Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб и методы определения содержания наночастиц в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств

Методические рекомендации
МР 1.2.0018—11

Издание официальное

Москва • 2011

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб и методы определения содержания наночастиц в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств

Методические рекомендации
МР 1.2.0018—11

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** отбора проб и методы определения содержания наночастиц в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—40 с.

1. Разработаны: Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г.Онищенко); Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Ю. А. Рахманин, С. И. Иванов, З. И. Жолдакова, О. О. Синицына); Биологическим факультетом Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (К. В. Шайтан, О. С. Соколова, Д. В. Багров, М. Г. Карлова, А. В. Пищальникова, А. Д. Докрунова, А. С. Роскошная, Е. С. Трифонова).

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

3. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г.Онищенко 02.03.2011.

4. Введены в действие с 02.03.2011.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 11.05.11

Формат 60x88/16 Печ. л. 2,5

Тираж 200 экз. Заказ 84

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

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

Список использованных сокращений 4
Введение 5
I. Область применения 6
II. Нормативные ссылки 6
III. Общие положения 8
IV. Порядок и методы отбора проб продукции, содержащей наноматериалы 9
V. Требования безопасности 13
VI. Наночастицы серебра, оксида титана и оксида цинка. Порядок выявления и определения содержания методом просвечивающей электронной микроскопии 13
VII. Наночастицы оксида титана и оксида цинка. Порядок выявления и определения содержания методом сканирующей электронной микроскопии с применением рентгеновского микроанализа 23
VIII. Наночастицы серебра. Порядок выявления методом атомно-силовой микроскопии 27
IX. Фуллерены. Порядок выявления и определения содержания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 32
Приложение 1. Типовая форма акта отбора проб продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств 37
Приложение 2. Термины и определения 39

Список использованных сокращений

АСМ – атомно-силовая микроскопия
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
МР – методические рекомендации
НЧ – наночастица
ПЗС – прибор (детектор) с зарядовой связью
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
РМА – ренгеноспектральный микроанализ
СО – стандартный образец
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
ПАВ – поверхностно активные вещества
ССБТ – система стандартов безопасности труда
ГСОЕИ – государственная система обеспечения единства измерений
ГСО – государственный стандартный образец
НТД – научно-техническая документация

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

Г. Г. Онищенко
2 марта 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Порядок отбора проб и методы определения содержания наночастиц в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств

Методические рекомендации МР 1.2.0018—11

Введение

Современные косметические средства, парфюмерия, продукция бытовой химии, дезинфекционные средства могут содержать наноэмульсии, а также разнообразные наночастицы (далее – НЧ), например серебро (Ag), фуллерены (С60), оксиды металлов (ZnO, TiO_2), которые широко используются в качестве дезинфицирующих, антимикробных, светоотражающих и других агентов.

Оксиды цинка и титана применяются в основном при производстве парфюмерно-косметических средств. Они входят в состав кремов, предохраняющих от воздействия УФ-радиации. Фуллерен С60 обладает антивирусной, противораковой и антиоксидантной активностью. Он входит в состав кремов для лица в качестве антиоксидантов и в средства против старения кожи.

Изучение и определение НЧ, находящихся в продукции бытовой химии, парфюмерно-косметических и дезинфекционных средствах, представляют особый интерес в связи с тем, что их проникновение в организм может происходить не только через кожу, но и через легкие путем вдыхания аэрозолей.

I. Область применения

1.1. В настоящих методических рекомендациях (далее – МР) приведен порядок отбора проб и проведения исследований содержания наночастиц в продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средствах.

1.2. Рекомендации, изложенные в настоящем документе, могут быть использованы при мониторинге процессов производства, оборота и использования НЧ в целях принятия решений о соответствии продукции гигиеническим требованиям, а также при оценке риска воздействия НЧ на здоровье человека.

1.3. МР разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации существующих микроскопических и хроматографических методов в ходе определения содержания НЧ в продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средствах.

1.4. МР 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, а также иными организациями, деятельность которых связана с оценкой нанотехнологий и продукции наноиндустрии.

II. Нормативные ссылки

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

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

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

4. Федеральный закон от 10.01.2002 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».

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

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

7. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 г. № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки рис-

ка, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».

8. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» (Зарегистрирован в Минюсте России 13 октября 2010 г., регистрационный номер 18713).

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

10. ГОСТ 30333—07 «Паспорт безопасности химической продукции. Общие требования».

11. ГОСТ 12.0.004—90 ССБТ «Организация обучения безопасности труда. Общие положения».

12. ГОСТ 12.1.004—91 ССБТ «Пожарная безопасность. Общие требования».

13. ГОСТ 12.4.021—75 ССБТ «Системы вентиляционные. Общие требования».

14. ГОСТ 12.1.019—79 ССБТ «Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

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

16. ГОСТ 5789—78 «Реактивы. Толуол. Технические условия».

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

18. ГОСТ 18300—87 «Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия».

19. ГОСТ 9293—74 «Азот газообразный и жидкий. Технические условия».

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

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

22. ГОСТ 29227—91 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Ч. 1. Общие требования».

23. ГОСТ Р 8.563—2009 ГСОЕИ «Методики (методы) измерений».

24. ГОСТ 29188.0—91 «Изделия парфюмерно-косметические. Правила приемки, отбор проб, методы органолептических испытаний».

25. ГОСТ 26678—85 «Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия».

26. ГОСТ 10157—79 «Аргон газообразный и жидкий. Технические условия».

27. ТУ 9310-13-00008064—00 «Арговит – концентрированный раствор биосеребра».

28. ГОСТ Р 8.635—2007 ГСОЕИ «Микроскопы сканирующие зондовые атомно-силовые. Методика калибровки».

29. ГОСТ Р 8.636—2007 ГСОЕИ «Микроскопы электронные растровые. Методика калибровки».

30. ГОСТ 8.207—76 ГСОЕИ «Прямые измерения с многократными наблюдениями. Методы обработки результатов наблюдений. Основные положения».

31. ГОСТ 12.1.005—88 ССБТ «Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

III. Общие положения

Проведение исследований по определению НЧ в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств.

3.1. Требования к используемому оборудованию.

3.1.1. Организации, проводящие определение НЧ в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств, должны быть оснащены необходимым оборудованием, прошедшим метрологическую поверку в установленном порядке.

3.1.2. Необходимое оборудование перечислено в разделах 6—9.

3.1.3. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническими паспортами и инструкциями по применению. Результаты проведения калибровки и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование.

3.2. Определение НЧ в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств проводится по утвержденному плану с ведением протокола, в который заносятся все результаты исследований и который вместе с заключением заносится в отчет.

3.3. Требования к оформлению отчета:

3.3.1. В отчете представляются: название, адрес организации, даты начала и завершения исследований, цель и задачи исследования, имеющиеся сведения об определяемых НЧ (физические, химические, биологические, токсикологические свойства), перечень исследованных образцов и используемых СО, методы подготовки образцов, протокол проведения исследования, результаты исследований, сведения о наличии в исследуемом образце НЧ, при наличии – характеристика НЧ.

3.3.2. Отчет утверждается руководителем организации, проводящей исследования, и скрепляется печатью организации.

3.4. Стандартные операционные процедуры:

3.4.1. Соблюдение стандартных операционных процедур осуществляется в целях обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.4.2. Отклонения от стандартных операционных процедур должны быть документально оформлены.

3.5. Меры конфиденциальности:

3.5.1. Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований по определению содержания НЧ в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

IV. Порядок и методы отбора проб продукции, содержащей наноматериалы

4.1. Цель и назначение процедуры пробоотбора – получение представительной (репрезентативной) пробы продукции, позволяющей получить объективную информацию о содержании НЧ в данной партии или лоте продукции с использованием рекомендованных для этой цели методов исследования (анализа).

4.2. Отбор проб может проводиться в случаях:

4.2.1) экспертизы продукции при её постановке на производство или ввозе (импорте) в Российскую Федерацию;

4.2.2) контроля и надзора за продукцией, содержащей НЧ, на всех стадиях её жизненного цикла (производство–транспортировка–реализация–использование–утилизация);

4.2.3) подтверждения соответствия продукции действующим санитарным правилам и нормативам и иным нормативным документам, утвержденным в установленном порядке;

4.2.4) в иных случаях, предусмотренных законодательством Российской Федерации.

