روش‌های رنگ‌آمیزی فلورسنت با رنگ رودامین B ایزوتیوسیانات در مواد سلولزی

حافظه شیخ علی[۱]
امیر خسروانی[۲*]

[۱] فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، نور، مازندران، ایران

[۲] استادیار، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، نور، مازندران، ایران

مسئول مکاتبات:
khosravani@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۹

چکیده

رنگ‌آمیزی با مواد فلورسنت از روش‌های پرکاربرد در مطالعه و مکان‌یابی مواد سلولزی می‌باشد. در این مطالعه، رنگ‌آمیزی مواد سلولزی با دو روش مستقیم (افزودن مستقیم عامل فلورسنت) و غیرمستقیم (افزودن ماده فلورسنت پس از ایجاد لنگر) مورد تحقیق قرار گرفت و در ادامه، نتایج رنگ‌آمیزی بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که هر چند در هر دو روش امکان تصویربرداری فراهم گردید، اما رنگ-آمیزی به روش غیرمستقیم، نتایج به نسبت یکنواخت‌تر و رنگ‌آمیزی موثرتری را در این مطالعه ارائه داد. به‌علاوه، اثر هریک از روش‌های رنگ آمیزی بر ویژگی بار سطحی (پتانسیل زتای نانوالیاف) و برهمکنش‌های پایانه تر (با بررسی درجه روانی به عنوان یک شاخص) مطالعه شد. نتایج نشان داد پتانسیل زتای (منفی) ماده سلولزی در اثر رنگ‌آمیزی به هر دو روش رنگ‌آمیزی منفی‌تر شد. همچنین مشاهده شد رنگ‌آمیزی ماده سلولزی به هر دو روش، اثر چندانی بر درجه روانی خمیرکاغذ به عنوان یک معیار نداشت.

واژگان کلیدی: رنگ آمیزی فلورسنت، رودامین، نشان‌دار کردن، میکروسکوپ فلورسنت.

مقدمه

بطور کلی رنگ‌آمیزی تکنیکی است برای افزایش تباین رنگی در نمونه‌ها که به ویژه در مقیاس میکروسکوپی استفاده می‌شود [۳-۱]. روش رنگ‌آمیزی میکروسکوپی، روشی مفید برای شناسایی و مکان‌یابی وجود ترکیبات لیگنوسلولزی در مواد خام است و از مزایای غیرمخرب بودن برخوردار است. به عنوان مثال به طور خاص، از رنگ سفرانین برای رنگ‌آمیزی ترکیب‌های لیگنین‌دار در بافت گیاهان و الیاف سلولزی در مطالعات استفاده شده است که نوعی رنگ‌آمیزی ساده به حساب می‌آید [۳]. رنگ‌آمیزی و نشانه‌گذای فلورسنت نیز اهداف مشابهی دارد که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است [۳]. در زمینه مطالعات مختلف در صنایع کاغذسازی، علی‌رغم روش‌های زیادی که وجود دارد، رنگ آمیزی و روش‌های تصویربرداری مبتنی بر خاصیت فلورسنت در سال‌های اخیر به دلیل سادگی، حساسیت بالا، سریع و به نسبت ارزان بودن به عنوان ابزاری قابل اعتماد در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. رنگ‌های فلورسنت واکنش‌دهنده یکی از پرکاربردترین عوامل اصلاح‌کننده برای نشانه‌گذاری ساختارهای هدف هستند. به عنوان نمونه، نشانه‌گذاری فلورسنت یک آنتی-بادی، قابلیت تشخیصی را فراهم می‌کند که آنتی‌بادی به تنهایی قادر به داشتن آن نیست. ترکیب حاصل را می‌توان در طیف گسترده‌ای از سنجش‌های مبتنی بر فلورسنس استفاده کرد که مجموعه‌ای بسیار حساس را برای کاربردهای بی‌شماری در تحقیقات زیستی و سایر زمینه‌ها فراهم می‌کند. می‌توان گفت فلورسنس یکی از انواع فوتولومینسنس و اثری است که اولین بار توسط جورج

گابریل استوکس در سال ۱۸۵۲ توصیف شد که در آن اتم‌ها یا ملکول‌ها امواج الکترومغناطیس (یا همان انرژی فوتون‌ها) را جذب کرده، برانگیخته می‌شوند و در بازگشت به حالت پایه نیز، انرژی اضافی خود را در قالب فوتون از دست می‌دهند [۲]. عوامل رنگ‌زای فلورسنت[1] را می‌توان به راحتی با طول موج خاص خود (که به طیف جذب فلوروفور بستگی دارد و باید اطمینان حاصل شود که مقدار مناسبی از انرژی برای بالا بردن الکترون‌ها به حالت برانگیخته تحویل داده می‌شود) از طریق منابع نوری خاص (مانند لامپ‌ها و لیزرها) برانگیخت و نور ساطع شده را می‌توان با طول موج بالاتری از نور تحریک تشخیص داد. با استفاده از تصویربرداری فلورسنس که با استفاده از میکروسکوپ‌های مخصوص فلورسنت انجام می‌گردد، محقق می‌تواند مقدار و محل قرارگیری یک مولکول در داخل یک سلول یا ماده را مشخص کند [۴،۵]. همانطوری که مشخص است نور مورد استفاده در ایجاد تصویر در نمونه‌های مورد بررسی در میکروسکوپ فلورسنت نور حاصله از نمونه است. بنابراین نمونه بایستی یا فلورسنت باشد و یا به طریقه رنگ‌آمیزی به صورت فلورسنت تبدیل شود. بر همین اساس، درصورتی که خود ماده مورد بررسی فاقد ویژگی فلورسنس باشد، نیاز است که توسط رنگ‌های فلورسنت، نشاندار شوند. بنابراین، به طور کلی رنگ‌آمیزی فلورسنت روشی است که از یک رنگ یا ماده فلورسنت استفاده می‌کند تا به طور انتخابی با اجزای بافت خاصی وصل شده و سپس تحت تابش نور، فلورسنس تولید نماید. در زمینه بررسی نشان‌دار کردن مواد سلولزی، در تحقیقات مختلف رنگ‌های متفاوتی برای رنگ‌آمیزی ماده سلولزی معرفی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به رنگ‌های رودامین و فلورسین اشاره نمود [۶،۷]. رنگ فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات یکی از رنگ‌های فلورسنت است که دارای کاربردهای مختلفی جهت رنگ‌آمیزی الیاف در صنایع نساجی و صنایع سلولزی می‌باشد. این رنگ یکی از رنگ‌های فلورسنت معرفی شده برای کاربرد در رنگ‌آمیزی الیاف/نانوالیاف سلولزی است که با بستری که قرار است در فرآیند رنگ‌آمیزی نشاندار شود، پیوند کووالانسی تشکیل می‌دهند. به‌طور معمول با توجه به تعداد گروه‌های فعال موجود در آنها، رنگ‌های فلورسنت را می‌توان به رنگ‌های تک، دوگانه و چند لنگر[2] طبقه‌بندی کرد. رودامین B ایزوتیوسیانات یک رنگ فلورسنت تک‌لنگر واکنشی است که به راحتی می‌تواند در حضور یک پایه (باز) به سلولز متصل شود. مولکول رنگ حاوی گروه‌های عاملی خاصی است که می‌توانند با گروه‌های OH-، SH- و یا NH_2- که در الیاف نساجی و یا کاغذسازی وجود دارند و یا اینکه از طریق اصلاح شیمیایی الیاف روی سطح الیاف اضافه شوند، واکنش افزودنی یا جایگزینی دهند [۸]. این رنگ آمیزی کاربردهای متنوع دیگری در بررسی مواد لیگنوسلولزی پیدا کرده است [۹]. در همین ارتباط، به‌منظور آشکارسازی و مطالعه خواص فلورسنت، میکروسکوپ‌های ویژه فلورسنت نیاز هستند که از نوع میکروسکوپ‌های نوری بوده و یکی از مهمترین میکروسکوپ‌های مورد استفاده در علوم مختلف می‌باشند. میکروسکوپ‌های فلورسنت دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی هستند [۵]. با توجه به آنکه نور تابش یافته از مواد فلورسنت دارای طول موج‌های مشخص می‌باشند، می‌توان از نور حاصله اطلاعات کمی و کیفی متعددی بدست آورد و در تحلیل نحوه کار ماده مورد نظر به کار برد [۵]. در این زمینه، میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال (CLSM) نیز امکان ویژه‌ای است که قابلیت تهیه تصاویر فلورسانس با بزرگنمایی تا ۴۰۰ نانومتر و ویژگی‌های ریخت شناسی در دو و سه‌بعد را فراهم می‌نماید. بنابراین این میکروسکوپ (CLSM) قادر به ارائه اطلاعات مهمی در مورد مقدار و توزیع سه‌بعدی فلوروفور در یک نمونه می‌باشد که در تحقیقات زیادی در زمینه صنایع سلولزی مورد استفاده قرار گرفته است. بطور کلی برای برخی مطالعات مانند بررسی پراکنش اجزای سلولزی در ساختار کاغذ زمانی که همه ساختار کاغذ تنها الیاف اصلی نباشد، در حالی‌که همگی دارای خاصیت فلورسانی یکسان هستند، می‌توان از روش نشاندار کردن و یا رنگ‌آمیزی با رنگ‌های دارای خاصیت فلورسنت بهره گرفت. در این زمینه، Hobisch و همکاران (۲۰۱۹)، مکان‌یابی و نحوه قرارگیری نرمه‌های سلولزی در کاغذ را با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت رودامین ایزوتیوسیاتات، مورد مطالعه قرار دادند [۱۰]. Wang و

