

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИСТАЛЛИЧНОСТИ, ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА И ЛИНЕЙНЫХ РАЗМЕРОВ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ В ОБРАЗЦАХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ МЕТОДОМ ПРОСВЕЧИВАЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Д. В. БАГРОВ*, С. С. ГОЛУБЕВ, Ю. А. КУДЕЯРОВ*, П. Ю. НИКОЛАЕВА**, Г. Е. ОНИЩЕНКО*, Е. А. СМИРНОВА*, А. В. ФЕОФАНОВ***, А. С. ШЕБАНОВА***

* Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

Москва, Россия, e-mail: dbagrov@gmail.com

** Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы,

Москва, Россия, e-mail: sergolub@mail.ru

*** Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и

Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Описана методика определения кристалличности, элементного состава и линейных размеров наночастиц оксидов железа, церия и титана в биологических тканях методом аналитической просвечивающей электронной микроскопии. Предложен способ оценки погрешности измерения размеров наночастиц с помощью электронного микроскопа.

Ключевые слова: линейный размер, кристалличность, элементный состав, неорганические наночастицы, биологические ткани, просвечивающая электронная микроскопия.

The procedure of determination of linear sizes, crystallinity and chemical composition of iron, cerium and titanium oxides nanoparticles in biological tissues by transmission electron microscopy is described. The method for estimation of nanoparticle size measurement error by means of transmission electron microscope is suggested

Key words: linear size, crystallinity, elemental composition, inorganic nanoparticles, biological tissues, transmission electron microscopy.

В настоящее время наноматериалы широко применяются в самых разных областях науки и техники. Специфические свойства вещества в виде наночастиц открывают уникальные возможности получения материалов с новыми свойствами, такими как высокая механическая прочность и особые спектральные, электрические, магнитные, химические и биологические характеристики. Это, в свою очередь, приводит к

увеличению объемов производства наноматериалов. Наиболее распространенными из них являются наночастицы оксидов кремния, титана, цинка, железа, церия, алюминия, металлические наночастицы железа, меди, кобальта, никеля, алюминия, серебра, золота, углеродные нанотрубки, фуллерены [1, 2]. Как следствие, неизбежно увеличивается поступление значительных количеств наноматериалов в окружающую среду, их накопление в компонентах биоты и абиотических средах с последующей передачей человеку. Последствия этих процессов в большинстве случаев непредсказуемы. В связи с этим необходима разработка государственной системы контроля и надзора за производством нанотехнологической продукции, составной частью которой является система мониторинга загрязнений наноматериалами объектов окружающей среды, компонентов биоты, сельскохозяйственных растений и животных, пищевых продуктов.

Формализованная система критериев оценки безопасности нанопроductии с точки зрения токсикологии и экологии должна опираться на метрологически обеспеченные результаты измерений параметров нанопроductии, таких как размеры частиц, их структура, состав и др. Настоящая работа посвящена решению задач метрологического обеспечения измерений параметров нанопроductии.

Одним из первых шагов на пути разработки системы контроля и надзора за выпуском и обращением нанопроductии стало создание и утверждение методических рекомендаций службы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования Российской Федерации [3, 4]. В них, в частности, отмечено, что среди методов, используемых в настоящее время для выявления и идентификации наночастиц в биологических образцах, наиболее разработанными и надежными являются методы аналитической просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Эти методы позволяют обнаруживать в составе сложных многокомпонентных биологических образцов, таких как биологические ткани и отдельные клетки, электроноплотные наночастицы размерами 5 – 100 нм (в случае более мелких частиц резко снижается достоверность анализа), определять их число, размер и форму. С помощью метода дифракции электронов можно подтвердить, что обнаруженные в образце наноразмерные включения имеют кристаллическую структуру, характерную для детектируемых наночастиц. Спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) подтверждает, что в состав выявленных наночастиц входят определенные химические элементы.

Возможности аналитической ПЭМ позволяют использовать ее для решения основных задач, которые ставятся в экспериментах по детектированию техногенных наночастиц в органах и тканях живых организмов. Они включают в себя определения размеров наночастиц (распределения по размерам), их химического состава и кристалличности. Метрологическое обеспечение (МО), необходимое для решения этих задач, требует детальной разработки. В частности, актуальной является разработка методов и средств МО для электронной микроскопии. В качестве средств МО часто используются меры, позволяющие определить метрологические характеристики средств измерений – просвечивающих электронных микроскопов. Важным элементом МО является методика измерений, с помощью которой определяются перечисленные выше параметры наночастиц в органах и тканях.