4.3. Отбор проб продукции осуществляют специалисты, в обязательном порядке изучившие методику пробоотбора, а также ознакомленные с правилами техники безопасности и действующими нормативными и методическими документами для работы с продукцией, содержащей НЧ. Отбор проб рекомендуется проводить в присутствии представителя производителя (поставщика) продукции.

Количество и масса отбираемых единиц продукции должна быть достаточной для формирования объединённой пробы и выделения из неё средней пробы. Величина (масса, объём) средней пробы должна быть достаточна для выделения из неё контрольной и лабораторной проб. Масса средней пробы зависит от количества определяемых показателей и применяемых методов исследований.

Величина (объём, масса) лабораторной и контрольной проб должна быть достаточной для выполнения в лаборатории необходимых (установленных нормативными документами по безопасности нанотехнологической продукции и зафиксированных в акте отбора проб) видов исследований данного вида продукции с учётом применяемых методик анализа и количества повторов исследования, удовлетворяющего требованиям статистической достоверности результата. Точную массу навески, необходимую для проведения каждого вида исследований, устанавливают в соответствии с действующими нормативными документами на методы исследований.

4.4. Минимальная масса пробы, необходимая для проведения исследований на наличие НЧ одного вида, не должна быть менее рекомендуемой, представленной в табл. 1 настоящих методических рекомендаций.

Таблица 1

Рекомендуемая минимальная масса пробы, необходимая для проведения исследований на содержание НЧ одного вида в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств

№ п/п	Вид материала	Единицы измерения	Минимальное количество пробы (образца)
Бытовая химия и дезинфекционные средства			
1	Порошки стиральные	г	5
2	Моющие средства	$см^3$	1
3	Отбеливающие средства	$см^3$	1
4	Средства для дезинфекции поверхностей, медицинских инструментов и оборудования	$см^3$	1
5	Средства для обеззараживания воды	$см^3$	0,5
6	Кожные антисептики	$см^3$	0,5
Парфюмерно-косметические средства			
7	Губная помада	г	1
8	Дезодорант	г	2,5
9	Зубная паста	г	5
10	Краски для волос	г	2,5
11	Кремы	$см^3$	1
12	Лаки для волос	$см^3$	1
13	Лосьон/Одеколон	$см^3$	1
14	Жидкое мыло	$см^3$	1
15	Средство до и после бритья	$см^3$	1
16	Шампуни жидкие	$см^3$	1

4.5. При увеличении числа определяемых НЧ в образце величина (масса, объём) лабораторной, контрольной и средней пробы пропорционально увеличивается для проведения дополнительных измерений.

4.6. Контрольная проба выделяется из средней пробы. Масса контрольной пробы должна быть не менее массы наибольшего тестового образца, направляемого в лабораторию на отдельный конкретный вид исследований.

4.7. Контрольная проба в опломбированном (опечатанном) виде может храниться:

- у производителя (поставщика) продукции или его представителя;
- в лаборатории, проводившей исследования.

4.8. Особенности процедуры отбора и подготовки проб из твердых сред (крем, губная помада, пудра, мыло и др.).

Отбор пробы из твердой среды производят в том случае, если объект пробоотбора является нерастворимым или если есть основания полагать, что его растворение может оказать влияние на последующую идентификацию и количественное определение НЧ. В случае если объект пробоотбора растворим и оснований предполагать изменения свойств искомых НЧ при растворении нет, производят его растворение и последующая работа производится с жидкой фазой (раствором) образца (*п.* 4.9).

Отбор точечных проб производят либо острым скальпелем с различных случайно выбранных участков исходного образца, либо шпателем. Таким образом, отбирается не менее 5 точечных проб из различных участков исходного образца. Кроме того, необходимо отобрать как минимум одну точечную пробу из середины объема образца. Следует учитывать то, что НЧ не должны агломерировать или разрушаться в процессе пробоотбора. Поэтому не рекомендуется использовать такие способы пробоподготовки, как растирание образца в ступке, нагревание выше 50 °С. Также следует учесть, что большинство основ в продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средствах не растворимы в воде.

Отобранные точечные пробы смешивают, обеспечивая за счет этого усреднение по объему образца. В случае если есть основания полагать различия в концентрации искомых объектов (НЧ) в различных участках образца, допускается работа с отобранными точечными пробами по отдельности с соответствующей их маркировкой. В этом случае в акте отбора проб ставится запись, однозначно идентифицирующая место исходного образца откуда проба была отобрана.

4.9. Особенности процедуры отбора и подготовки проб из жидких сред (жидкое мыло, дезинфицирующие средства, шампунь, косметические сыворотки и др.).

Если жидкость однородна, то отбирают небольшое ее количество в любом месте с помощью соответствующего дозатора-пипетки, чтобы получить среднюю пробу.

Если жидкость не обладает абсолютной гомогенностью в большом объеме жидкости или в ней присутствуют эмульгированные, не смешивающиеся с основой другие жидкости, то среднюю пробу готовят путем отбора нескольких точечных проб из разных мест и на разной глубине анализируемой жидкости.

Приборы для отбора проб жидкостей должны быть чистыми. Их промывают в зависимости от свойств жидкости водой или спиртом, сушат или обмывают отбираемым продуктом. Наконечники измерительных пипеток должны использоваться строго один раз в связи с невозможностью их тщательного отмывания.

Перед отбором проб анализируемые жидкости должны быть хорошо перемешаны. Могут быть отобраны 3—5 проб. При отборе трех проб одну пробу берут на 10 % ниже уровня поверхности, вторую – на 10 % выше уровня дна и третью – из середины по высоте столба жидкости. При отборе пяти проб дополнительно к указанным берут пробы в точках, находящихся между верхней и средней и между нижней и средней точками трехточечного пробоотбора.

Отобранные точечные пробы смешивают, обеспечивая за счет этого усреднение по объему образца. В случае если есть основания полагать различия в концентрации искомых объектов (НЧ) в различных участках образца, допускается работа с отобранными точечными пробами по отдельности с соответствующей их маркировкой. В этом случае в акте отбора проб ставится запись, однозначно идентифицирующая место исходного образца откуда проба была отобрана.

4.10. Маркировка, хранение и транспортирование лабораторных и контрольных проб.

4.10.1. Маркировка проб.

Каждый сосуд с пробой маркируют, т. е. снабжают этикеткой, на которой указано наименование продукта, индивидуальный номер пробы и номер акта отбора проб. На этикетку с контрольной пробой наносят надпись «Контрольная проба».

4.1.2. Составление акта отбора проб.

Информация об отобранных пробах заносится в «Акт отбора проб» (прилож. 1). В акте указывается:

- наименование продукта;
- его сорт или марка;
- наименование предприятия-изготовителя, с которого отпущен продукт;

• дата отбора пробы;

• фамилия и подпись пробоотборщика (лица, отобравшего пробу).

4.1.3. Хранение проб.

Отобранные пробы хранятся в герметично закрытых сосудах при условиях (температура, освещенность и пр.), соответствующих установленным производителем.

4.1.4. Транспортирование проб.

Пробы должны быть доставлены в лабораторию максимально быстро, с соблюдением мер против протекания, высушивания, повреждения проб (например, пробы, требующие особых условий хранения (при пониженных температурах), помещают в сумку-холодильник или обкладывают сухим льдом).

V. Требования безопасности

5.1. Требования к помещению.

Помещение лаборатории должно соответствовать санитарным правилам проектирования, оборудования, эксплуатации и содержания производственных и лабораторных помещений, предназначенных для проведения работ с веществами 1—2-го классов опасности, органическими растворителями. Аналитическая лаборатория должна быть оснащена вентиляционной системой согласно ГОСТ 12.4.021—75. Выброс воздуха из вытяжки должен быть выведен в вентиляционную шахту и оборудован воздушным фильтром для улавливания НЧ.

Температура окружающего воздуха должна быть от 15 до 25 °С. Относительная влажность воздуха не более 80 % при 25 °С.

В процессе выполнения работ с НЧ персоналу необходимо соблюдать правила личной гигиены. На рабочих местах строго запрещен приём пищи и курение. После завершения работ проводят влажную уборку на рабочем месте и в помещении.

VI. Наночастицы серебра, оксида титана и оксида цинка. Порядок выявления и определения содержания методом просвечивающей электронной микроскопии

6.1. Область применения

Настоящая методика применяется для качественной идентификации и контроля количественного содержания НЧ серебра, оксидов титана и цинка в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств.