[1] Fluorochromes

[2] mullti-anchor

همکاران (۲۰۱۸) نیز در مطالعه‌ای مشابه، ماندگاری نانوالیاف سلولزی را بررسی کرده‌اند و همچنین محققانی چون Whiple و Maltesh (۲۰۰۰) نیز فرایندهای تشکیل فلاک و جذب در تولید کاغذ را با رنگ‌آمیزی فلورسنت مورد بررسی قرار داده‌اند [۱۱،۱۲]. همانطور که مشخص است، در این پژوهش‌ها، رنگ‌آمیزی فلورسنت برای اهداف و کاربردهای مختلف مورد استفاده قرار گرفته است [۱۳،۱۴]. اما رنگ‌آمیزی مواد سلولزی با رنگ فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات به دو روش کلی مستقیم و غیرمستقیم قابل انجام است [۸]. در رنگ‌آمیزی مستقیم، اتصال عامل رنگ‌زا از طریق گروه‌های هیدروکسیل سلولزی (OH-) پیشنهاد می‌شود در حالیکه در روش غیرمستقیم، ابتدا گروه‌های حاوی (SH- و یا NH2 –) بر روی ماده سلولزی جایگزین شده و سپس با معرفی عامل رنگ‌آمیزی، اتصال عامل رنگ‌زا از طریق این گروه‌ها انجام خواهد شد. لذا این مطالعه به بررسی روش‌های رنگ‌آمیزی با استفاده از عامل نشاندارکردن فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات به دو روش کلی مستقیم و غیرمستقیم برای مواد سلولزی و مقایسه آنها و بررسی اینکه کدام روش جهت رنگ‌آمیزی و استفاده در تحقیقات مناسب‌تر هستند و نتایج و تصاویر با قابلیت آنالیز مناسب‌تری ارائه می‌دهند، می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مواد

خمیر شیمیایی الیاف بلند به طور کامل رنگبری‌شده به صورت ورقه‌های خشک وارداتی از شرکت صنایع چوب و کاغذ مازندران تهیه و به عنوان منبع سلولزی مورد استفاده قرار گرفت. نانوالیاف سلولزی مورد استفاده در این پژوهش نیز از همین منبع سلولزی و توسط شرکت دانش بنیان نانونوین پلیمر تهیه شد.

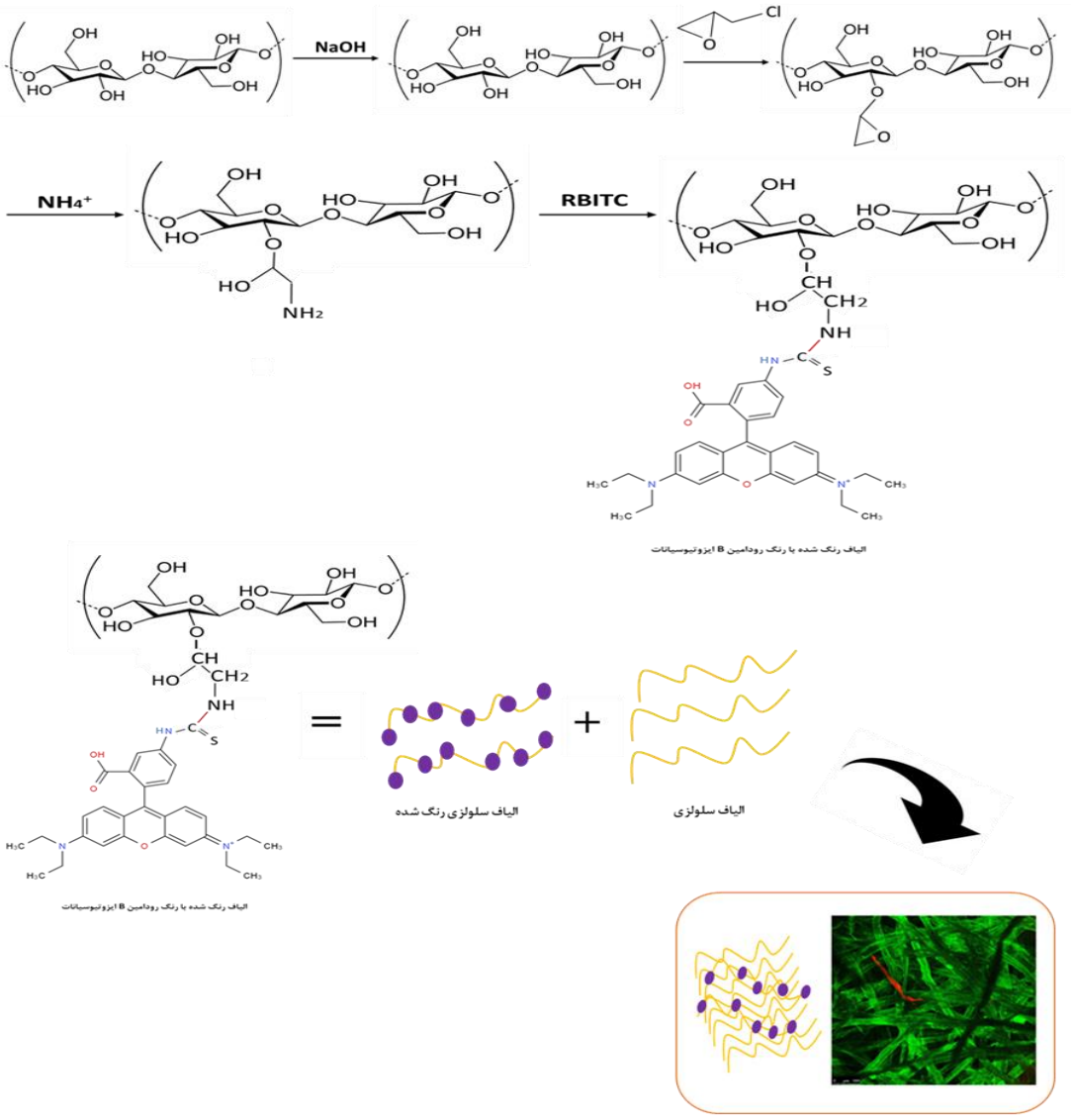
همچنین، رنگ فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات (RBITC)، هیدروکسید سدیم (۹۷ درصد)، اپی‌کلروهیدرین (۹۹ درصد)، آمونیوم‌هیدروکسید (NH_4OH) و آمونیوم‌کلرید (NH_4Cl) از شرکت مرک آلمان خریداری شد. به‌علاوه، مواد افزودنی شامل نشاسته کاتیونی از نوع نشاسته کاتیونی تاپیوکا حاوی گروه کاتیونی آمین نوع چهارم با درجه استخلاف ۰/۰۱۸ (mol/mol) از شرکت Siam Modified Starch تایلند تهیه شد. نانوسیلیکا، با بار آنیونی و پراکنش ابعاد حدود ۵-۲ نانومتر به صورت کلوییدی بی‌رنگ از شرکت EKA Paper Chemicals با کد تجاری NP320 تهیه گردید. تمام مواد شیمیایی تهیه شده بدون خالص سازی مورد استفاده قرار گرفتند.

