Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Применение метода энергодисперсионной микроспектроскопии для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0046—11

Издание официальное

Москва • 2012

gost.e-ecolog.ru

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Применение метода энергодисперсионной микроспектроскопии для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0046—11

ББК 51.2
П75

П75 **Применение** метода энергодисперсионной микроспектроскопии для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях животных и растений: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—43 с.

ISBN 978—5—7508—1128—1

1. Разработаны Государственным учебно-научным учреждением «Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова» (М. П. Кирпичников, Г. Е. Онищенко, Е. А. Смирнова, К. В. Шайтан, А. С. Шебанова, А. Г. Богданов, М. В. Ерохина); Учреждением Российской Академии наук «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» РАН (А. В. Феофанов, А. А. Игнатова); Учреждением Российской Академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания» РАМН (В. А. Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, М. М. Г. Гаппаров); Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (С. А. Кононогов, С. С. Голубев); Учреждением Российской Академии наук «Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин).

2. Разработаны в рамках Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2011 годы».

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 11 ноября 2011 г.

4. Введены в действие 11 ноября 2011 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

ISBN 978—5—7508—1128—1

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

I. Область применения 4
II. Введение 5
III. Нормативные ссылки 7
IV. Общие положения 11
V. Подготовка проб для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в тканях животных и растений 15
5.1. Методики подготовки проб для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в тканях растений 15
5.2. Методики подготовки проб для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в тканях животных 22
5.3. Приготовление образцов сравнения из наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия 24
VI. Анализ наночастиц в биологических образцах с применением метода энергодисперсионной микроспектроскопии 25
6.1. Технические характеристики применяемых средств измерений 25
6.2. Подготовка и настройка прибора перед проведением анализа методом ПЭМ с ЭДС 26
6.3. Процедура проведения измерений 27
VII. Анализ полученных данных и представление результатов 29
7.1. Анализ полученных данных 29
7.2. Представление результатов анализа 41
Приложение 1. Обозначения и сокращения 43
Приложение 2. Рекомендуемая литература 43

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
11 ноября 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Применение метода энергодисперсионной микроспектроскопии для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0046—11

I. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации применяются для выявления и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях и органах животных и растений.

1.2. Настоящие методические рекомендации могут использоваться:

• при анализе разрабатываемых и новых наноматериалов, содержащих наночастицы серебра, оксидов алюминия, церия и цинка с целью оценки их безопасности;

• в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с процессами производства и оборота наноматериалов на основе наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка;

• при проведении экспертизы пищевых продуктов, продукции сельского хозяйства, фармацевтической промышленности, биотехнологического производства;

• при проведении мероприятий по осуществлению надзора (контроля) в процессе производства, транспортирования, хранения, реализа-

ции и утилизации наноматериалов на основе наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка.

1.3. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства процедур и средств подготовки образцов, проведения измерений и представления результатов в ходе выявления и идентификации наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка в тканях животных и растений методом энергодисперсионной микроспетроскопии.

1.4. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также могут быть использованы научно-исследовательскими организациями гигиенического профиля, медицинскими учебными заведениями и иными организациями, проводящими исследования по оценке безопасности наноматериалов и продукции наноиндустрии.

II. Введение

Метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (далее – ЭДС) является одним из наиболее надёжных и широко применяемых методов аналитической электронной микроскопии. Метод является методом элементного анализа. В случае задач по выявлению и идентификации искусственных наночастиц в биологических образцах применение метода ЭДС в комбинации с методом просвечивающей электронной микроскопии (далее – ПЭМ) позволяет за относительно короткое время проанализировать элементный состав интересующей области образца (например, области, содержащей скопление наночастиц неизвестного происхождения либо единичные наночастицы).

Принцип метода состоит в регистрации характеристического рентгеновского излучения при возбуждении внутренних оболочек атомов образца падающими электронами пучка. При возбуждении электрона внутренней оболочки и его переходе на более высокий энергетический уровень происходит переход другого электрона с более высокого энергетического уровня на освободившуюся позицию, сопровождающийся эмиссией характеристического рентгеновского излучения. Энергия излучаемого рентгеновского фотона соответствует разности энергий энергетических уровней. При этом, согласно правилам отбора, могут иметь место только определённые электронные переходы. Рентгеновские фотоны, излучающиеся при переходе на K, L, M и так далее оболочки атома, обозначаются символами K, L, M и так далее соответственно. Греческими символами α, β обозначаются рентгеновские фотоны, образую-

щиеся при конкретных, разрешённых правилами отбора, электронных переходах между подоболочками (рис. 1).

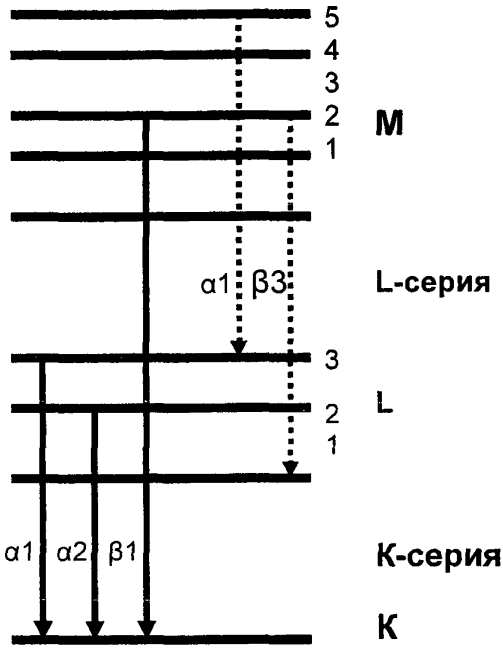


Рис. 1. Энергетические уровни электронов в атоме и примеры обозначения рентгеновских фотонов, излучающихся при определённых электронных переходах (по [1], с изменениями)

Энергия характеристического рентгеновского излучения измеряется в килоэлектронвольтах (кэВ). Каждому химическому элементу соответствует набор характеристических энергий эмитируемого рентгеновского излучения, соответствующих возможным электронным переходам. Значения характеристических энергий рентгеновского излучения являются табличными. Если энергии фотонов, соответствующие двум разным переходам одного элемента, близки (например, фотоны Kα1 и Kα2), то в справочниках они представляются как одно значение (Kα1, 2).

Для применения метода ЭДС в комбинации с методом ПЭМ, просвечивающий электронный микроскоп должен быть оборудован детектором рентгеновского излучения. Рентгеновские фотоны попадают в

детектор, в котором образуются электрические заряды, пропорциональные энергии излучения. Заряды преобразуются в импульсы напряжения, высота которых пропорциональна величине зарядов. Импульсы напряжения анализируются с помощью многоканального анализатора высоты импульсов, с помощью которого анализируется количество импульсов, соответствующих каждой высоте. В итоге получается спектр, по оси х которого отложена энергия рентгеновского излучения, а по оси у – количество детектированных рентгеновских фотонов с данными значениями энергии. Анализируя спектр, можно определить элементный состав образца, сравнивая значения энергии пиков в спектре с табличными значениями характеристического излучения для элементов. Данная процедура проводится с помощью специального программного обеспечения. Однако следует отметить, что пики некоторых элементов могут перекрываться, поэтому специалисту, проводящему анализ, следует представлять, какие элементы могут присутствовать в образце.

Анализ методом ЭДС в комбинации с ПЭМ можно проводить в различных режимах. Одним из вариантов является получение рентгеновского спектра со всей области видимой на экране электронного микроскопа. Другим вариантом является точечный анализ: фокусировка электронного пучка в определённую точку образца и получение спектра с данной точки. Последний вариант позволяет надежно идентифицировать обнаруженные в образце наноразмерные электронно-плотные включения по их элементному составу. Для реализации данного режима измерения электронный микроскоп должен быть оснащён системой развёртки пучка, сканирующей приставкой, и, таким образом, иметь возможность работы в режиме сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (далее – СПЭМ).

III. Нормативные ссылки

3.1. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

3.2. Федеральный закон от 2 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».

3.3. Федеральный закон от 26 июня 2008 г. № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений»

3.4. Федеральный закон от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».

3.5. Федеральный закон от 10 января 2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

3.6. Постановление Правительства Российской Федерации от 30 июня 2004 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

3.7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».

3.8. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 г. № 988 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».

3.9. Постановление Правительства Российской Федерации от 2 февраля 2006 г. № 60 «Об утверждении Положения о проведении социально-гигиенического мониторинга».

3.10. Постановление Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569 «О Положении об осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации».

3.11. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

3.12. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

3.13. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 г. № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».

3.14. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

3.15. СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ –99/2009)».

3.16. ГН 1.2.2633—10 «Гигиенические нормативы содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды».

3.17. СП 2.2.2.1327—03 «Гигиенические требования к организации технологических процессов, производственному оборудованию и рабочему инструменту».

3.18. МУ 1.2.2520—09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

3.19. МУ 1.2.2636—10 «Проведение санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции, полученной с использованием нанотехнологий и наноматериалов».

3.20. МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.21. МУ 1.2.2742—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

3.22. МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных».

3.23. МУ 1.2.2873—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в водных беспозвоночных».

3.24. МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

3.25. МУ 1.2.2875—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в водоемах».

3.26. МУ 1.2.2876—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в растениях».

3.27. МУ 1.2.2877—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в рыбах».

3.28. МУ 1.2.2635—10 «Медико-биологическая оценка безопасности наноматериалов».

3.29. МР 1.2.2522—09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

3.30. МР 1.2.2566—09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*».

3.31. МР 1.2.2639—10 «Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии».

3.32. МР 1.2.2640—10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов».

3.33. МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах».

3.34. МР 1.2.0022—11 «Порядок отбора проб для контроля за наноматериалами».

3.35. МР 1.2.0023—11 «Контроль наноматериалов в пищевой продукции».

3.36. ГОСТ 2603—79 «Реактивы. Ацетон. Технические условия».

3.37. ГОСТ 4328—77 «Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия».

3.38. ГОСТ 6709—72 «Вода дистиллированная. Технические условия».

3.39. ГОСТ 1942—86 «1,2-Дихлорэтан технический. Технические условия».

3.40. ГОСТ 4198—75 «Реактивы. Калий фосфорно-кислый однозамещенный. Технические условия».

3.41. ГОСТ 3118—77 «Реактивы. Кислота соляная. Технические условия».

3.42. ГОСТ 4172—76 «Реактивы. Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный. Технические условия».

3.43. ГОСТ 5833—75 «Реактивы. Сахароза. Технические условия».