6.2. Ограничения методики

6.2.1. Рабочая концентрация НЧ для определения методом ПЭМ – 0,1—1 мг/см^3.

6.2.2. Идентификация аморфных НЧ с помощью метода дифракции электронов невозможна.

6.2.3. Минимальный определяемый линейный размер НЧ – не менее 5 нм.

6.3. Средства измерения

6.3.1. Оборудование

Электронный микроскоп с компьютерным управлением Philips EM208 или эквивалентный, имеющий следующие параметры: – диапазон величин ускоряющего напряжения электронов не меньше 80—100 кВ; – диапазон увеличений в режиме ПЭМ 10 000—200 000; – опция работы в режиме дифракции параллельного пучка электронов; – полевая апертурная диафрагма диаметром 1 мкм или меньше; – предельное разрешение не хуже 0,5 нм	
pH-метр	ГОСТ 27987—88
Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования	ТУ 9452-002-33189998—2002
Весы лабораторные аналитические	ГОСТ 24104—2001

6.3.2. Стандартные образцы

До принятия ГСО рекомендуемые СО для выявления НЧ методом ПЭМ:
СО НЧ серебра Sigma-Aldrich, 730793 (или аналогичный)
СО НЧ оксида цинка, Sigma-Aldrich, 677450 (или аналогичный)
СО НЧ диоксида титана, Sigma-Aldrich, 718467 (или аналогичный)
До принятия ГСО рекомендуемые СО для построения градуировочной характеристики электронного микроскопа:
СО «astigmatism correction holey carbon film», ISO9001/9002
СО «magnification calibration diffraction grating replica», ISO9001/9002

СО «diffraction standard evaporated aluminum», ISO9001/9002	
СО для поверки разрешающей способности электронных микроскопов: – кристаллы фталоцианина меди; – графитизированный углерод; – ориентированные кристаллы золота; – кристаллы асбеста-крокидолита	

6.4. Вспомогательное оборудование

Холодильник бытовой электрический	ГОСТ 26678—85
Центрифуга лабораторная	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс»	
Электрошкаф сушильный лабораторный с погрешностью поддержания температуры ± 2,5 в интервале от 50 до 350 °С	ТУ 16-531.639

6.5. Расходные материалы

Сетки для электронной микроскопии с формварровым покрытием, стабилизированным углеродом	
Наконечники к дозаторам пластиковые 1—200 мм^3	
Пробирки лабораторные пластиковые	
Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3—88
Пластиковые контейнеры для хранения сеток	

6.6. Реактивы

Толуол	ГОСТ 5789—78
Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый	ГОСТ 5964—93

6.7. Требования к квалификации оператора ПЭМ

Измерения производятся квалифицированным персоналом, в обязательном порядке ознакомленным с настоящими рекомендациями, а также изучившим правила техники безопасности и действующие нормативные документы для работы с продукцией, содержащей НЧ. Лица, осуществляющие измерения, должны иметь опыт работы с просвечивающими электронными микроскопами.

6.8. Принцип метода ПЭМ

В основе метода ПЭМ лежит упругое рассеяние пучка электронов при взаимодействии с исследуемым объектом. Изображение формируется потоком рассеянных электронов с энергией 50—200 кэВ, прошедших через находящийся на подложке образец, и при помощи системы магнитных линз проецируется на матрицу ПЗС-камеры, люминесцентный экран или фотопластинку.

Для идентификации НЧ может использоваться дифракция электронов в выбранной области (рекомендуется для идентификации НЧ серебра). В режиме дифракции электронов результатом измерений является электронограмма, содержащая отдельные рефлексы на монокристаллическом образце или концентрические кольца на поликристаллическом образце.

6.9. Построение градуировочной характеристики электронного микроскопа

6.9.1. Ежедневно после включения микроскопа проверяются и корректируются (при необходимости) следующие настройки:

• настройка катода и наклон источника освещения.

Оптимальный режим накала устанавливается по изображению катода на люминесцентном экране ПЭМ, а именно – по изображению кроссовера. Нарушение ориентировки пушки устраняется путём изменения её угла наклона (в соответствии с инструкцией к конкретному прибору);

• настройка конденсорной диафрагмы.

При сведении (фокусировке) и разведении (дефокусировке) луча на люминесцентном экране освещённая область должна симметрично приближаться к центру (при фокусировке) или к краям экрана (при дефокусировке);

• коррекция астигматизма конденсорной линзы (астигматизма пятна).

При сведении луча освещённое пятно на экране должно иметь форму круга, а не эллипса;

• настройка объективной диафрагмы.

Объективная диафрагма должна быть отцентрирована. Следует отметить, что срок службы объективных диафрагм в среднем составляет около 3 лет, после чего их следует заменять. Старые загрязнённые диафрагмы могу стать причиной ухудшения качества изображения;

• коррекция астигматизма проекционной линзы.

Проверяется и настраивается в режиме дифракции по форме каустики. Кроме того, одним из признаков появления астигматизма является смещение изображения в стороны при настройке фокуса (при скорректированном астигматизме оно может лишь вращаться вокруг центральной оси).

6.9.2. Раз в неделю, а также при возникновении подозрения на нарушение коррекции астигматизма проверяется и корректируется:

• коррекция астигматизма объективной линзы.

Проверка и коррекция проводится с помощью тест-образца, имеющего неоднородности с чёткими краями (рекомендуется использовать углеродную пленку с дырочками), по симметричности (должны быть симметричны) полос Френеля, формирующихся на краях неоднородностей (на краях дырочек в углеродной пленке), при фокусировке и дефокусировке изображения (выполняется путем дефокусировки линз объектива). Возникновение такого астигматизма может быть связано с загрязнением электронной оптики. До принятия ГСО для коррекции астигматизма рекомендуется использовать образец «astigmatism correction holey carbon film», который соответствует стандарту ISO 9001/9002.

Детальные инструкции по проверке и коррекции перечисленных выше настроек приведены в инструкциях к конкретным электронным микроскопам. Неправильные настройки и нескорректированный астигматизм линз приводят к ухудшению качества изображения.

6.9.3. Не реже 1 раза в месяц проверяется правильность настройки микроскопа, включая следующие параметры: разрешающая способность микроскопа, калибровка масштаба изображения на ПЗС-камере при различных коэффициентах увеличения (в первую очередь в рабочем диапазоне увеличений). Выбираются ускоряющее напряжение и параметры линз объектива, при которых будут проводиться измерения дифракции электронов, при этих параметрах измеряется дифракция электронов от стандартного образца и при необходимости определяется специальный коэффициент, обеспечивающий пересчет диаметров окружностей на дифракционной картине в межплоскостные расстояния кристаллической решетки для анализируемых образцов. Для проверки перечисленных параметров используются соответствующие стандартные образцы. Поверка осуществляется в соответствии с документацией производителя электронного микроскопа и действующими стандартными операционными процедурами.

Разрешающая способность проверяется путем получения изображений от кристаллов, в которых должны быть видны (разрешены) плоскости кристаллической решетки. В зависимости от предельной разрешающей способности микроскопа в качестве стандартных рекомендуется использовать следующие образцы: кристаллы асбеста-крокидолита (межплоскостные расстояния 0,903 и 0,452 нм*), кристаллы фталоцианина меди (межплоскостные расстояния 1,03 нм), графитизированный

* Опасен для здоровья – использовать с осторожностью.

углерод (межплоскостные расстояния 0,34 нм), ориентированные кристаллы золота (межплоскостные расстояния 0,204, 0,143 и 0,102 нм). Перечисленные образцы рекомендуется применять до принятия ГОСТа, регламентирующего ГСО для поверки разрешающей способности электронных микроскопов.

Для калибровки линейных размеров при измерениях с помощью электронных микроскопов используется электронно-прозрачный стандартный образец с регулярными неоднородностями, расстояние между которыми известно (например, реплики дифракционных решеток с известным расстоянием между штрихами). Калибровку производят, получая изображения реплики дифракционной решетки при различных значениях увеличения микроскопа (Г), используемых в анализе НЧ и фиксированной дискретности оцифровки изображений (фиксированный размер цифрового изображения X × Y в пикселах). По полученным цифровым изображениям выбирают два крайних штриха (крайний левый и крайний правый или крайний верхний и крайний нижний в зависимости от ориентации решетки), подсчитывают число промежутков между этими штрихами на изображении (n) и число пикселов цифрового изображения, соответствующих расстоянию между крайними штрихами (p). Масштаб (M) цифрового изображения при неизменных параметрах Г и X × Y рассчитывают в единицах нм/пиксел по формуле:

$$M(Г, X \times Y) = n \times l/p, \text{ где}$$

l – это известное (стандартное) расстояние между штрихами решетки в нм.