رنگ‌آمیزی ماده سلولزی

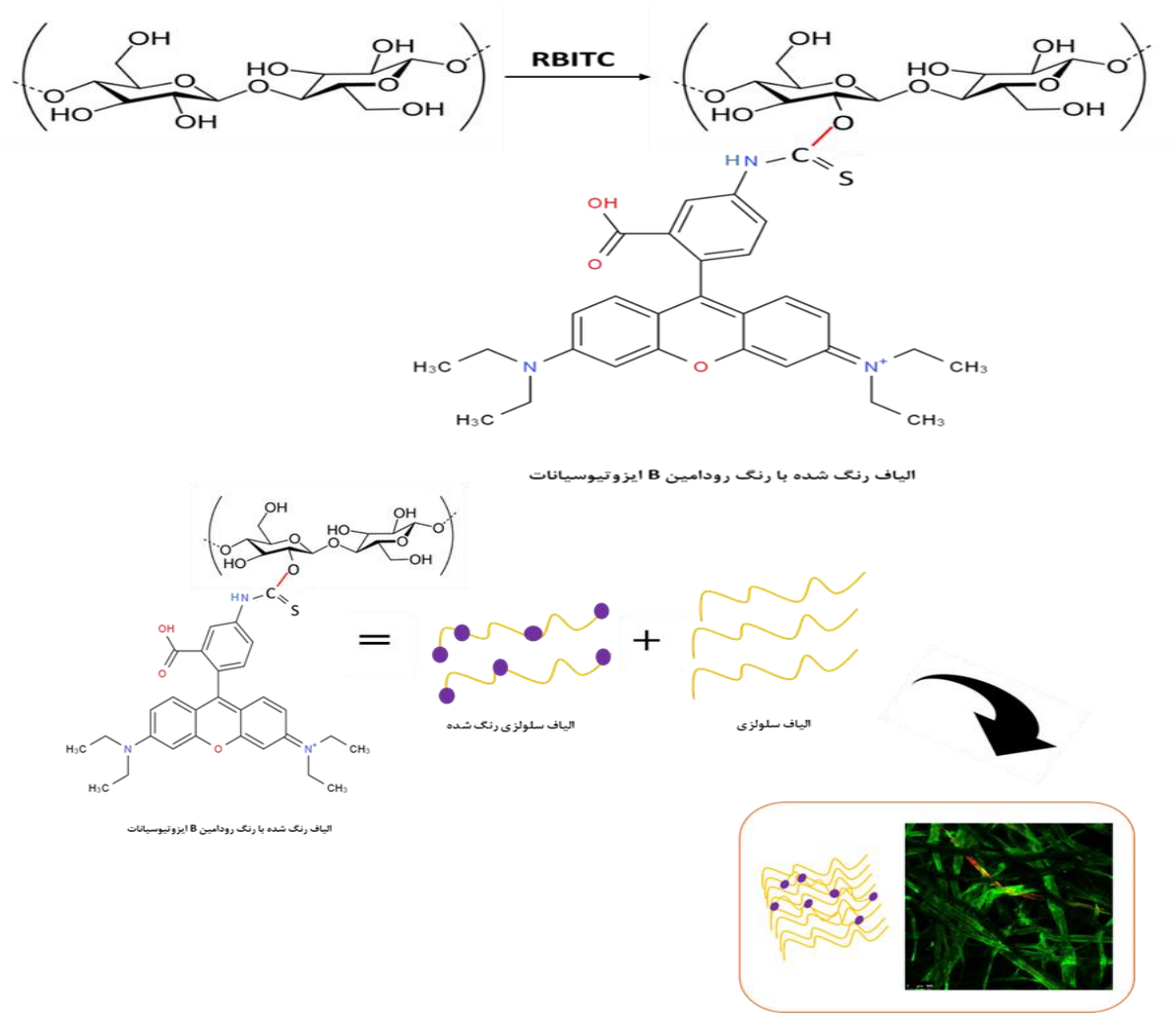
رنگ‌آمیزی ماده سلولزی به دو روش مستقیم و غیرمستقیم انجام شد. در روش غیرمستقیم، به منظور افزودن گروه اپوکسی بر روی گروه‌های OH سلولزی، ابتدا ماده سلولزی با اپی‌کلروهیدرین (۵ ml/g به ازای وزن خشک ماده سلولزی) در شرایط قلیایی (pH:۱۲) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت همزده شد. سپس سوسپانسیون‌ها سانتریفیوژ شده و با آب دیونیزه شست‌وشو شدند تا گروه‌های واکنش نداده حذف شوند. در مرحله بعد، هیدروکسید آمونیوم (۴ ml/g به ازای وزن خشک ماده سلولزی) و آمونیوم کلرید (۱ml/g به ازای وزن خشک ماده سلولزی) به سوسپانسیون‌های نانوالیاف/الیاف سلولزی دارای گروه اپوکسی اضافه شد (pH:۱۱) و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد توسط همزن مکانیکی به مدت ۲ ساعت اختلاط یافت. سپس سوسپانسیون‌ها سانتریفیوژ شده و تا رسیدن به pH خنثی (pH:۷) شست‌وشو شدند. در مرحله آخر، RBITC (۰/۰۱ g/g به ازای وزن خشک ماده سلولزی) به سوسپانسیون نانوالیاف/الیاف اضافه شد و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی بر روی همزن قرار داده شد. به عبارت دیگر، در روش رنگ‌آمیزی غیرمستقیم، در ابتدا سطح ماده سلولزی به صورت شیمیایی اصلاح می‌شوند و برای پیونددهی با رنگ دارای یک گروه آمین می‌شوند و سپس رنگ به آن اضافه می‌شود. رنگ با ماده سلولزی پیوند کوالانسی تشکیل می‌دهند. طبق شکل ترسیم شده در زیر (شکل۱)، ابتدا با افزودن اپی‌کلروهیدرین به سوسپانسیون ماده سلولزی در شرایط قلیایی و با pH حدود ۱۲، یک گروه اپوکسی بر روی یکی از گروه‌های OH نانوالیاف/الیاف معرفی می‌شود. در ادامه با افزودن آمونیوم‌هیدروکسید و آمونیوم‌کلرید یک گروه آمین و یک OH جدید بر روی گروه OH قبلی واحد

گلوکزی که یک گروه اپوکسی روی آن معرفی شده بود، ایجاد شد. بنابراین این ماده سلولزی با گروه آمین ایجاد شده، آماده رنگ‌آمیزی گردید. بعد از افزودن رنگ به سوسپانسیون نانوالیاف/الیاف سلولزی اصلاح شده، رنگ-آمیزی در محیط تاریک انجام شد و رنگ با ماده سلولزی پیوند کوالانسی تشکیل داد. این روش بارها در مطالعات پیشین معرفی شده است [۸] و برای مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۷،۱۰].