3.44. ГОСТ Р 51652—2000 «Спирт этиловый ректификованный из пищевого сырья. Технические условия».

3.45. ГОСТ 24104—2001 «Весы лабораторные. Общие технические требования».

3.46. ГОСТ 27987—88 «Анализаторы жидкости потенциометрические ГСП. Общие технические условия».

3.47. ГОСТ 25336—82 «Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры».

3.48. ГОСТ 1770—74 «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия».

3.49. ГОСТ 29227—91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования».

3.50. ГОСТ 21240-89 «Скальпели и ножи медицинские. Общие технические требования и методы испытаний».

3.51. ГОСТ 21241—89 «Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний».

3.52. ГОСТ 16317—87 «Приборы холодильные электрические бытовые. Общие технические условия».

3.53. ГОСТ 3—88 «Перчатки хирургические резиновые. Технические условия».

3.54. ГОСТ 2493—75 «Реактивы. Калий фосфорно-кислый двузамещенный 3-водный. Технические условия».

3.55. ГОСТ 4568—95 «Калий хлористый. Технические условия».

3.56. ГОСТ 4233—77 «Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия».

3.57. ГОСТ 1625—89 «Формалин технический. Технические условия».

3.58. ГОСТ 4517—87 «Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе».

3.59. ГОСТ 20015—88 «Хлороформ. Технические условия».

3.60. ГОСТ 21239—93 «Инструменты хирургические. Ножницы. Общие требования и методы испытаний».

3.61. ГОСТ 7.32—2001 «Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

IV. Общие положения

4.1. Целью выявления и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методом энергодисперсионной микроспектроскопии является:

- установление возможности проникновения металлических и металлооксидных наночастиц в организмы животных и растения;
- выявление органов-мишеней воздействия металлических и металлооксидных наночастиц;
- установление наличия эффектов кумуляции наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в организмах животных и растениях;
- выявление механизмов действия наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия;
- исследования по токсиколого-гигиенической и медико-биологической оценке наноматериалов на основе наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия;
- санитарно-гигиеническое нормирование содержания наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в продовольственном сырье и пищевых продуктах растительного и животного происхождения;
- экспертиза продукции наноиндустрии, полученной на основе наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия, производимой на территории Российской Федерации или ввозимой на территорию Российской Федерации;
- государственный надзор (контроль) за использованием наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия и продукции, их содержащей, в процессе разработки, производства, хранения, транспортирования, реализации и утилизации;
- оценка экспозиции человека наночастицами серебра, оксидами цинка, алюминия и церия через пищевые продукты животного и растительного происхождения;
- оценка риска для здоровья населения при поступлении наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в организм в составе продукции растительного и животного происхождения;
- проверка оценки соответствия продукции наноиндустрии установленным требованиям;

• разработка мероприятий по охране окружающей среды от воздействия металлических и металлооксидных наночастиц.

4.2. Отбор проб органов и тканей животных и растений осуществляется в соответствии с МУ 1.2.2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных», МУ 1.2.2742—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в растениях», МУ 1.2.2745—10 «Порядок отбора проб для характеристики действия наноматериалов на лабораторных животных», МР 1.2.2640—10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалах», МР 1.2.0022—11 «Порядок отбора проб для контроля за наноматериалами».

Фиксацию и хранение проб органов и тканей растений для последующего анализа методом ПЭМ выполняют, как описано в МУ 1.2.2876—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в растениях». Фиксацию и хранение проб органов и тканей животных для последующего анализа методом ПЭМ выполняют, как описано МР 1.2.2640—10 «Методы отбора проб, выявления и определения содержания наночастиц и наноматериалов в составе сельскохозяйственной, пищевой продукции и упаковочных материалов» (п. 5.1.5.2.2).

4.3. Организация (лаборатория) должна быть аккредитована на проведение работ в области оценки безопасности наноматериалов.

В лаборатории должны соблюдаться правила надлежащей лабораторной практики в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

4.4. В организации (лаборатории), проводящей исследования по выявлению и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений, должна быть разработана программа по обеспечению качества проводимых исследований. Все производственные операции проводятся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП), осуществляемыми в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

4.5. Организации (лаборатории), проводящие исследования по выявлению и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методами энергодисперсионной микроспектроскопии, должны быть укомплектованы необходимыми оборудованием и средствами измерений, прошедшими поверку (калибровку) в установленном порядке. Эксплуатация оборудова-

ния и средств измерений проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения поверки (калибровки) и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание. Применяются средства измерений, имеющие сертификат и зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений.

4.6. Организации (лаборатории) проводящие исследования по выявлению и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методами энергодисперсионной микроспектроскопии, должны иметь оборудованные помещения для работы с биологическим материалом (препарирование, пробоподготовка, анализ). Для обработки материала должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие вертикальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока, и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

4.7. Организации (лаборатории), проводящие исследования по выявлению и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методами энергодисперсионной микроспектроскопии, должны иметь оборудование, обеспечивающее безопасность работы с наноматериалами неорганического происхождения: ламинарные вытяжные шкафы, перчаточные боксы, снабжённые системой вентиляции (HEPA-фильтры), препятствующие поступлению аэрозоля наноматериалов в воздух производственных помещений и в окружающую среду.

4.8. Организации (лаборатории), проводящие исследования по выявлению и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методами энергодисперсионной микроспектроскопии, должны иметь помещения для содержания и работы с лабораторными животными (виварий, клиники лабораторных животных), требования к которым изложены в МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

4.9. Проведение исследований по выявлению и идентификации наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методами энергодисперсионной микроспектроскопии осуществляется на основе предварительно разработанного дизайна (плана) исследований в соответствии с МУ 1.2.2874—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных живот-

ных» и МУ 1.2.2876—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в растениях». При разработке дизайна (плана) исследований необходимо учитывать, что метод энергодисперсионной микроспектроскопии за день работы позволяет провести анализ ограниченного (не более 10, в среднем 5—6) числа образцов.

4.10. Документом, подтверждающим результаты проведённых исследований наноматериалов, является отчёт о проведённом исследовании. Отчет содержит следующие сведения: название исследования; адрес организации; даты начала и завершения исследований; цель и задачи исследования; характеристика тестируемого наноматериала; перечень исследованных образцов и применяемых стандартов; *для животных* – вид, линию, пол и возраст используемых животных, состав применяемых рационов, условия содержания животных, метод введения наночастиц, применяемые дозы, длительность и кратность введения, схему проведения исследования; *для растений* – вид, линию используемых растений, условия выращивания или сбора, методы введения наночастиц, применяемые дозы, длительность введения, схему проведения исследования; перечень использованных средств измерений и вспомогательного оборудования и режимы их работы; методы статистической обработки результатов; результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним; заключение; выводы; список использованных источников.

Оформление отчёта о результатах исследования должно соответствовать требованиям ГОСТ 7.32—2001 «Отчёт о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления».

Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

4.11. Организация (лаборатория), проводящая исследования по выявлению наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в срезах тканей животных и растений методами энергодисперсионной микроспектроскопии, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Сотрудники обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

V. Подготовка проб для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в тканях животных и растений

5.1. Методики подготовки проб для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в тканях растений

5.1.1 Реактивы, материалы и оборудование

5.1.1.1. Реактивы

Дигидрофосфат калия водный ($KH_2PO_4 \times H_2O$), квалификация хч	ГОСТ 4198—75
Гидрофосфат натрия 12-водный ($Na_2HPO_4 \times 12H_2O$), квалификация хч	ГОСТ 4172—76
Гидроксид натрия (NaOH), квалификация хч	ГОСТ 4328—77
Сахароза, квалификация хч	ГОСТ 5833—75
Кислота соляная (HCl), квалификация хч	ГОСТ 3118—77
Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—79
Спирт этиловый ректифицированный, 96 %-й первого сорта или высшей очистки	ГОСТ 51652—2000
Ацетон, квалификация чда	ГОСТ 2603—79
Эпоксидная смола (Epoxy Embedding Medium, Эпон® 812) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичная	
Додецилянтарный ангидрид фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Метилэндиковый ангидрид МЭА-610 фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Тридиметиламинофенол (катализатор DMP-30) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Формвар (Formvar® solution) для микроскопии фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный (в случае самостоятельного приготовления формваровой пленки)	
Дихлорэтан (для приготовления раствора формвара)	ГОСТ 1942—86

5.1.1.2. Материалы

Материалы для отбора проб растений в соответствии с МУ 1.2.2876—11 «Порядок выявления и идентификации наноматериалов в растениях»	
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239—93

Скальпель	ГОСТ 21240—89
Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3—88
Бритва фирмы «Ted Pella, Inc.» (США), кат. № 121-1 или аналогичная	
Контейнеры стеклянные для фиксации материала вместимостью 50 $см^3$	
Пенициллиновые флаконы стеклянные с крышкой вместимостью 10 $см^3$	
Чашки Петри стеклянные (диаметром 12 $см^3$)	ГОСТ 25336—82
Пробирки стеклянные вместимостью 20 $см^3$ с резиновой пробкой	ГОСТ 25336—82
Штативы для пробирок	
Медицинский шприц объёмом 50—100 $см^3$ (для удаления воздуха из растений)	
Цилиндр мерный вместимостью 100 $см^3$ с наименьшей ценой деления 1 $см^3$	ГОСТ 1770—74
Колба мерная стеклянная с притертой крышкой вместимостью 250 $см^3$	ГОСТ 1770—74, ГОСТ 23932—90
Колбы стеклянные без крышки вместимостью 100, 250, 1 000 $см^3$	
Пипетки стеклянные или пластиковые градуированные вместимостью 5 $см^3$	ГОСТ 29227—91
Наконечники для автоматических дозаторов полистирольные нестерильные вместимостью 200 и 1 000 $мм^3$	
Система для фильтрации растворов стеклянная вместимостью 1,0 $дм^3$ с вакуумным насосом	
Мембраны эфирно-целлюлозные толщиной 150 мкм, диаметром 47 мм, с размером пор 0,22 мкм	
Пинцет для электронно-микроскопических работ 110 мм тип 5 кончик 0,05 × 0,01мм (или 115 мм тип 7 кончик 0,10 × 0,06 мм) ненамагничивающийся фирмы «Ted Pella»	
Полипропиленовые пробирки для микропроб однократного применения типа «Эппендорф» вместимостью 1,5 и 2,0 $см^3$	ТУ 64-2-30—80
Полиэтиленовые капсулы с плоским или коническим дном для заливки образцов, диаметр от 6 мм, выдерживающие нагрев до 75 °С или	