Масштабирование выполняют для фиксированного набора увеличений микроскопа Г и фиксированного размера цифрового изображения X × Y. В дальнейшем при анализе НЧ регистрацию изображений выполняют только при тех значениях Г и X × Y, при которых проведена калибровка масштаба М.

Для проведения калибровки увеличения микроскопа и масштабирования цифровых изображений могут быть использованы специальные программные опции, предусмотренные в программном обеспечении к электронному микроскопу. Эти опции облегчают проведение калибровки и обеспечивают автоматическое введение масштаба или масштабных меток в цифровые изображения.

До принятия ГСО для калибровки линейных размеров при измерениях с помощью электронных микроскопов рекомендуется применять следующий образец, соответствующий стандарту ISO 9001/9002: «magnification calibration diffraction grating replica».

6.9.4. Для более точного определения размеров НЧ рекомендуется:

• анализ исследуемых образцов выполнять при том же значении тока объективной линзы, при котором выполнялась калибровка увеличения и масштаба с применением стандартного образца;

• обеспечить одинаковое положение образцов (стандартного и анализируемых) в держателе образцов, а также одинаковое положение держателя в приборе;

• обеспечить одинаковую ориентацию образцов (стандартного и анализируемых) в держателе, т. е. всегда либо подложкой вверх, либо подложкой вниз.

• не использовать искривлённые сеточки и бленды.

При выборе и контроле параметров для проведения измерений дифракции электронов применяется стандартный поликристаллический образец, для которого известны межплоскостные расстояния кристаллической решетки. С использованием этого образца контролируется стабильность параметров, влияющих на точность и воспроизводимость дифракционного анализа, таких как токи линз, значение напряжения и расстояние от образца в держателе до матрицы ПЗС. На основе дифракционной картины, измеренной от стандартного образца, определяют и корректируют специальный коэффициент, с помощью которого возможен пересчет диаметров окружностей на дифракционной картине в межплоскостные расстояния кристаллической решетки для анализируемых образцов.

До принятия ГСО для контроля параметров микроскопа при дифракции электронов рекомендуется применять следующий образец, соответствующий стандарту ISO 9001/9002: «diffraction standard evaporated aluminum».

6.9.5. Внеплановые проверки качества настройки электронного микроскопа.

Внеплановая проверка качества настройки электронного микроскопа проводится, если в процессе измерений выявляются артефакты, которые, по мнению оператора, могут быть связаны с разъюстировкой микроскопа. Если очередная или внеочередная проверка выявила существенную разъюстировку микроскопа по одному или нескольким из перечисленных выше параметров, то определение НЧ в образцах проводиться не может до устранения неисправности квалифицированным персоналом.

6.10. Подготовка СО НЧ

Для подготовки СО используются коммерческие коллоидные растворы НЧ с ПАВ (Арговит или аналогичный), коммерческие растворы НЧ в воде, либо НЧ в сухом порошкообразном виде. В случае порошкообразных образцов, готовится их водный раствор с рабочей концентрацией ~0,1—1 мг/см^3.

6.11. Подготовка проб к измерениям

6.11.1. Пробы, являющиеся суспензией НЧ с ПАВ, можно наносить на сетку без предварительной подготовки. В случае если ожидаемая концентрация НЧ в суспензии велика (более 1 мг/см^3), допускается разведение суспензии дистиллированной водой до рабочей концентрации.

6.11.2. Пробы, не являющиеся суспензией (крем, жидкое мыло, твердая косметика и др.), растворяют в 96 % этаноле в соотношении 1 : 1 по объему при встряхивании на вибрационном встряхивателе в течение 1—2 мин.

6.11.3. Подготовленный образец центрифугируют в настольной центрифуге при 16 000 об./мин в течение 2 мин.

6.11.4. 3 мм^3 надосадочной жидкости наносят на медную сетку, покрытую углеродной или формваровой подложкой, и высушивают на воздухе в течение 1 мин.

6.11.5. Осадок (при его наличии) растворяют в объеме толуола, равном объему использованного этанола, последовательно применяя процедуры, описанные в п.п. 6.11.2—6.11.4.

6.11.6. Подготовленный раствор НЧ наносят на медную сетку, покрытую углеродной или формваровой подложкой, в количестве 3 мм^3.

6.11.7. Сетку высушивают на воздухе в течение 1 мин, закрывая от пыли.

6.11.8. Сетки с нанесенными образцами готовы к исследованиям методом ПЭМ.

6.12. Хранение готовых образцов

Готовые образцы (сетки) хранят в специальных пластиковых контейнерах в сухом темном месте не более месяца.

6.13. Порядок проведения измерений

6.13.1. Анализ образцов проводится для трех подготовленных сеток с образцами, нанесенными из одной и той же пробы. Чтобы удостовериться в отсутствии контаминации бленды или сеточки посторонними НЧ, можно использовать чистую бленду или сеточку с углеродным или формваровым покрытием. В качестве контроля применяют СО с известным содержанием НЧ (п. 6.10).

6.13.2. Для проведения измерений помещают сетку в колонну электронного микроскопа при ускоряющем напряжении 80—120 кВ.

6.13.3. После настройки микроскопа (п.п. 6.9.1—6.9.3) в режиме просвечивающей электронной микроскопии проводится предварительный просмотр СО с небольшим увеличением (около 2 500 ×) для оценки однородности распределения НЧ по образцу.

6.13.4. Области скопления НЧ подвергаются анализу при увеличении 50 000—100 000 ×. С разных участков образца в пределах каждой обнаруженной области снимается 3—5 изображений, в которых должны быть представлены основные (по форме, размеру) типы обнаруженных НЧ.

6.13.5. Измерение изображений в режиме ПЭМ дополняется (для НЧ серебра) измерениями в режиме дифракции электронов. Цель измерений в режимах дифракции электронов – получение данных для идентификации электронно-контрастного материала и обоснованного отнесения его к определяемым НЧ.

6.13.6. После измерений областей неоднородного скопления электронно-контрастного материала, а также в случае их отсутствия оператор намечает линию, проходящую через весь образец, и вдоль этой линии измеряет 30 равномерно отстоящих друг от друга изображений в режиме ПЭМ. При увеличении 50 000 расстояние между регистрируемыми изображениями составляет 10—30 полей зрения. Количество пропускаемых полей зрения меняется прямо пропорционально используемому увеличению: при увеличении 100 000 пропускается 20—60 полей зрения; при увеличении 10 000 пропускается 2—6 полей зрения. Если в образце обнаружены области неоднородного скопления электронно-контрастного материала, то линия, вдоль которой измеряются изображения, по возможности должна пройти мимо этих областей. Для подсчета пропускаемых полей рекомендуется использовать дефекты подложки или неоднородности образца, контролируя по ним перемещение образца. Если в поле зрения, от которого предполагается регистрировать изображение, НЧ отсутствуют, то записывать изображение в файл не следует, однако количество таких полей зрения должно быть посчитано и учтено при анализе плотности и однородности распределения НЧ по образцу.

6.13.7. Изображения НЧ необходимо сохранять в файл, обращая внимание на то, чтобы на изображениях была масштабная метка. По окончании измерений следует конвертировать файлы с полученными изображениями из внутреннего формата программного обеспечения к прибору в форматы jpeg или tif (8-битном).

6.14. Порядок обработки данных

6.14.1. Полученные изображения должны быть обработаны в программе для обработки микроскопических изображений (например, свободно распространяемая программа ImageJ или другие с аналогичными характеристиками).

6.14.2. По полученным изображениям вычисляется среднее число частиц, приходящихся на единицу площади образца. Для этого для каж-

дого из имеющихся кадров вычисляется количество НЧ, приходящееся на единицу площади. К полученной выборке добавляются пустые поля зрения, если они были обнаружены на образце. По полученной выборке вычисляется среднее количество НЧ, приходящееся на единицу площади, и среднее квадратичное отклонение этой величины.