در روش مستقیم تنها مرحله معرفی RBITC به سوسپانسیون نانوالیاف/الیاف سلولزی خنثی (pH:۷) که از قبل شست‌وشو شده‌اند، انجام شد و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت برروی همزن در تاریکی قرار داده شد.



شکل ۱. شماتیک انجام کار رنگ‌آمیزی با عامل فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات به روش غیرمستقیم [۸،۱۶]



شکل۲. شماتیک پیشنهادی روش رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات به روش مستقیم

سپس نانوالیاف/ الیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده در هر دو روش برای حذف معرف‌های واکنش نداده (رنگ) ابتدا سانتریفیوژ و سپس با آب یون زدایی شده شست‌وشو گردید تا زمانی که رنگی در پساب بعد از سانتریفیوژ باقی نماند که این مورد توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در محدوده فرابنفش- مرئی با تحریک در طول موج ۵۵۵ نانومتر بررسی شد. تمامی مراحل رنگ‌آمیزی در محیط تاریک انجام گرفت.

بررسی پتانسیل زتای نانوالیاف رنگ‌آمیزی شده به دو روش مستقیم و غیرمستقیم

پتانسیل الکتریکی اثرگذار ذرات برای کاربردهای گسترده‌ای از اهمیت بالایی برخوردار است و در چگونگی برهمکنش ذرات دارای بار در شرایط کلوئیدی موثر است [۱۵]. با هدف بررسی تغییرات بار اثرگذار ذره در اثر رنگ‌آمیزی با مواد فلورسنت، آنالیز پتانسیل زتا انجام شد. با توجه به سطح ویژه بسیار بیشتر نانوالیاف، پتانسیل زتای نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده به روش مستقیم و غیرمستقیم، تعیین و با پتانسیل زتای نانوالیاف رنگ‌آمیزی نشده به عنوان شاهد، مقایسه گردید. بدین منظور از دستگاه Zeta sizer (Zeta–DLS) ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان استفاده شد که این آنالیز به صورت سه تکرار در pH:۱۲ انجام گرفت.

تهیه خمیرکاغذ و ورقه کاغذ دست‌ساز آزمایشگاهی

آماده‌سازی خمیرکاغذ

ورقه‌های خمیر خشک وارداتی (الیاف سوزنی‌برگ سفید به طور کامل رنگبری‌شده) با هدف تسهیل فرآیند خمیرسازی، ابتدا بصورت دستی قطعه‌قطعه شدند. سپس عمل پراکنده‌سازی و جداسازی الیاف، با استفاده از دستگاه کوبنده آزمایشگاهی (Beater Valley) و بر طبق استاندارد TAPPI T200 sp-01 انجام شد. برای این کار سوسپانسیون الیاف آماده شده را به درون ظرف دستگاه ریخته و عمل پراکنده کردن الیاف به مدت ۳۰ دقیقه بدون اعمال نیروی وزنه صورت گرفت. در ادامه فرآیند پالایش تا رسیدن به درجه روانی مورد نظر (۳۵۰ ml CSF)، با آویزان کردن وزنه ۵۵۰۰ گرمی انجام شد. در نهایت سوسپانسیون حاصل برای انجام مراحل بعدی کار در ظرف دربسته در یخچال در دمای حدود ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

ساخت ورقه کاغذ حاوی مواد سلولزی رنگ آمیزی شده و فاقد رنگ آمیزی

خمیرکاغذ با استفاده از همزن مکانیکی آزمایشگاهی با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه پراکنده شد. کاغذ حاوی الیاف رنگ‌آمیزی شده، با افزودن ۱ درصد وزنی الیاف سلولزی نشان‌دار شده (با هر دو روش رنگ‌آمیزی) و همچنین کاغذهای حاوی نانوالیاف نشان‌دار شده (با هر دو روش رنگ‌آمیزی) با افزودن ۸ درصد نانوالیاف رنگ‌آمیزی شده به سوسپانسیون الیاف سلولزی تهیه شدند (جدول ۱). درصد الیاف رنگ آمیزی شده (به مقدار یک درصد وزن خشک الیاف) بر اساس آزمون‌های اولیه و درصد اختلاط نانوالیاف (۸ درصد وزن خشک الیاف) بر اساس مرور منابع تعیین گردید [۷]. نمونه کاغذهای دست‌ساز بر طبق شیوه‌نامه مندرج در استاندارد TAPPI T 205 cm-00، با استفاده از دستگاه تولیدکاغذ دست‌ساز آزمایشگاهی (PTI، اتریش) تهیه شدند [۱۶]. توری کاغذسازی پس از اتمام ساخت ورق کاغذ در هر مرحله با آب به طور کامل شسته شد. در مرحله آخر، ورق کاغذ در یک محیط تاریک با شرایط دمایی ۲۵ ^{o}C و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا در هوای آزاد خشک شوند. برای آماده‌سازی نشاسته کاتیونی، سوسپانسیون با غلظت ۰/۵ درصد تهیه و بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه به آرامی حرارت داده شد و همزده شد تا به دمای ۹۰ ^{o}C برسد و سپس در همین دما نیز به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. در آخر پس از خنک شدن و رسیدن به دمای محیط، نشاسته در همان روز مورد استفاده قرار گرفته است. نانوسیلیکا نیز با غلظت ۰/۱ درصد و به نسبت ۰/۱ درصد (وزن خشک الیاف) مورد استفاده قرار گرفت.

جدول۱- ترکیب اختلاط مواد سلولزی رنگ‌آمیزی شده در کاغذهای تصویربرداری شده

خمیرکاغذ	الیاف/نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده با روش مستقیم	الیاف/نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده با روش غیرمستقیم
خمیرکاغذ شاهد	۰	۰
خمیرکاغذ با ترکیب ۱	۱ درصد الیاف	۰
خمیرکاغذ با ترکیب ۲	۰	۱ درصد الیاف
خمیرکاغذ با ترکیب ۳	۸ درصد نانوالیاف	۰
خمیرکاغذ با ترکیب ۴	۰	۸ درصد نانوالیاف

با توجه به بزرگتر بودن ابعاد الیاف نسبت به نرمه‌ها، قطعات الیاف و نانوالیاف، برای بررسی کیفیت ظاهری رنگ‌آمیزی در دو روش مستقیم و غیرمستقیم، یک درصد الیاف رنگ‌آمیزی شده و با الیاف زمینه‌ای کاغذ مخلوط گردید. همچنین در ادامه، با توجه به بیشتر بودن سطح ویژه نانوالیاف نسبت به الیاف، انتظار می‌رود اثر روش رنگ‌آمیزی بر تعامل‌ها و برهمکنش‌های سطحی در خصوص نانوالیاف بیشتر نمایان گردد؛ لذا با هدف بررسی

تاثیر احتمالی روش رنگ‌آمیزی بر تعامل‌ها و برهمکنش-های سطحی زیاد نانوالیاف، هشت درصد نانوالیاف با الیاف رنگ‌آمیزی نشده زمینه‌ای کاغذ مخلوط و ارزیابی‌های میکروسکوپی، پتانسیل زتا و درجه روانی خمیرکاغذ بررسی گردید (جدول ۱).