В качестве составной части государственной системы контроля и надзора за производством нанотехнологической продукции авторами была разработана методика измерений [5], позволяющая проводить измерения структуры, элементного состава и линейных размеров наночастиц оксидов железа, церия и титана в биологических тканях методами аналитической ПЭМ. Данная статья содержит пояснение основных положений методики измерений [5], разработанной и аттестованной в соответствии с положениями [6].

Для апробации методики [5] были использованы следующие наночастицы* (Sigma-Aldrich, США): TiO_2 (не более 25 нм), CeO_2 (не более 25 нм), Fe_2O_3 (не более 50 нм). Из порошков перед введением в живые организмы с помощью ультразвука готовили водные суспензии.

Для апробации методики на растениях использовали семена риса *Oryza sativa* L. Семена проращивали во влажной камере, когда длина корешков достигала 1,5 см, проростки переносили на 24 ч в суспензию наночастиц, затем ополаскивали в дистиллированной воде и использовали для приготовления проб. Электронно-микроскопическому исследованию подвергали участки листьев, корня и стебля.

Для апробации методики на животных использовали мышей cd-1 (половозрелые нелинейные самцы, возраст 4 месяца). Каждой мыши путем инъекции внутрибрюшинно вводили 1 см³ суспензии наночастиц в физиологическом растворе (0,9 %-й раствор хлорида натрия в дистиллированной воде) или чистый физиологический раствор

*Размеры наночастиц приводятся по данным производителя

(контрольный эксперимент). Через 3 ч после введения наночастиц животных умерщвляли с помощью эфирного наркоза и отбирали пробы органов (печени, почки) для электронно-микроскопического исследования.

Подготовку проб к электронно-микроскопическому исследованию (фиксация, обезвоживание, заливка и приготовление срезов) выполняли по рекомендациям [3, 4, 7]. Отметим, что тяжелые металлы, применяемые для контрастирования клеточных структур при стандартной подготовке биологических образцов для ПЭМ, препятствуют выявлению наночастиц оксидов металлов. Поэтому при приготовлении образцов для измерений структуры, химического состава и распределения по размерам наночастиц в соответствии с [5] контрастирующие реагенты не использовали.

При проведении электронно-микроскопического анализа важное значение имеет идентификация наночастиц. Биологические образцы, в том числе срезы тканей, содержат большое количество электроноплотных наноразмерных включений, которые могут быть ошибочно приняты за внедренные искусственные наночастицы. Для того чтобы отличить внедренные в образец наночастицы оксидов железа, церия и титана от биогенных используют дифракцию электронов и СХПЭЭ. Когда доказано, что обнаруженные в образце наночастицы являются именно наночастицами оксидов, определяют их размеры и строят распределение по размерам.

Методика [5] предназначена для решения трех задач – определения кристалличности структуры наночастиц, их элементного состава и распределения наночастиц по размерам.

Определение кристаллической структуры наночастиц. Метрологическое обеспечение необходимо для задач, в которых проводятся количественные измерения (т. е. где результатом измерений является значение некоторой величины и ее погрешность). Поэтому для ответа на вопрос о наличии электронографической кристалличности у обнаруженных наночастиц МО в указанном выше смысле не требуется. Однако, даже в данном случае необходим формализованный критерий определения кристалличности.

При наличии в образце кристаллической структуры пучок электронов дифрагирует на параллельных атомарных плоскостях. При дифракции электронов на монокристаллах дифракционная картина характеризуется появлением ограниченного числа дискретных рефлексов. Поликристаллы и группы хаотично ориентированных монокристаллов приводят к возникновению многочисленных рефлексов, сливающихся в концентрические кольца. Для аморфных образцов

характерно наличие размытого гало на дифракционной картине. Тем самым характер дифракции электронов позволяет определить структуру наночастиц, проверяя их на наличие электронографической кристалличности.

При большом скоплении наночастиц (порядка 100 частиц на 1 мкм²) электронограмма выглядит как система концентрических колец (рис. 1, *а*), электронограмма от одиночных наночастиц – как набор дискретных рефлексов (рис. 1, *б*).

Определение химического состава наночастиц. Для обнаружения в срезах тканей наночастиц железа, титана или церия (Fe, Ce, Ti), используют метод СХПЭЭ [8]. При этом получают энергетический спектр электронов, прошедших через анализируемую область образца, и проверяют наличие в этом спектре характеристических пиков, соответствующих краям поглощения искоемых химических элементов. Значения краев поглощения и соответствующие им электронные оболочки представлены в таблице.

