiv silice și polimer, conturul acestora nu este clar delimitat, ceea ce conduce la variabilitatea rezultatelor măsurărilor.

4. EXPERIMENTAL RESULTS REPORTED BY INM

In this project, INM studied the TEM and SEM techniques, carried out experiments by these methods on all 7 type of samples and participated with SEM method in the interlaboratory exercise.

A high resolution image of a silica nanoparticle of IRMM-304 sample, by the TEM technique is presented in Figure 2a,. For the sizes distribution of silica nanoparticles, more than 100 particles were measured (Figure 2b), and the mean value of nanoparticles was calculated as well as other parameters such as, minimum diameter, median and maximum diameter of nanoparticles. In Figure 2c is presented a high resolution image of a polymer nanoparticle of Duke 3100A sample by the TEM technique. As it can be noticed in Figures 2a and 2c, the edges of the nanoparticles are not clearly defined when the non-conductive nanoparticles silica and polymer were measured, fact that leads to the variability of the measurement results.

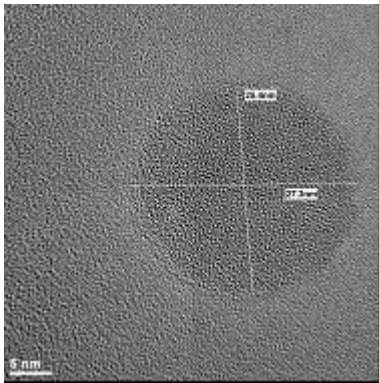


Fig. 2a. Imagine a IRMM-304 prin TEM
Fig. 2a. IRMM -304 image by TEM

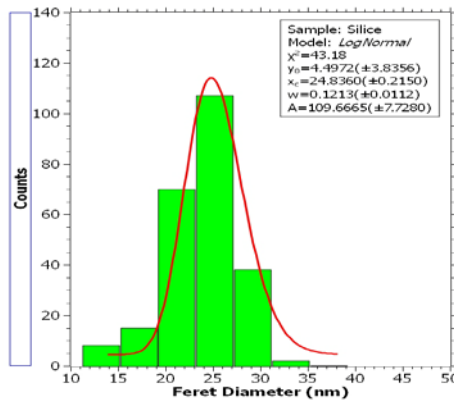


Fig. 2b. Distribuția de dimensiuni pentru IRMM- 304 prin TEM
Fig. 2b. Sizes ditribution for IRMM-304 by TEM

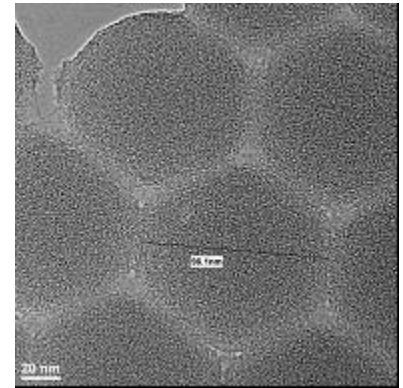


Fig. 2c. Duke 3100A prin TEM
Fig. 2c. Duke 3100A by TEM

În Figura 3a este prezentată o imagine obținută prin SEM la măsurarea probei NIST RM 8011 iar în Figura 3b histograma distribuției diametrelor pentru această probă. După cum se poate observa frecvențele apariției dimensiunilor cuprinse între 6,0 și 7,5 nm sunt cele care determină distribuția de probabilitate a dimensiunii nano-particulelor.

In Figure 3a is presented a SEM image of the NIST RM 8011 nanosample and in the Figure 3b the histogram of sizes diametres distribution is presented. As can be noticed the frequencies of size diametres between 6,0 and 7,5 nm are dominant for the size nanoparticles distribution.