تصویربرداری میکروسکوپی

در این مطالعه، آنالیز تصویربرداری فلورسنت با میکروسکوپ روبشی هم‌کانون لیزری و یا کانفوکال (confocal microscope) بر اساس دستورالعمل R00 SOP۹۶۰۳۱ انجام شد. نمونه‌ها پس از اینکه بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده شدند، در بزرگنمایی ده برابر تصویربرداری شدند. لازم به توضیح است با توجه به نازک بودن ورقه‌ها، همه تصاویر ارائه شده در این مقاله دو بعدی (از کل ضخامت ورقه کاغذ) تهیه شده است.

اندازه‌گیری درجه روانی

در ادامه به منظور بررسی اثر روش رنگ‌آمیزی بر تعامل‌ها و برهمکنش‌های سطحی و کیفیت تشکیل دلمه در خمیرکاغذ، بویژه در خمیرکاغذ حاوی نانوالیاف رنگ-آمیزی شده و رنگ‌آمیزی نشده، اندازه‌گیری درجه روانی خمیرکاغذ به عنوان یک معیار، بر اساس شیوه‌نامه استاندارد TAPPI T 227 om-00 انجام گرفت [۱۷]. احتمال می‌رود با توجه به سطح ویژه زیاد نانوالیاف و همچنین اثرگذاری بسیار زیاد حضور نانوالیاف بر درجه روانی خمیر کاغذ [۱۸،۱۹]، تغییرات در ویژگی‌های سطح نانوالیاف پس از رنگ‌آمیزی، می‌تواند اثر خود را بهتر از الیاف نمایش دهد. همچنین، ماده افزودنی نشاسته-نانوسیلیکا یک ترکیب افزودنی کمک آبگیری است که وابستگی زیادی به بار سطحی و ویژگی‌های سطحی دارد و بنابراین در تعامل با نانوالیاف می‌تواند تغییرات ویژگی‌های سطحی نانوالیاف در اثر رنگ‌آمیزی را در عمل نشان دهد. با این هدف، از نمونه خمیر شاهد (فاقد نانوالیاف و مواد افزودنی)، درجه روانی گرفته شد. در ادامه نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی نشده، بدون مواد افزودنی و هم چنین در مرحله بعد با مواد افزودنی (نشاسته کاتیونی به مدت ۶۰ ثانیه و نانوسیلیکای آنیونی به مدت ۱۵ ثانیه) مورد ارزیابی درجه روانی قرار گرفت. سپس نانوالیاف رنگ‌آمیزی شده به دو روش مستقیم و غیرمستقیم به همراه مواد افزودنی (نشاسته کاتیونی به مدت ۶۰ ثانیه و نانوسیلیکای آنیونی به مدت ۱۵ ثانیه) به سوسپانسیون اضافه شده و تحت شرایط ثابت ارزیابی شدند.

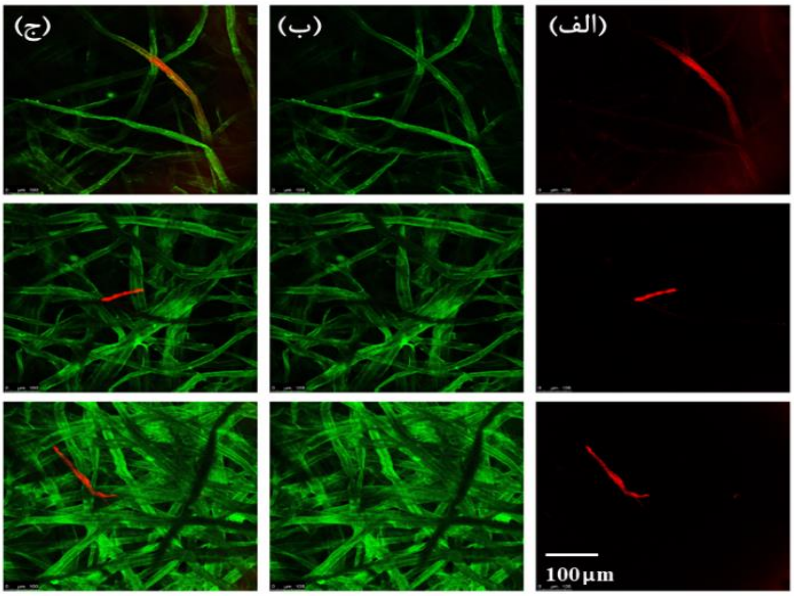
نتایج و بحث

در این پژوهش به بررسی روش‌های رنگ‌آمیزی الیاف و نانوالیاف سلولزی با رنگ فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات با دو روش رنگ‌آمیزی مستقیم، اتصال عامل رنگ‌زا به گروه‌های هیدروکسیل سلولزی (OH-) و غیرمستقیم، اتصال عامل رنگ‌زا به گروه‌های ($-NH_2$) جایگزین شده بر روی سطح ماده سلولزی پرداخته شد. در مطالعات پیشین روش‌های رنگ‌آمیزی توسط Botelho and Vieira (۲۰۰۱) مطرح شد [۸]، اما به طور تقریبی در تمامی مطالعات در صنایع چوب و الیاف سلولزی از روش غیرمستقیم برای رنگ‌آمیزی مواد سلولزی استفاده شده است [۳،۷،۱۰]. لذا در این مطالعه به بررسی مقایسه‌ای رنگ‌آمیزی الیاف و نانوالیاف سلولزی به روش مستقیم و همچنین غیرمستقیم پرداخته شد و کیفیت رنگ‌آمیزی از طریق انجام رنگ‌آمیزی در شرایط یکسان و تصویربرداری و مشاهده میکروسکوپی آنها مورد مطالعه قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی الیاف سلولزی به روش غیرمستقیم

با هدف بررسی کیفیت نشان‌دار کردن ماده سلولزی به روش غیرمستقیم، از طریق معرفی گروه‌های آمینی و اتصال عامل فلورسنت به آن، تصاویر میکروسکوپی ذیل مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۳، تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های کاغذی با وزن پایه ۲۵ گرم بر متر مربع حاوی یک درصد الیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده به روش غیرمستقیم (تصویربرداری درصفحه ورقه کاغذ؛ بزرگنمایی ۱۰X) را نشان می‌دهد. هر ردیف از تصاویر، مربوط به یک نقطه از لبه صفحه تا وسط صفحه در یک ورقه نمونه کاغذ می‌باشد. در هر ردیف از تصاویر، از سمت راست (الف) ابتدا ماده سلولزی نشان‌دار شده، تصویر (ب)، الیاف نشان‌دار نشده در همان تصویر قبل را نمایش می-دهد و تصویر (ج)، الیاف نشان‌دار شده و نشده را با هم

بصورت یکجا نشان می‌دهد (الف و ب یکجا نشان داده شده است). در شکل ۳، به وضوح پراکنش الیاف نشان‌دار شده در شبکه الیاف نمایان است. بر اساس همین روش، پیش از این نیز پراکنش انواع مواد سلولزی، نظیر انواع الیاف، نرمه‌ها و نانوالیاف در ساختار کاغذ، با استفاده از روش رنگ‌آمیزی غیرمستقیم در منابع مختلف بررسی و مورد کاربرد قرار گرفته است [۷،۱۰].



