

TEM protocol comparison between ACEnano, NCEC, ISO and NANoREG

Factors		ACEnano	NCEC	ISO	NANoREG
Instrument		JEOL 1200EX TEM (accelerating voltage 80 kV)	JEOL JEM-2010 TEM (accelerating voltage 200 kV)	-	FEI tecnai G2 Spirit(accelerating voltage 80kV-200kV)
Sample preparation	Dropping method	Placing a drop of sample on the surface of the copper grid			
	process:	Drop(30~60min) ->(Air-dry + Cover)	Drop(5ul) -> Cover ->Dry	Drop(~5ul) ->Dry	Drop on grid or Grid on drop
Image analysis	Software	ImageJ			
	Size distribution requirement	At least 100 particles	At least 500 particles	-	-

1. 목적

투과전자현미경을 이용한 나노입자의 크기 분포 측정

2. 개요

본 지침서는 투과전자현미경과 이미지 분석법을 이용하여 나노입자의 크기 분포를 측정하기 위하여 작성되었음.

3. 재료 & 시약

<u>재료/시약/장비</u>	<u>판매사</u>	<u>Stock Number</u>
<u>재료</u>		
Concial centrifuge tubes (15 mL)		
TEM grid (01813-F)	Ted Pella	
Petri dish (10035)	SPL	
Filter paper		
<u>시약</u>		
Deionized water		
<u>장비</u>		
Vortex mixer (DH.WVM00010)	DAIHAN	
Sonication bath (DH.D300H)	DAIHAN	
Transmission electron microscope (JEM-2000EXII)	JEOL	
Image analysis software (ImageJ)	NIST	

4. Workflow

- (1) 나노입자 stock solution을 준비한다.
- (2) 가루 형태의 나노입자의 경우에는 반드시 분산을 시켜준다.
- (3) 나노입자 stock solution을 TEM grid에 떨어뜨린 후 건조시켜 TEM 시료를 만든다.
- (4) 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 나노입자 이미지를 찍는다.
- (5) 이미지분석프로그램을 이용하여 나노입자의 크기 분포를 분석한다.

-절차

1. 나노입자 stock solution 준비

- (1) 실험에 앞서 나노입자 stock solution을 준비한다. 가루형태의 나노입자의 경우, 3차 증류수를 이용하여 적절한 농도의 stock solution을 준비한다. 진한 농도의 나노입자 분산액은 3차 증류수로 묽혀서 적절한 농도의 stock solution을 만든다. 묽은 농도의 나노입자 분산액은 stock solution으로 바로 사용한다.
- (2) TEM 시료를 만들기 전에 water bath sonicator를 이용하여 stock solution을 15분정도 분산시킨다.

2. TEM 시료 준비

- (1) Filter paper를 적당한 크기로 잘라 petri dish 바닥에 깔고 그 위에 TEM grid를 올려놓는다. 여기서 TEM grid는 절편을 지지하는 얇은 망으로써 직경 3mm 정도의 원형으로 구멍 수에 따라 구분된다.
- (2) Stock solution 5 μ L를 TEM grid 위에 떨어뜨린 후 petri dish 뚜껑을 덮고 하루 동안 건조시킨다.

3. 투과전자현미경(TEM)을 이용한 나노입자 이미지 촬영

- (1) 입자의 이동이 최소화 되는 장비운영 조건을 선택한다.
- (2) 적절한 가속전압에서 이미지 수집한다.
- (3) 평균입자크기에 따른 이미지 해상도를 설정한다.
- (4) 이미지 측정을 위한 렌즈 교정을 (hysteresis 최소화)한다.
- (5) 각각의 측정 이미지에 기준자(scale bar) 포함하여 결과를 얻는다.
- (6) 불규칙한 형태 또는 날카로운 모서리 형태를 갖는 입자를 제외하지 않는다.
- (7) 측정된 이미지에 나노입자가 잘리지 않게 측정한다.
- (8) 한 개의 프레임에 **최소 500개**의 나노입자를 측정한다.
- (9) 한 개의 프레임에 있는 모든 입자를 분석에 사용한다.

4. 이미지분석프로그램(ImageJ)를 이용한 나노입자의 크기 분포 분석

- (1) 모든 이미지는 작업하기 전에 복사본을 만들어 놓는다.
- (2) ImageJ 프로그램을 실행하여 이미지 파일을 연다.
- (3) 측정스케일 설정에서 기준자(scale bar)에 따른 픽셀크기를 설정한다.
- (4) 실제 분석에 사용될 이미지만을 잘라낸다(기준자, 분석정보 등 이미지 분석에 필요 없는 항목들을 제거).
- (5) Brightness와 contrast 항목에서 histogram을 중앙에 있게 설정하고, 회색부분이 최소 80% 이상이 되게 설정한다.
- (6) 이미지의 품질이 이미지 분석에 적당하지 않은 경우, Threshold를 이용하여 이미지 분석이 용이하도록 품질을 향상 시킨다. 추가적으로 Special filters를 사용하면 고르지 못한 입자의 가장자리나 배경 등을 수정할 수 있다. 이렇게 수정된 이미지를 따로 저장한다.
- (7) 이미지 분석 단계에서 생성된 새로운 입자(Touching particles)은 자동분리 알고리즘(Watershed)를 사용하여 제거하면 안 된다. 반드시 모든 입자는 분석에 사용되어야 하며 기록되어야 한다. Touching particles는 결과시트에서 수동으로 제거한다.
- (8) 원하는 분석항목(area, shape descriptors, Feret's diameter, fit ellipse, and limit to threshold등)을 설정한다.
- (9) 입자를 분석한다. (ImageJ의 경우 show outlines, display results, include holes, and exclude on edges 같은 설정을 포함한다)
- (10) 나노입자의 측정은 “나노입자는 대부분 구형에 가깝다”라는 가정이 기본 전제 조건이다. 입자의 원형성(circularity value)은 $4\pi A/P^2$ (A =particle area, P =particle perimeter)으로 계산되며, 0.25 미만의 입자는 응집형태 또는 artifacts로 분류하여 결과에서 제외시킨다.

5.참고문헌

1. Nanotechnologies - Protocol for particle size distributions by transmission electron microscopy, ISO/TC 229/SC /WG 2
2. NANoREG - Deliverable D 2.10
3. ACEnano - NanoMILE Scientific Protocol