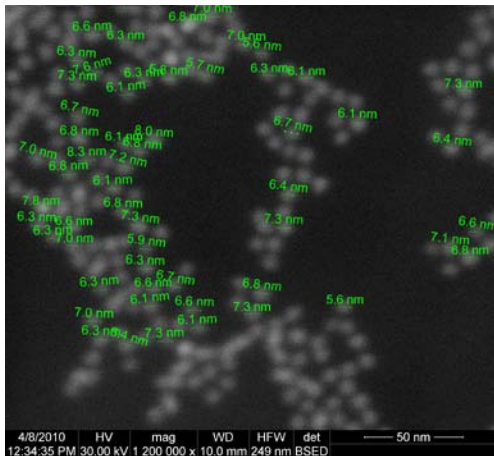


Fig. 3a. Imagini prin SEM pentru NIST RM 8011
Fig. 3a. SEM images for NIST RM 8011 by SEM

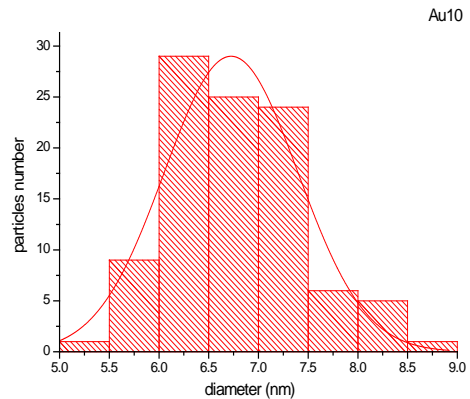


Fig. 3b. Distribuția diametrului pentru NIST RM 8011
Fig. 3b. Diameter size distribution for NIST RM 8011

În Figura 4a este prezentată o imagine obținută prin SEM la măsurarea probei DUKE 3200A iar în Figura 4b histograma distribuției diametrelor pentru această probă.

In Figure 4a the SEM image of Duke 3200A and in Figure 4b the histogram of sizes diametres distribution of same nanosample there are presented.

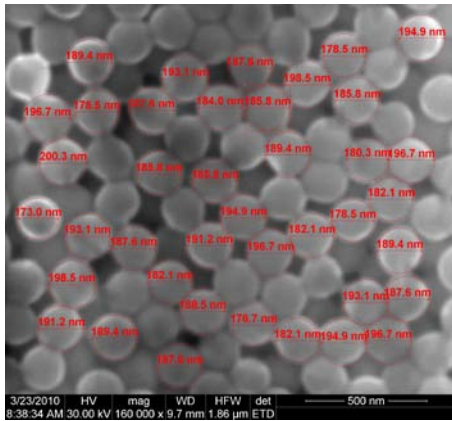


Fig. 4a Imagini prin SEM pentru Duke 3200A
Fig. 4a SEM images for Duke 3200A

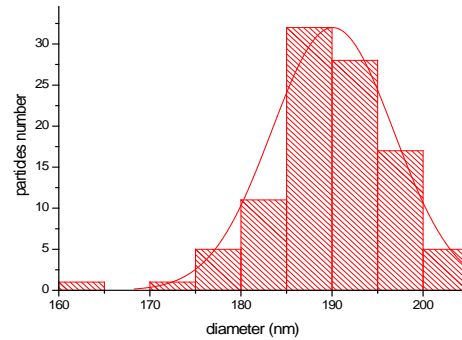


Fig. 4b Distribuția diametrului pentru Duke 3200A
Fig. 4b Diameter size distribution for Duke 3200A

În cadrul proiectului s-a organizat, deasemenea, un exercițiu de comparare interlaboratoare la care au participat șase institute naționale de metrologie. Au fost analizate toate cele șapte probe de nanoparticule prezentate mai sus. Participanții au aplicat cinci metode de măsurare pe care le-au avut la dispoziție, respectiv: AFM, DLS, SAXS, SEM și TSEM ale căror principii sunt fundamental diferite. Au fost raportate: valoarea diametrului mediu, distribuția dimensiunilor nano-particulelor, abaterea standard și incertitudinea de măsurare.