6.14.3. По полученным изображениям вычисляется средний размер частиц. Для этого используются те изображения, на которых увеличение микроскопа максимально. Если общее число частиц на всех полученных изображениях менее или равно 100, то они все должны быть включены в выборку, которая будет обрабатываться. Если общее число НЧ на всех полученных изображениях более 100, то следует выбрать те изображения, на которых НЧ видны наиболее контрастно. По полученным результатам строится гистограмма распределения НЧ по размерам, проверяется ее нормальное (гауссовское) распределение (рекомендации по выбору критериев проверки описаны в ГОСТ 8.207—76), вычисляется средний размер и среднее квадратичное отклонение. Возможно использовать специальные функции для обработки изображений, которые позволяют автоматизировать вычисления.

6.14.4. Для характеристики формы НЧ используется один из двух подходов:

• для каждой НЧ, входящей в выборку, вычисляются максимальный и минимальный размер, анализируется их отношение – форм-фактор;

• для каждой НЧ вычисляется циркулярность $4\pi\frac{S}{p^2}$, где S – площадь, а p – периметр НЧ.

По форм-фактору (или по циркулярности) должна быть построена гистограмма распределения, вычислено среднее и среднее квадратичное отклонение.

Если была получена электронограмма от НЧ в исследуемом образце, то ее необходимо сравнить с эталонной электронограммой от СО путем наложения.

6.15. Порядок составления отчета

По результатам анализа готовится письменный отчет о наличии или отсутствии НЧ в образце. Если НЧ были обнаружены, то должны быть предоставлены:

• характерные изображения НЧ в образце, полученные методом ПЭМ;

• для однородных образцов представляется среднее число НЧ, приходящееся на единицу площади, и среднее квадратичное отклонение этой величины; данные заносятся в таблицу (пример: табл. 2);

Таблица 2

Показатель	Стандартный образец	Исследуемый образец
Среднее число НЧ на единице площади (± среднее квадратичное отклонение)		
Средний размер НЧ (± среднее квадратичное отклонение)		

• строится гистограмма распределения НЧ по размерам, средний размер, его среднее квадратичное отклонение, а также сопоставление с соответствующими данными для СО;

• если была снята картина дифракции электронов, то должен быть представлен результат ее сопоставления с электронограммой СО.

VII. Наночастицы оксида титана и оксида цинка. Порядок выявления и определения содержания методом сканирующей электронной микроскопии с применением рентгеновского микроанализа

7.1. Область применения

Настоящая методика применяется для качественной идентификации и количественного определения содержания НЧ в парфюмерно-косметических средствах.

7.2. Ограничения методики

7.2.1. Минимальная рабочая концентрация НЧ оксидов цинка и титана для определения методом СЭМ (РМА) – 0,02 % по весу.

7.2.2. Идентификация НЧ серебра этим методом не рекомендуется из-за недостаточной чувствительности метода.

7.3. Средства измерения

7.3.1. Оборудование

Сканирующий электронный микроскоп FEI Quanta или эквивалентный, поддерживающий режим РМА при ускоряющем напряжении не более 25 кВ

Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования	ТУ 9452-002-33189998—2002
Весы лабораторные аналитические	ГОСТ 24104—2001

7.3.2. Стандартные образцы

До принятия ГСО рекомендуемые СО для выявления НЧ методом СЭМ:
СО НЧ оксида цинка, Sigma-Aldrich, 677450 (или аналогичный)
СО НЧ диоксида титана, Sigma-Aldrich, 718467 (или аналогичный)

7.4. Вспомогательное оборудование

Термостат	ТУ 64-1-1382—72
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс»	
Прибор для напыления пленок углерода в вакууме	
Прободержатель с лунками, объемом 20 мм^3 (рис. 1)	

7.5. Расходные материалы

Углеродный двухсторонний скотч	
Наконечники к дозаторам пластиковые 1—200 мм^3	
Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3—88
Пробирки лабораторные пластиковые	

7.6 Реактивы

Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый	ГОСТ 18300—87
Толуол	ГОСТ 5789—78

7.7. Требования к квалификации оператора СЭМ

Измерения производятся квалифицированным персоналом, в обязательном порядке ознакомленным с настоящими рекомендациями, а также изучившим правила техники безопасности и действующие нормативные документы для работы с продукцией, содержащей НЧ. Лица, осуществляющие измерения, должны иметь опыт работы со сканирующими (растровыми) электронными микроскопами.

7.8. Принцип метода РМА

РМА – метод, позволяющий регистрировать химический состав изучаемого объекта. Он используется в металлургии, кристаллографии, а также в биологических исследованиях для изучения элементарного состава тканей, клеток и субклеточных структур.

Регистрация и спектрометрия характеристического рентгеновского излучения, испускаемого атомами вещества объекта, возбужденными электронной бомбардировкой, дает информацию об элементном составе поверхностного слоя и может использоваться для проведения локального элементного анализа. Поскольку энергия рентгеновских фотонов квантована и каждый химический элемент имеет присущий только ему рентгеновский спектр, использование этого метода позволяет с высокой точностью и локальностью порядка 1 мкм анализировать состав микроструктур.

7.9. Построение градуировочной характеристики микроскопа

Калибровка микроскопа проводится не реже 1 раза в месяц в соответствии с ГОСТ Р 8.636—2007 ГСИ.

7.10. Подготовка СО НЧ

Приготавливают растворы СО TiO_2 (10 % по весу) и ZnO (10 % по весу). Для приготовления калибровочных образцов растворы СО разводят дистиллированной водой последовательно в 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 и 512 раз, 20 $мм^3$ полученной суспензии наносят на двухсторонний углеродный скотч в виде капли диаметром около 4 мм. Далее с приготовленных образцов для построения калибровочной кривой снимают элементные спектры на СЭМ в режиме РМА при ускоряющем напряжении 25 кВ. Сканирование проводят по площади 1 $мм^2$. Обрабатывают не менее трех площадей для каждой концентрации НЧ. Строят калибровочную кривую зависимости концентрации НЧ от высоты пиков сигнала, соответствующих титану либо цинку.

7.11. Подготовка проб к измерениям

7.11.1. Твердые образцы наносятся на столик для СЭМ, покрытый углеродным скотчем, жидкие или пастообразные образцы без разведения или в лунки специально сконструированного металлического прободержателя, изготовленного из дюралюминия (рис. 1).

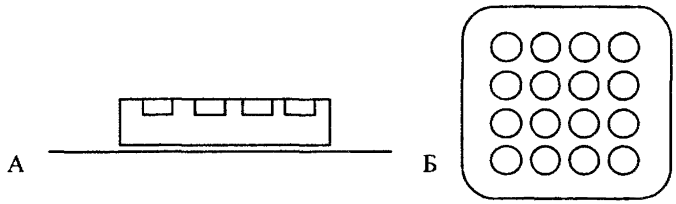

Рис. 1. Прободержатель с известным объемом лунок: (А) вид сбоку; (Б) вид сверху

Столики и лунки прободержателя маркируют с обратной стороны номерами, соответствующими номерам образцов.

7.11.2. Столик для СЭМ или прободержатель с нанесенным образцом помещается в термостат при 50 °С на не менее чем 12 ч.

7.11.3. После высыхания образец покрывают тонким слоем углерода. Напыление производят с помощью прибора для напыления пленок углерода в вакууме (например, Emitech K950X, Великобритания, или аналогичном). Напыление производят в вакууме (не выше 4—10 мБар) в течение 10—20 с.

7.11.4. Приготовленный таким способом образец может быть исследован на сканирующем электронном микроскопе в режиме РМА.

7.12. Хранение готовых образцов

Образцы хранят в сухом месте, закрывая от пыли, не более месяца.

7.13. Порядок проведения измерений

Приготовленные образцы исследуют на СЭМ в режиме РМА при ускоряющем напряжении 25 кВ. Сканирование проводят по площади 1 мм^2. Обрабатывают не менее пяти площадей на одном образце.

7.14. Порядок обработки данных

Оценку концентрации НЧ методом РМА проводят с использованием калибровочных кривых зависимости концентрации НЧ от высоты пиков сигнала для TiO_2 или ZnO.