При использовании СХПЭЭ для анализа элементного состава наночастиц наиболее важен вопрос о достоверности выделения пика на спектре на фоне шума. Исследование образца проводят по предусмотренным в программном обеспечении (ПО) конкретного микроскопа процедурам. В частности, спектр записывают с наилучшим возможным разрешением по энергии, а диапазон энергий и характеристический

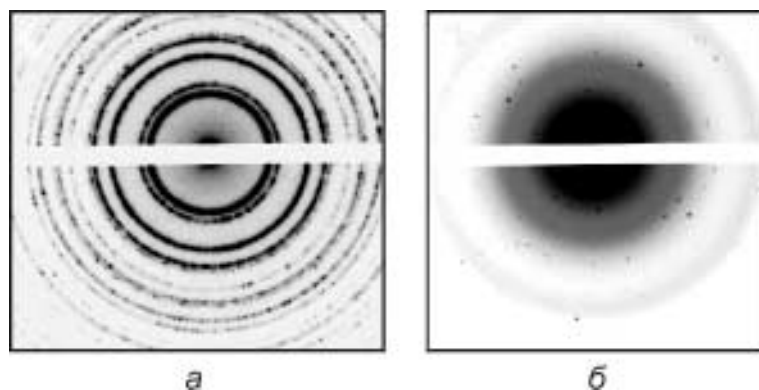


Рис. 1. Картины дифракции электронов от наночастиц оксида церия: при большом количестве наночастиц в поле зрения – непрерывные кольца (*а*), при малом – отдельные рефлексy (*б*)

Края поглощения в спектрах ХПЭЭ некоторых элементов

Элемент	Край поглощения (электронная оболочка), эВ
Ce	902 (M4), 884 (M5)
Fe	721 (L2), 708 (L3)
Ti	461 (L2), 455 (L3)

пик на этом спектре выбирают в соответствии с рекомендациями, заложенными в ПО микроскопа. Пример спектра характеристических потерь от единичной наночастицы оксида железа приведен на рис. 2, а, б.

По полученным спектрам СХПЭЭ определяют края поглощения. Если пики поглощения достоверны и положение краев поглощения соответствует значениям, типичным для искоемых элементов (железа, церия и титана, см. таблицу), то говорят о присутствии соответствующих элементов в образце и элементный состав обнаруженных в срезе ткани наночастиц считают установленным. Для определения достоверности регистрации пика авторами был предложен критерий, аналогичный критерию 3σ [9]. Согласно ему, пик на спектре является достоверным, если локальный максимум интенсивности $I_{\max}$ отличается от ожидаемого (теоретически предсказываемого) значения фона $I_t(E_{\max})$ не менее

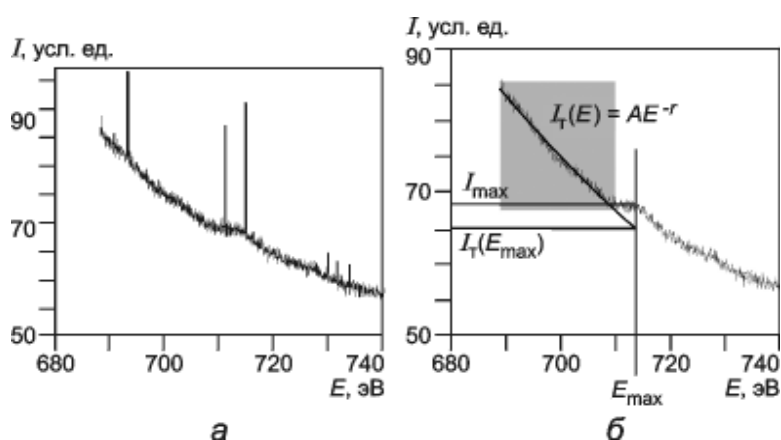


Рис. 2. Спектр характеристических потерь энергии электронов в наночастицах оксида железа:

а – исходный спектр; б – спектр после усреднения, по которому определяют $E_{\max}$ и $I_{\max}$. График функции $I_t(E) = AE^{-r}$ показан черной линией

чем на $3S$, где S – среднеквадратичный уровень шума, т. е. критерий можно записать в виде

$$I_{\max} - I_{\tau}(E_{\max}) > 3S.$$

Для оценки уровня шума и для вычисления ожидаемого значения фона $I_{\tau}(E_{\max})$ используют формулу $I_{\tau}(E) = AE^{-r}$ [8]. Для определения максимума поглощения $E_{\max}$ обычно уменьшают шумы в спектре путем усреднения [5].