În acest exercițiu INM a folosit tehnica SEM utilizând Microscopul Electronic Quanta Inspect F fabricat de compania FEI, echipat cu sursă de emisie a unui câmp de electroni, cu detector de electroni secundari tip Everhart-Thornley [5,6]. Energia maximă de electroni este de 30 keV și rezoluția de 1,4 nm. Instrumentul a fost sub servicii de mentenanță și ajustări ale producătorului în acord cu instrucțiunile de lucru și proceduri internaționale relevante [7]. Pentru calibrarea parametrilor magnitudinii scalei x și y s-au folosit Etaloane de Referință de Magnitudine (MRS) certificate de Laboratorul Geller Microanalytical, trasabile la NPL, acești parametri s-au păstrat și la măsurările ulterioare.

La toate măsurările SEM, s-au folosit cca. 10 μ L din probă. Probele de nano-particule pe bază de aur s-au folosit imediat după deschiderea lor, în timp ce proba de nanoparticule pe bază de silice și cele pe bază de polimer au fost deschise cu cca. 6 luni înaintea măsurărilor prin SEM. Probele au fost dispersate uniform pe griduri de cupru sau pe discuri de aluminiu și a fost măsurat un număr suficient de mare de particule (cel puțin 100) pentru a se asigura că eșantionul supus investigațiilor este reprezentativ și pentru a se evita erori de natură statistică datorate

The interlaboratories comparison exercise was organised in the frame of this project among six national metrology institutes project partners. The seven nanoparticle samples presented above were analysed in this exercise. The participants applied five fundamentally different measurement methods at their availability, such as: AFM, DLS, SAXS, SEM, and TSEM. The participants reported the mean diameter, the size distribution, the standard deviation and the measurement uncertainty.

In this comparison exercise, SEM technique was used by INM, by using a Quanta Inspect F Electron Microscope, manufactured by FEI, fitted with a field emission electron source, an Everhart-Thornley detector for secondary electrons [5,6]. The maximum electron energy is 30 keV and the 1.4 nm. Resolution. The equipment was maintained and adjusted by the manufacturer in accordance with their working instructions and the relevant international procedures [7]. Magnification reference standards (MRS) certified by Geller Microanalytical Laboratory, traceable to NPL, were used for calibrating the SEM magnification of the x- and y-scale, the same parameters were used during calibration and the subsequent measurements as well.

About 10 μ L of sample solution was used for all SEM investigations. The gold nanoparticle samples were used just after opening the original ampoules, while the colloidal silica sample and the polymer samples were opened with about 6 months before the SEM investigations. To ensure that the specimen under investigation is representative and that the statistical errors due to inadequate representation are controlled, the samples were well dispersed on the copper grids or aluminium disc and a sufficient number of particles were measured (at least 100 particles were observed).

reprezentativității neadecvate.

Evaluarea imaginilor prelevate prin SEM a fost efectuată prin determinarea dimensiunii particulei cu diametrul proiecției unei sfere circumscrise particulei. La estimarea incertitudinii de măsurare au fost considerate toate sursele cunoscute de incertitudine [8]. Principala sursă de incertitudine a fost repetabilitatea măsurărilor datorată delimitării conturului imaginilor particulelor. Alte componente ale incertitudinii au fost datorate echipamentului (de. ex. 5% din valoarea măsurată în acord cu specificațiile producătorului), condițiilor de mediu (de ex. temperatura și umiditatea) precum și natura eșantionului supus investigațiilor.

În Tabelul 2 sunt prezentate rezultatele raportate de INM în cadrul acestei intercomparări, în care:

- d_{nom} - diametru nominal;
- d_m - diametru mediu;
- N - număr de particule analizate;
- u_c - incertitudine standard combinată;
- s - deviație standard;
- v_{eff} - număr efectiv de grade de libertate;
- d_{med} - mediana diametrelor;
- d_{mod} - modul diametrelor.