полипропиленовые аналогичные капсулы, выдерживающие нагрев до 100 °С производства фирмы «BEEM® Embedding Capsule» или аналогичные

Контейнеры тефлоновые с размером лунки от 0,5 × 0,5 см до 1,0 × 1,0 см для заливки образцов в эпоксидную смолу

Электронно-микроскопические бленды (медные), отверстие круглое 1, 3 мм или овальное 1 × 2 мм, или сетки медные круглые с размером отверстий 200—450 мкм

Специальное стекло для изготовления стеклянных ножей шириной 25 мм, длиной 400 или 200 мм, толщиной 6 или 10 мм фирмы «TedPella, Agar Scientific» или аналогичный (если используются стеклянные ножи)

Пластиковые одноразовые ванночки для сбора срезов фирмы «TedPella» или аналогичные

Палочки для чистки алмазного ножа из сердцевины пробкового дерева фирмы «TedPella, Agar Scientific» или аналогичные (если используется алмазный нож)

Стеклянная палочка длиной до 220 см и диаметром 3—5 мм

Химически чистое отшлифованное стекло для получения формваровой плёнки

Специальный стеклянный стакан для приготовления и хранения раствора формвара

Фильтровальная бумага

5.1.1.3. Оборудование

Вытяжной шкаф, оборудованный фильтром для улавливания наночастиц

Холодильник бытовой электрический — ГОСТ 26678—85

Центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин и охлаждением для микропробирок вместимостью 1,5 $см^3$ (5415 R «Eppendorf», ФРГ или аналогичная)

Центрифуга мультифункциональная со скоростью вращения ротора до 5 000 об./мин (с бакет-ротором) и 14 000 об./мин (с угловым ротором),

охлаждением для пробирок вместимостью 20 $см^3$ (5804 R «Eppendorf», ФРГ или аналогичная) (для суспензионных образцов)	
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г	ГОСТ 24104—2001
pH-Метр, диапазон измерения pH от 0,0 до 14, дискретность измерения 0,01 или аналогичный	ГОСТ 27987—88
Ультрамикротом, обеспечивающий возможность получения ультратонких срезов биологических образцов толщиной 30—100 нм, скорость резания 0,1—50 мм/с, термоподача 40—60 нм	
Прибор для изготовления стеклянных ножей для ультрамикротомов LKB 7800 или аналогичный	
Алмазные ножи для ультрамикротома	
Магнитная мешалка с регулируемой частотой вращения магнитного якоря в диапазоне 100—1 200 об./мин, рассчитанная на объем до 1,0 $дм^3$	
Электромешалка со спиральной насадкой низкоскоростная (до 250 об./мин), рассчитанная на объем до 0,5 $дм^3$	
Суховоздушный термостат с диапазоном регулируемых температур от 25 до 80 °С и точностью ± 0,4 °С	
Дистиллятор объемом от 4 $дм^3$, производительностью от 1 $дм^3$/ч	
Автоматические дозаторы с переменным объемом дозирования 100—1 000 $мм^3$, 20—200 $мм^3$ и 2—20 $мм^3$	
Держатели для прямоугольных и круглых блоков, совместимые с используемым ультрамикротомом, фирма «TedPella, Agar Scientific» или аналогичные	
Лобзик ручной механический для обработки залитых в эпоксидную смолу образцов	
Бинокулярная лупа, оснащенная настольным штативом, с линейным полем зрения от 2 до 10 см и диапазоном увеличений 0,6×, 1×, 2×,4×, 8×	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин (V3 «Elmi Ltd», Латвия или аналогичный)	

Ламинарный бокс биологической безопасности
класс II

5.1.2. Приготовление рабочих растворов и смесей

Рабочие растворы готовят в соответствии с общепринятыми правилами лабораторной практики. pH растворов контролируют при помощи pH-метра. Приготовленные растворы фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. После каждого использования рабочие инструменты подвергают тщательной обработке в ультразвуковой ванне во избежание перекрестной контаминации образцов наночастицами.

5.1.2.1. Приготовление двукратного раствора Соренсена (0,2 моль/дм^3) 0,06 моль/дм^3 KH_2PO_4, 0,14 моль/дм^3 Na_2HPO_4, pH 7,2—7,4, с добавлением 30 г/дм^3 сахарозы.

Для приготовления вспомогательных 1,0 моль/дм^3 растворов на лабораторных весах готовят навески 136 г KH_2PO_4, 358,2 г $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$ и вносят каждое вещество в отдельную мерную колбу объемом 1 000 см^3, содержащую 500 см^3 дистиллированной воды. Соли растворяют при перемешивании, и объемы растворов доводят дистиллированной водой до 1 000 см^3. Для ускорения растворения солей рекомендуется подогреть воду до 50—60 °C. Вспомогательные растворы фильтруют и хранят при температуре не более 4 °C в течение 6 месяцев.

Для приготовления двукратного 0,2 моль/дм^3 раствора Соренсена с добавлением 30 г/дм^3 сахарозы на лабораторных весах готовят навеску 30,0 г сахарозы и помещают в мерную колбу объемом 1 000 см^3. В колбу с веществом вносят 300 см^3 дистиллированной воды, 60 см^3 1,0 моль/дм^3 раствора KH_2PO_4, 140 см^3 1,0 моль/дм^3 раствора Na_2HPO_4 и растворяют при перемешивании. Объем раствора доводят до 1 000 см^3 дистиллированной водой, фильтруют и хранят при температуре не более 4 °C в течение 1 месяца.

5.1.2.2. Приготовление однократного раствора Соренсена (0,1 моль/дм^3) 0,03 моль/дм^3 KH_2PO_4, 0,07 моль/дм^3 Na_2HPO_4, pH 7,2—7,4, 15 г/дм^3 сахарозы.

Для приготовления 100 см^3 однократного раствора Соренсена (0,1 моль/дм^3) с добавлением 15 г/дм^3 сахарозы к 50 см^3 двукратного раствора Соренсена с добавлением 30 г/дм^3 сахарозы (приготовление описано в п. 5.2.1) добавляют 50 см^3 дистиллированной воды.

5.1.2.3. Приготовление фиксирующего раствора (0,1 моль/дм^3 раствор Соренсена pH 7,2—7,4, 2,5 % (по массе) глутарового альдегида).

Для приготовления 100 см^3 фиксирующего раствора в мерную колбу вносят 50 см^3 двухкратного раствора Соренсена с добавлением

30 г/дм^3 сахарозы (по п. 5.1.2.1), 10 см^3 коммерческого препарата глутарового альдегида (25 %-й водный раствор). С помощью pH-метра доводят pH буфера до 7,3 добавлением 1М HCl и далее доводят объём раствора до 100 см^3 дистиллированной водой.

Фиксирующий раствор готовят непосредственно перед использованием из расчета 4 см^3 на 1 образец.

5.1.2.4. Приготовление 1 моль/дм^3 раствора NaOH pH 14, а также 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %-х водных растворов этанола проводят, как описано в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (п. 5.1.3.3). Растворы этанола готовят из расчета 2 см^3 на образец и хранят в плотно закрытых емкостях при температуре 4 °С в течение 1 месяца.

5.1.2.5. Смесь эпоксидных смол готовят непосредственно перед использованием:

• смесь А (смешивают эпон 812 и додецилянтарный ангидрид в соотношении 5 : 8 по объему, из расчета 3 см^3 на 1 образец);

• смесь Б (смешивают эпон 812 и метилэндиковый ангидрид в соотношении 8 : 7 по объему, из расчета 3 см^3 на 1 образец);

• объединяют смеси А и Б в соотношении 13 : 15 по объему в стеклянном стакане и перемешивают в течение 20—60 мин с помощью электромешалки со спиральной насадкой при скорости вращения 100—120 об./мин, добавляют 1 % (по весу) катализатора полимеризации тридиметиламинофенола. Следует отметить, что оптимизация твердости полимерного блока может потребовать экспериментального подбора точных пропорций смолы и катализатора.

5.1.2.6. Ацетон и эпоксидную смолу приготовленную по п. 5.1.2.5, но без добавления катализатора, смешивают в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3. Каждую смесь готовят непосредственно перед использованием из расчета 2 см^3 на 1 образец.

5.1.3. Протокол подготовки проб к анализу

5.1.3.1. Образцы вынимают из фиксатора и промывают в буферном растворе Соренсена (pH 7,2—7,4) 2—4 раза до получения прозрачного смыва.

5.1.3.2. Образцы дегидратируют в серии спиртовых растворов восходящей концентрации:

• 10 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С (процедуру повторяют 3—4 раза, до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва);

• 20 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;

• 30 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
• 40 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
• 50 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
• 60 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
• 80 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре;
• 96 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре.

5.1.3.3. Образцы инкубируют в 100 %-м ацетоне два раза по 60 мин.

5.1.3.4. Образцы пропитывают смесями ацетона с эпоксидными смолами (приготовленными по п. 5.1.2.6) в последовательности, которая обеспечивает возрастание концентрации эпоксидных смол:

• из 3 частей ацетона и 1 части смеси эпоксидных смол – в течение 24 ч;
• из 2 частей ацетона и 2 частей смеси эпоксидных смол – в течение 24 ч;
• из 1 части ацетона и 3 частей смеси эпоксидных смол – в течение 24 ч.

5.1.3.5. Подготовленные образцы стеклянной палочкой переносят в заливочные контейнеры, заполненные 100 %-й эпоксидной смолой с добавлением катализатора. Для полимеризации смолы контейнеры с образцами инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24 ч, затем при 60 °С в течение 48 ч.

5.1.3.6. Из образцов, заключенных в смолу, при помощи лобзика выпиливают блоки размером 2 × 2 × 5 мм. Из эпоксидного блока, закрепленного в держателе, лезвием бритвы формируют усеченную пирамиду, с меньшего основания которой с помощью ультрамикротома, оснащенного стеклянным или алмазным ножом, получают срезы толщиной 40—80 нм. Для повышения статистической значимости результатов анализа нарезку пробы организуют в виде 4—6 серий, отстоящих друг от друга не менее чем на 100 мкм, по 10 срезов в каждой серии. Случайно выбранные срезы (по 1—2 из каждой серии) вылавливают на бленды или сетки для электронной микроскопии с формваровой либо углеродной подложкой (по несколько срезов на одну бленду или сетку) и высушивают не менее 1 ч. Необходимо удостовериться, что на отобранных срезах присутствует ткань.