7.15. Порядок составления отчета

По результатам анализа готовится отчет о наличии или отсутствии НЧ оксидов титана и цинка в образце. Если НЧ оксидов титана или цинка были обнаружены, то должны быть предоставлены:

- дата проведения измерений, марка прибора;

• элементный спектр раствора TiO_2/ZnO (стандартный образец) и TiO_2/ZnO в исследуемой продукции;

• калибровочная кривая, построенная по стандартному образцу;

• концентрации НЧ, рассчитанные по калибровочной кривой, представленные в виде таблицы (табл. 3).

Таблица 3

Наименование исследуемого образца	Номер пробы исследуемого образца	Концентрация НЧ в пробах образца, % по весу	Средняя концентрация НЧ в образце ± среднее квадратичное отклонение, % по весу	Погрешность определения концентрации НЧ, %
		x_i	$\overline{x} \pm S$	$\delta = \frac{\Delta \overline{x}_i}{\overline{x}_i} \cdot 100$

VIII. Наночастицы серебра. Порядок выявления методом атомно-силовой микроскопии

8.1. Область применения

Настоящие рекомендации применяются для подготовки проб и определения содержания НЧ серебра в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств в суспензиях при концентрации серебра 0,01—1 мг/см^3 и низкой концентрации ПАВ (минимум в 10 раз меньше).

8.2. Ограничения методики

Методика применима для определения НЧ серебра в растворах с минимальной концентрацией 0,01 мг/см^3. Методика не применима для образцов с повышенной вязкостью (кремы, пасты). Минимальный определяемый линейный размер НЧ – не менее 5 нм.

8.3. Средства измерения

8.3.1. Оборудование

Атомно-силовой микроскоп, поверенный аккредитованными на это организациями в установленном порядке.

Используемые атомно-силовые микроскопы должны удовлетворять следующим требованиям:

• прибор должен иметь возможность работы в контактном и полуконтактном режимах. Для упрощения процедуры настройки параметров сканирования должны быть предусмотрены возможности проведения

силовой спектроскопии (в контактном режиме) и фазовой спектроскопии (в полуконтактном режиме);

• предельный размер исследуемого образца должен быть не менее 5 мм вдоль каждого измерения;

• атомно-силовой микроскоп должен быть оснащен пьезосканером с полем не менее 20 × 20 мкм и желательно иметь емкостные датчики для коррекции нелинейности и гистерезиса сканера;

• желательно, чтобы атомно-силовой микроскоп имел систему позиционирования образца с минимальным перемещением 2—5 мкм и диапазоном перемещений не менее 5 × 5 мм. Эта система может быть моторизована;

• должна быть возможность использования стандартных кантилеверов с размером чипа 3,4 × 1,6 × 0,3 мм;

• уровень шумов прибора (среднеквадратичное отклонение сигнала в полосе до 1 кГц) должен быть не более 0,07 нм по вертикальной оси и не более 0,3 нм в плоскости образца, нелинейность сканера не более 0,1 %.

Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования — ТУ 9452-002-33189998—2002

8.3.2. Стандартные образцы

До принятия ГСО рекомендуемые СО для выявления НЧ методом АСМ:

СО НЧ серебра (Арговит) или аналогичный — ТУ 9310-13-00008064—00

8.4. Вспомогательное оборудование

Холодильник бытовой электрический — ГОСТ 26678—85

Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс»

Центрифуга лабораторная

8.5. Расходные материалы

Пробирки лабораторные пластиковые

Перчатки хирургические резиновые — ГОСТ 3—88

Наконечники к дозаторам пластиковые 1—200 $мм^3$

Кантилеверы для проведения измерений в полуконтактном режиме с радиусом кривизны не более 10 нм и жесткостью не более 20 Н/м

Фильтровальная бумага

Стерильные чашки Петри диаметром 60 мм или более

8.6. Реактивы

Толуол	ГОСТ 5789—78
Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый	ГОСТ 18300—87
Газообразный азот*	ГОСТ 9293—74
Газообразный аргон	ГОСТ 10157—79
Полилизин с молекулярной массой 30—70 кДа Sigma P2636 (или аналогичный)	

8.7. Требования к квалификации оператора АСМ

Измерения должны производиться квалифицированным персоналом, ознакомленным с настоящими рекомендациями, а также изучившим правила техники безопасности и действующие нормативные документы для работы с продукцией, содержащей НЧ. Лица, осуществляющие выполнение измерений, должны иметь опыт работы со сканирующими атомно-силовыми микроскопами.

8.8. Построение градуировочной характеристики микроскопа

8.8.1. Калибровка и настройка АСМ

Калибровка и настройка АСМ производятся в соответствии с руководством пользователя к конкретному прибору.

8.8.2. Построение градуировочной характеристики

Настоящая методика является методикой полуколичественного анализа и позволяет определить концентрацию НЧ (их содержание) в образце по порядку величины. Для этого, после того как просканированы не менее 7 областей поверхности, необходимо вычислить среднюю поверхностную плотность НЧ (среднее число НЧ на единицу площади подложки) и оценить разброс значений (разность между максимальным и минимальным значениями) поверхностной плотности. Если образец приготовлен однородно и разброс значений поверхностной плотности составляет не более 20 % от среднего значения, то можно использовать значение средней поверхностной плотности для оценки концентрации НЧ в образце.

Пример градуировочной характеристики приведен в табл. 4 (в качестве поверхностной плотности НЧ используется число НЧ на площади 3×3 мкм^2).

---

* Газообразный азот может быть заменен газообразным аргоном или бытовыми баллончиками для бесконтактной сушки оптики.

Таблица 4

Среднее число наночастиц на площадке 3 × 3 мкм^2	Диапазон концентрации наночастиц, 10^{10} шт./см^3
<20	<15
20—100	15—60
100—350	60—280

8.9. Подготовка СО НЧ

Для построения калибровочной кривой готовят разведения СО НЧ серебра (ТУ 9310-13-00008064—00) дистиллированной водой в 10, 100 и 500 раз (можно также использовать и разведения на усмотрение оператора АСМ). Рассчитывают среднее число НЧ на площади 3 × 3 мкм^2. Строят зависимость среднего числа НЧ на площади от концентрации.

8.10. Подготовка проб к измерениям

8.10.1. Суспензию можно наносить на подложку из кремния, слюды или графита без предварительной подготовки. В случае если ожидаемая концентрация НЧ в суспензии велика (более 1 мг/см^3), допускается разведение суспензии дистиллированной водой до рабочей концентрации (~0,1—1 мг/см^3).

8.10.2. Каплю суспензии объемом 5—10 мм^3 наносят на подложку на 2 мин. Чтобы при нанесении НЧ образец не загрязнился пылью из воздуха, рекомендуется накрыть его чашкой Петри.

8.10.3. Каплю удаляют фильтровальной бумагой, при этом важно не касаться центральной области подложки, которая в дальнейшем будет исследована. Для этого подложку берут пинцетом, наклоняют, чтобы капля скатилась на ее край, и ребром подносят к краю фильтровальной бумаги, чтобы убрать каплю. После этого подложка не оказывается полностью сухой, но объем капли на ней зрительно уменьшается в 3—6 раз.

8.10.4. Подложку следует отмыть от плохо адсорбированного вещества. Для этого рекомендуется поступить следующим образом. На чистой чашке Петри приготовить две капли дистиллированной воды объемом 70—100 мм^3. Подложку обмакивают в каждую из капель на 2—5 с, после этого удаляют оставшуюся на поверхности воду фильтровальной бумагой.

8.10.5. Перед измерениями необходимо тщательно высушить образец. Для этого можно использовать поток сухого азота или аргона или же использовать баллончик со сжатым воздухом для бесконтактной чистки оптики.

8.10.6. Приготовленный таким способом образец может быть исследован с использованием АСМ.

8.11. Хранение готовых образцов

Хранят готовые образцы в специальных пластиковых контейнерах в сухом темном месте. Не рекомендуется хранить образцы дольше 5 суток.

8.12. Порядок проведения измерений

Включают прибор, устанавливают кантилевер для проведения измерений в полуконтактном режиме сканирования, выполняют настройку лазерно-оптической системы.

Приготовленный образец размещается в держателе прибора, осуществляется настройка на резонансную частоту кантилевера, подвод кантилевера к образцу.

Вначале осуществляется сканирование поля 10×10—30×30 мкм^2, чтобы оценить плотность распределения НЧ, затем при необходимости поле зрения сужается, чтобы более детально определить размер. Для измерения размера рекомендуется использовать изображения, на которых шаг сканирования такой, что на диаметре НЧ укладывается не менее 8 пикселей, т. е. частица вписана в площадку не менее 8×8 пикселей. Общее число НЧ для вычисления среднего размера должно быть не менее 50.