The SEM image evaluation was performed by determining the diameter particle size as the diameter of a sphere that circumscribed this particle. All known uncertainty sources were considered to estimate the measurement uncertainty [8]. The main uncertainty component was the overall repeatability, especially due to the delimitation of the edges image of the particles. Other uncertainty components were the variations associated with the equipment (i.e. 5% from the measured value in accordance with the technical specifications of the manufacturer), the environmental conditions (i.e. temperature and humidity) as well as the nature of the specimen under investigations.

In Table 2 are presented the results reported by INM in this intercomparison exercise, where:

- d_{nom} - nominal diameter;
- d_m - mean diameter;
- N - number of particles analysed;
- u_c - combined standard uncertainty;
- s - standard deviation;
- v_{eff} - effective degree of freedom;
- d_{med} - median;
- d_{mod} - mode

Proba/Sample	d_{nom} nm	d_m nm	u_c nm	v_{eff}	N	s nm	D_{med} nm	D_{mod} nm
NIST RM 8011	10	6.7	2.31	50	100	0.673	6.65	6-6.5
NIST RM 8012	30	26.1	2.89	106	100	1.726	26.1	27-28
NIST RM 8013	60	54.3	2.37	56	100	3.782	53.9	52-54
IRMM-304	40	35.3	2.42	60	100	6.610	37.0	35-40
Duke 3050A	50	44.7	2.38	56	100	4.474	45.5	48-50
Duke 3100A	100	98.1	2.51	68	100	5.478	97.1	95-100
Duke 3200A	200	190.0	2.86	106	100	6.637	191.2	190-195

Tabelul 2. Rezultate raportate de INM în exercitiul de intercomparare

Table 2. INM reported results in the intercomparison exercise

În Figura 5 sunt prezentate grafic cele 48 de rezultate raportate de toți partenerii implicați în acest exercițiu.

Pentru proba NIST RM 8013 sunt prezentate, în Figura 6, valorile și incertitudinile asociate raportate de partenerii proiectului împreună cu cele certificate de producătorul acestui material (NIST) prin metodele de măsurare dezvoltate în cadrul proiectului. Valoarea țintă raportată de INM în acest proiect este foarte apropiată de cea raportată de NIST prin aceeași tehnică, respectiv SEM [6].

In Figure 5, the results reported by all partners involved in the intercomparison exercise are grafically presented.

The comparative measured values and the associated uncertainty for NIST RM 8013 reported by all partners and the reference material values provided by NIST material manufacturer by the same measurement methods developed in the project, are presented in Figure 6. The target value reported by INM in this project is almost the same with the reported NIST value obtained by the same SEM method [6].

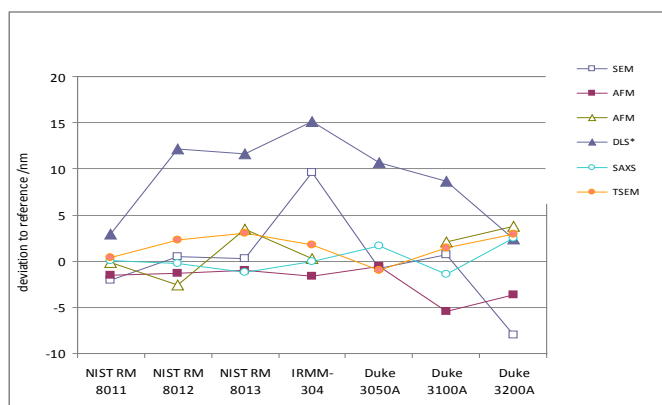


Fig. 5. Rezultatele comparării interlaboratoare
Fig. 5. The interlaboratories results

Valorile de referință stabilite la comparare au fost calculate ca valori medii ponderate cu incertitudinile de măsurare raportate de participanți. Pentru particulele cu dimensiuni mai mici de 100 nm, incertitudinea standard combinată asociată valorii de referință este mai mică de 1nm. Criteriul Birge, testul statistic Birge și scorul En ($|En_{95}| \leq 1$) au fost utilizate pentru a evalua consistența rezultatelor raportate [5, 6].