Для анализа методом ПЭМ в комбинации с ЭДС предпочтение следует отдавать сеткам, а не блендам, т. к. в случае прожигания электронным лучом подложки в одной из ячеек сетки остается возможность работы на других ячейках этой же сетки. В случае бленд образец после случайного прожигания становится непригоден для анализа.

5.2. Методики подготовки проб для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в тканях животных

5.2.1. Реактивы, материалы и оборудование

5.2.1.1. Реактивы

В дополнение к реактивам, перечисленным в п. 5.1.1.1, необходимы:

Гидрофосфат калия 3-водный ($K_2HPO_4 \times 3H_2O$), хч ГОСТ 2493—75

Хлорид натрия NaCl, хч ГОСТ 4233—77

Тетраоксид осмия (OsO_4), ACS фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный

5.2.1.2. Материалы

Необходимые материалы перечислены в п. 5.1.1.2

5.2.1.3. Оборудование

Необходимое оборудование перечислено в п. 5.1.1.3

5.2.2. Приготовление рабочих растворов и смесей

5.2.2.1. Растворы, необходимые для подготовки образцов

Двукратный фосфатно-солевой буферный раствор (0,2 моль/дм^3) pH 7,2—7,4 (0,04 моль/дм^3 KH_2PO_4, 0,16 моль/дм^3 K_2HPO_4) с добавлением 1,76 % (масса/объем) NaCl

Однократный фосфатно-солевой буферный раствор (0,1 моль/дм^3) pH 7,2—7,4 (0,02 моль/дм^3 KH_2PO_4, 0,08 моль/дм^3 K_2HPO_4) с добавлением 0,88 % (масса/объем) NaCl

Фиксирующий раствор (2,5 % (по весу) глутарового альдегида в 0,1 моль/дм^3 фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,2—7,4 с добавлением 2 % нейтрального формалина), из расчета 4 см^3 на 1 образец

Водные растворы этанола с концентрацией 50, 60, 70 и 80 %, из расчета 2 см^3 на 1 образец

2 %-й водный раствор OsO_4

1 %-й раствор OsO_4 в 0,1 моль/дм^3 фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,2—7,4, из расчета 2 см^3 на 1 образец

Рабочие растворы готовят в соответствии с общепринятыми правилами лабораторной практики; pH растворов контролируют при помощи pH-метра. Приготовленные растворы фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Процедуры приготовления перечисленных растворов детально изложены в МР 1.2.2641—10 «Определение

приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (п. 5.1.3.3). Растворы фильтруют и хранят в плотно закрытых емкостях при температуре 4 °С в течение 1 месяца, за исключением фиксирующего раствора и 1 %-го раствора OsO_4 в 0,1 моль/дм^3 фосфатно-солевом буферном растворе, которые готовят непосредственно перед использованием.

5.2.2.2. Приготовление смеси эпоксидных смол.

Смесь эпоксидных смол готовят непосредственно перед использованием, как описано в п. 5.1.2.5.

5.2.2.3. Приготовление смесей ацетона и эпоксидной смолы.

Смеси готовят, как описано в п. 5.1.2.6.

5.2.3. Подготовка образцов тканей животных к анализу методом электронной микроскопии

Все работы с использованием органических растворителей (ацетон и его смеси с эпоксидными смолами) ведут в вытяжном шкафу, применяя только стеклянную посуду. После каждого использования инструменты, применяемые при пробоподготовке, тщательно моют и подвергают обработке в ультразвуковой ванне во избежание перекрестной контаминации образцов наночастицами.

Тяжелые металлы, применяемые для контрастирования клеточных структур при стандартной подготовке образцов тканей животных для ПЭМ, существенно мешают обнаружению наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка. Поэтому образцы для анализа этих наночастиц методом ПЭМ в комбинации с ЭДС следует готовить без использования контрастирующих реагентов или с применением только тетраоксида осмия, который не оказывает значительного влияния на результаты анализа. Всю совокупность фиксированных образцов разделяют на две равноценные группы, одну из которых (в дальнейшем – группа № 1) дополнительно фиксируют и контрастируют тетраоксидом осмия, а вторую (группа № 2) подвергают обработке без применения контрастирующих агентов. При отсутствии контрастирования возрастает достоверность выявления и идентификации электронно-плотных наночастиц металлов и их оксидов в структуре биологического материала, но теряется информация о локализации наночастиц в клетках. Контрастирование тетраокисью осмия даёт возможность определить некоторые структуры клеток и тканей, в которых обнаруживают искусственные наночастицы.

Методика пробоподготовки для детекции наночастиц в тканях животных методом ПЭМ детально описана в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей сре-

ды, живых организмах и пищевых продуктах» (п. 5.1.5.4.1). Она включает в себя отмывку полученных кусочков тканей и органов от фиксатора, обезвоживание образцов растворами этанола 50, 60, 70, 80, 96 %-ми концентрациями и абсолютным ацетоном, пропитку их смесями смол и ацетона в различных соотношениях, окончательную заливку в смесь заливочных смол, приготовление блоков из залитого в смолы материала и их нарезку на ультрамикротоме.

Методика контрастирования тетраоксидом осмия включает в себя дополнительный этап: после отмывки от фиксатора образцы тканей и органов дополнительно контрастируют и фиксируют 1 %-м раствором тетраоксида осмия в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2—7,4) в течение 2 ч, отмывают холодным (4 °С) 50 %-м этанолом 3—4 раза по 5 мин до прекращения потемнения раствора. После этого проводят обезвоживание образцов растворами этанола возрастающей концентрации и ацетоном как описано в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (п. 5.1.5.4.1). Пропитку образцов эпоксидными смолами и заливку в эпоксидную смолу с катализатором выполняют как описано в пп. 5.1.3.4 и 5.1.3.5. Приготовление блоков из залитого в смолы материала, их нарезку на ультрамикротоме и перенос срезов на сеточки или бленды выполняют как описано в п. 5.1.3.6.

5.3. Приготовление образцов сравнения из наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия

При проведении лабораторных исследований для приготовления образцов сравнения используют препараты наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия отечественного и зарубежного производства, предварительно охарактеризованные в соответствии с МУ 1.2.2636—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах» (пп. 3.1.3, 3.1.4). При проведении мониторинга содержания наночастиц в объектах окружающей среды или при выявлении последствий техногенной аварии в качестве образца сравнения используют наночастицы, производимые на предприятии, в окрестностях которого проводят мероприятия по выявлению наночастиц.

Образцы сравнения готовят из чистых наночастиц, смешивая их со смесью эпоксидных смол, приготовленных как описано в п. 5.1.2.5, в заливочных контейнерах. Для полимеризации смолы контейнеры с образцами инкубируют в термостате при 37 °С в течение 24 ч, затем при 60 °С в течение 48 ч. Приготовление блоков из залитых в смолы наноча-

стиц, их нарезку на ультрамикротоме и перенос срезов на сеточки или бленды выполняют как описано в п. 5.1.3.6.

VI. Анализ наночастиц в биологических образцах с применением метода энергодисперсионной микроспектроскопии

6.1. Технические характеристики применяемых средств измерений

Применяют просвечивающие электронные микроскопы с компьютерным управлением, оборудованные системой цифровой регистрации изображений и имеющие в своем составе рентгеновский детектор со следующими параметрами:

- величина ускоряющего напряжения электронов не менее 100 кВ (оптимально 200 кВ), максимальное увеличение (по техническому паспорту) не менее 500 000×;
- предельное разрешение двух точек в режиме ПЭМ (по техническому паспорту) не хуже 0,4 нм;
- предельное разрешение двух линий в режиме ПЭМ (по техническому паспорту) не хуже 0,25 нм;
- возможность фокусировки электронного пучка на образце в пятно диаметром от 1 до 25 нм (по техническому паспорту);
- в случае оснащения СПЭМ-детектором – разрешение в режиме СПЭМ не хуже 1 нм (по техническому паспорту);
- цифровая камера для регистрации изображений с матрицей размером не менее 2 048 × 2 048 пикселей;
- рентгеновский детектор со сверхтонким окном, с возможностью анализа элементов с атомными номерами от $Z = 6$ (углерод) и более;
- бериллиевый держатель образцов для работы с ЭДС;
- программное обеспечение для работы в режиме ЭДС, позволяющее накапливать спектры в различных режимах (в точке, с выбранной произвольной области), проводить анализ элементного состава и идентификацию пиков в полученных спектрах в автоматическом и ручном режиме, а также сравнивать полученные спектры между собой;
- максимальная скорость счёта рентгеновского детектора не менее 200 000 фотонов в секунду (по техническому паспорту);
- спектральное разрешение по энергии 130 эВ или лучше (по техническому паспорту);
- дополнительно возможно оснащение прибора СПЭМ детектором (детектором вторичных электронов).

6.2. Подготовка и настройка прибора перед проведением анализа методом ПЭМ с ЭДС

Юстировка электронного микроскопа проводится согласно прилагаемой производителем инструкции к прибору как в ПЭМ, так и в СПЭМ режиме, и проверяется оператором перед каждым сеансом измерений. В случае смены ускоряющего напряжения в процессе работы проводится юстировка прибора на новом ускоряющем напряжении.

Цифровая камера, используемая для регистрации изображений в режиме ПЭМ, должна быть откалибрована по набору стандартных образцов (например, калибровочных решёток, предлагаемых фирмой «Ted Pella», США, или аналогичных) на каждом применяемом в процессе измерений ускоряющем напряжении согласно инструкциям фирмы-производителя. Для каждого увеличения должен быть рассчитан масштабный коэффициент (количество пикселов, соответствующее 1 нм изображения).

Рентгеновский детектор должен быть откалиброван с использованием калибровочного образца с известным набором линий в спектре. Порядок и частота проведения данной калибровки должны соответствовать инструкции фирмы-производителя. В процессе измерений можно контролировать калибровку по известным пикам элементов в регистрируемых спектрах, например, пикам углерода, кислорода, меди, присутствующих в материале сеточки с подложкой.