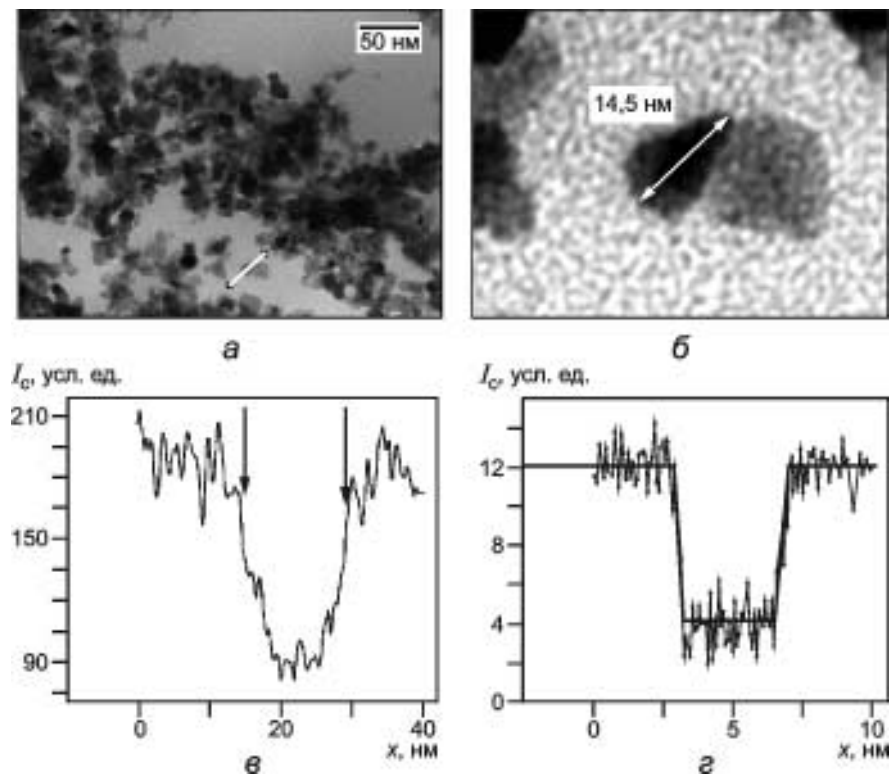


Рис. 3. Пример определения размера наночастицы оксида церия в срезе корешка риса:

a – изображение скопления частиц; b – увеличенное изображение; v – профиль интенсивности яркости вдоль измеряемой наночастицы; z – схематичный график, используемый для определения ширины размытой области (d_1 , d_2) на краю частицы

Для сопоставления значения сигнала и уровня шума при обработке спектров СХПЭЭ можно использовать ПО микроскопа или специализированные программы для анализа и обработки спектров.

Определение размеров наночастиц в биологических образцах. Проникающая способность наночастиц, токсичность и закономерности накопления в организме существенно зависят от их размеров [10, 11]. Поэтому важнейшим результатом электронно-микроскопического исследования биологического образца, помимо обнаружения искусственных наночастиц, является установление распределения наночастиц по размерам. Данное распределение находится измерением размеров отдельных наночастиц в образце.

Выявление экзогенных наночастиц в биологических образцах и измерения их геометрических параметров (размеров) выполняют с помощью поверенного аналитического просвечивающего электронного микроскопа. Это обеспечивает прослеживаемость результатов измерений к эталону соответствующей физической величины. Пример определения размера наночастицы оксида церия приведен на рис. 3, а – г.

Процедура определения размеров наночастиц с использованием полученных электронно-микроскопических изображений нуждается в разъяснении [12]. Во-первых, методом ПЭМ регистрируется двумерная проекция трехмерного объекта на плоскость, перпендикулярную направлению распространения пучка электронов. Во-вторых, если проекция частицы не является фигурой правильной геометрической формы (например, кругом), то определяемый размер зависит от направления, в котором проводят измерение. Поэтому предложено размер наночастицы характеризовать двумя величинами: максимальным и минимальным линейными размерами ее двумерной проекции.

Если проекция частицы выпуклая, то максимальный и минимальный размеры частицы определяются сравнительно легко (рис. 4). Результатом анализа размеров обнаруженных в образце наночастиц являются графики их распределения наночастиц по максимальному и минимальному размерам, соответствующие средние значения и средние квадратические отклонения. Определение размера частицы, имеющей невыпуклую проекцию, методикой [5] не регламентировано. В проведенных экспериментах такие частицы не встречались.