În urma acestui studiu, s-a stabilit o valoare de referință și o incertitudine asociată acesteia pentru fiecare tip de probă astfel încât să se permită compararea rezultatelor obținute prin toate metodele de măsurare utilizate în proiect.

5. CONCLUZII

În cadrul acestui proiect au fost studiate mai multe metode de măsurare în domeniul nanoparticulelor, printre care AFM-Microscopia de forțe atomice, DLS-Difuzia dinamică a luminii, SAXS-Difuzia de raze X în unghiuri mici, TEM-Microscopie electronică de transmisie, SEM-Microscopie electronică de scanare și TSEM-Microscopie electronică de scanarea prin transmisie.

Lucrările proiectului au contribuit la dezvoltarea de metode de măsurare a dimensiunii nanoparticulelor trasabile, în intervalul de măsurare cuprins între 10 nm și 200 nm. Pentru particulele mai mici de 100 nm, incertitudinea standard combinată asociată valorii de referință este mai mică de 1 nm.

Prin aplicarea metodelor de măsurare dezvoltate, într-un exercitiu de intercomparare, s-au stabilit valori de referință și incertitudinile corespunzătoare asociate acestora pentru toate cele șapte tipuri de probe de nanoparticule investigate, în așa fel încât să fie posibilă compararea rezultatelor obținute prin toate metodele de măsurare utilizate în proiect.

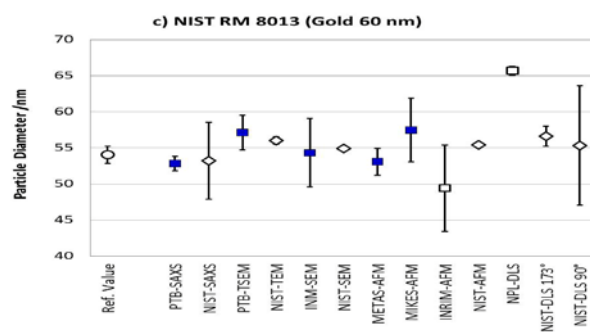


Fig. 6. Rezultate comparative cu valorile NIST
Fig. 6. Comparative results with NIST values

The reference values of the comparison exercise were calculated as the weighted mean values based on the estimated measurement uncertainties of the participants. The combined standard uncertainty associated with the reference value for particles with sizes up to 100 nm is smaller than 1 nm.

The data consistency was verified using the Birge criterion, the statistical Birge test as well as the En score ($|En_{95}| \leq 1$) [5, 6].

As result of this comparison study, a reference value within the associated uncertainty were provided for each type of samples, in such a way to allow the cross-comparison between all the measurement methods used in the project.

5. CONCLUSIONS

In the frame of this project several measurement methods in the nanoparticles range were studied, such as, AFM - Atomic Force Microscopy, DLS - Dynamic light scattering, SAXS - Small angle X-ray scattering, TEM -Transmission electron microscopy, SEM -Scanning electron microscopy și TSEM -Scanning electron microscopy by transmission.

The traceable measurement methods in the measurement range of 10 nm to 200 nm were developed based on the project activities. The combined standard uncertainty associated with the reference value for the particles with sizes up to 100 nm is smaller than 1 nm.

A reference value within the associated uncertainty was provided for all the seven types of samples by using the developed methods in an intercomparison exercise, in such a way that allow the cross-comparison between the measurement methods used in the project.

The project JRP T3 J1.1 "Traceable

Proiectul JRP T3 J1.1 "Traceable characterisation of nanoparticles size" a fost finanțat de Uniunea Europeană în cadrul Programului Cadru 7, prin proiectul ERA-NET Plus, prin Contractul de finanțare Nr. 217257.