Перед началом измерений должна быть выполнена подготовительная работа по выбору оптимального комплекса настроек прибора для проведения измерений в режимах ПЭМ, СПЭМ и ЭДС в биологических срезах на известных типах подложек (формваровая либо углеродная). Сюда относится выбор ускоряющего напряжения, а также других параметров, индивидуальных для каждого прибора, например, набора используемых диафрагм для ограничения электронного луча, выбор параметров, задающих диаметр электронного луча и его угол схождения, времени набора спектра ЭДС и так далее. Подбор данных параметров необходим для обеспечения стабильности биологического образца при освещении электронным лучом, возможности поиска и выявления искусственных наночастиц на фоне биологического матрикса, оптимизации скорости счёта и мёртвого времени рентгеновского детектора (согласно рекомендациям фирмы-производителя). При выборе параметров для измерения спектров ЭДС необходимо следить, чтобы не было дрейфа подложки. Дрейф выявляется путем сравнения ПЭМ- или СПЭМ-изображений электронно-плотных частиц до и после снятия спектров ЭДС. При обнаружении дрейфа (смещение анализируемой частицы от первоначального положения) необходимо изменить параметры измерений, ослабив интенсивность освещения и/или сократив время снятия спектра ЭДС.

6.3. Процедура проведения измерений

Для выявления наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях животных и растений следует использовать неконтрастированные образцы (группа № 1). Срезы тканей животных, контрастированные тетраоксидом осмия (группа № 2), рекомендуется использовать, если помимо выявления наночастиц необходимо охарактеризовать их локализацию в тканевых структурах. При этом вначале следует провести выявление наночастиц в образцах группы № 1.

Для исследуемого органа (ткани) растения или животного анализируется не менее 3 ультратонких срезов. Параллельно с опытными образцами обязательно проводится анализ отрицательных контрольных образцов (то есть образцов, которые заведомо не должны содержать наночастиц).

На средних увеличениях (порядка 6 000×—30 000×) проводят поиск электронно-плотных частиц характерной формы и их агрегатов на срезе. Оптимальным является последовательный просмотр полей зрения вдоль одной из осей среза. Необходимо убедиться, что просмотр ведется в области среза, содержащего биологический образец. В случае если проводится поиск мелких единичных частиц (например, размерами 5—10 нм), поиск следует проводить на более высоких увеличениях, например, 50 000×—100 000×. Если плотность распределения наночастиц очень низкая, необходимо просмотреть не менее половины площади среза. Для ускорения процесса можно просматривать участки через одно—два поля зрения. При средней и высокой плотности распределения наночастиц необходимо просмотреть не менее чем 30—50 полей на увеличении 6 000×—30 000× и 100—150 полей на увеличении 50 000×—100 000×. В случае обнаружения электроноплотных включений, напоминающих по морфологии искомые наночастицы или их агрегаты, отмечают места их скопления, однородность распределения, а также регистрируют их ПЭМ-изображения на различных увеличениях. Для получения качественных ПЭМ-изображений наночастиц увеличение должно быть таким, чтобы можно было рассмотреть морфологию отдельной частицы (то есть изображение самого мелкого единичного электронно-плотного включения должно занимать на матрице камеры участок размером не менее 5 × 5 пикселей). Изображения рекомендуется сохранять с масштабной меткой. Помимо регистрации ПЭМ-изображений необходимо занести в протокол анализа общее число всех просмотренных полей.

Обнаружение искомых наночастиц вне границ среза ткани указывает на возможную контаминацию среза наночастицами в процессе пробоподготовки. Если плотность наночастиц вне среза ткани в 10 и более раз ниже, чем в пределах самой ткани, результаты анализа считаются

значимыми. Если плотность распределения наночастиц внутри среза ткани и за её пределами (в эпоксидной смоле) сравнимы, процедуру пробоподготовки повторяют, используя свежеприготовленные растворы и смеси.

Найденные электронно-плотные включения, напоминающие по морфологии искомые наночастицы, анализируют методом ЭДС. Если все встречающиеся включения имеют одинаковую морфологию, следует получить спектры ЭДС от нескольких (трёх—пяти) произвольно выбранных частиц. Если в каждом из измеренных спектров присутствуют характеристичные пики элементов, входящих в состав искомых наночастиц, то обнаруженные электронно-плотные включения одинаковой морфологии относят к искомым наночастицам. Если выясняется, что сходные по морфологии включения имеют разный элементный состав, то спектр ЭДС измеряется для каждого электронно-плотного включения, и только после этого делается заключение, является ли данное включение искомой наночастицей. При обнаружении электронно-плотных включений нехарактерной морфологии следует измерить от них спектры ЭДС.

При обнаружении по спектру ЭДС искомой наночастицы необходимо, не меняя параметры измерений, получить фоновый спектр от ближайшего участка образца, не содержащего электронно-плотные включения. Спектры сопоставляют, чтобы убедиться в отсутствии в фоновом спектре пиков элементов, входящих в состав наночастицы.

Анализ электронно-плотных включений методом ЭДС можно выполнять в режиме ПЭМ или СПЭМ (далее по тексту режимы ПЭМ-ЭДС и СПЭМ-ЭДС). В режиме ПЭМ-ЭДС оператор устанавливает изображение электронно-плотного включения по центру флуоресцентного экрана и фокусирует электронный луч в пятно, близкое по размеру к анализируемому включению. Затем к образцу подводится рентгеновский детектор и регистрируется спектр ЭДС. Режим ПЭМ-ЭДС удобен, если необходимо измерить спектры ЭДС от одного—двух включений в поле зрения. Режим СПЭМ-ЭДС используют следующим образом. Находят электронно-плотные включения в режиме ПЭМ, переводят микроскоп в режим СПЭМ и получают СПЭМ-изображение интересующей области. Затем с помощью специального программного обеспечения на СПЭМ-изображении отмечают все интересующие области и в автоматическом режиме измеряют от этих областей спектры ЭДС. Режим СПЭМ-ЭДС удобен, если необходимо измерить спектры ЭДС от нескольких или многих включений в одном поле зрения микроскопа. Программное обеспечение позволяет сохранить СПЭМ-изображения с отмеченными областями, в которых проводился анализ, и установить привязку измеренных спектров ЭДС к отметкам на СПЭМ-изображении.

Для идентификации частиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка в биологических образцах спектры регистрируют в диапазоне 0—10 кэВ, с дискретностью 5—10 эВ на точку в спектре. ЭДС-спектры регистрируют при параметрах измерений, оптимизированных, как описано в п. 6.2.

Для достоверного определения элементного состава электронноплотной частицы или агрегата частиц ЭДС-анализ следует проводить или в выбранной точке на данной частице (диаметр электронного луча меньше, чем сечение частицы), или с выделенной области, содержащей данную частицу (агрегат), при минимально возможном попадании в эту область окружающих участков биологического образца.

Для анализа полученных результатов ЭДС наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка в биологических образцах желательно иметь спектры сравнения, измеренные от чистых образцов данных наночастиц. Кроме того, необходимо измерить спектр ЭДС пустой бленды/сеточки с подложкой, чтобы корректно учесть ее вклад в спектр ЭДС анализируемых образцов. Материал сеточек или бленд разных производителей может отличаться по составу.

На образцах группы № 2 тканей животных, контрастированных тетраоксидом осмия, и образцах группы № 1 тканей растений дополнительно определяют зоны преимущественного накопления наночастиц в клетках и тканевых структурах, отмечают наличие, характер и степень структурно-морфологических изменений в клетках и тканях. Идентификация тканевых и клеточных структур и заключение о локализации наночастиц должны выполняться специалистом, имеющим опыт подобных исследований.

VII. Анализ полученных данных и представление результатов

7.1. Анализ полученных данных

Все полученные ПЭМ-изображения конвертируют из формата, используемого программным обеспечением к прибору, в 8-битные форматы *.jpeg или *.tiff с сохранением размера изображения в пикселах, без изменения настроек яркости, контраста и «гамма» параметра. Для обработки изображений рекомендуются программы, аналогичные свободно распространяемым программам «ImageJ» (http//rsb.info.nih.gov/ij/) или «UTHSCSA Image Tool» («UTHSCSA Dental Diagnostic Science», США, gost.e-ecolog.ru). Также может использоваться программное обеспечение к электронному микроскопу, если в нем предусмотрены возможности для обработки изображений.

По полученным изображениям дают качественное морфологическое описание найденных наночастиц, субъективно классифицируя их по взаимоисключающим категориям, например, «округлые»/«продолго-

ватые», «агрегированные/одиночные», «с чётким краем/с расплывчатым краем» и так далее.

Для оценки количественных морфологических параметров (размер и форм-фактор) определяют линейные размеры наночастиц вдоль наиболее короткой и наиболее длинной осей. Форм-фактор F рассчитывают по формуле (1).

$$F = \frac{a}{b}, \text{ где} \quad (1)$$

a – размер наиболее длинной оси;

b – размер наиболее короткой оси.

Затем рассчитывают средний наименьший и средний наибольший размер частиц, а также стандартные отклонения от среднего. Если было найдено очень много наночастиц, то размеры и их среднее значение определяют для 100 частиц, выбранных случайным образом.

Качественно характеризуют плотность распределения наночастиц на просматриваемом срезе:

• частицы агрегированы и распределены неоднородно по площади среза (на срезе найдены несколько агрегатов наночастиц, размеры которых существенно превышают размеры индивидуальных наночастиц в образце сравнения);

• единичные наночастицы (на всей просмотренной площади среза найдено от 1 до 5 наночастиц заданного элементного состава);

• низкая плотность распределения наночастиц (частицы встречаются реже, чем через каждые 5 полей зрения, найдено от 5 до 10 частиц);

• средняя плотность распределения наночастиц (частицы встречаются через три—пять полей зрения, найдено более 10 частиц);

• высокая плотность распределения наночастиц (частицы присутствуют на срезе в каждом втором—третьем поле зрения);

• очень высокая плотность распределения частиц (частицы присутствуют в каждом поле зрения).

Если плотность наночастиц в срезе средняя или выше, то рекомендуется провести количественный анализ плотности распределения наночастиц. Для этого в серии изображений систематически расположенных областей среза (не менее 30) подсчитывают число обнаруженных искусственных наночастиц M. Двумерную плотность распределения искусственных наночастиц D определяют по формуле (2).

$$D = \frac{M}{S \cdot N}, \text{ где} \quad (2)$$

N – общее число изображений как содержащих, так и не содержащих наночастицы;

S – площадь образца на изображении в мкм^2 (серия изображений должна быть получена при одном увеличении микроскопа).

Равномерность распределения наночастиц характеризуют величиной дисперсии σ^2 среднего количества наночастиц на одном изображении (формула 3).

$$\sigma^2 = \frac{\sum (M_i - \frac{M}{N})^2}{N-1}, \text{ где} \qquad (3)$$

M_i – количество наночастиц в i-м изображении. Суммирование по i ведут по всем N полученным изображениям (как содержащим, так и не содержащим наночастицы).