Должны быть исследованы не менее 7 случайно выбранных полей зрения на поверхности образца, удаленных друг от друга на 0,5—1 мм, чтобы доказать, что поверхность образца однородна.

8.13. Порядок обработки данных

Обработка изображений должна выполняться с использованием специализированных программ, поставляемых вместе с микроскопом. Для обработки изображений рекомендуется использовать следующие фильтры и операции:

- вычитание общего наклона;
- кадрирование изображения;
- усреднение по строкам;
- построение сечений.

Не рекомендуется использовать следующие фильтры и операции:

- Фурье-фильтрация;
- фильтры для уменьшения уровня шумов (медианная фильтрация, усреднение).

8.14. Порядок составления отчета

Отчет должен включать в себя:

- дату проведения измерений;
- марку прибора;
- параметры сканирования;

• минимум два типичных изображения, на изображениях должны быть горизонтальные шкалы; через типичную частицу должно быть проведено сечение, график этого сечения должен быть приведен;

• гистограмму распределения НЧ по размерам (за размер принимается высота НЧ над подложкой), средний размер, стандартное отклонение, оценку концентрации наночастиц.

IX. Фуллерены. Порядок выявления и определения содержания методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

9.1. Область применения

Настоящая методика применяется для подготовки проб и определения содержания НЧ фуллеренов С60 в составе продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств.

9.2. Ограничения методики

Методика применима при концентрации фуллеренов 1,5—1 × 10^3 нг/см^3.

9.3. Средства измерения

9.3.1 Оборудование

Система для ВЭЖХ, снабжённая аналитической колонкой, насосом высокого давления, УФ-детектором, петлевым инжектором, системой регистрации хроматограмм	
Хроматографическая колонка: силикагель, химически связанный с октадецилсиланом (ODS или С18), размер частиц 5 мкм, длина колонки 250 мм, внутренний диаметр колонки 4,6 мм или аналогичная	
Спектрофотометр ПЭ-5300В или аналогичный	
Весы лабораторные аналитические	ГОСТ 24104—2001
Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования	ТУ 9452-002-33189998—2002
Цилиндр мерный, вместимостью 100 см^3	ГОСТ 1770—74
Микрошприц «Hamilton», объём 25 мм^2	

9.3.2. Стандартные образцы

До принятия ГСО рекомендуемые СО для выявления НЧ методом ВЭЖХ:

Фуллерен С60 Sigma-Aldrigh, 572500
(или аналогичный)

9.4. Вспомогательное оборудование

Концентратор вакуумный лабораторный (роторный испаритель)
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс»
Центрифуга лабораторная
Ультразвуковая ванна
Вакуумный насос
Виалы тёмного стекла хроматографические (вместимостью 1—2 $см^3$) с герметично завинчивающейся крышкой
Кювета кварцевая для спектрофотометрии
Система вакуумной фильтрации растворителей

9.5. Расходные материалы

Перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3—88
Наконечники к дозаторам пластиковые 1—200 $мм^3$	
Защитная лабораторная пленка типа Parafilm «М»® или подобная	
Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками типа «Эппендорф» объемом 1,5 $см^3$	
Одноразовые фильтры для микрофильтрации, размер пор 0,2 мкм	
Одноразовые шприцы (полипропилен)	

9.6. Реактивы

Ацетонитрил квалификации осч или «для хроматографии»	
Деионизованная вода	ГОСТ 6709—79
Толуол квалификации осч или «для хроматографии»	ГОСТ 5789—78
Спирт этиловый	ГОСТ 18300—87

9.7. Требования к квалификации оператора ВЭЖХ

К выполнению измерений и обработке их результатов допускаются специалисты, имеющие высшее или специальное химическое образование, владеющие техникой проведения хроматографического и спектрофотометрического анализа, изучившие техническое описание измерительного прибора и настоящие рекомендации; прошедшие инструктаж по технике безопасности на рабочем месте и ознакомленные с правилами обслуживания хроматографа, имеющие опыт работы в лаборатории.

9.8. Построение градуировочной характеристики

9.8.1. Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (мм^2) от количества С60 (нг), устанавливают по 5 сериям стандартных растворов.

Строят стандартный график по методу наименьших квадратов (линейная регрессия) в координатах: количество фуллерена в образце (нг) (ось абсцисс) – площадь пика (мм^2) (ось ординат). Возможно использование встроенной программы обработки данных для построения стандартного графика. Коэффициент линейной корреляции должен быть не менее 0,995.

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводится при смене реактивов, используемых для анализа, освоении методики новым исполнителем, неудовлетворительных результатах контроля погрешности измерений. Контроль стабильности градуировочной характеристики проводится не реже одного раза в квартал или непосредственно перед проведением анализа, если анализ проводится реже, чем один раз в квартал. Для контроля используют стандартные растворы, приготовленные по п. 9.9.

9.8.2. Контроль погрешности измерений стандартных растворов.

Рассчитывают среднее значение результатов измерений содержания в стандартных растворах (нг):

$$\overline{C}_i = \frac{1}{n} \cdot \left(\sum_{i=1}^{n} C_i \right), \text{ где}$$

n – число измерений вещества в пробе стандартного раствора;

C_i – результат измерения содержания вещества компонента в i-й пробе стандартного раствора, нг.

Рассчитывают среднее квадратичное отклонение результата измерения содержания вещества в стандартном растворе:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (C_i - \overline{C}_i)^2}{n-1}}$$

Рассчитывают доверительный интервал:

$$\Delta \overline{C}_i = \frac{S}{\sqrt{n}} \cdot t, \text{ где}$$

t – коэффициент нормированных отклонений, определяемый по табл. Стьюдента, при доверительной вероятности 0,95.

Рассчитывают погрешность определения концентраций С60:

$$\delta = \frac{\Delta \bar{C}_i}{\bar{C}_i} \cdot 100\,\%$$

Величина погрешности δ не должна превосходить указанной в НТД к используемой системе для ВЭЖХ. Если данное условие не выполняется, то выясняют причину и повторяют измерения.

9.9. Подготовка СО НЧ

9.9.1. Исходный стандартный раствор С60.

Исходные стандартные растворы фуллерена С60 готовят следующим способом: навеску С60 массой 1 мг растворяют в 1 $см^3$ толуола. Для полного растворения навески фуллеренов плотно закрытую пробирку со стандартным раствором подвергают обработке в ультразвуковой ванне в течение 2 ч для получения раствора с концентрацией 1 $мг/см^3$. Точность навески и степень растворения стандарта С60 контролируют спектрофотометрически по поглощению на длине волны 328 нм (молярный коэффициент экстинкции 51238 $М^{-1} \cdot см^{-1}$).

9.9.2. Рабочие стандартные растворы С60.

Рабочие стандартные растворы С60 готовят последовательным разведением исходного стандартного раствора в 10 раз. Получают растворы с концентрациями 100 $мкг/см^3$, 10 $мкг/см^3$, 1 $мкг/см^3$, 100 $нг/см^3$, 10 $нг/см^3$. Для построения калибровочной характеристики используют все эти растворы, хотя рабочий диапазон методики 1,5—1 × 10^3 $нг/см^3$.

9.10. Подготовка проб к измерениям

Данная методика пробоподготовки применима как к жидким, так и к твердым образцам. Жидкие образцы можно подвергать экстракции в соответствии с п. 9.10.2 без предварительной подготовки, твердые образцы надо предварительно растворить в соответствии с п. 9.10.1.

9.10.1. В чистые пластиковые пробирки, содержащие исследуемый образец (около 1 г), добавляют 1 $см^3$ спирта, 1 ч обрабатывают в ультразвуковой ванне, затем центрифугируют 10 мин при 16 000 g. Надосадочную жидкость отбирают в чистую пластиковую пробирку, концентрируют до 100 $мм^3$, используя вакуумный лабораторный концентратор; осадок и сконцентрированную надосадочную жидкость объединяют.

9.10.2. Проводят экстракцию: к жидкому или растворенному твердому образцу добавляют по 1 $см^3$ толуола, обрабатывают в ультразвуковой ванне 1 ч, центрифугируют 10 мин при 16 000 g, фазу толуола отбирают. Проводят последовательно 4 повтора экстракции.