Погрешность измерения размеров одиночной наночастицы (наибольшей и наименьшей проекций) вычисляется как

$$S = k \sqrt{\frac{\Delta_{\text{п}}^2 + \Delta_{\text{м}}^2}{3} + \Delta_{\text{с}}^2},$$

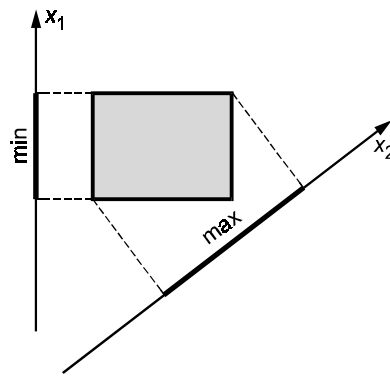


Рис. 4. Процедура измерения размера частицы, показаны максимальный и минимальный размеры прямоугольной частицы

где $\Delta_{\text{п}}$, $\Delta_{\text{м}}$, $\Delta_{\text{с}}$ – погрешности прибора, метода и случайная; коэффициент k определяется по [13].

Погрешность прибора

$$\Delta_{\text{п}} = C + \alpha L, \quad (1)$$

где C , α – постоянные прибора; L – размер кадра (поля зрения микроскопа). Эти константы определяют при испытаниях или калибровке ПЭМ с использованием меры МПУ278НМ (Государственный реестр СИ № 47524-11). Мера МПУ278НМ решает задачу обеспечения единства геометрических измерений в нанометровом диапазоне и прослеживаемости результатов измерений [14].

Константа C – это погрешность, связанная с применением для калибровки ПЭМ меры МПУ278НМ, $C = 2$ нм. Вторая составляющая погрешности αL определяется нелинейными искажениями кадра в электронном микроскопе. При многократных измерениях в различных областях кадра и переустановке образца в держатель результаты таких измерений могут различаться между собой. Это различие достигает 7 – 10 %, что и выражается константой α в (1). Строго говоря, слагаемое αL в (1) должно содержать размер не кадра, а измеряемого объекта. Однако это неправильно с точки зрения нормативных документов [15]. Согласно им у средств измерений может нормироваться относительная погрешность измерений, но при этом оказывается неучтенной константа C , так как ее нельзя отнести к размеру измеряемого объекта. В случае же нормировки абсолютной погрешности измерений значение ее не может зависеть от параметров измеряемого объекта. Поэтому формально следует исходить из размеров кадра, стараясь выполнить кадрирование изображения так, чтобы исследуемый объект хотя бы по одному измерению занимал не менее 90 % поля зрения. При кадрировании изображения необходимо соблюдать условие: размер элемента изображения, проецируемого на 1 пиксел должен быть менее одной трети методической погрешности $\Delta_{\text{м}}$. Это позволяет пренебречь погрешностью, связанной с пикселизацией (оцифровкой) кадра.

Отметим, что большая погрешность определения размеров (нанометры) не противоречит высокой разрешающей способности электронного микроскопа (для современных приборов она составляет около 1 А). В случае электронной микроскопии погрешность определяется цепочкой передачи единицы физической величины от эталонов (с помощью меры МПУ278НМ или аналогичной), а разрешающая способность не зависит от этой цепочки.

Погрешность Δ_m связана с неопределенностью положения края частицы на изображении и вычисляется по формуле

$$\Delta_m = 0,5d, \quad (2)$$

где d – ширина размытой области на краю частицы в нм.

Пример определения величины d приведен на рис. 3, ее удобно оценивать по графику сечения, проведенному через частицу (рис. 3, в). Значение d определяется влиянием большого количества факторов, в том числе материалом наночастиц и наличием у них оболочки или стабилизирующего вещества на поверхности, параметрами микроскопа (ускоряющим напряжением, уровнем шумов и т. п.), дрейфом образца и т. д. Некоторые особенности определения d проиллюстрированы на схеме на рис. 3, г. Если на разных краях частицы значения d отличаются (на схеме $d_2 > d_1$), то в (2) следует подставлять большее из них. В том случае если изображение зашумлено, то необходимо поступать в соответствии с рекомендациями документа VDI/VDE 2656. Описанная в нем процедура построения средних линий зашумленных поверхностей представляет собой медианную фильтрацию. Поэтому рекомендацию данного документа можно упростить и в случае зашумленного изображения для определения d выполнить медианную фильтрацию с окном 3 несколько раз, уменьшив тем самым уровень шума, и определить параметр d по полученному таким образом сечению.