Полученные ЭДС-спектры анализируют с помощью программного обеспечения для обработки спектров ЭДС. В автоматическом режиме обработки спектров проводится авторазпознавание пиков элементов в спектре и их идентификация.

Анализ начинают со спектров, полученных от чистых сеточек с подложкой, чтобы определить их возможный вклад в спектры ЭДС от биологических образцов и анализируемых наночастиц (рис. 2). Помимо пиков от материала сеточки с подложкой в спектре могут также присутствовать аппаратные пики.

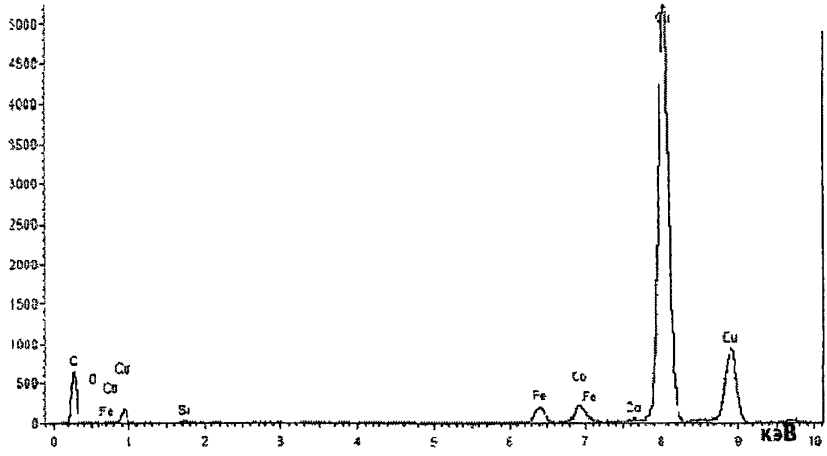


Рис. 2. Пример спектра ЭДС, измеренного от участка пустой формваровой подложки, стабилизированной напылённым углеродом, на медной сеточке. В спектре определяются пики углерода, кислорода, меди, кремния, кобальта и железа. Спектр измерен в режиме ПЭМ-ЭДС при ускоряющем напряжении 200 кВ

Помимо пиков материала бленды/сеточки и подложки, а также аппаратных пиков, в спектрах ЭДС биологических образцов могут присутствовать пики ряда элементов, входящих в состав клеток и тканей животных (растений). В табл. 1 приведены значения энергий, соответствующих максимумам пиков в энергодисперсионных рентгеновских спектрах, для основных элементов, которые могут присутствовать в биологических образцах и материале подложки.

Таблица 1

Наиболее интенсивные пики в энергодисперсионных рентгеновских спектрах для основных элементов, входящих в состав биологических образцов и материала подложки

Элемент	Энергия пика, кэВ	Обозначение
Углерод	0,28	Kα12
Азот	0,39	Kα12
Кислород	0,53	Kα12
Натрий	1,04	Kα1,2
Фосфор	2,01	Kα1
Сера	2,30	Kα1
Хлор	2,62	Kα1
Калий	3,31	Kα1
Кальций	3,69 0,34	Kα1 Lα1,2
Железо	6,40 0,70	Kα1 Lα1,2
Медь	0,93 8,05 8,9	Lα12 Kα12 Kβ13

Для идентификации наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка в срезах тканей животных и растений рекомендуется использовать характеристические пики соответствующих металлов в энергодисперсионных рентгеновских спектрах (табл. 2).

Таблица 2

Наиболее интенсивные пики в энергодисперсионных рентгеновских спектрах серебра, алюминия, церия и цинка, по которым проводится идентификация наночастиц, содержащих данные элементы, в биологических образцах

Элемент	Энергия пика, кэВ	Обозначение
Серебро	2,98 3,15 3,35	Lα1 Lβ1 Lβ2
Алюминий	1,49	Kα12
Церий	4,84 5,26 5,61	Lα12 Lβ1 Lβ2
Цинк	8,64 9,57	Kα12 Kβ13

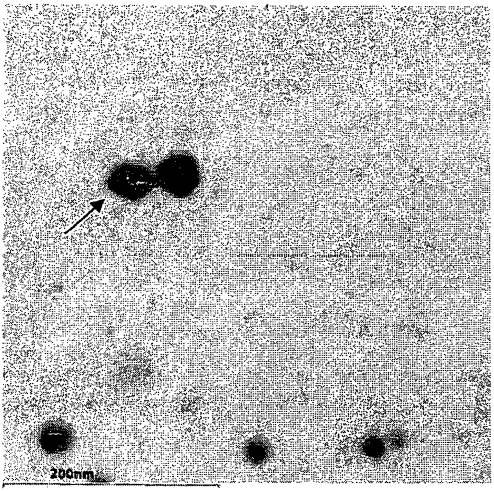
При проведении анализа желательно иметь спектры от чистых образцов наночастиц, поиск и идентификация которых проводится в срезах тканей животных или растений. Примеры СПЭМ-изображений и энергодисперсионных рентгеновских спектров наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка представлены на рис. 3—6.

Наиболее интенсивные пики, соответствующие L – серии серебра (рис. 3, табл. 2), не перекрываются пиками элементов, входящих в состав биологических образцов (табл. 1), и позволяют достоверно идентифицировать наночастицы серебра и их агрегаты в биологических образцах (рис. 7).

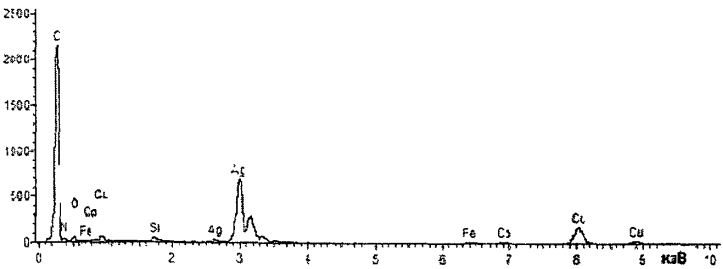
Идентификация наночастиц оксида алюминия в биологических образцах (рис. 8) может быть успешно проведена по интенсивному пику алюминия Kα12 (1,49 кэВ). Дополнительным признаком является относительное увеличение интенсивности пика кислорода Kα12 (0,53 кэВ).

Характеристичные пики церия Lα12 (4,84 кэВ), Lβ1 (5,26 кэВ), Lβ2 (5,61 кэВ) лежат вне области пиков элементов, входящих в состав биологических образцов и подложки, и могут быть использованы для идентификации наночастиц оксида церия (рис. 9).

Несмотря на то, что линия Lα12 наиболее интенсивная в спектре цинка (рис. 6), использовать её для идентификации наночастиц оксида цинка в биологических образцах нежелательно, так как она перекрывается с линиями натрия (Kα1,2 – 1,04 кэВ) и меди (Lα12 – 0,93 кэВ). Для идентификации оксида цинка в биологических срезах рекомендуется использовать линии Kα12 (8,64 кэВ) и Kβ13 (9,57 кэВ).

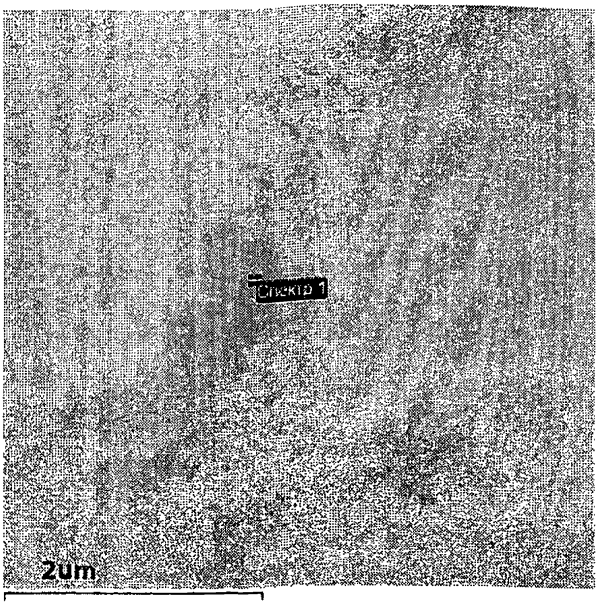


А

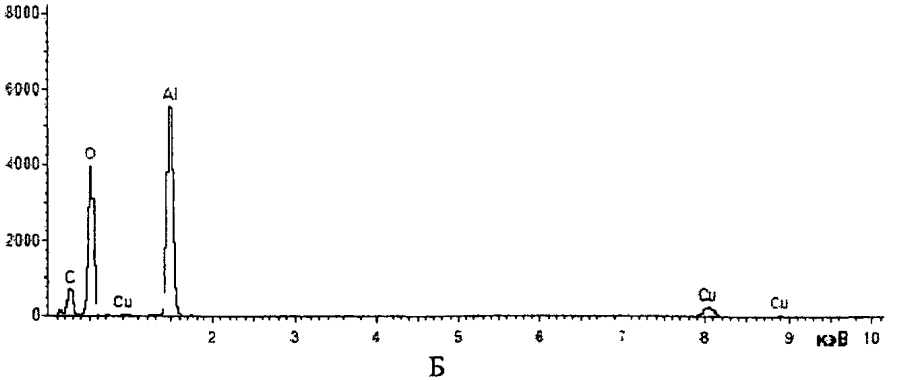


Б

Рис. 3. А. СПЭМ-изображение наночастиц серебра «Аргоника» на медной сетке с формваровой подложкой, полученное при ускоряющем напряжении в 200 кВ. Б. Энергодисперсионный рентгеновский спектр, измеренный от наночастицы, отмеченной стрелкой на изображении А. В спектре помимо пиков от подложки (углерод, кислород, кремний, железо, кобальт, медь) присутствует группа пиков серебра Lα1 (2,98 кэВ), β1 (3,15 кэВ), Lβ2_15 (3,35 кэВ)



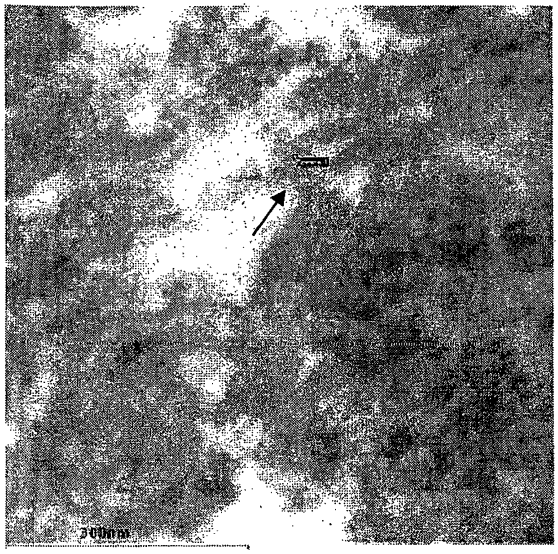
А



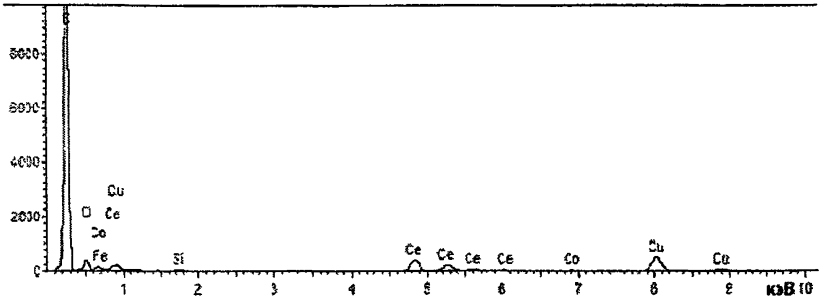
Б

Рис. 4. А. СПЭМ-изображение наночастиц оксида алюминия на медной сетке с формваровой подложкой, покрытой углеродной плёнкой, полученное при ускоряющем напряжении в 200 кВ.