9.10.3. Порции экстрактов суммируют и высушивают в вакуумном концентраторе при 60 °С. Сухой остаток промывают этиловым спиртом, высушивают.

9.10.4. Сухой остаток растворяют в 100 мм^3 толуола, обрабатывают 1 ч в ультразвуковой ванне, переносят в стеклянную виалу объемом 1,5 см^3, 5 мм^3 пробы вносят в хроматограф.

9.11. Готовые образцы не хранят.

9.12. Порядок проведения измерений

9.12.1. Условия измерений.

Выполнение измерений на жидкостном хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору. Перед выполнением измерений проводят следующие работы: приготовление стандартных растворов НЧ, приготовление подвижной фазы, подготовку хроматографической системы, установление градуировочной характеристики, подготовку образцов к измерениям.

9.12.2. Приготовление элюента (подвижной фазы).

Смесь ацетонитрила и толуола в соотношении 40 : 60 по объёму готовят не менее чем за 1 ч до начала измерений.

9.12.3. Подготовка прибора.

Насос хроматографа заполняют подвижной фазой и пропускают через хроматографическую колонку объем подвижной фазы, равный не менее чем 10 объёмам хроматографической колонки, со скоростью 0,5 см^3/мин. Затем устанавливают рабочую скорость 0,1 см^3/мин и дополнительно пропускают объем подвижной фазы, равный 3 объёмам хроматографической колонки.

9.12.4. Выполнение измерений.

Пробы объёмом 5 мм^3 отбирают микрошприцем «Hamilton» и вводят вручную в колонку прибора с помощью петлевого инжектора (можно использовать автоматический инжектор, подключенный к автосэмплеру, при его наличии). Время выхода фуллерена С60 при элюации смесью ацетонитрил–толуол 40 : 60 со скоростью 1 см^3/мин для колонки ODS 250 × 4,6 мм (размер частиц сорбента 5 мкм, поры 30 нм) составляет ориентировочно 7 мин. Точное определение времени выхода производят по стандартным растворам при градуировке прибора.

9.13. Порядок обработки данных

Каждое определение концентрации фуллеренов в образце осуществляют минимум в трёх индивидуальных повторах, определяют выборочное среднее значение концентрации и стандартное отклонение.

9.14. Порядок составления отчета

Результаты измерений концентраций фуллерена С60 оформляют в виде: C (мг/м^3) ± δ % с указанием даты проведения анализа, места отбора пробы, названия лаборатории, юридического адреса организации, ответственного исполнителя и руководителя лаборатории.

Приложение 1
(рекомендуемое)

Типовая форма акта отбора проб продукции бытовой химии, дезинфекционных и парфюмерно-косметических средств

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

_____
(название организации, осуществляющей отбор проб)

адрес:
телефон:_____ факс:_____ электронная почта:_____

А К Т
отбора проб продукции

№ 00-00- /_____ от «____» _____ 20___г.
Город (район, населенный пункт)
Место отбора проб _____
_____
(наименование и адрес предприятия, хранилища (склада) или № транспортного средства, его местонахождение)

Мною (нами), _____
(указать должность, Ф.И.О.)
в присутствии _____
(указать должность, Ф.И.О.)
проведен осмотр _____
(указать наименование продукции)

Размер партии: _____, дата поступления _____,
(масса нетто или количество единиц)

Сопроводительные документы: (ненужное зачеркнуть)
Свидетельство о государственной регистрации № _____ от _____,
(указать, если имеется)
Декларация изготовителя о качестве и безопасности № _____ от _____,
(указать, если имеется)
Товарно-транспортная накладная № _____ от , _____
(указать, если имеется)

Продукция изготовлена _____
(страна происхождения, наименование изготовителя, дата изготовления)
_____,
срок годности _____
_____
_____
_____

Цель проведения лабораторных исследований продукции:

_____

Пробы отобраны в ___ч ___мин в количестве _____,
им присвоены номера _____
Пробы направляются в _____
(указать наименование лаборатории)
для _____

_____

_____
(указать перечень показателей и наночастиц (наноматериалов) по которым необходимо провести исследования)

Условия хранения проб:

_____

_____
(отметка об условиях хранения или обращения с продукцией)

Подпись представителя(ей), осуществлявших отбор проб:

_____ _____
(подпись) (Ф.И.О.)

_____ _____
(подпись) (Ф.И.О.)

Подпись ответственного лица производителя/поставщика продукции или его представителя:

_____ _____
(подпись) (Ф.И.О.)

Дата отправки проб _____, время: ____ ч ____мин.
Способ отправки (доставки) проб:

_____
Отметка о месте хранения контрольной пробы _____

_____

Настоящий акт составлен в трех экземплярах под одним номером и вручен (направлен):
– 1-й экземпляр предназначен для отправки в лабораторию;
– 2-й экземпляр – предоставлен производителю/поставщику продукции или его представителю;
– 3-й экземпляр – остается в организации, сотрудники которой производили отбор проб.

Приложение 2
(справочное)

Термины и определения

Контрольная проба – часть средней пробы, хранящаяся в лаборатории, проводящей исследования, или у владельца продукции и предназначенная для повторного или арбитражного исследования при классифицировании лота, партии как несоответствующего установленным требованиям или возникновении споров по результатам проведённых исследований.

Лабораторная проба – (конечная проба или репрезентативная часть конечной пробы) часть средней пробы, предназначенная для формирования тестового образца (образцов), направляемая на исследования в лабораторию с целью подтверждения соответствия контролируемого объекта установленным требованиям.

Лот – определённое количество продукции (товара), произведённой при одинаковых условиях.

Объединенная проба – совокупность идентичных, отобранных от однородной продукции, точечных проб, предназначенная для составления средней пробы. Объединённую (составную) пробу получают равномерным перемешиванием первичных проб (элементов) из лота расфасованных продуктов или смешивая первичные пробы (инкременты) из лота не расфасованных продуктов.

Отбор проб – процедура по выделению или составлению пробы, включающая не основанный на статистике случайный – эмпирический или точечный – отбор проб, используемая для принятия решения о соответствии лота продукции установленным требованиям.

Наночастица – объект с линейными размерами по крайней мере в одном измерении менее 100 нм.

Нормативные документы – государственные (национальные стандарты) (ГОСТ), методические рекомендации (МР), санитарные правила и нормы (СанПиН), устанавливающие нормы, правила, методы, в т. ч. по отбору, упаковке, доставке и хранению проб.

Партия – количество однородной продукции, изготовленной одним производителем в одинаковых условиях, оформленное одним сопроводительным документом и доставленное одновременно. Она может состоять из части лота или из набора нескольких лотов. Если партия является частью лота, каждая часть считается отдельным лотом для контроля. Если партия состоит из нескольких лотов, необходимо определить её однородность. Если партия неоднородна, то она делится на соот-

ветствующее количество однородных партий, от каждой из которых отбирают для исследования необходимое количество проб.

Проба (репрезентативная проба) – одна или несколько единиц (объёмов) вещества, отобранных установленными способами из совокупности (лота, партии), позволяющая получить информацию о заданной характеристике совокупности и являющаяся основой для принятия решения о совокупности, веществе или процессе их производства. Репрезентативная проба сохраняет характеристики лота, партии, из которого была выбрана. Её частным случаем является случай простой случайной пробы (точечная проба), когда у каждого элемента или части вещества есть равная вероятность попасть в пробу.

Средняя проба – часть объединенной пробы, предназначенная для проведения исследований – формирования лабораторной (проба А) и контрольной (проба Б) проб.

Стандартные образцы – вещества (материалы) с достаточно точно известными и официально удостоверенными значениями специфических для данного вещества (материала) параметров, которые количественно характеризуют свойства данного вещества (материала) и его технические параметры.

Схема отбора проб – процедура отбора проб, включающая в себя «переключение» (переход) от одного плана выборочного контроля (например, стандартного) к другому (например, более жёсткому).

Тестовый образец – часть лабораторной пробы, направляемой на исследования в контрольную лабораторию.

Точечная проба – некоторое минимальное количество вещества (продукции), отобранное из одного места за один прием от данной партии для составления объединенной пробы. В некоторых случаях отбора проб от однородной фасованной продукции, штучной продукции (рыба, птица и т. п.) точечная проба может выступать в качестве репрезентативной контрольной, лабораторной пробы.

gost.e-ecolog.ru