BIBLIOGRAFIE

- [1]. R. D. Boyd, A. Cuenat, F. Meli, T. Klein, C.G. Frase, G. Gleber, M. Krumrey, A. Duță, S. Duță, R. Hogstrom, E. Prieto, The Good Practice Guide for the determination of the size and size distribution of spherical nanoparticles, No. 9, 2011
- [2]. SRM 8011-8013, NIST, Standard Reference Materials, Gaithersburg, MD, United States. www.nist.gov/srm
- [3]. IRMM-304, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium. <https://irmm.jrc.ec.europa.eu>
- [4]. 3060A, 3100A and 3300A, Microgenics Corporation (Thermo Scientific), Fremont, CA, United States. www.thermoscientific.com
- [5]. A. Duță, S. Duță, EMRP T3.J1.1 Traceable nanoparticle characterisation: Particle size measurement comparison report, 2011
- [6]. Traceable size determination of nanoparticles, a comparison among European metrology institutes, F. Meli, T. Klein, E. Buhr. C. G. Frase, G. Gleber, M. Krumrey, A. Duță, S. Duță, V. Korpelainen, R. Bellotti, G.B. Picotto, R.D. Boyd, A. Cuenat, Meas. Sci. Technol, 23 (2012), 125005 (15 pg)
- [7]. ASTM E 766-98: Standard practice for calibrating the magnification of a Scanning Electron Microscope, 2003
- [8]. Bureau international des poids et mesures (BIPM) (2008) *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement* JCGM 100:2008 and *ISO/IEC Guide 98-3:2008: Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement*, 2008

Revizia științifică:

Dragoș BOICIUC, doctor, cercetător științific gradul I, e-mail: dragos.boiciuc@inm.ro

Despre autori:

Alexandru DUȚĂ, doctor inginer, cercetător științific gradul II, Șef al Laboratorului Lungimi al INM, e-mail: alexandru.duta@inm.ro

Steluța DUȚĂ, doctor inginer, cercetător științific gradul I, e-mail: steluta.duta@inm.ro

characterisation of nanoparticles size" was funded by the European Union's Seventh Framework Programme, in the frame of ERA-NET Plus project, under the Grant Agreement No. 217257.

REFERENCES

- [1]. R. D. Boyd, A. Cuenat, F. Meli, T. Klein, C.G. Frase, G. Gleber, M. Krumrey, A. Duță, S. Duță, R. Hogstrom, E. Prieto, The Good Practice Guide for the determination of the size and size distribution of spherical nanoparticles, No. 9, 2011
- [2]. SRM 8011-8013, NIST, Standard Reference Materials, Gaithersburg, MD, United States. www.nist.gov/srm
- [3]. IRMM-304, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium. <https://irmm.jrc.ec.europa.eu>
- [4]. 3060A, 3100A and 3300A, Microgenics Corporation (Thermo Scientific), Fremont, CA, United States. www.thermoscientific.com
- [5]. A. Duță, S. Duță, EMRP T3.J1.1 Traceable nanoparticle characterisation: Particle size measurement comparison report, 2011
- [6]. Traceable size determination of nanoparticles, a comparison among European metrology institutes, F. Meli, T. Klein, E. Buhr. C. G. Frase, G. Gleber, M. Krumrey, A. Duță, S. Duță, V. Korpelainen, R. Bellotti, G.B. Picotto, R.D. Boyd, A. Cuenat, Meas. Sci. Technol, 23 (2012), 125005 (15 pg)
- [7]. ASTM E 766-98: Standard practice for calibrating the magnification of a Scanning Electron Microscope, 2003
- [8]. Bureau international des poids et mesures (BIPM) (2008) *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement* JCGM 100:2008 and *ISO/IEC Guide 98-3:2008: Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement*, 2008

Scientific revue:

Dragoș BOICIUC, doctor, scientific researcher Ist degree, e-mail: dragos.boiciuc@inm.ro

About the authors:

Alexandru DUȚĂ, doctor, main scientific researcher 2nd degree, Head of Length Lab at INM, e-mail: alexandru.duta@inm.ro

Steluța DUȚĂ, doctor, main scientific researcher 1st degree, e-mail: steluta.duta@inm.ro