Б. Энергодисперсионный рентгеновский спектр, измеренный от наночастиц, отмеченных на изображении А. В спектре помимо пиков от подложки (C, O, Cu) присутствует пик алюминия Kα12 (1,49 кэВ)



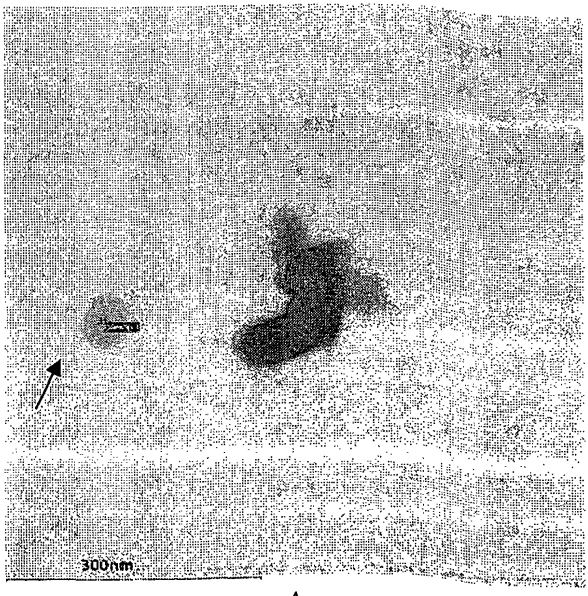
А



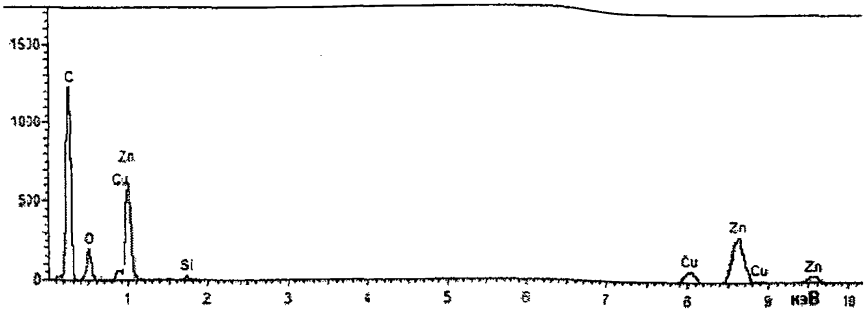
Б

Рис. 5. А. СПЭМ-изображение наночастиц оксида церия на медной сетке с формваровой подложкой, покрытой углеродной плёнкой, полученное при ускоряющем напряжении в 200 кВ.

Б. Энергодисперсионный рентгеновский спектр, измеренный от наночастиц, отмеченных стрелкой на изображении А. В спектре помимо пиков от подложки (C, O, Co, Cu) присутствуют пики церия, соответствующие L-серии. Наиболее интенсивные из них — Lα12 (4,84 кэВ), Lβ1 (5,26 кэВ) и Lβ2 (5,61 кэВ)



А



Б

Рис. 6. А. СПЭМ-изображение наночастиц оксида цинка на медной сетке с формваровой подложкой, покрытой углеродной плёнкой, полученное при ускоряющем напряжении в 200 кВ.

Б. Энергодисперсионный рентгеновский спектр, измеренный от наночастицы, отмеченной стрелкой на изображении А. В спектре помимо пиков от подложки (C, O, Cu, Si) присутствуют пики цинка, соответствующие L- и K-сериям: Lα12 (1,01 кэВ), Kα12 (8,64 кэВ), Kβ13 (9,57 кэВ)

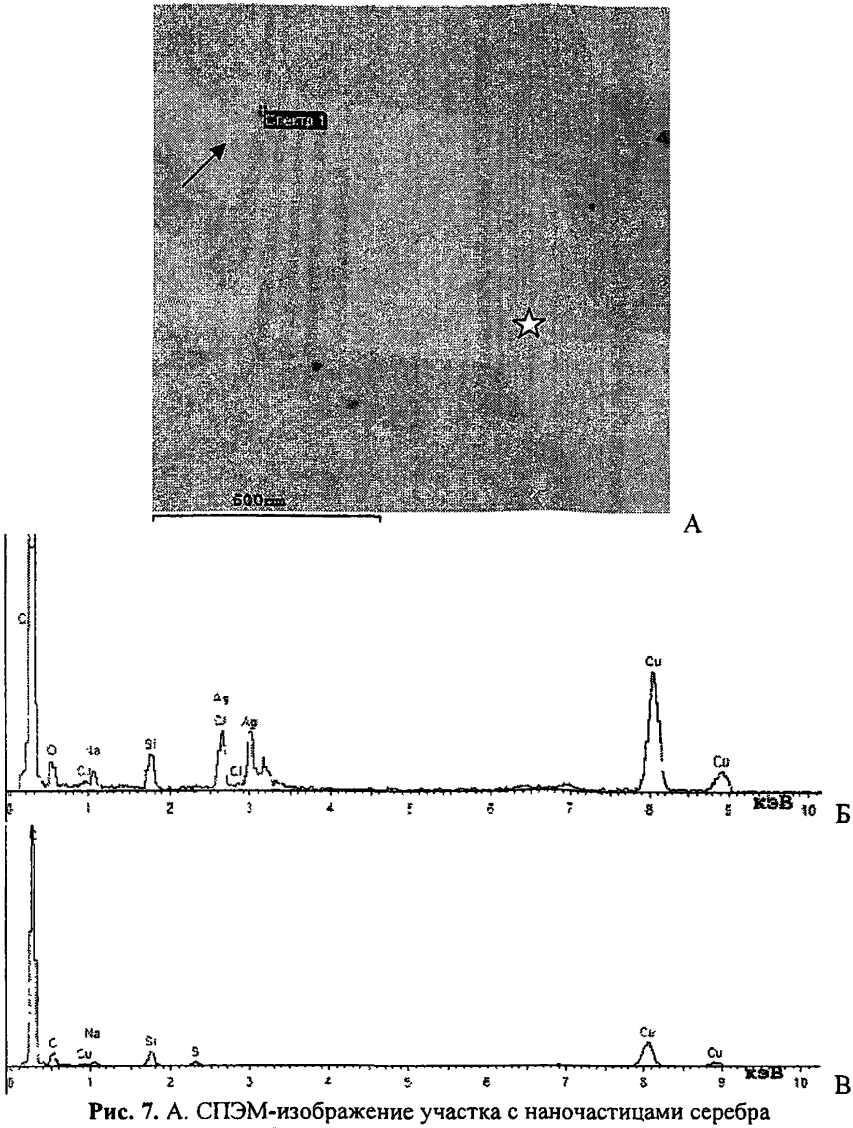


Рис. 7. А. СПЭМ-изображение участка с наночастицами серебра в образце сыворотки крови человека.
Б, В. Энергодисперсионные рентгеновские спектры, полученные от участков, отмеченных на изображении А звездочкой (наночастица серебра, спектр В) и стрелкой (фон, спектр Г)

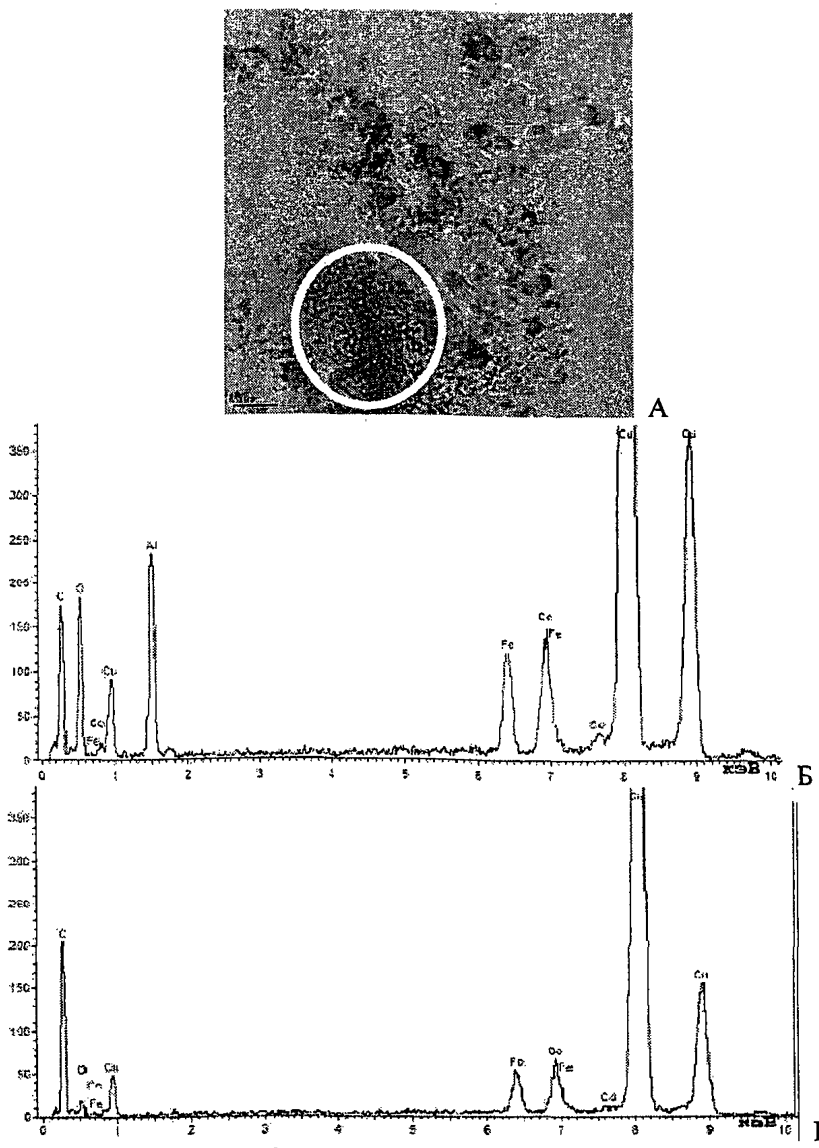


Рис. 8. А. ПЭМ-изображение участка с наночастицами алюминия в срезе лимфоузла мыши. Масштабная метка – 20 нм.
Б, В. Энергодисперсионные рентгеновские спектры, полученные от участка, отмеченного на изображении А (наночастица оксида алюминия, спектр Б), и пустого участка среза (фон, спектр В)