Случайная погрешность Δ_c определяется как среднее квадратическое отклонение при многократном измерении размера одной и той же частицы по одному кадру. По порядку величины $\Delta_c \approx 0,1...1$ нм (для измерения размеров чаще всего используют кадры, на которых масштаб равен 0,2 – 0,3 нм/пикс).

Наибольший вклад в суммарную погрешность измерения размера конкретной наночастицы обычно определяется приборной составляющей. При размере кадра $L=235$ нм, приборная погрешность, вычисленная по (1), как правило, составляет не менее 18,5 нм, что существенно

больше случайной ($0,1 - 1$ нм) и методической (1 нм) погрешностей.

Для построения гистограмм распределений наночастиц по размерам измерения проводят многократно, чтобы набрать достаточный объем выборки. Рекомендуемый объем выборки N_p определяется следующим образом. Весь диапазон размеров наночастиц, встречающихся в образце, необходимо покрыть бинами гистограммы шириной $3C$, где C – константа, входящая в (1). Количество бинов при этом будет N_6 . Минимальный объем выборки, при котором строят гистограмму, равен $N_p = 10N_6$. Если частицы встречаются в образце редко и выполнить необходимое для построения гистограммы количество измерений не удастся, то распределение по размерам характеризуют не гистограммой, а таблицей.

Таким образом, метод ПЭМ является основным аналитическим методом, позволяющим обнаружить в биологическом образце техногенные наночастицы, идентифицировать их, определить кристалличность и элементный состав и построить распределение по размерам. Разработанная авторами методика [5] может быть использована научными учреждениями и аналитическими лабораториями, занимающимися проблемами воздействия наночастиц на живые организмы. Для развития системы мониторинга загрязнений окружающей среды наноматериалами рекомендуется разработка аналогичных методик измерений, предназначенных для работы с другими типами наночастиц и наноматериалов, а также образцов (физиологическими жидкостями, пробами воды и т. д.).

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.648.11.3002 от 08 июня 2011 г.).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. **Kuhlbusch T. A. J. e. a.** Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: A review // Particle and Fibre Toxicology. 2011. V. 8. N 22. P. 1 – 18.
2. **Simko M., Mattsson M.-O.** Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: A critical review // Particle and Fibre Toxicology. 2010. V. 7. N 42. P. 1 – 15.
3. **МР 1.2.2639–10.** Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях nanoиндустрии. Методические рекомендации.

4. **МР 1.2.2641–10.** Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах. Методические рекомендации.

5. **ФР.1.39.2011.10830.** Методика измерений структуры (аморфная или кристаллическая), элементного состава и распределения по размерам наночастиц оксида железа, церия и титана в срезах тканей животных и растений с использованием аналитического просвечивающего электронного микроскопа.

6. **ГОСТ Р 8.563–2009.** ГСИ. Методики (методы) измерений.

7. **Смирнова Е. А. и др.** Углеродные нанотрубки проникают в ткани и клетки и оказывают стимулирующее воздействие на проростки эспарцета *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 1. С. 106 – 113.

8. **Egerton R. F.** Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope. Springer Science+Business media, 2011.

9. **Larsen R. J., Marx M. L.** An introduction to mathematical statistics and its applications. Boston: Pearson Education Inc., 2012.

10. **Sohaebuddin S. K. e. a.** Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent // Particle and Fibre Toxicology. 2010. V. 7. N 22.

11. **Hamilton R. F. e. a.** Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity // Particle and Fibre Toxicology. 2009. V. 6. N 35.

12. **Russ J. C., Dehoff R. T.** Practical Stereology. N. Y.: Plenum Press, 2000.

13. **ГОСТ 8.207–76.** ГСИ. Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения

14. **Голубев С. С., Голубев С. Н.** Прослеживаемость результатов измерений в нанометровом диапазоне к единицам Международной системы единиц физических величин // Измерительная техника. 2010. № 11. С. 13 – 17; **Golubev S. S., Golubev S. N.** Traceability of measurement results in the nanometric range to the units of the international system of units of physical quantities // Measurement Techniques. 2010. V. 53. N 11. P. 1209 – 1214.

15. **ГОСТ 8.009–84.** ГСИ. Нормируемые метрологические характеристики средств измерений.

Дата принятия 11.09.2012 г.