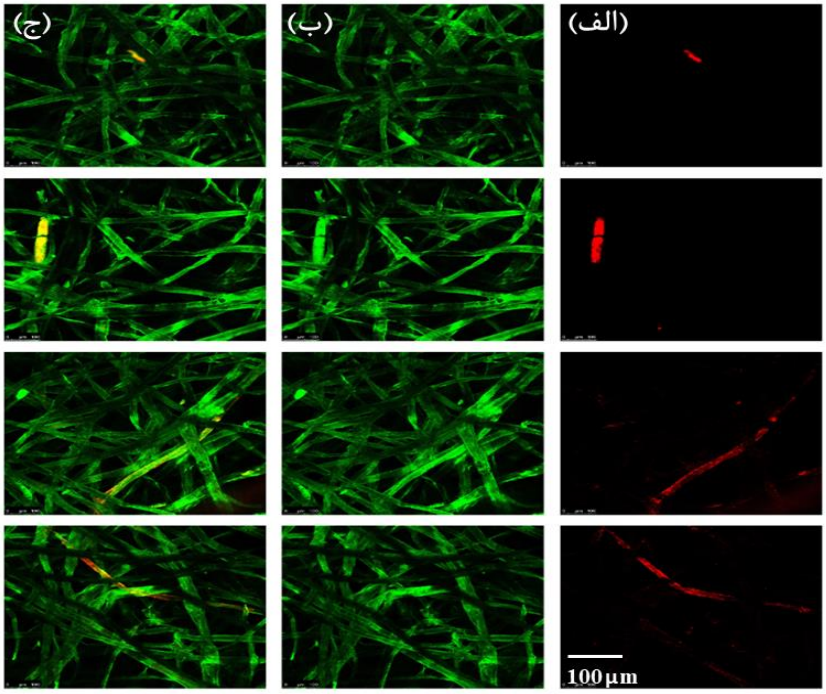
شکل ۳. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های کاغذی در وزن پایه ۲۵ گرم بر متر مربع حاوی یک درصد الیاف سلولزی رنگ-آمیزی شده به روش غیرمستقیم (تصویربرداری درصفحه ورقه کاغذ؛ الف: ماده سلولزی نشان‌دار شده؛ ب: الیاف نشاندار نشده؛ ج: ترکیب تصاویر «الف» و «ب» در نمایش همزمان)

رنگ‌آمیزی الیاف سلولزی به روش مستقیم

در این روش، رنگ به طور مستقیم به سوسپانسیون الیاف سلولزی بدون اصلاح و دارای pH خنثی افزوده و در محیط تاریک رنگ‌آمیزی به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، ادعا شده است که ساختار رنگ در روش رنگ‌آمیزی مستقیم، با گروه OH الیاف وارد واکنش شده و از این طریق به الیاف متصل می‌گردد [۸]. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌ها، در شکل ۴ آورده شده است. از مقایسه تصاویر تهیه شده جهت بررسی روش رنگ‌آمیزی در مرحله اول این مطالعه (شکل‌های ۳ و ۴)، می‌توان نتیجه گرفت که رنگ‌آمیزی به روش غیرمستقیم کیفیت رنگ‌آمیزی بهتری نسبت به رنگ‌آمیزی به روش مستقیم نشان داد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در اولین ستون از سمت چپ در شکل‌های ۳ و ۴، الیاف نشان‌دار شده در شکل ۳ رنگ قرمز ناشی از نشان‌دارشدن با رنگ رودامین ایزوتیوسیانات را بهتر نشان می‌دهد؛ به بیان دیگر می‌توان گفت که رنگ-آمیزی بهتر و تمیزتری نیز در تصاویر ارائه داده است.

همان‌طور که از تصاویر میکروسکوپی گرفته شده مشاهده شد، الیاف سلولزی دارای خاصیت فلورسنس طبیعی (رنگ سبز منعکس شده از الیاف) هستند که در تحقیقات مختلف نیز به آن اشاره شده است. اما با توجه به اینکه نرمه‌های سلولزی، نانوالیاف سلولزی و الیاف سلولزی منشا یکسان دارند، بنابراین خاصیت فلورسنس طبیعی مشترک و رنگ سبز یکسانی را در زمینه نشان می‌دهند. لذا، به طور خاص در مطالعاتی که در آن دو ماده دارای یک ساختار شیمیایی مشترک و از یک منبع اولیه مشترک و در نتیجه دارای خاصیت فلورسانی یکسان، اما در ابعاد و اندازه‌های مختلف و با اهداف مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرد، لازم خواهد بود که جزء مورد بررسی نشان‌دار گردد که این هدف بخوبی با استفاده از دو روش رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت رودامین B

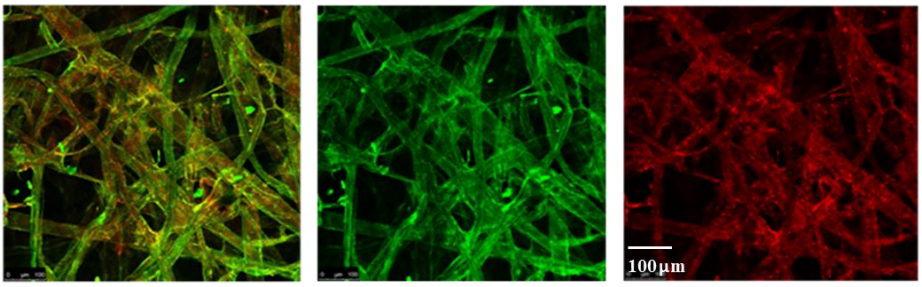
ایزوتیوسیانات در این مطالعه به طور کامل مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه امکان استفاده مستقیم از رنگ فلورسنت رودامین B ایزوتیوسیانات را چنان که توسط Botelho and Vieira (۲۰۰۱) مطرح شد [۸]، نشان می‌دهد هرچند به طور احتمالی به دلیل کیفیت کمتر رنگ آمیزی در مطالعات چندان مورد استفاده قرار نگرفته است.



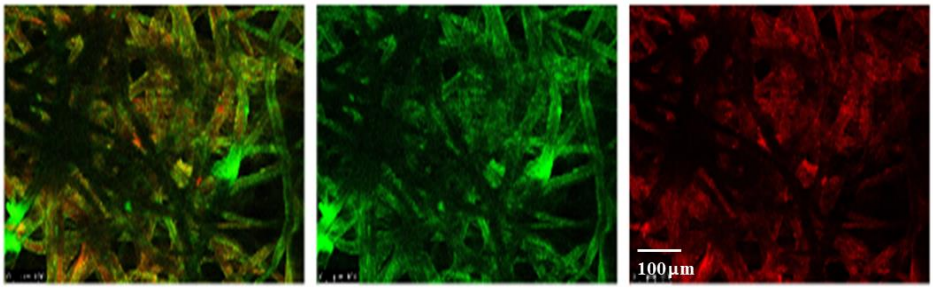
شکل۴. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های کاغذی در وزن پایه ۲۵ گرم بر متر مربع حاوی ۱ درصد الیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده به روش مستقیم (تصویربرداری درصفحه ورقه کاغذ (در جهت x,y)؛ الف: ماده سلولزی نشان‌دار شده؛ ب: الیاف نشاندار نشده؛ ج: ترکیب تصاویر «الف» و «ب» در نمایش همزمان)

رنگ‌آمیزی نانوالیاف سلولزی به دو روش رنگ‌آمیزی مستقیم و غیرمستقیم

نانوالیاف سلولزی با توجه به ویژگی‌های منحصربه فردشان با هدف افزایش پیوندیابی و در نهایت افزایش مقاومت‌ها و افزایش کیفیت کاغذ نهایی در بعضی موارد به خمیرکاغذ افزوده می‌شود [۱۸]. بر همین اساس، امکان بررسی پراکنش نانوالیاف با دو روش رنگ آمیزی (مستقیم و غیرمستقیم) مورد مطالعه قرار گرفت. تصاویر زیر (شکل ۵ و ۶) پس از رنگ‌آمیزی نانوالیاف و سپس افزودن آن به خمیرکاغذ و ساخت کاغذ، با میکروسکوپ اسکن هم‌کانون لیزری کانفوکال تهیه شد. همان‌طور که از تصاویر مشخص است، نانوالیاف به دلیل ریزابعاد بودن و مقدار به نسبت زیاد آن (۸ درصد وزن خشک کاغذ) در کل شبکه پخش شده و حتی بر روی سطح الیاف پراکنده شده‌اند، چنان که سطح الیاف هم بدلیل استقرار نانوالیاف نشان‌دار شده به رنگ قرمز نمایش داده شده است.



شکل ۵. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های کاغذی در وزن پایه ۶۰ گرم بر متر مربع حاوی ۸ درصد نانوالیاف سلولزی رنگ-آمیزی شده به روش مستقیم (درصفحه ورقه کاغذ؛ جهت x,y)؛ بخش‌های قرمز رنگ، پراکنش نانوالیاف نشان‌دار شده و بخش‌های سبزرنگ، الیاف و مواد سلولزی نشان‌دارنشده را نشان می‌دهند.



شکل ۶. تصاویر میکروسکوپی گرفته شده از نمونه‌های کاغذی در وزن پایه ۶۰ گرم بر متر مربع حاوی ۸ درصد نانوالیاف سلولزی رنگ-آمیزی شده به روش غیرمستقیم (درصفحه ورقه کاغذ؛ جهت x,y)؛ بخش‌های قرمز رنگ، پراکنش نانوالیاف نشان‌دار شده و بخش‌های سبزرنگ، الیاف و مواد سلولزی نشان‌دارنشده را نشان می‌دهند.

بررسی پتانسیل زتا

در این پژوهش به منظور بررسی تغییرات بار منفی سطحی نانوالیاف رنگ‌آمیزی شده که می‌تواند بر تشکیل فلاک و استفاده از پلی‌الکترولیت‌ها و در نهایت پراکنش نانوالیاف سلولزی در ساختار کاغذ اثر بگذارد، از آزمون پتانسیل زتا استفاده شد. این آزمون در واقع میزان بار اثرگذار ذره را اندازه‌گیری می‌کند [۱۵]. باید گفت که میزان پتانسیل زتا با میزان بار سطحی ذرات رابطه دارد. یکی از عوامل اثرگذار بر پایداری کلوییدها، بار سطحی ذرات است. بارهایی که هم نام هستند و باعث می‌شوند تا ذرات یکدیگر را دفع کرده و مانع پیوستن ذرات به هم و تشکیل کلوخه‌های بزرگتر می‌شوند. نتایج تغییرات پتانسیل زتا در اثر رنگ‌آمیزی در جدول ۲ آورده شده است.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که بار الکتریکی (منفی) نانوالیاف در اثر رنگ‌آمیزی به‌طور تقریبی دو برابر افزایش می‌یابد. اما در روش رنگ‌آمیزی غیرمستقیم این افزایش بار به نسبت کمتر از روش مستقیم بوده است. افزایش بار آنیونی ماده سلولزی پس از رنگ‌آمیزی را می‌توان به معرفی گروه‌های کربوکسیل ماده رنگی فلورسنت بر روی الیاف نسبت داد.

جدول۲- نتایج حاصل از آزمون پتانسیل زتا

نام	میانگین	انحراف معیار
نمونه رنگ‌آمیزی نشده (شاهد)	-۱۰/۹۶	۰/۶۰
نمونه رنگ‌آمیزی شده به روش مستقیم	-۲۴/۷۰	۰/۷۵
نمونه رنگ‌آمیزی شده به روش غیرمستقیم	-۲۰/۲۳	۱/۰۷

بررسی درجه روانی (ارزیابی قابلیت آبگیری از خمیرکاغذ)

در این بررسی با افزودن نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی نشده و رنگ‌آمیزی شده به دو روش مستقیم و غیرمستقیم، به خمیرکاغذ و بدون مواد کمک‌آبگیری و همچنین با مواد مواد کمک‌آبگیری، درجه روانی و قابلیت آبگیری مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود، بر طبق انتظار قابلیت آبگیری نمونه خمیرکاغذ شاهد، با افزایش نانوالیاف سلولزی به میزان زیادی کاسته شد [۱۸،۱۹]. دلیل این کاهش را می‌توان به آبدوست بودن و نگهداری آب در ساختار نانوالیاف سلولزی نسبت داد که با داشتن سطح ویژه زیاد که پوشیده از گروه‌های هیدروکسیلی می‌باشد، آب را در ساختار خود نگه می‌دارند. همچنین نانوالیاف سلولزی با توجه به اینکه قابلیت تشکیل شبکه در درون سوسپانسیون خمیر را دارند، پس از تشکیل ورقه تر بر روی توری، سبب بسته شدن منافذ بین الیاف که مسیر خروج آب است، می‌شوند و با ایجاد نیروهای مویینگی در شبکه نانوالیاف، توانایی و ظرفیت نگهداری آب را افزایش داده و آبگیری را کندتر می‌نمایند [۲۰]. با افزودن ۱/۵ درصد نشاسته کاتیونی و ۰/۱ درصد نانوسیلیکای آنیونی، قابلیت آبگیری تا حد زیادی افزایش پیدا کرد. چنانکه کاهش درجه روانی در اثر افزودن نانوالیاف جبران گردید. همچنین، اثر استفاده از نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده به هر دو روش، بر کارایی مواد کمک آبگیری مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد، رنگ آمیزی به هر دو روش، اثر چندانی بر قابلیت آبگیری از ورقه کاغذ نداشته است و نتایج قابلیت آبگیری، مشابه نتایج نانوالیاف بدون رنگ‌آمیزی بر قابلیت آبگیری از خمیر است.

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی درجه روانی

نوع تیمار	درجه روانی (میلی‌لیتر)
درجه روانی خمیر شاهد	۳۵۰
درجه روانی خمیرکاغذ با افزودن نانوالیاف رنگ نشده	۲۲۰
درجه روانی خمیرکاغذ با افزودن نانوالیاف رنگ نشده با ۱،۵٪ نشاسته کاتیونی و ۰،۱٪ نانوسیلیکا	۳۶۰
درجه روانی خمیرکاغذ با افزودن نانوالیاف رنگ شده با روش مستقیم با ۱،۵٪ نشاسته کاتیونی و ۰،۱٪ نانوسیلیکا	۳۶۰
درجه روانی خمیرکاغذ با افزودن نانوالیاف رنگ شده با روش غیرمستقیم با ۱،۵٪ نشاسته کاتیونی و ۰،۱٪ نانوسیلیکا	۳۵۰

نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی روش‌های رنگ‌آمیزی الیاف سلولزی به روش مستقیم و غیرمستقیم پرداخته شد و کیفیت رنگ‌آمیزی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. در نهایت این نتیجه حاصل شد که هرچند هر دو روش در موارد مورد کاربرد در این پژوهش، کارایی قابل قبولی ارائه دادند، اما استفاده از رنگ‌آمیزی به روش غیرمستقیم، تصاویر یکنواخت‌تر، مناسب‌تر و تمیزتری را در مطالعات تصویربرداری ارائه داد.

همچنین به منظور بررسی تغییرات پتانسیل موثر نانوالیاف رنگ‌آمیزی شده که می‌تواند بر تشکیل فلاک و استفاده از پلی‌الکترولیت‌ها و در نهایت پراکنش نانوالیاف سلولزی در ساختار کاغذ اثر بگذارد، در این مطالعه از آنالیز پتانسیل زتا استفاده شد که نتایج نشان داد، پتانسیل زتای (منفی) نانوالیاف رنگ‌آمیزی به هر دو روش رنگ-آمیزی نسبت به نانوالیاف رنگ‌آمیزی نشده تقریبا دو برابر افزایش یافت. اما در روش رنگ‌آمیزی غیرمستقیم این افزایش بار، کمی کمتر از روش رنگ‌آمیزی مستقیم بوده است.

اثر استفاده از نانوالیاف سلولزی رنگ‌آمیزی شده به هر دو روش، با مواد کمک‌آبگیری، با استفاده از تست درجه روانی، مورد ارزیابی قرار گرفت که مشاهده شد، رنگ آمیزی اثر چندانی بر درجه روانی نداشته است و نتایج مشابه نتایج نانوالیاف بدون رنگ‌آمیزی حاصل شد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مشورت‌های Prof. Antje Potthast، استاد بخش شیمی، موسسه شیمی مواد تجدیدپذیر، دانشگاه منابع طبیعی و علوم زندگی، وین، اتریش و نیز همکاری آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی شریف قدردانی می‌نماید.

منابع

[1] Horobin, R. and Kiernan, J., eds., 2002. Conn's biological stains: A handbook of dyes, stains and fluorochromes for use in biology and medicine, Taylor & Francis.

[2] Mycek, M.A. and Pogue, B.W., 2003. Handbook of biomedical fluorescence, CRC Press, Boca Raton, FL.

[3] Hubbe, M.A., Chandra, R. P., Dogu, D. and Velzen, S.T.J., 2019. Analytical staining review. BioResources, 14(3): 7387-7464.

[4] Jin, D. and Piper, J.A., 2011. Time-gated luminescence microscopy allowing direct visual inspection of lanthanide-stained microorganisms in background-free condition. Anal. Chem., 83(6): 2294–2300.

[5] Hagen, G.M., Bendesky, J., Machado, R., Nguyen, T.A., Kumar, T. and Ventura, J., 2021. Fluorescence microscopy datasets for training deep neural networks. GigaScience, 10(5): 1-6 (giab032).

[6] Dong, S.P. and Roman, M., 2007. Fluorescently labeled cellulose nanocrystals for bio-imaging applications. J. Am. Chem. Soc., 129, 13810-13811.

[7] Ding, Q., Zeng, J., Wang, B., Gao, W., Chen, K., Yuan, Z., Xu, J. and Tang, D., 2018. Effect of retention rate of fluorescent cellulose nanofibrils on paper properties and structure. Carbohydr. Polymers, 186: 73-81.

[8] Botelho, D.R., Vieiri, F., 2001. Photonic and electronic spectroscopies for the characterization of organic surfaces and organic molecules adsorbed on surfaces, in: Handbook of surface and interface analysis and properties, Academic Press.

[9] Rohrling, J., Potthast, A., Rosenau, T., Lange, T., Ebner, G., Sixta, H. and Kosma, P., 2002. A novel method for the determination of carbonyl groups in cellulosics by fluorescence labeling. 1. method development. Biomacromolecules, 3(5): 959-968.

[10] Hobisch, M.A., Bossu, J., Mandlez, D., Spirk, S., Eckhart, R. and Bauer, W., 2019. Localization of cellulose fines in paper via fluorescent labeling. Cellulose, 26, 6933-6942.

[11] Wang, S., Gao, W., Chen, K., Zeng, J., Xu, J. and Wang, B., 2018. An effective method for determining the retention and distribution of cellulose nanofibrils in paper handsheets by dye labeling. TAPPI Journal, 17(3): 157–164.

[12] Whipple, W.L. and Maltesh, C., 2000. Visualizing flocculation and adsorbtion processes in papermaking using fluorescence microscopy. Langmuir, 16(7): 3124-3132.

[13] Huang, L., He, L., Gao, W., Zeng, J., Wang, B., Xu, J. and Chen, K., 2020. Distribution analysis of cellulose nanofibrils in paper handsheets: dyelabeled method, Carbohydrate Polymers, 239, 116-226.

[14] Orelma, H., Filpponen, I., Johansson, L. S., Osterberg, M., Rojas, O. J. and Laine, J., 2012. Surface functionalized nanofibrillar cellulose (NFC) film as a platform for immunoassays and diagnistics, Biointerphases, 61(7): 1-4.

[15] William E. Scott, 1996. Principles of Wet End Chemistry, Tappi Pr, 185 pages.

[16] TAPPI T205 sp-02, 2007. Forming handsheets for physical tests of pulp.

[17] TAPPI T227 om-04, 2007. Freeness of pulp (Canadian standard method).

[18] Yousefhashemi, S. M., Khosravani A. and Yousefi., H., 2019. The effect of addition of lignocellulose nanofiber produced from old corrugated container pulp on recycled paperboard properties, Iranian Journal of Wood and Paper Industries, 9(4): 575-584. (In Persian)

[19] Yousefhashemi, S. M., Khosravani, A. and Yousefi H., 2019. Isolation of lignocellulose nanofiber from recycled old corrugated container and its interaction with cationic starch-nanosilica combination to make paperboard, Cellulose, 26: 7207-7221.

[20] Najideh, R., Rahmaninia, M. and Khosravani A., 2021. Cellulose nanofibers made from waste printing and writing papers and its effect on the properties of recycled paper, Iranian Journal of Wood and Paper Industries, 12(2): 185-194. (In Persian)

Fluorescent labeling methods by rhodamine B isothiocyanate in cellulose Materials

Abstract

Staining with fluorescent materials is one of the widely used methods in studying and locating cellulosic materials. In this study, the staining of cellulosic materials was investigated by two approaches as direct (direct addition of fluorescent labelling agent) and indirect (adding fluorescent label after creating an anchor) methods; then the staining results were compared. The results showed that although imaging was possible in both methods, indirect staining provided relatively better and more effective results in this study. The results showed although fluorescent imaging was possible following both methods, the use of indirect staining method provided relatively more uniform and effective image results during this investigation. Moreover, the effect of each staining method on the surface charge property (zeta potential of nanofibers) and wet-end interactions (via freeness testing as an indicator) were studied. The results showed that the (negative) zeta potential of cellulose material became more negative as a result of staining following both staining methods. It was also observed that the staining of the cellulose material by both methods did not affect the freeness as an indicator.

Keywords: Fluorescent staining, rhodamine, labeling, fluorescent microscope.

H. Sheikhali[1]
A. Khosravani[2*]

[1] MSc, Wood and Paper Science and Technology Department, Natural Resources Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran

[2] Associate Professor, Wood and Paper Science and Technology Department, Natural Resources Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran

Corresponding author:
khosravani@modares.ac.ir

Received: 2022/08/13
Accepted: 2022/10/31