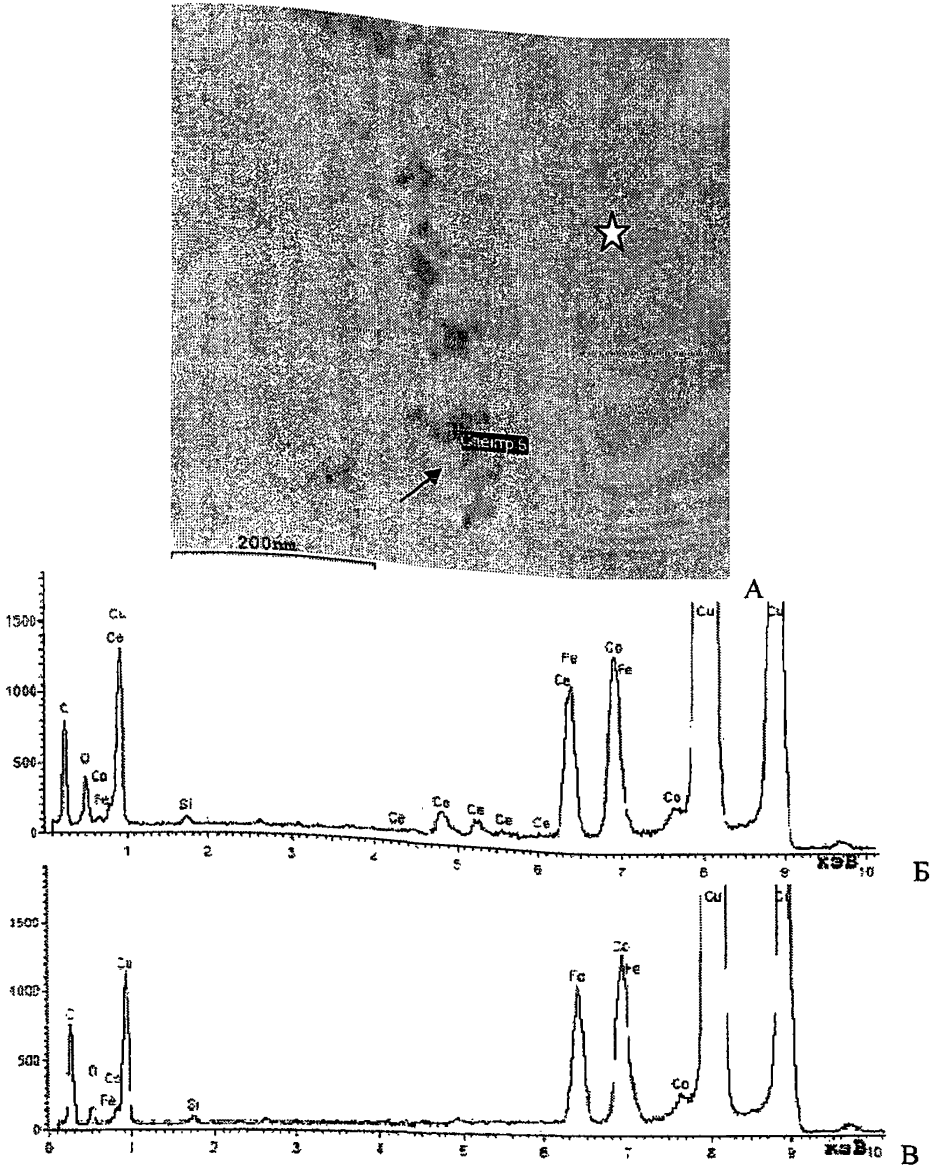


Рис. 9. А. СПЭМ-изображение участка с наночастицами оксида церия в срезе корня проростка риса.

Б, В. Энергодисперсионные рентгеновские спектры, полученные от участков, отмеченных на изображении А стрелкой (наночастица оксида церия, спектр В) и звездочкой (фон, спектр Г)

Для идентификации наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия и цинка в образцах животных и растительных тканей проводится анализ и сравнение спектров, полученных от областей, содержащих электронноплотные частицы, и соседних с ними участков среза. Частицы считаются идентифицированными как наночастицы серебра, оксидов алюминия, церия и цинка в случае, если в их энергодисперсионных рентгеновских спектрах присутствуют пики соответствующих металлов (табл. 2), а в фоновых спектрах они отсутствуют (рис. 7—9). Если при анализе образцов не были выявлены и идентифицированы наночастицы серебра, оксидов алюминия, церия и цинка, то делают вывод, что данные образцы не содержат включений соответствующих наночастиц в количествах, достаточных для детекции методом ПЭМ с применением ЭДС. Если есть сомнения относительно отрицательного результата детекции, то проводят анализ дополнительных образцов или повторный анализ исследованных образцов, с более детальным исследованием образца методами ПЭМ, СПЭМ и ЭДС.

Если искусственные наночастицы помимо исследуемых образцов были обнаружены в контрольных образцах, исходно не содержавших наночастицы, то результаты анализа считают недостоверными. В этом случае необходимо устранить причину контаминации образцов наночастицами в процессе пробоподготовки (тщательно вымыть инструменты, используемые в пробоподготовке, сменить растворы, смеси эпоксидных смол и тому подобное), повторить пробоподготовку и анализ исследуемых и контрольных образцов.

7.2. Представление результатов анализа

Результаты анализа представляют и хранят в виде файлов с изображениями и спектрами ЭДС, а также электронного текстового документа, который должен содержать:

- описание исследованных образцов, их шифры, происхождение, вид растений/животных, орган (отдел, вид ткани), из которого взята проба, дата забора пробы по сопровождающим документам, используемый консервант, соблюдение режима хранения пробы, визуальная сохранность пробы до начала пробоподготовки;
- описание контрольных образцов, не содержащих наночастицы;
- краткое описание пробоподготовки (с контрастированием или без), отмечают соблюдение всех этапов пробоподготовки; использованные сеточки или бленды, их фирма-производитель, покрытие (углеродное, формваровое, формвар, стабилизированный углеродом или другое), количество исследованных срезов, толщина приготовленных срезов;
- данные о параметрах прибора, при которых проводились измерения (ускоряющее напряжение, набор диафрагм, ограничивающих электронный

луч, параметров, регулирующих диаметр электронного луча и угол схождения луча, время накопления энергодисперсионных спектров и так далее);

• заключение о наличии или отсутствии наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия, церия в анализируемых образцах.

В случае положительного результата (наличие наночастиц в образце) отмечают количество просмотренных срезов, количество полей, просмотренных на каждом срезе, увеличение, на котором вёлся просмотр образца.

Дают морфологическое описание обнаруженных наночастиц.

Качественно и (по возможности) количественно характеризуют плотность распределения наночастиц.

Приводят данные о размерах найденных частиц, их среднем наименьшем и наибольшем размере. В случае большого количества частиц строят гистограмму распределения частиц по размерам. В случае единичных частиц представляют таблицу с размерами найденных наночастиц.

Представляют наиболее репрезентативные ПЭМ- м СПЭМ-изображения с найденными включениями и полученные энергодисперсионные рентгеновские спектры от частиц, подтверждающие, что найденные частицы действительно являются частицами серебра, оксида алюминия, церия или цинка. Для каждого спектра от области с наночастицами должен быть также приведён спектр от соседней области образца, не содержащей частиц, в качестве фонового спектра. Для серии спектров от образцов должен быть приведён спектр, полученный от чистой подложки на бленде или сеточки, использованных в процессе пробоподготовки.

В обязательном порядке отмечают факт отсутствия искомых наночастиц в отрицательном контрольном образце (в противном случае достоверность анализа подвергают сомнению).

Если наночастицы в срезах не были обнаружены, то дают заключение об отсутствии наночастиц серебра, оксидов алюминия, церия или цинка в исследуемом образце. Кратко описывают, сколько полей зрения и на каком увеличении было просмотрено. В случае если были выявлены электронно-плотные частицы, не идентифицированные как наночастицы серебра, оксидов алюминия, церия или цинка, дают их морфологическое описание, качественную характеристику плотности распределения и размеры, приводят репрезентативные изображения и спектры, подтверждающие, что данные частицы не содержат серебро, алюминий, церий или цинк.

В конце отчета дается список файлов с изображениями и спектрами, не вошедшими в текстовый документ в виде рисунков. К каждому файлу пишется аннотация, поясняющая, от какого образца и как сделано измерение, приводятся существенные параметры измерений.

При необходимости текстовый документ распечатывается, заверяется подписями ответственных лиц и печатью организации (дополнительно прикладывается в электронном варианте текстовый документ и файлы с изображениями и спектрами ЭДС).

Приложение 1

Обозначения и сокращения

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
ПЗС – прибор с зарядовой связью
СПЭМ – сканирующая просвечивающая электронная микроскопия
ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Приложение 2

Рекомендуемая литература

1. Синдо Д., Оикава Т. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. М.: Техносфера, 2006. 256 с.

Применение метода энергодисперсионной микроспектроскопии для анализа наночастиц серебра, оксидов цинка, алюминия и церия в тканях животных и растений

Методические рекомендации
МР 1.2.0046—11

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 28.03.12

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,75
Тираж 200 экз. Заказ 22

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru