Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии

Методические рекомендации
МР 1.2.2639—10

Издание официальное

Москва • 2010

gost.e-ecolog.ru

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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии

Методические рекомендации
МР 1.2.2639—10

ББК 51.2
И88

И88 **Использование** методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.—82 с.

ISBN 978—5—7508—0944—8

1. Авторский коллектив: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г. Г. Онищенко, И. В. Брагина, А. А. Волков, Т. Ю. *Зависгяева*); *Учреждение Российской академии медицинских наук научно-*исследовательский институт питания РАМН (В. А.Тутельян, И. В. Гмошинский, С. А. Хотимченко, И. В. Аксенов, Е. А. Арианова, В. В. Бессонов, В. М. Верников, М. М. Гаппаров, Р. В. Распопов, О. И. Передеряев, О. Н. Тананова, В. В. Смирнова, А. А. Шумакова, К. И. Эллер); Учреждение Российской академии медицинских наук научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи РАМН (А. Л. Гинцбург, Б. С. Народицкий, И. Ю. Грибова, Н. А. Зигангирова, Д. Ю. Логунов Л. Н. Нестеренко, И. Л. Тутыхина, А. И. Тухватулин, М. М. Шмаров, Д. В. Щебляков); Государственное учебно-научное учреждение Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан, А. П. Бонарцев, А. В. Феофанов, Д. В. Багров, В. В. Воинова, А. П. Босхомджиев, А. С. Шебанова, А. С. Китаев, М. Е. Бозлаганян, О. М. Ковалева, Ф. С. Орехов, О. В. Самсонова, Е. А. Смирнова); Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (И. А. Дятлов, В. П. Холоденко, М. В. Храмов, В. Н. Герасимов, В. В. Фирстова, В. А. Чугунов, Е. Н. Кобзев); Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана Роспотребнадзора (А. И. Потапов, В. Н. Ракитский, А. В. Тулакин, Т. В. Юдина, Л. А. Луценко, Т. К. Татянюк, Г. В. Цыплакова, Л. П. Терешкова, О. В. Жигайло, Н. С. Белоедова, К. Б. Лохин, Н. И. Николаева, И. П. Громова, Е. В. Сарафанюк); Учреждение Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН (К. Г. Скрябин, О. А. Зейналов, Н. В. Равин, С. П. Комбарова); Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН (В. О. Попов, Б. Б. Дзантиев, А. В. Жердев, Н. В. Голуб); Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (Д. С. Павлов, Ю. Ю. Дгебуадзе, Е. С. Бродский, Е. Ю. Крысанов, Т. Б. Демидова, А. В. Купцов); Федеральное государственное унитарное предприятие «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (ФГУП ВНИИМС) (С. А Кононогов, С. С. Голубев); ООО «Интерлаб» (А. Н. Веденин, Г. В. Казыдуб).

2. Разработаны в рамках реализации Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008—2010 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 24 мая 2010 г.

4. Введены в действие с 24 мая 2010 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2010
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010

Содержание

1. Область применения 6
2. Введение 7
3. Общие положения 8
4. Перечень объектов окружающей среды, в которых осуществляется количественное определение наноматериалов в ходе проведения контрольных мероприятий 11
5. Перечень и порядок идентификации приоритетных наноматериалов, подлежащих контролю на предприятиях наноиндустрии 16
6. Порядок электронно-микроскопического выявления и идентификации наночастиц и наноматериалов 20
6.1. Требования к используемой аппаратуре 20
6.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению 25
6.3. Порядок выявления наночастиц в образцах методом просвечивающей электронной микроскопии 27
6.4. Выбор оптимального метода пробоподготовки, электронно-микроскопической визуализации и дополнительных опций 28
6.4.1. Воздушные системы окружающей среды 28
6.4.2. Средства бытовой химии, косметические средства и пищевые продукты в порошкообразной и жидкой формах 30
6.4.3. Средства бытовой химии, косметические средства и пищевые продукты в твердой форме 32
6.4.4. Электронно-микроскопическое выявление и идентификация наночастиц в клетках, тканях и органах животных и растительных организмов 35
6.4.5. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в воде природных и искусственных водоёмов 43
6.4.6. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в сточных и грунтовых водах 45
6.4.7. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в тонкой структуре образцов почвы, грунта, донных отложений 51
6.4.8. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в тонкой структуре природных биопленок 57

7. Порядок применения атомно-эмиссионной спектрофотометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой при количественном определении наноматериалов 60
7.1. Перечень индикаторных химических элементов для различных типов искусственных наноматериалов 60
7.2. Требования к используемой аппаратуре 62
7.3. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению 62
7.4. Выбор оптимального метода пробоподготовки 62
7.5. Выбор оптимального режима работы аппаратуры 62
7.6. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования 63
8. Порядок анализа углеродсодержащих наноматериалов (фуллерены) методом ВЭЖХ 64
8.1. Требования к используемой аппаратуре 64
8.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению 64
8.3. Требования к помещениям 64
8.4. Выбор оптимального режима работы аппаратуры 65
8.5. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования 65
9. Порядок анализа биогенных наноматериалов методами ПЦР, электрофореза и иммуноферментного анализа 66
9.1. Требования к используемой аппаратуре 66
9.1.1 Требования к амплификаторам для проведения реакции ПЦР 66
9.1.2. Требования к амплификаторам для проведения реакции ПЦР в реальном времени 67
9.1.3. Требования к фотометрическим счетчикам для проведения иммуноферментного анализа 67
9.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению 68
9.2.1. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению для проведения анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР 68
9.2.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению для проведения анализа биогенных наноматериалов методом иммуноферментного анализа 72

9.3. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования 73
10. Порядок анализа биогенных наноматериалов на основе корового белка вируса гепатита В 74
10.1. Требования к используемой аппаратуре 74
10.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению 74
10.3. Выбор оптимального режима работы аппаратуры 77
10.4. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования 77
10.4.1. Иммуноферментный анализ (ИФА) 77
10.4.2. Денатурирующий белковый электрофорез в полиакриламидном геле 78
Приложение 1. Наименование и краткие характеристики аппаратуры, используемой при контроле содержания наноматериалов методом электронной микроскопии 79
Приложение 2. Список использованных сокращений 82

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 мая 2010 г.

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии

Методические рекомендации МР 1.2.2639—10

1. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации определяют применение методов качественного и количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии в ходе гигиенического контроля за содержанием наноматериалов и наночастиц в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе, сточных водах, живых организмах – компонентах природных экосистем.

1.2. Настоящие методические рекомендации применяются при мониторинге процессов производства, оборота, использования и утилизации наноматериалов в целях принятия решений по оценке рисков.

1.3. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации имеющихся методов и средств качественного и количественного анализа наночастиц в ходе контроля за содержанием наноматериалов искусственного происхождения в природных объектах.

1.4. Методические рекомендации предназначены для специалистов учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-исследовательских организаций гигиенического профиля и медицинских учебных заведений,

предприятий наноиндустрии, а также иных организаций и учреждений, проводящих исследования по изучению содержания наноматериалов.

2. Введение

Контроль и надзор за производством, оборотом, использованием и утилизацией наноматериалов, гигиеническое нормирование содержания искусственных наночастиц в объектах окружающей среды требует наличия методов, позволяющих осуществлять выявление, идентификацию и количественное определение наночастиц искусственного происхождения в объектах окружающей среды (воздух, почва, вода, организмы животных и растений – компоненты биоты, сельскохозяйственное сырьё, пищевые продукты). В числе методов, существующих в настоящее время, наиболее разработанным и надёжным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму частиц электронно-плотных веществ в диапазоне размеров 1—100 нм в составе сложных многокомпонентных, многофазных матриксов, какими являются объекты природного происхождения, такие как биологические ткани и отдельные клетки. С помощью дополнительных опций дифракции электронов в выбранной области и спектров характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ) можно установить наличие у наночастиц кристаллической структуры и определённого химического состава, что является ценной дополнительной информацией для их идентификации.

Электронная микроскопия позволяет приближённо установить число наночастиц определенного вида в единице объёма или массы анализируемой продукции. Однако точные количественные данные о содержании наночастиц, необходимые для выполнения задач их гигиенического нормирования, с помощью метода электронной микроскопии в общем случае получить не представляется возможным. После того как наночастицы определённого химического состава идентифицированы в образце, их количественный анализ производится с использованием метода атомно-эмиссионной спектрофотометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. При этом анализируется содержание определённых химических элементов, являющихся маркёрными для наночастиц данного класса. По их содержанию в образце с учётом сведений химического и фазового состава наноматериала, плотности частиц, их распределения по размерам можно определить собственно массу, число и суммарную площадь поверхности частиц в единице образца, что

позволяет перейти собственно к задаче гигиенического нормирования наноматериалов.

В случае фуллеренов, являющихся наночастицами сложенными по преимуществу атомами углерода, методы ПЭМ и ИСП-МС неинформативны. Методом выбора для определения этого класса наноматериалов в составе объектов окружающей среды является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на C_{18} обращённой фазе, сочетаемая с определенным типом пробоподготовки (экстракцией ароматическими органическими растворителями).

Настоящие методические рекомендации разработаны в целях установления единого, научно обоснованного подхода к применению перечисленного комплекса методов в целях выявления, идентификации и количественного определения наиболее важных видов искусственных наноматериалов в объектах окружающей среды в ходе реализации задач контроля за наноматериалами на всех стадиях их жизненного цикла.

3. Общие положения

3.1. Проведение исследований по определению наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах определяются правилами надлежащей лабораторной практики.

3.2. При градуировке измерительной аппаратуры и количественных определениях наноматериалов в объектах окружающей среды применяются стандартные образцы наноматериалов (стандарты).

3.3. Каждый стандарт наноматериала должен быть охарактеризован на соответствие государственному эталонному образцу по показателям химического состава (включая наличие примесей), размеру и форме частиц, удельной площади поверхности, типу кристаллической структуры. Указанные характеристики определяются с использованием методов масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, трансмиссионной электронной микроскопии, дифракции электронов в выбранной области, СХПЭЭ. В случае стандартных образцов фуллеренов при проверке соответствия используется метод обращённофазовой ВЭЖХ.

3.4. Каждый стандартный образец наноматериала должен быть снабжён «Паспортом безопасности наноматериалов», который составляется в соответствии с ГОСТ 30333—2007 «Паспорт безопасности химической продукции. Общие требования».

3.5. Стандартные образцы наноматериалов должны иметь упаковку для защиты при транспортировании от загрязнения или порчи.

3.6. Хранение стандартных образцов наноматериалов осуществляется отдельно от остальных применяемых веществ с соблюдением условий хранения, указанных в паспорте безопасности на протяжении всего срока годности образца.

3.7. Хранение и использование стандартных образцов наноматериалов осуществляется в соответствии с утвержденным протоколом исследования.

3.8. Оборудование, используемое в организациях, проводящих определение наноматериалов в объектах окружающей среды, должно иметь государственный сертификат соответствия и проходить метрологический контроль (поверку) аккредитованными для этого организациями в установленном порядке и в установленные сроки.

3.9. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения градуировки, поверки и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание.

3.10. При эксплуатации оборудования, содержащего источники ионизирующих излучений, должны соблюдаться требования безопасности, определяемые СанПиН 2.6.1.2523—09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ 99/2009)».

3.11. Отчёт о проведённом исследовании является основным документом, подтверждающим результаты определения наноматериалов в объектах окружающей среды. Отчет должен в обязательном порядке содержать следующие сведения: название исследования; адрес организации; даты начала и завершения исследований; цель и задачи исследования; характеристику определяемого наноматериала; перечень исследованных образцов и применяемых стандартов; схему проведения исследования; перечень использованной аппаратуры и режимы её работы, описание методов статистической обработки результатов; результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой и комментариев к ним; заключение.

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

3.13. Контроль за качеством работ по определению содержания наноматериалов в объектах окружающей среды включает в себя оформле-

ние перечня исследований, проводимых в организации, с указанием для каждого исследования руководителя и заказчика, названия определяемого наноматериала, даты начала и состояния каждого исследования на текущий момент времени, оценку протоколов и методов исследования на соответствие правилам лабораторной практики, мониторинг текущих исследований, отчет о проведенных проверках и рекомендации по устранению недостатков.

3.14. Для осуществления контроля качества руководство организации, проводящей исследования по определению содержания наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах, назначает в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики ответственных лиц за мониторинг исследования из числа сотрудников, не участвующих в исследовании.

3.15. На все производственные операции, включая поступление, идентификацию, маркировку, отбор, обработку проб, использование и хранение исследуемых проб, хранение и аттестацию стандартов; обслуживание и калибровку измерительных приборов и оборудования для контроля содержания наноматериалов в объектах окружающей среды; приготовление реактивов, ведение записей, отчетов и их хранение; обслуживание помещений; обезвреживание или утилизацию наноматериалов и содержащих их образцов (если это необходимо), должны иметься стандартные операционные процедуры (СОП). СОП разрабатываются организацией, аккредитованной в установленном порядке на проведение исследований по определению содержания наноматериалов, и утверждаются руководителем организации.

3.16. Соблюдение СОП осуществляется в целях обеспечения качества, достоверности и воспроизводимости результатов исследования.

3.17. Отклонения от стандартных операционных процедур должны быть документально оформлены и утверждены руководителем исследования.

3.18. Организация, проводящая исследование по определению содержания наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах, должна иметь утвержденный порядок приема и учета поступления анализируемых проб и стандартов наноматериалов; проводить учет анализируемых проб и стандартов наноматериалов при поступлении, расходовании, возврате заказчику или их утилизации; принимать меры по обеспечению идентификации исследуемых веществ (название, химическая формула, номер серии, дата выпуска, условия хранения и срок годности) и их стабильности на протяжении

всего исследования. Для образцов наноматериалов на этикетке дополнительно должны указываться степень дисперсности, размер, форма частиц, при необходимости – удельная площадь поверхности и кристаллическая структура.

3.19. Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований по определению содержания наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.20. Организация, проводящая исследования по определению содержания наноматериалов в объектах окружающей среды, живых организмах и пищевых продуктах, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

4. Перечень объектов окружающей среды, в которых осуществляется количественное определение наноматериалов в ходе проведения контрольных мероприятий

Причинами появления искусственных наночастиц в экосистемах могут быть контакт с наноматериалами во время профессиональной деятельности человека, очистка и переработка с использованием наноматериалов загрязненных грунтовых вод и рекультивация почвы, использование наноматериалов для сельскохозяйственных нужд, выбросы наночастиц, содержащихся в присадках к топливу для транспортных средств, в составе выхлопных газов, промышленных и бытовых сточных водах, производственных отходах заводов и электростанций. Контаминация объектов окружающей среды наночастицами происходит также при производстве, транспортировании и использовании различных средств гигиены и бытовой химии (солнцезащитные средства, детергенты), резины автомобильных покрышек, типографских красок, изделий из текстиля и пр.

Выбор объектов окружающей среды, в которых осуществляется определение наноматериалов в ходе проведения контрольных мероприятий, определяется путями попадания наночастиц и наноматериалов в экосистемы и закономерностями циркуляции наночастиц в нативной либо модифицированной форме в экосистемах. С учетом этих факторов ряд контролируемых объектов включает:

1) атмосферный воздух;

2) водные объекты;

3) почвы;
4) гидробионты;
5) водоросли, грибы;
6) ткани наземных растений;
7) ткани наземных животных.

4.1. Атмосферный воздух

Основным путем попадания наночастиц в организм человека, учитывая доминирующие по объемам производства виды наночастиц, является ингаляционный. Из содержащихся в воздухе наночастиц преобладают продукты сгорания, например, топлива дизельных двигателей (так называемые «непромышленные» наночастицы). Риск экспозиции промышленно производимыми наночастицами относится в первую очередь к людям, непосредственно задействованным в изготовлении, переработке или использовании наноматериалов либо контактирующим с наночастицами в помещениях исследовательских лабораторий. По сравнению с этим степень экспозиции человека наночастицами, циркулирующими в атмосферном воздухе, существенно ниже.

При контроле наночастиц в атмосферном воздухе должен учитываться ряд метрических показателей, включающих массу и размер наночастиц, число частиц и площадь их поверхности, с детальной оценкой влияния этих параметров на степень риска в отношении здоровья человека.

Перечень воздушных объектов, в которых проводится контроль за содержанием наночастиц:

1) атмосферный воздух;
2) воздух на предприятиях наноиндустрии:
- воздух помещений рабочей зоны;
- воздух санитарно-защитной зоны;

3) воздух помещений исследовательских лабораторий.

4.2. Водные объекты

Вода может быть первичным путем поступления наноматериалов в организм человека, наземных животных и водных организмов. Очистка загрязненных сточных вод с применением наноматериалов (например, наножелеза для нейтрализации хлорсодержащих соединений, наносеребра для дезинфекции) как эффективный способ коррекции водоносных слоев потенциально может способствовать попаданию наночастиц в питьевую воду. Поэтому необходимо осуществлять обязательный контроль содержания наноматериалов в водопроводной воде.

Перечень водных объектов, в которых проводится контроль на содержание наночастиц:

1) промышленные сточные воды;

2) бытовые сточные воды;

3) воды открытых водоемов;

4) водопроводная вода.

4.3. Почвы

Попадание наночастиц в почвы может происходить в результате применения наноматериалов в системах очистки почвы и воды, для сельскохозяйственных нужд (в качестве наноудобрений, пестицидов, препаратов для обработки семян, материалов для агропленок, приготовления гидропонических растворов и др.), а также путем оседания наночастиц, находящихся в атмосфере, посредством сточных вод и донных отложений. Загрязнение почв наноматериалами представляет серьезный риск их попадания в организм человека, ткани наземных растений и животных.

Перечень почвенных объектов, в которых проводится контроль на содержание наночастиц:

1) почвы вблизи предприятий и других объектов наноиндустрии;

2) почвы вблизи автомобильных дорог в пределах населённых пунктов и рекреационных территорий;

3) почвы сельскохозяйственных угодий.

4.4. Гидробионты

Поверхностные свойства наноматериалов определяют стабильность и подвижность коллоидных систем, образуемых наночастицами, а также их агрегацию и отложение в водных системах. Стабильность коллоидных суспензий наночастиц обусловливает высокую вероятность накопления наночастиц в водорослях с последующей передачей наночастиц по пищевой цепи гидробионтов. После попадания наноматериалов в водную систему посредством сточных вод или промышленных выбросов происходит их аккумуляция в растительных организмах (например, водорослях), а также организмах беспозвоночных животных (планктоне, бентосе, ракообразных), являющихся первичными звеньями пищевой цепи, и далее переход в организмы водных позвоночных, участвующих в пищевой цепи человека.

Поскольку ключевым фактором, определяющим поведение наночастиц в водных средах, являются их поверхностные свойства, при контроле содержания наночастиц в организме гидробионтов необходимо

учитывать такие параметры, как химический состав наночастиц, их размер, концентрацию, агрегационную способность и поверхностный заряд.

Перечень гидробионтов, в которых проводится контроль на содержание наночастиц:

1) зоопланктон;

2) фитопланктон (например, низшие водоросли);

3) водные беспозвоночные (например, ракообразные, моллюски);

4) водные позвоночные (рыбы).

4.5. Водоросли, грибы

Наноматериалы, поступающие в почву, грунтовые воды и воды открытых водоемов, в результате антропогенной деятельности могут проникать в ткани несовершенных грибов и водорослей. Известно, что клеточные стенки грибов обладают свойством полупроницаемости. Наночастицы проникают через клеточные стенки и достигают плазматической мембраны. Следующий за этим эндоцитоз, а также проникновение наночастиц через ионные каналы или с помощью транспортных белков обусловливают попадание наночастиц в клеточные органеллы. Находящиеся внутри клеток наночастицы способны оказывать влияние на метаболические процессы грибов и водорослей. Поскольку степень токсического воздействия (угнетение фотосинтетических процессов и газообмена, образование свободных радикалов) наночастиц на грибы и водоросли определяется в основном химическим составом и поверхностной реакционной способностью наноматериалов, при контроле их содержания необходимо учитывать прежде всего эти параметры.

Некоторые наночастицы, обладающие антимикробным и противогрибковым действием, могут оказывать влияние на жизнедеятельность свободноживущих азотфиксирующих бактерий и таким образом нарушать равновесие в симбиотических взаимодействиях между грибами, бактериями и растениями. Это может привести к существенным нарушениям в экосистеме. Кроме того, попадание наночастиц в такие объекты окружающей среды, как грибы, может отрицательно сказаться на функциях этих организмов при защите растений-хозяев от фитопатогенов и факторов оксидативного стресса. Трофический переход наночастиц обусловливает высокую вероятность их попадания в ткани почвенных животных, основным источником питания которых являются грибы и бактерии. Таким образом, попадание наноматериалов в любой компонент биоценоза может привести к внедрению наночастиц в другие объекты данной системы. При этом контаминация наночастицами водорослей и грибов является информативным индикатором, позволяющим

принимать оперативные меры по предотвращению последствий загрязнения.

Перечень объектов, в которых проводится контроль на содержание наночастиц:

1) ткани несовершенных грибов (мицелий);

2) ткани водорослей (у крупных макрофитов – слоевище);

3) ткани миксомицетов (плазмодий, плодовые тела);

4) лишайники (слоевище).

4.6. Ткани наземных растений

Попадание наноматериалов в ткани наземных растений с последующим накоплением и встраиванием наночастиц в пищевые цепи может происходить несколькими путями. Перенос загрязняющих почву и грунтовые воды наночастиц осуществляется с помощью корневой системы растения посредством эндоцитоза; наземная часть растительных организмов подвергается экспозиции наночастицами, содержащимися в атмосферном воздухе. При этом растения с большим индексом площади поверхности листьев аккумулируют большие количества наночастиц, увеличивая приток наноматериалов в пищевые цепи. Преднамеренное использование нанопрепаратов в растениеводстве (при послеуборочной обработке различных сельскохозяйственных культур, хранении овощей и фруктов в регулируемых газовых средах, предпосевной обработке и протравливании семян, в качестве пестицидов, наноудобрений, стимуляторов роста растений, в составе гидропонических растворов и других целях) также обусловливает аккумуляцию наночастиц в тканях растений.

Перечень тканей наземных растений, в которых проводится контроль на содержание искусственных наночастиц:

1) листья;

2) корни;

3) плоды.

4.7. Ткани наземных животных

Попадание искусственных наночастиц в ткани наземных животных обусловлено двумя факторами – распространением наночастиц в почвах, грунтовых водах и тканях наземных растений, а также направленным использованием препаратов, содержащих наночастицы, в агропромышленном комплексе в целях обеззараживания воздуха и различных материалов животноводческих помещений, при стимуляции роста кормовых растений, в ветеринарии, для улучшения качества кормов. Наночастицы металлов включают в состав премиксов для повышения жизнестойкости

животных и их продуктивности. Материалы с наночастицами серебра, обладающие антибактериальными свойствами, в виде красок, бесхлорных средств дезинфекции, перевязочных материалов, лака для покрытия катетеров применяются в ветеринарии для борьбы со стафилококковыми и другими инфекциями. Наносеребро может использоваться в доильных аппаратах, фильтрах систем кондиционирования животноводческих помещений.

Поскольку реакционная способность и биологическая активность наночастиц зависит от их состава, размеров, концентрации, заряда, площади поверхности, необходимо учитывать эти параметры при контроле содержания наночастиц в животных организмах.

Перечень органов и тканей наземных животных, в которых контролируется содержание наночастиц:

1) органы пищеварительной системы (кишечник, печень);
2) органы дыхательной системы (легкие);
3) органы мочевыделительной системы (почки);
4) органы и ткани кровеносной системы (сердце, кровь);
5) органы нервной системы (мозг);
6) покровные ткани (кожа);
7) экскреты (моча, молоко).

5. Перечень и порядок идентификации приоритетных наноматериалов, подлежащих контролю на предприятиях наноиндустрии

5.1. Фуллерены и углеродные нанотрубки

В составе продукции наноиндустрии, подлежащей контролю на предприятиях, могут присутствовать фуллерены различного состава и углеродные нанотрубки. Идентификация фуллеренов осуществляется по их подвижности (времени удержания) при ВЭЖХ на колонке с обращённой фазой, изократически элюируемой смесью полярного и неполярного органического растворителя. Поскольку условия извлечения (экстракции) из продукции и последующего хроматографического разделения фуллеренов и их производных различны, заявитель должен предоставить информацию о структуре фуллеренов (число атомов углерода в ядре, число и структура боковых цепей) в составе продукции. Идентификация фуллерена в образце продукции проводится с использованием методики экстракции и стандарта, предоставленных заявителем. При отсутствии данной информации в составе продукции производится выявление, идентификация и количественное определение низших не-

модифицированных фуллеренов (пристинов C_{60} и C_{70}). Экстракция из продукции проводится с помощью бромбензола, а анализ на колонке C_{18}. Идентификация пика фуллерена на хроматограмме и определение максимума поглощения в УФ области выполняется с помощью стандарта C_{60} или C_{70} фуллерена, полученного из «банка стандартных образцов наноматериалов».

При выявлении и идентификации углеродных нанотрубок используется метод ПЭМ с контрастированием солями тяжёлых металлов. В качестве дополнительных методов идентификации могут применяться методы инфракрасной фотолюминесцентной спектроскопии и ИК-спектроскопии поглощения.

Идентификация вида наноматериала (одно-, многостенные углеродные нанотрубки) выполняется на основании сравнения с результатами исследования для стандарта, входящего в состав «банка стандартных образцов наноматериалов».

5.2. Частицы металлов

Выявление наночастиц металлов основано на свойстве их высокой электронной плотности. Выявление и идентификацию наночастиц металлов рекомендуется проводить методами ПЭМ в образцах, приготовленных без использования контрастирующих агентов (солей тяжелых металлов).

К приоритетным наноматериалам данной категории относятся наночастицы золота и серебра, для которых возможно привести общий порядок идентификации. Наночастицы в препарате могут представлять гетерогенную смесь по размерам, с низким показателем полиморфизма, поэтому их идентификация по размерным параметрам в образце затруднена. Наночастицы серебра и золота имеют низкий показатель полиморфизма, характерна, как правило, эллиптическая форма частиц с широким диапазоном коэффициента формы частиц. Среди смеси компонентов наночастицы можно отличить по электронной плотности и правильной, без углов поверхности. Агрегированное состояние наночастиц в материале встречается, однако сохраняется признак отдельных частиц – правильная поверхность без углов. Существует вероятность ошибки: как ложноположительной (когда частицы матрикса принимаются за наночастицы, так и ложноотрицательной, когда наночастицы выбраковываются из-за схожести с компонентами матрикса). Обязательным является получение электронограммы в режиме дифракции и сравнение с электронограммой референс-образца анализируемых наночастиц.

Порядок идентификации наночастиц золота и серебра:

1) обнаружить электронно-плотные частицы или их агрегаты;

2) отметить форму и коэффициент формы наночастиц;

3) отметить характер поверхности наночастиц;

4) отметить присутствие наночастиц в агрегированной форме и сохранение морфометрических признаков наночастиц при образовании агрегатов;

5) получить электронограмму в режиме дифракции, сопоставить полученные результаты с референс-образцами.

5.3. Оксидные наночастицы, наночастицы силикатов и алюмосиликатов

Выявление наночастиц оксидов металлов, силикатов и алюмосиликатов, также как и наночастиц металлов, основано на свойстве их высокой электронной плотности. К этой группе следует отнести следующие приоритетные наноматериалы: наночастицы диоксида титана, оксида железа, оксида кобальта, оксида никеля, оксида церия, оксида цинка, оксида меди, оксида алюминия, наноглины. Выявление и идентификация перечисленных приоритетных наночастиц проводится методами ПЭМ в образцах, приготовленных без использования контрастирующих агентов (солей тяжелых металлов).

Отличительной особенностью наночастиц оксидов металлов является неоднородность распределения электронной плотности частиц. Признак связан с разнообразием форм наночастиц оксидов, присутствием крупных выступов, неровностей, шероховатостей на поверхности наночастиц. Оксиды металлов обладают высокой степенью полиморфизма. Коэффициент формы наночастиц варьирует в широком диапазоне. Агрегированное состояние характерно для наночастиц оксидов. Агрегаты различной формы и размеров сохраняют признаки отдельных наночастиц. При анализе на присутствие наночастиц оксидов в низких концентрациях в водной среде следует учитывать возможное уменьшение электронной плотности по сравнению с референс-образцами, что связано с растворимостью конкретных оксидов. Для идентификации наночастиц обязательным является получение электронограммы в режиме дифракции или спектров характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ).

Порядок идентификации:

1) обнаружить электронно-плотные наночастицы или их агрегаты;

2) отметить форму и степень варьирования коэффициента формы;

3) отметить степень неровности и шероховатости поверхности;

4) отметить присутствие наночастиц в агрегированной форме и сохранение морфометрических признаков наночастиц при образовании агрегатов;

5) получить электронограмму в режиме дифракции или спектров характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ);

6) сопоставить полученные результаты с референс-образцами.

Для получения достоверных результатов необходим анализ как минимум 10 случайных полей изображения.

5.4. Квантовые точки

Идентификация квантовых точек осуществляется на основе выявления у них специфической флуоресценции. Длины волн возбуждения и эмиссии флуоресценции представляются заказчиком или могут быть определены на спектрофлуориметре в автоматическом режиме. Исследованию подвергается разбавленная водная дисперсия наноматериала или содержащей его пробы. Идентификация квантовых точек проводится путём сравнения максимума спектра флуоресценции с паспортным значением или величиной для стандарта, а количественное определение – путём сравнения интенсивности флуоресценции анализируемого и стандартного образца. При количественном спектрофлуориметрическом определении необходимо учитывать наличие артефактов, обусловленных мутностью дисперсных сред и возможным наличием в составе комплексной продукции веществ – гасителей флуоресценции.

5.5. Наночастицы органических полимеров

Выявление и идентификация наночастиц органических полимеров (латексов, дендримеров) в составе продукции проводится с использованием метода ПЭМ с контрастированием солями тяжёлых металлов. Критериями идентификации наночастиц является размер частиц и распределение частиц по размеру. В случае полимерных частиц, несущих флуоресцентную метку, их выявление и идентификация может проводиться с использованием метода спектрофлуориметрии аналогично квантовым точкам.

Выявление и идентификация наночастиц органических полимеров (латексов, дендримеров) в составе продукции проводится с использованием методов ПЭМ. При низком электронном контрасте анализируемых наночастиц рекомендуется подбирать оптимальные способы контрастирования этих наночастиц в составе проб солями тяжёлых металлов.

5.6. Биогенные наночастицы

При выявлении и идентификации наночастиц биогенного происхождения в составе продукции заявитель предоставляет сведения о составе

наночастиц (ДНК-, РНК-содержащие наночастицы, белковые наночастицы, наночастицы других типов биополимеров) и их видовой принадлежности. В соответствии с этим выбирается метод идентификации, отвечающий наибольшей биологической специфичности тестирования, из следующего списка:

1. ДНК содержащие наночастицы – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с видоспецифическим олигодезоксирибонуклеотидным праймером в варианте ПЦР с электрофоретическим разделением (идентификация) или ПЦР в реальном времени (количественное определение);

2. РНК-содержащие вирусы – ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ) с двумя нетождественными видоспецифичными олигодезоксирибонуклеотидными праймерами;

3. Белок-содержащие наночастицы – двухвалентный твёрдофазный иммуноферментный тест (ИФА) или ЭФ в ПААГ с электрофоретическим переносом на нитроцеллюлозную мембрану и иммуноблоттингом. Используются моноклональные видоспецифические антитела против определяемого белка и антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой;

4. Прочие биогенные наночастицы. Метод определяется спецификой анализируемого наноматериала. Для большого числа биогенных наночастиц может быть применён метод биотестирования специфической биологической активности. Сведения о подходящей для биотестирования модели предоставляются заявителем.

6. Порядок электронно-микроскопического выявления и идентификации наночастиц и наноматериалов

6.1. Требования к используемой аппаратуре

6.1.1. Для реализации метода применяются просвечивающие электронные микроскопы, оборудованные системой цифровой регистрации изображений и имеющие в своем составе модули для измерения дифракции электронов и спектров характеристических потерь энергии электронами, со следующими параметрами:

- величина ускоряющего напряжения электронов не менее 80 кВ;
- максимальное увеличение не менее 100 000;
- диапазон увеличений в режиме СХПЭЭ не уже 20 и до 300;
- система фильтрации электронов по энергии и параллельная детектирующая система спектров потерь энергии с разрешением по энергии

не хуже 2 эВ и областью изменения энергии в диапазоне от 0 до 1 000 эВ *или больше*;

• наличие режима дифракции параллельного пучка электронов. В этом режиме апертурная диафрагма должна избирательно ограничивать освещаемую область образца в диапазоне размеров (по диаметру) от 1 до 50 мкм или в более широком диапазоне;

• предельное разрешение двух точек (по техническому паспорту) не хуже 0,4 нм;

• предельное разрешение двух линий (по техническому паспорту) не хуже 0,25 нм.

Примеры аппаратуры, удовлетворяющей указанным требованиям, приведены в справочном приложении.

6.1.2. Подготовка электронного микроскопа к работе.

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).

Проверяется и корректируется раз в неделю, а также при возникновении подозрения на нарушение коррекции астигматизма:

• 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 ГОСТа, регламентирующего стандартные образцы для коррекции астигматизма, рекомендуется использовать образец «astigmatism correction holey carbon film» (каталожный номер 609, фирмы «Ted Pella. Inc.», США), который соответствует стандарту ISO9001/9002.

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.

6.1.3. Плановая проверка качества настройки электронного микроскопа.

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 СОП.

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; опасен для здоровья – использовать с осторожностью!), кристаллы фталоцианина меди (межплоскостные расстояния 1,03 нм), графитизированный углерод (межплоскостные расстояния 0,34 нм), ориентированные кристаллы золота (межплоскостные расстояния 0,204, 0,143 и 0,102 нм). До принятия ГОСТа, регламентирующего стандартные образцы для поверки разрешающей способности электронных микроскопов, рекомендуется применять следующие образцы фирмы «Ted Pella. Inc.», США, соответствующие стандарту ISO9001/9002: asbestos-crocidolite (каталожный номер 624), copper phthalocyanin (каталожный номер 629-1), graphitized carbon black (каталожный номер 645), orientated gold crystals (каталожный номер 646).

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 наночастиц 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 наночастиц регистрацию изображений выполняют только при тех значениях Г и X × Y, при которых проведена калибровка масштаба M.

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 ГОСТа, регламентирующего стандартные образцы для калибровки линейных размеров при измерениях с помощью электронных микроскопов, рекомендуется применять следующий образец фирмы «Ted Pella. Inc.», США, соответствующий стандарту ISO9001/9002: magnification calibration diffraction grating replica (каталожный номер 606).

Для более точного определения размеров наночастиц 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 ГОСТа, регламентирующего стандартные образцы для контроля параметров микроскопа при дифракции электронов, рекомендуется применять следующий образец фирмы «Ted Pella. Inc.», США,

соответствующий стандарту ISO9001/9002: diffraction standard evaporated aluminum (каталожный номер 619).

Проверка и калибровка энергетического фильтра, используемого в режиме СХПЭЭ, должна выполняться сертифицированным специалистом по обслуживанию электронных микроскопов данной марки.

6.1.4. 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 наночастиц в образцах проводиться не может до устранения неисправности.

6.1.5. Основные требования к электронному микроскопу, применяемому для визуализации и идентификации наночастиц.

Электронный микроскоп может применяться для определения наночастиц в образцах и пробах, если при проверке правильности настройки микроскопа получены следующие результаты:

- тест на разрешающую способность подтверждает, что разрешение микроскопа не хуже 0,5 нм;
- удалось добиться эффективной коррекции астигматизма;
- масштаб изображений откалиброван с точностью до 5 %;
- измерена длина камеры (расстояние между образцом и ПЗС-матрицей) и определены ускоряющее напряжение и параметры линз объектива, при которых будут проводиться измерения дифракции электронов в исследуемых образцах.

6.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению

6.2.1. Помещения, в которых располагается оборудование для электронно-микроскопических исследований, должны отвечать следующим требованиям.

Микроскоп должен быть установлен в помещении такой площади, чтобы расстояние от боковых и задней частей микроскопа до стен было не менее 1 м с высотой потолка 2,5 м. Температура воздуха в помещении 18—25 °С, а максимальный дрейф температуры не превышает 3 °С/ч, если иное не указано в техническом паспорте к конкретному электронному микроскопу. Влажность в помещении – (65 ± 15) %, напряжен-

ность магнитного поля – не более 0,2 мкТл, вибрация пола – не более 0,2 мм/сек для 5—50 Гц, если иное не указано в техническом паспорте к конкретному электронному микроскопу.

6.2.2. Электропроводка должна соответствовать мощности электронного микроскопа. Сопротивление заземляющего контура – не более 4 Ом.

6.2.3. Помещение должно быть оборудовано водопроводом с подачей воды 0,3 $м^3$/ч (15 ± 5) °С с дренажной системой. Выброс воздуха из вакуумного насоса должен быть выведен наружу и оборудован воздушным фильтром для улавливания проскочивших наночастиц.

6.2.4. Должны быть соблюдены дополнительные требования к помещению, такие как, например, требования к кондиционированию воздуха, подаче азота и т. п., если эти требования указаны в техническом паспорте к конкретному электронному микроскопу.

6.2.5. При подготовке образцов к электронно-микроскопическому исследованию, применяется вспомогательное оборудование, характеризуемое следующими параметрами:

- ультрамикротом, обеспечивающий получение ультратонких срезов биологических и физических образцов толщиной 30—100 нм, скорость резания 0,4—1 мм/с, термоподача 40—60 нм;
- прибор для изготовления стеклянных ножей для ультрамикротомов;
- стеклянные или алмазные ножи;
- pH-метр, ± 0,1 pH;
- весы, ± 0,1 мг;
- центрифуга – 6 000 об./мин, центрифугируемые объёмы от 1 до 100 $см^3$;
- термостаты: от 37 до 110 °С, ± 0,1 °С;
- дистиллятор;
- аппарат для перемешивания растворов (магнитная мешалка, механическая мешалка);
- электромешалка (для приготовления эпоксидных смол);
- ламинарный бокс биологической безопасности класс III или вытяжной шкаф, оборудованный фильтром для улавливания наночастиц;
- холодильник – для проведения обработки образцов и хранения реактивов при 4 °С, холодильник для хранения реактивов при –18 °С.

6.3. Порядок выявления наночастиц в образцах методом просвечивающей электронной микроскопии

Просмотр сеточек (бленд) с исследуемым материалом проводят в просвечивающем электронном микроскопе при увеличениях 20 000—100 000 крат и ускоряющем напряжении не менее 80 кВ. При низких увеличениях проводят предварительную оценку качества образца. Визуально (по изображению на мониторе рабочей станции) исследуют образец при низких и высоких разрешениях на предмет наличия структур, обладающих морфологическими признаками техногенных наночастиц. Используя ПЗС-матрицу электронного микроскопа, получают и сохраняют с оптимальным разрешением цифровые изображения 5—6 полей, содержащих предполагаемые наночастицы. Такой целенаправленный поиск наночастиц позволяет уменьшить вероятность получения ложноотрицательного результата.

Затем для получения статистически значимой выборки данных, характеризующих частоту встречаемости наночастиц в пробе или их плотность распределения в образце, получают и сохраняют с оптимальным разрешением изображения 30 случайным образом выбранных полей образца. Для этого рекомендуется наметить произвольную линию, проходящую через весь образец и вдоль этой линии измерить 30 равномерно отстоящих друг от друга изображений в режиме просвечивающей электронной микроскопии. Если в образце обнаружены единичные области неоднородного скопления наночастиц, то линия, вдоль которой измеряются изображения, по возможности должна пройти мимо этих областей. Для обеспечения равномерности измерений вдоль выбранной линии между последовательными измерениями рекомендуется пропускать одинаковое число полей зрения. Для подсчета пропускаемых полей рекомендуется использовать дефекты подложки или неоднородности образца, контролируя по ним перемещение образца. Также для подсчета пропускаемых полей зрения можно использовать подсчет числа поворотов ручки, отвечающей за перемещение образца. Количество пропускаемых полей зрения меняется прямо пропорционально используемому увеличению: при увеличении 10 000 пропускается 2—6 полей зрения; при увеличении 50 000 расстояние между регистрируемыми изображениями составляет 10—30 полей зрения; при увеличении 100 000 пропускается 20—60 полей зрения.

Если в области образца, от которой предполагается регистрировать изображение, наночастицы отсутствуют, то записывать изображение в файл не следует, однако количество таких областей должно быть посчи-

тано и учтено при анализе плотности и однородности распределения наночастиц по образцу, выполняемом на основе серии равномерных измерений вдоль линии.

Измерение изображений в режиме просвечивающей электронной микроскопии дополняется (в зависимости от типа анализируемых наночастиц) измерениями в режиме дифракции электронов или СХПЭЭ. Цель измерений в режимах дифракции электронов и СХПЭЭ – получение данных для идентификации электронно-контрастного материала и обоснованного отнесения его к определяемым наночастицам.

6.4. Выбор оптимального метода пробоподготовки, электронно-микроскопической визуализации и дополнительных опций

6.4.1. Воздушные системы окружающей среды

В аппарате Кротова или в его аналогах помещают чашку Петри диаметром 8,5 см с 20,0 $см^3$ дистиллированной воды. Затем включают аппарат на 10 мин для прокачки воздуха с определенной скоростью из окружающей среды, которая устанавливается по шкале. На входе аппарата устанавливают фильтр для отсечения крупных частиц. Прибор градуируется, регулярно проверяется метрологической службой.

На пять электронно-микроскопических медных сеточек, покрытых формваровой или коллодиевой пленкой, наносят по одной капле суспензии частиц из воздуха (50 –100 $мм^3$), через 1 мин удаляют всю жидкость с поверхности сеточки и при необходимости окрашивают 1,0 %-м раствором уранилацетата. Параллельно на электронно-микроскопических сеточках препарируют контрольные образцы с искомыми наночастицами. Для этого на электронно-микроскопических сеточках наносят водную суспензию одного вида наночастиц или водную суспензию нескольких видов наночастиц, выпускаемых предприятиями, расположенными в зоне отбора проб воздуха.

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в различных воздушных системах окружающей среды представлена в табл. 1.

Таблица 1

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в различных воздушных системах окружающей среды

Объект исследования	Воздушная среда предприятий, цехов, коммунально-бытовых помещений
1	2
Физическая форма объекта исследования	Газообразная
Количество материала для выполнения исследований	10,0 м^3
Приборное обеспечение	Аппарат Кротова для отбора проб воздуха, просвечивающий электронный микроскоп, соответствующий п. 6.1.1
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, чашки Петри, автоматическая микропипетка на 100 мм^3, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 см^3, пробирки вместимостью 20 см^3, пипетки
Химические реактивы	Формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата. Этап 2 (препарирование образцов наноматериалов для электронной микроскопии): – чашку Петри с дистиллированной водой помещают в аппарат Кротова и выдерживают в потоке воздуха 10 мин; – на электронно-микроскопические сеточки наносят по одной капле суспензии частиц из воздуха (50—100 мм^3), через 1 мин удаляют всю жидкость с поверхности сеточки и окрашивают (если необходимо) 1,0 % водным раствором уранилацетата; – сеточки с наноматериалом контрастируют 1,0 %-м раствором уранилацетата в течение 1—2 мин
Исследование образцов (проб воздуха) в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3

Продолжение табл. 1

1	2
Анализ электронно-микроскопических изображений структуры твердой фракции проб воздуха	Основные этапы: – визуализация наночастиц в пробах воздуха; – морфометрический анализ наночастиц; – определение степени полиморфизма; – определение коэффициента формы наночастиц; – определение степени агрегированности наночастиц в воздухе; – определение степени загруженности воздуха наночастицами (количество частиц на единицу объема воздуха)
Основные параметры и характеристики твердой фракции воздуха для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в пробах воздуха; – уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в воздухе; – степень агрегированности частиц в пробах воздуха

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в пробах воздуха содержат информацию о форме, тонкой структуре (наличие канала, полости, пустот, структура рельефа поверхности частиц и др.) и размерах наночастиц, данные о степени агрегированности наночастиц, электронные изображения частиц, гистограммы, отражающие структурные и морфометрические особенности наночастиц в исследуемых пробах воздуха.

6.4.2. Средства бытовой химии, косметические средства и пищевые продукты в порошкообразной и жидкой формах

Образцы средств бытовой химии, косметических средств, лекарств и пищевых продуктов суспензируют или растворяют в дистиллированной воде.

На пять электронно-микроскопических медных сеточек, покрытых формваровой или коллодиевой пленкой, наносят по одной капле суспензии или раствора исследуемого образца (50—100 мм^3), через 1 мин удаляют всю жидкость с поверхности сеточки и при необходимости окрашивают 1,0 %-м водным раствором уранилацетата в течение 1—2 мин.

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц представлена в табл. 2.

Таблица 2

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в средствах бытовой химии, косметических средствах, лекарствах и пищевые продуктах в порошкообразной и жидкой формах

Вид продукта, наноматериала	Промышленные товары, лекарства, пищевые продукты
1	2
Физическая форма продукта, наноматериала	Порошок, суспензия, раствор
Количество материала для выполнения исследований	50—100 мг (0,5—1,0 $см^3$)
Приборное обеспечение	Просвечивающий электронный микроскоп, соответствующий п. 6.1.1
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка, вместимостью 50 $мм^3$, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 $см^3$, пробирки вместимостью 20 $см^3$, пипетки
Химические реактивы	Формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата. Этап 2 (препарирование образцов наноматериалов для электронной микроскопии): – суспензию или раствор наноматериала наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой (коллодиевой) пленкой; – при необходимости сеточки с наноматериалом контрастируют 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование образцов наноматериалов в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3

Продолжение табл. 2

1	2
Анализ электронно-микроскопических изображений структуры наноматериала (продукта)	Основные этапы: – визуализация наночастиц в структуре наноматериала или продукта; – морфометрический анализ наночастиц; – определение степени полиморфизма наночастиц в материале; – определение степени агрегированности наночастиц в материале
Основные параметры и характеристики наноматериала (продукта) для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в образце; – уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в материале; – степень агрегированности частиц в наноматериале

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в продукции содержат информацию о форме и размерах наночастиц в исследуемом материале, данные о степени агрегированности наночастиц, сведения о характере распределения наночастиц в образцах, электронно-микроскопические изображения частиц и структуры продукта.

6.4.3. Средства бытовой химии, косметические средства и пищевые продукты в твердой форме

Целью является определение наличия наночастиц в продукции и морфометрическая идентификация частиц.

Образцы продукции объемом 1—2 мм^3 обезвоживают в трех сменах абсолютного этилового спирта или 100,0 % ацетона.

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в средствах бытовой химии, косметических средствах, лекарствах и пищевых продуктах в твердой форме представлена в табл. 3.

Таблица 3

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в средствах бытовой химии, косметических средствах, лекарствах и пищевых продуктах в твердой форме

Вид продукта, наноматериала	Промышленные товары, лекарства, пищевые продукты
1	2
Физическая форма продукта, наноматериала	Твердая
Количество материала для выполнения исследований	50—100 мг (0,5—1,0 $см^3$)
Приборное обеспечение	Просвечивающий электронный микроскоп, соответствующий п. 6.1.1, дополнительное оборудование по п. 6.2.5
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, автоматическая микропипетка на 100 $мм^3$, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 $см^3$, пробирки вместимостью 20 $см^3$, пипетки
Химические реактивы	Абсолютный этиловый спирт или 100,0 % ацетон, эпоксидные смолы (аралдит или эпон), формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, цитрат свинца, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата; приготовление раствора цитрата свинца; приготовление эпоксидной смолы. Этап 2 (препарирование образцов наноматериалов для электронной микроскопии): – фрагменты наноматериала величиной 1—2 $мм^3$ или порошок наноматериала выдерживают в трех сменах абсолютного этилового спирта или ацетона; – наноматериал пропитывают в трех сменах абсолютного этилового спирта и аралдита;

Продолжение табл. 3

1	2
	– образцы наноматериала заключают в аралдит и полимеризуют в течение 72 ч при температуре 60 °С; – на ультрамикротоме стеклянным ножом из образцов наноматериала получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой; – при необходимости ультратонкие срезы наноматериала окрашивают цитратом свинца и 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование образцов наноматериалов в просвечивающем электронном микроскопе	по п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений структуры наноматериала (продукта)	Основные этапы: – визуализация наночастиц на ультратонких срезах наноматериала или продукта; – морфометрический анализ наночастиц; – определение степени полиморфизма наночастиц в материале; – определение степени агрегированности наночастиц в материале
Основные параметры и характеристики наноматериала (продукта) для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в образце; – уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в материале; – степень агрегированности частиц в образце; – характер распределения наночастиц в материале

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в средствах бытовой химии, косметических средствах, лекарствах и пищевых продуктах в твердой форме содержат информацию о форме, структуре и размерах наночастиц в исследуемом материале, данные о степени агрегированности наночастиц в

материале, сведения о характере распределения наночастиц в образцах, электронные изображения частиц и структуры образца.

6.4.4. Электронно-микроскопическое выявление и идентификация наночастиц в клетках, тканях и органах животных и растительных организмов

Задачи, которые решаются методами электронно-микроскопического анализа клеток, тканей и органов животных и растительных организмов:

1) установление наличия техногенных наночастиц в клетках, тканях и органах;

2) идентификация наночастиц;

3) определение размеров и формы наночастиц;

4) выявление тенденции к агрегированию наночастиц;

5) установление распределения наночастиц по органам;

6) установление распределения наночастиц по тканям и клеткам;

7) ультраструктурный анализ локализации наночастиц в клетках и тканях;

8) анализ наличия, характера и степени морфологических изменений в клеточных и тканевых структурах.

Набор конкретных задач электронно-микроскопических исследований определяется с учетом характера выполняемых контрольных мероприятий:

- первичное или уточняющее определение факторов (типов наночастиц), подлежащих периодическому контролю на предприятии наноиндустрии, в конкретной местности или локальной биосистеме;
- определение степени опасности наночастиц, производящихся, используемых или образующихся в виде побочных продуктов на предприятиях наноиндустрии;
- периодические контрольные мероприятия.

При первичном или уточняющем определении факторов (типов наночастиц), подлежащих периодическому контролю на предприятии наноиндустрии, в конкретной местности или локальной биосистеме рекомендуется проводить электронно-микроскопические исследования в рамках задач 1—5.

При определении степени опасности наночастиц, производящихся, используемых или образующихся в виде побочных продуктов на предприятиях наноиндустрии, выявлении их острых, хронических и отсро-

ченных токсических эффектов рекомендуется проводить электронно-микроскопические исследования в рамках задач 1—8.

При проведении периодических контрольных мероприятий рекомендуется проводить электронно-микроскопические исследования в рамках задач 1—5.

Процедуры отбора проб тканей и органов животных, их фиксации, *транспортирования и хранения отобранного материала регламентируются* в соответствии с действующими нормативно-методическими документами.

При выборе вида растений для проведения контрольных мероприятий на предприятии наноиндустрии, в его окрестностях (на территории Российской Федерации) или для определения степени опасности наночастиц следует придерживаться следующих рекомендаций.

В качестве тест-систем для обнаружения наноматериалов в растениях рекомендуется выбирать дикорастущие виды: пырей (*Agropyron L.*), тимофеевка (*Phleum L.*) и др.; культивируемые виды злаков: пшеница (*Triticum L.*), ячмень (*Hordeum L.*), рожь (*Secale L.*), овес (*Avena L.*), рис (*Oryza L.*), растущие или выращиваемые вблизи производств, возможных источников загрязнений (наночастиц).

Выбор представителей семейства злаков (*Poaceae*) связан с их повсеместным распространением (дикие злаки – сорняки) и разведением в сельском хозяйстве (основные зерновые культуры). Весной вырастают не только проростки злаков (из осыпавшихся семян, находящихся в почве). Большинство сорных злаков – многолетние растения и они ежегодно отрастают от корневищ, зимующих в почве. Более того, озимые культурные хлебные злаки (растения целиком) зимуют под снегом. Для анализа подходят как проростки, так и взрослые растения (злаки), растущие вблизи очагов возможного загрязнения. Для определения содержания наноматериалов методом электронной микроскопии в растениях рекомендуется брать не менее 5 растений одного вида.

Пробоподготовка тканей животных и растений для проведения электронно-микроскопических исследований может выполняться без *контрастирования или с применением контрастирующих агентов* (табл. 4, 5).

Препарирование без контрастирования можно использовать, если определяемые наночастицы обладают более высокой электронной плотностью (ВЭП-наночастицы), чем биологический материал (матрикс), в котором их требуется обнаружить и охарактеризовать. Препарирование без контрастирования является наилучшей и наиболее простой методи-

кой для электронно-микроскопических исследований ВЭП-наночастиц в рамках задач 1—5, но оно не подходит для решения задач 6—8.

Если определяемые наночастицы обладают электронной плотностью, сравнимой с электронной плотностью биологического материала, в котором их требуется выявлять (наночастицы с низкой электронной плотностью, НЭП-наночастицы), то препарирование следует выполнять *с применением контрастирующих агентов. При этом для электронно-микроскопических исследований НЭП-наночастиц в рамках задач 1—5* необходимо подобрать те контрастирующие агенты и процедуры их использования, которые обеспечивают наилучшее распознавание определяемых наночастиц в биологическом материале.

Препарирование с применением контрастирующих агентов следует использовать для любых наночастиц при электронно-микроскопических исследованиях в рамках задач 6—8. При решении задач 6 и 7 применение агентов, делающих клеточные и тканевые структуры более контрастными и узнаваемыми, не должно мешать распознаванию наночастиц в этих структурах. При решении задачи 8 контрастирующие агенты и процедуры их применения выбираются так, чтобы обеспечить наиболее достоверный анализ наличия, характера и степени морфологических изменений в клеточных и тканевых структурах, пусть даже и в ущерб возможности распознавания наночастиц в этих структурах. Все процедуры пробоподготовки проводятся только в стеклянной посуде.

Таблица 4

Подготовка образцов для определения наночастиц методами ПЭМ в тканях животных

Вид исследуемого материала	Фрагменты тканей и органов животных
1	2
Физическая форма исследуемого материала	Изолированные кусочки тканей и органов животных, фиксированные в 2,5 % глутаровом альдегиде на 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2—7,4 с добавлением 2 % нейтрального формалина
Количество материала для выполнения исследований	По 4 кусочка каждого вида образцов (из одного органа или гистологически выделяемого типа ткани)
Приборное обеспечение	Электронный микроскоп по п. 6.1.1; дополнительное оборудование по п. 6.2.4
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические бленды, покрытые формваровой пленкой, автоматические пипетки

Продолжение табл. 4

1	2
	вместимостью 1 $см^3$ и 200 $мм^3$, наконечники к автоматическим пипеткам, пипетки вместимостью 5 $см^3$, колбы вместимостью 100 $см^3$, пробирки вместимостью 20 $см^3$, пенициллиновые флаконы вместимостью 10 $см^3$, мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$, стеклянные или алмазные ножи для ультрамикротома
Химические реактивы	Хлорид натрия, калий фосфорно-кислый однозамещенный, калий фосфорно-кислый двузамещенный, четырехокись осмия (OsO_4), 96 % этиловый спирт, 100 % ацетон, эпоксидные смолы (на основе эпона), катализатор полимеризации (тридиметиламинофенол), уранилацетат, цитрат свинца, деионизированная вода
Процедура подготовки срезов тканей и органов животных для определения наноматериалов методами электронной микроскопии	
Подготовка реактивов и материалов к эксперименту	– приготовление 0,1 М фосфатно-солевого буфера (pH 7,2—7,4); – приготовление 1 %-го раствора четырехокиси осмия на фосфатно-солевом буфере (pH 7,2—7,4); – приготовление батареи водных растворов этанола с возрастающей концентрацией (50 %, 60 %, 70 %, 80 %); – приготовление заливочной эпоксидной смолы; – приготовление смесей ацетона и эпоксидной смолы в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3; – приготовление раствора цитрата свинца; – приготовление 2,0 %-го раствора уранилацетата в 70 % этаноле
Подготовка исследуемых материалов к приготовлению ультратонких срезов для определения наноматериалов методами электронной микроскопии	Образцы материала в фиксирующем растворе (2,5 %-й раствор глутарового альдегида на 0,1 М фосфатно-солевом буфере pH 7,2—7,4 с добавлением 2 % нейтрального формалина) разделяют на две равные группы для проведения анализа в присутствии контрастирующих агентов и на неконтрастированных срезах
Приготовление ультратонких срезов образцов тканей и органов животных для определения наноматериалов методами электронной микроскопии в присутствии контрастирующих агентов	– *фиксирующий раствор отмывают* 2 $см^3$ 0,1 М фосфатно-солевого буфера (pH 7,2—7,4); процедуру повторяют всего 3 раза; – пробу материала дополнительно фиксируют в 2 $см^3$ 1,0 %-го раствора четырехокиси осмия на 0,1 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2—7,4) в течение 2 ч при комнатной температуре; – образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 50 %-го раствора этанола в течение 20 мин при 4 °С; процедуру повторяют до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва;

Продолжение табл. 4

1	2
	– образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 60 %-го раствора этанола в течение 20 мин при 4 °С; – образец повторно обрабатывают 2 $см^3$ водного 60 %-м раствором этанола в течение 20 мин при 4 °С; – образец обрабатывают 2 $см^3$ 1 %-го раствора уранилацетата в 70 % этаноле в течение 12 ч при 4 °С (оставляют на ночь в холодильнике); – образец обрабатывают 2 $см^3$ 80 %-го водного раствора этанола в течение 20 мин при комнатной температуре; – образец обрабатывают 2 $см^3$ 96 %-го водного раствора этанола в течение 20 мин при комнатной температуре; – образец обрабатывают 100 % ацетоном 3 раза по 45 мин при комнатной температуре; – образец пропитывают в трех сменах ацетона и эпоксидной смолы с восходящей концентрацией смолы (1 : 3, 1 : 1, 3 : 1 по объемному соотношению смолы и ацетона); время пропитки составляет 2 ч для смесей 1 : 3 и 1 : 1 и 12 ч для смеси 3 : 1 при комнатной температуре; – образец помещают в эпоксидную смолу на 2 ч для пропитки; – образец помещают в заливочную форму, заполненную эпоксидной смолой с добавлением катализатора, и полимеризуют в течение 24 ч при температуре 37 °С, а затем в течение 48 ч при температуре 60 °С; – на ультрамикротоме стеклянным или алмазным ножом из полимеризованного эпоксидного блока в зоне, содержащей образец, получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические бленды, покрытые формваровой пленкой; – ультратонкие срезы окрашивают цитратом свинца и 1,0 %-м раствором уранилацетата
Приготовление ультратонких срезов образцов тканей и органов животных для определения наноматериалов методами электронной микроскопии без контрастирования	– *фиксирующий раствор отмывают 2 $см^3$, 1 М фосфатно-солевого буфера* (pH 7,2—7,4); процедуру повторяют всего 3 раза; – образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 50 %-го раствора этанола в течение 20 мин при 4 °С; процедуру повторяют до получения визуально прозрачного водно-спиртового смыва; – образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 60 %-го раствора этанола в течение 20 мин при 4 °С; – образец повторно обрабатывают 2 $см^3$ водного 60 %-го раствора этанола в течение 20 мин при 4 °С;

Продолжение табл. 4

1	2
	– образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 70 %-го раствора этанола в течение 12 ч при 4 °С (оставляют на ночь в холодильнике); – образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 80 %-го раствора этанола в течение 20 мин при комнатной температуре; – образец обрабатывают 2 $см^3$ водного 96 %-го раствора этанола в течение 20 мин при комнатной температуре; – образец обрабатывают 100 % ацетоном 3 раза по 45 мин при комнатной температуре; – образец пропитывают в трех сменах ацетона и эпоксидной смолы с восходящей концентрацией смолы (1 : 3, 1 : 1, 3 : 1 по объемному соотношению смолы и ацетона); время пропитки составляет 2 ч для смесей 1 : 3 и 1 : 1 и 12 ч для смеси 3 : 1 при комнатной температуре; – образец помещают в эпоксидную смолу на 2 ч для пропитки; – образец помещают в заливочную форму, заполненную эпоксидной смолой с добавлением катализатора, и полимеризуют в течение 24 ч при температуре 37 °С, а затем в течение 48 ч при температуре 60 °С; – на ультрамикротоме стеклянным или алмазным ножом из полимеризованного эпоксидного блока в зоне, содержащей образец, получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические бленды, покрытые формваровой пленкой

Таблица 5

Подготовка образцов для определения наночастиц методами ПЭМ в тканях и органах растений

Вид исследуемого материала	Фрагменты тканей и органов растений (корешков и листьев)
1	2
Физическая форма исследуемого материала	Изолированные кусочки тканей и органов растений, фиксированные в 2,5 % глутаровом альдегиде на 0,1 М буфере Зоренсена, pH 7,2—7,4, с добавлением 15 г/л сахарозы
Количество материала для выполнения исследований	По 2 кусочка каждого вида образцов (из одного органа или гистологически выделяемого типа ткани)

Продолжение табл. 5

1	2
Приборное обеспечение	Термостат, холодильник, вытяжной шкаф, pH-метр, электромешалка, ультрамикротом
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические бленды, покрытые формваровой пленкой, автоматические пипетки вместимостью 1 $см^3$ и 200 $мм^3$, наконечники к автоматическим пипеткам, пипетки вместимостью 5 $см^3$, колбы вместимостью 100 $см^3$, пробирки вместимостью 20 $см^3$, пенициллиновые флаконы вместимостью 10 $см^3$, мерный цилиндр вместимостью 100 $см^3$, стеклянные или алмазные ножи для ультрамикротома
Химические реактивы	Натрий фосфорнокислый однозамещенный, калий фосфорнокислый двузамещенный, сахароза, 96 % этиловый спирт, 100 % ацетон, эпоксидные смолы (на основе эпона), катализатор полимеризации (трис-диметиламинофенол), деионизированная вода
Процедура подготовки срезов тканей и органов растений для определения наноматериалов методами электронной микроскопии	
Подготовка реактивов и материалов к эксперименту	– приготовление 0,1 М буфера Зоренсена (pH 7,2—7,4) с добавлением 15 г/л сахарозы; – приготовление батареи водных растворов этанола возрастающей концентрацией (20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %); – приготовление заливочной эпоксидной смолы; – приготовление смесей ацетона и эпоксидной смолы в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3
Приготовление ультратонких срезов образцов тканей и органов растений для определения наноматериалов методами электронной микроскопии (без контрастирования)	– фиксирующий раствор отмывают 2 $см^3$, 1 М буфера Зоренсена (pH 7,2—7,4) с добавлением 15 г/л сахарозы; процедуру повторяют всего 3 раза; – образец дегидратируют, инкубируя в водных растворах этанола возрастающей концентрации (20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %) в течение 30 мин при комнатной температуре; – образец инкубируют в 70 %-м растворе этанола в течение 12 ч при комнатной температуре; – образец инкубируют в 80 %-м растворе этанола в течение 30 мин при комнатной температуре; – образец инкубируют в 96 %-м растворе этанола в течение 30 мин при комнатной температуре; – образец обрабатывают 100 % ацетоном 2 раза по 60 мин при комнатной температуре; – образец пропитывают в трех сменах ацетона и эпоксидной смолы с восходящей концентрацией смолы (1 : 3, 1 : 1, 3 : 1 по объемному соотношению смолы и ацетона); время пропитки составляет 24 ч для смеси каждого состава при комнатной температуре;

Продолжение табл. 5

1	2
	– образец помещают в заливочную форму, заполненную эпоксидной смолой с добавлением катализатора, и полимеризуют в течение 24 ч при температуре 37 °С, затем в течение 24 ч при температуре 45 °С, затем в течение 24 ч при температуре 60 °С; – на ультрамикротоме стеклянным или алмазным ножом из полимеризованного эпоксидного блока в зоне, содержащей образец, получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические бленды, покрытые формваровой пленкой

Выявление и определение характеристик наночастиц в биологических образцах проводится в порядке, изложенном в табл. 6.

Таблица 6

Определение наночастиц в ультратонких срезах клеток, тканей и органов животных и растений методами просвечивающей электронной микроскопии

Детекция наночастиц в срезах клеток, тканей и органов животных и растительных макроорганизмов	Согласно п. 6.4.4
Идентификация наночастиц металлов и оксидов металлов в срезах клеток, тканей и органов животных и растительных макроорганизмов	– выбирают область образца, которая содержит типичные структуры, обладающие морфологическими признаками техногенных наночастиц (электронная плотность, форм-фактор); – с выбранной области получают картину дифракции электронов. Наличие характеристичной картины дифракции является указанием на кристаллическую структуру (подтверждением кристаллической структуры) идентифицируемых наночастиц. Отсутствие дифракционных максимумов свидетельствует от аморфной структуре анализируемых наночастиц; – дополнительно к измерению дифракционной картины измеряют спектр ХПЭЭ, позволяющий установить или подтвердить элементный состав анализируемых наночастиц; – если анализируемые наночастицы обладают интенсивным спектром ХПЭЭ, рекомендуется их идентификацию и анализ распределения проводить с применением метода элементного картирования. Это позволяет исключить ошибочное отнесение эндогенных наночастиц к анализируемым техногенным наночастицам

Продолжение табл. 6

Анализ электронно-микроскопических изображений срезов клеток, тканей и органов животных и растительных макроорганизмов	– оценивают морфологические характеристики наночастиц в образце: размер, форм-фактор, распределение по размерам и степень полиморфизма; – оценивают характер накопления наночастиц: в виде отдельных наночастиц или с тенденцией к агрегированию разной степени; – оценивают объемную концентрацию наночастиц в образце; *Примечание: Для приблизительной оценки объемной концентрации наночастиц вычисляют среднюю плотность наночастиц в срезе* $\sigma = \Sigma N_i / \Sigma S_i$, *где* N_i *– количество наночастиц в поле i,* S_i *– площадь поля i. Объемную концентрацию оценивают по формуле* $\gamma = \sigma^{3/2}$. – устанавливают наличие и оценивают характер и степень структурно-морфологических изменений в клетках; – устанавливают внутриклеточную локализацию обнаруженных наночастиц

6.4.5. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в воде природных и искусственных водоёмов

К природным и искусственным водоёмам относятся родники, колодца, озера, реки, водохранилища, которые служат источниками питьевой и технической воды для человека. В природные и искусственные водоемы, расположенные вблизи крупных городов и промышленных предприятий, различными путями могут попасть наноматериалы, опасные для человека и окружающей среды.

Целью является определение наличия наночастиц в воде природных и искусственных водоемов, проведение структурной и морфометрической идентификации частиц в воде.

Для электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в воде природных и искусственных водоёмов из водоема с различной глубины (0,1 м; 1 м; 2 м; 3 м и т. д.) пробоотборником отбирают по 1—2 л воды. Каждую пробу воды выливают в химически чистую круглодонную колбу со шлифом вместимостью 2—3 л. Колбу с водой, соединенную с водоструйным или роторным вакуумным насосом, помещают на водяную баню и при температуре 80—90 °С выпаривают воду до объема 1—10 $см^3$.

На пять электронно-микроскопических медных сеточек, покрытых формваровой или коллодиевой пленкой, наносят по одной капле воды (50—100 мм^3), через 1 мин удаляют всю жидкость с поверхности сеточки и окрашивают 1,0 %-м раствором уранилацетата.

Просмотр сеточек с исследуемым материалом проводят в просвечивающем электронном микроскопе при увеличениях 20 000—100 000 крат и ускоряющем напряжении 75 кВ.

В электронном микроскопе с каждой сеточки при оптимальном разрешении фотографируют или снимают на электронном носителе 10 полей изображения исследуемого объекта, на котором присутствуют структурные элементы исследуемого образца.

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в воде природных и искусственных водоемов представлена в табл. 7.

Таблица 7

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в воде природных и искусственных водоемов

Объект исследования	Вода природных и искусственных водоемов
1	2
Физическая форма объекта исследования	Жидкость (вода питьевая или вода техническая для коммунальных и хозяйственных нужд человека)
Количество материала для выполнения исследований	1—2 см^3 воды, полученной после медленного выпаривания 1—2 дм^3 воды
Приборное обеспечение	Пробоотборник воды, роторный вакуумный насос или водоструйный насос, водяная баня, просвечивающий электронный микроскоп по п. 6.1.1
Материалы	Круглодонные колбы вместимостью 2 или 3 л со шлифом, пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка вместимостью 50 мм^3, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 см^3, пробирки вместимостью 20 см^3, пипетки
Химические реактивы	Формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате;

Продолжение табл. 7

1	2
	– покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата. Этап 2 (препарирование образцов для электронной микроскопии): – пробы воды из водоема в химически чистых колбах, соединенных с роторным вакуумным насосом или с водоструйным насосом, выпаривают на водяной бане при температуре 80—90 °С до уменьшения первоначального объема воды в 1 000—2 000 раз; – пробы воды наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой (коллодиевой) пленкой; – при необходимости сеточки контрастируют 1,0 %-ти раствором уранилацетата
Исследование проб воды в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений наночастиц в пробах воды	Основные этапы: – визуализация наночастиц в структуре образца; – морфометрический анализ наночастиц; – определение степени полиморфизма наночастиц в воде; – определение степени агрегированности наночастиц в воде
Основные параметры и характеристики наноматериала в воде для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в образце; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – структура рельефа поверхности частиц; – степень полиморфизма наночастиц в воде; – степень агрегированности наночастиц в воде

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в пробах воды природного или искусственного водоема содержат информацию о форме, структуре и размерах наночастиц в исследуемых пробах воды, данные о степени агрегированности наночастиц, электронно-микроскопические изображения наночастиц в воде.

6.4.6. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в сточных и грунтовых водах

Для выполнения работ по визуализации и идентификации наночастиц в сточных и грунтовых водах объектами исследований служат про-

бы воды, взятые на очистных сооружениях промышленных городов или предприятий, пробы стоков, отобранные из канализации предприятий, а также пробы грунтовых вод, отобранные вблизи промышленных предприятий.

Целью является определение наличия наночастиц в сточных и грунтовых водах, проведение структурной и морфометрической идентификации наночастиц в воде.

Для электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в сточных и грунтовых водах пробоотборником отбирают по 1—2 л воды. Каждую пробу воды выливают в химически чистую колбу со шлифом вместимостью 2—3 л. Каждую пробу воды фильтруют через 5—6 слоев обеззоленных фильтров. Фильтрат выливают в химически чистую круглодонную колбу. Затем колбу, соединенную с водоструйным или роторным вакуумным насосом, помещают на водяную баню и при температуре 80—90 °С выпаривают воду до объема 10—20 $см^3$. Пробы фильтрата после выпаривания используют для приготовления негативно-окрашенных препаратов для электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц (п. 6.4.6.1). Осадок с фильтра препарируют для исследования в электронном микроскопе методом ультратонких срезов (п. 6.4.6.2).

6.4.6.1. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в сточных и грунтовых водах методом негативно-окрашенных препаратов

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в сточных и грунтовых водах представлена в табл. 8.

Таблица 8

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в сточных и грунтовых водах методом негативно окрашенных препаратов

Объект исследования	Грунтовые и сточные воды
1	2
Физическая форма	Жидкость (суспензия воды, содержащая органические и неорганические примеси)
Количество материала для выполнения исследований	10—20 $см^3$ фильтрата сточной (грунтовой) воды, полученного после медленного выпаривания 1—2 л фильтрата сточной воды
Приборное обеспечение	Пробоотборник воды, роторный вакуумный насос или водоструйный насос, водяная баня, электронный микроскоп по п. 6.1.1

Продолжение табл. 8

1	2
Материалы	Круглодонные колбы вместимостью 2 или 3 л со шлифом, обеззоленные фильтры, пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка вместимостью 50 мм^3, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 см^3, пробирки вместимостью 20 см^3, пипетки
Химические реактивы	Формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата. Этап 2 (препарирование образцов для электронной микроскопии): – пробы сточной (грунтовой) воды фильтруют через 5—6 слоев обеззоленных фильтров, фильтрат выливают в химически чистые колбы, соединенные с роторным вакуумным насосом или водоструйным насосом, фильтрат выпаривают на водяной бане при температуре 80—90 °С до уменьшения первоначального объема в 1 000—2 000 раз; – пробы концентрированного фильтрата выпариванием наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой (коллодиевой) пленкой; – при необходимости сеточки контрастируют 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование проб воды в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений структуры наноматериала (продукта) в пробах воды	Основные этапы: – визуализация наночастиц в структуре воды; – морфометрический анализ наночастиц; – определение степени полиморфизма наночастиц в воде; – определение степени агрегированности наночастиц в воде
Основные параметры и характеристики	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала:

Продолжение табл. 8

1	2
наноматериала в сточных (грунтовых) водах для выдачи заключения	– наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в образце; – уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в воде; – степень агрегированности наночастиц в воде; – характер распределения наночастиц в воде

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в пробах сточных (грунтовых) вод содержат информацию о форме, структуре и размерах наночастиц в исследуемых пробах воды, данные о степени агрегированности наночастиц, сведения о характере распределения наночастиц в образцах, электронно-микроскопические изображения частиц в воде.

6.4.6.2. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в сточных и грунтовых водах методом ультратонких срезов

Схема проведения экспериментов электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в твердой фракции сточных и грунтовых вод представлена в табл. 9.

Таблица 9

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц твердой фракции сточных и грунтовых вод

Вид исследуемого материала	Твердая фракция сточных и грунтовых вод или осадок
1	2
Физическая форма исследуемого материала	Осадок (влажная биомасса гидробионтов и микроорганизмов)
Количество материала для выполнения исследований	100—150 мг влажной биомассы биопленки
Приборное обеспечение	Электронный микроскоп по п. 6.1.1; *дополнительное оборудование по п. 6.2.5*
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка вместимостью 50 мм^3, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 см^3, пробирки вместимостью 20 см^3, пипетки

Продолжение табл. 9

1	2
Химические реактивы	Глутаровый альдегид, четырехокись осмия, какодилат натрия, этиловый спирт, абсолютный этиловый спирт или 100,0 % ацетон, эпоксидные смолы (аралдит или эпон), формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, цитрат свинца, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 4,0 %-го раствора глутарового альдегида на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – приготовление 2,0 %-го раствора четырехокиси осмия на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – приготовление батареи спиртов возрастающей концентрацией; – приготовление смеси абсолютного спирта и эпоксидной смолы (аралдита); – заливочная эпоксидная смола; – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата; приготовление раствора цитрата свинца; приготовление эпоксидной смолы Этап 2 (препарирование образцов для электронной микроскопии): – пробы осадка фиксируют и инактивируют в 4,0 %-м растворе глутарового альдегида на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – образцы дофиксируют в 2,0 %-м растворе четырехокиси осмия на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – образцы дегидратируют в нескольких сменах этилового спирта с возрастающей концентрацией, образцы выдерживают в трех сменах абсолютного этилового спирта или ацетона; – образцы пропитывают в трех сменах абсолютного этилового спирта и аралдита; – образцы заключают в аралдит и полимеризуют в течение 72 ч при температуре 60 °С;

Продолжение табл. 9

1	2
	– на ультрамикротоме стеклянным ножом из образцов осадка сточных (грунтовых) вод получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой; – ультратонкие срезы наноматериала окрашивают цитратом свинца и 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование ультраструктуры осадка сточных (грунтовых) вод в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений ультраструктуры осадка сточных (грунтовых) вод, содержащего наноматериалы	Основные этапы: – визуализация наночастиц на ультратонких срезах осадка сточных (грунтовых) вод; – морфометрический анализ наночастиц в структуре осадка сточных (грунтовых) вод и клеток гидробионтов, микроорганизмов; – определение степени полиморфизма наночастиц в структуре осадка сточных (грунтовых) вод и клеток микроорганизмов; – оценка степени загруженности гидробионтов и микробов наночастицами (число наночастиц на одну клетку); – диагностика структурных патологий в микробах; – определение числа микробов в осадке с летальными повреждениями и др.
Основные параметры и характеристики наночастиц (наноматериала) в структуре осадка сточных (грунтовых) вод для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в осадке сточных (грунтовых) вод; – уровень электронно-оптической плотности наночастиц; – форма наночастиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в материале; – степень агрегированности наночастиц в образце; – степень загруженности микробов наночастицами;

Продолжение табл. 9

1	2
	– характер повреждений ультраструктуры микробов наночастицами; – количество микробов в осадке с интактной ультраструктурой; – число микробов в осадке с летальными повреждениями и др.

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в структуре осадка сточных (грунтовых) вод содержат информацию о форме, структуре и размерах наночастиц в исследуемом материале, данные о степени агрегировнности наночастиц, сведения о характере распределения наночастиц в образцах, число частиц на один микроб, характер и степень повреждения микроорганизмов наночастицами, электронно-микроскопические изображения наночастиц, осадка и микробов.

6.4.7. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в тонкой структуре образцов почвы, грунта, донных отложений

В структуре почвы, грунта и донных отложений содержатся органические вещества, минералы, вода, живые организмы и микроорганизмы. В почве, грунте и донных отложениях накапливаются продукты хозяйственной деятельности человека, такие как неорганические и органические вещества, продукты их распада, наноматериалы, токсиканты и т. д.

Целью является определение наличия наночастиц в структуре почвы, грунта и донных отложений, проведение структурной и морфометрической идентификации наночастиц в структуре почвы (грунта и донных отложений) и в тонкой структуре композиционных элементов почвы (грунта и донных отложений), живых микроорганизмах (бактериях, дрожжах, грибах и одноклеточных водорослях).

Образцы почвы (грунта и донных отложений) объемом 1 дм^3 суспензируют в 1—2 л дистиллированной воды. Затем полученную суспензию фильтруют через 2—3 слоя медицинской марли для удаления крупных и твердых частиц почвы. Полученный фильтрат дополнительно фильтруют через 5—6 слоев обеззоленных фильтров. Фильтрат выливают в круглодонную химически чистую колбу. Затем колбу, соединенную с водоструйным или роторным вакуумным насосом, помещают на водяную баню и при температуре 80—90 °С выпаривают воду до объема 10—20 см^3. Пробы фильтрата после выпаривания используют для при-

готовления негативно-окрашенных препаратов для электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта и донных отложений) (п. 6.4.7.1). Осадок с фильтра используют для препарирования ультратонких срезов для электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в твердой фракции почвы (грунта, донных отложений) (п. 6.4.7.2).

6.4.7.1. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в водорастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) методом негативно-окрашенных препаратов

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) представлена в табл. 10.

Таблица 10

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) методом негативно окрашенных препаратов

Объект исследования	Водная суспензия почвы (грунта, донных отложений)
1	2
Физическая форма	Жидкость (водорастворимая фракция почвы (грунта, донных отложений)
Количество материала для выполнения исследований	10—20 $см^3$ фильтрата, полученного после медленного выпаривания 1—2 л фильтрата водорастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений)
Приборное обеспечение	Пробоотборник воды, роторный вакуумный насос или водоструйный насос, водяная баня, электронный микроскоп по п. 6.1.1
Материалы	Круглодонные колбы вместимостью 2 или 3 л со шлифом, обеззоленные фильтры, пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка вместимостью 50 $мм^3$, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 $см^3$, пробирки вместимостью 20 $см^3$, пипетки
Химические реактивы	Формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой;

Продолжение табл. 10

1	2
	– приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата. Этап 2 (препарирование образцов для электронной микроскопии): – пробы почвы (грунта, донных отложений) 1 $дм^3$ суспензируют в 1—2 л дистиллированной воды; полученную суспензию фильтруют через несколько слоёв марли для удаления крупных нерастворимых частиц почвы; первичный фильтрат суспензии почвы фильтруют через 5—6 слоев обезоленных фильтров; фильтрат выливают в химически чистые колбы, соединенные с роторным вакуумным насосом или водоструйным насосом, выпаривают на водяной бане при температуре 80—90 °С до уменьшения объема пробы воды в 500—1 000 раз; – после выпаривания пробы из растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой (коллодиевой) пленкой; – сеточки контрастируют 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование проб растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений структуры наноматериала (продукта) в пробах растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений)	Основные этапы: – визуализация наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – морфометрический анализ наночастиц; – определение степени полиморфизма наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – степень агрегированности наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений)
Основные параметры и характеристики наноматериала в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в образце; – уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – степень агрегированности наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – характер распределения наночастиц в растворимой фракции почвы (грунта, донных отложений)

6.4.7.2. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в образцах почвы (грунта, донных отложений) методом ультратонких срезов

Схема проведения экспериментов электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) методом ультратонких срезов представлена в табл. 11.

Таблица 11

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в тонкой структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) методом ультратонких срезов

Вид исследуемого материала	Нерастворимая фракция почвы (грунта, донных отложений)
1	2
Физическая форма исследуемого материала	Влажная масса
Количество материала для выполнения исследований	100—150 мг влажной массы (осадка)
Приборное обеспечение	Электронный микроскоп по п. 6.1.1; дополнительное оборудование по п. 6.2.5
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка вместимостью 50 мм^3, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 см^3, пробирки вместимостью 20 см^3, пипетки
Химические реактивы	Глутаровый альдегид, четырехокись осмия, какодилат натрия, этиловый спирт, абсолютный этиловый спирт или 100,0 % ацетон, эпоксидные смолы (аралдит или эпон), формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, цитрат свинца, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 4,0 %-го раствора глутарового альдегида на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – приготовление 4,0 %-го раствора четырехокиси осмия на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – приготовление батареи спиртов возрастающей концентрацией;

Продолжение табл. 11

1	2
	– приготовление смеси абсолютного спирта и эпоксидной смолы (аралдита); – заливочная эпоксидная смола; – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовления 1,0 %-го раствора уранилацетата; приготовление раствора цитрата свинца; приготовление эпоксидной смолы. Этап 2 (препарирование образцов для электронной микроскопии): – образцы фиксируют в 4,0 %-м растворе глутарового альдегида на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – пробы дофиксируют в 2,0 %-м растворе четырехокиси осмия на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – образцы дегидратируют в нескольких сменах этилового спирта с возрастающей концентрацией, образцы выдерживают в трех сменах абсолютного этилового спирта или ацетона; – образцы пропитывают в трех сменах абсолютного этилового спирта и аралдита; – образцы заключают в аралдит и полимеризуют в течение 72 ч при температуре 60 °С; – на ультрамикротоме стеклянным ножом из образцов нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой; – ультратонкие срезы наноматериала окрашивают цитратом свинца и 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование ультраструктуры нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений ультраструктуры осадка сточных (грунтовых) вод, содержащего наноматериалы	Основные этапы: – визуализация наночастиц на ультратонких срезах нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – морфометрический анализ наночастиц в структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений);

Продолжение табл. 11

1	2
	– определение степени полиморфизма наночастиц в структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – определение степени агрегированности наночастиц в структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений)
Основные параметры и характеристики наночастиц (наноматериала) в структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений); – уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – структура рельефа поверхности частиц; – степень полиморфизма наночастиц в материале; – степень агрегированности наночастиц в нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений)

На экране электронного микроскопа, затем на электронных микрофотографиях (изображениях) образца определяют следующие структурные и морфометрические характеристики наночастиц в нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений):

- форма частиц;
- размер и распределение по размеру наночастиц;
- степень агрегированности наночастиц;
- характер распределения наночастиц в структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений);

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в структуре нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений) содержат информацию о форме, структуре и размерах наночастиц в исследуемом материале, данные о степени агрегированности наночастиц, сведения о характере распределения наночастиц в образцах, электронно-микроскопические изображения наночастиц и структуры нерастворимой фракции почвы (грунта, донных отложений).

6.4.8. Электронно-микроскопическая визуализация и идентификация наночастиц в тонкой структуре природных биопленок

Природные биопленки в окружающей среде представляют собой органические образования на поверхности некоторых конструкционных элементов промышленных и жилых зданий, на поверхности сооружений из кирпича, камня, бетона, металла, керамики, дерева, пластмассы, а также на поверхности отдельных агрегатов и деталей технологических линий, машин и приборов, образовавшихся в процессе жизнедеятельности природных (диких) микробов или ассоциаций бактерий, дрожжей, грибов и одноклеточных водорослей. В структуре природных биопленок микробы ассимилируют или депонируют все то, что содержатся в воздухе, воде, почве: химические элементы, наночастицы, органические молекулы, продукты распада и разложения материалов и т. д.

Целью является определение наличия наночастиц в структуре природных биопленок, проведение структурной и морфометрической идентификации частиц в структуре биопленок и в живых микроорганизмах (бактериях, дрожжах, грибах и одноклеточных водорослях).

Образцы биопленки, объемом 1—2 мм^3 (10—15 кусочков) или биомассу в количестве 100—150 мг, собранную с поверхности конструкционных агрегатов или материалов, фиксируют и инактивируют 4,0 %-м раствором глутарового альдегида на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2).

Схема проведения экспериментов электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в природных биопленках представлена в табл. 12.

Таблица 12

Схема проведения экспериментов по электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в тонкой структуре *природных биопленок*

Вид исследуемого материала	Биопленка или биомасса микроорганизмов, собранная с поверхности конструкционных материалов
1	2
Физическая форма исследуемого материала	Сухая или влажная биопленка (биомасса)
Количество материала для выполнения исследований	100—150 мг сухой или влажной биомассы или 10—15 кусочков биопленки величиной 1—2 мм^3

Продолжение табл. 12

1	2
Приборное обеспечение	Электронный микроскоп по п. 6.1.1; дополнительное оборудование по п. 6.2.5
Материалы	Пинцет для электронно-микроскопических работ, электронно-микроскопические сеточки, пластинка тефлона размером 10 × 20 см, микропипетка вместимостью 50 мм^3, наконечники к микропипетке, колбы вместимостью 100 см^3, пробирки вместимостью 20 см^3, пипетки
Химические реактивы	Глутаровый альдегид, четырехокись осмия, какодилат натрия, этиловый спирт, абсолютный этиловый спирт или 100,0 % ацетон, эпоксидные смолы (аралдит или эпон), формвар, коллодий, амилацетат, дихлорэтан, уранилацетат, цитрат свинца, дистиллированная вода
Препарирование образцов для исследования в электронном микроскопе	Этап 1 (подготовка реактивов и материалов к эксперименту): – приготовление 4,0 %-го раствора глутарового альдегида на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – приготовление 2,0 %-го раствора четырехокиси осмия на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – приготовление батареи спиртов возрастающей концентрацией; – приготовление смеси абсолютного спирта и эпоксидной смолы (аралдита); – заливочная эпоксидная смола; – приготовление 0,15 %-го раствора формвара на дихлорэтане или 0,5 %-го раствора коллодия на амилацетате; – покрытие электронно-микроскопических сеточек формваровой (коллодиевой) пленкой; – приготовление 1,0 %-го раствора уранилацетата; –приготовление раствора цитрата свинца; – приготовление эпоксидной смолы. Этап 2 (препарирование образцов для электронной микроскопии): – биомассу бактерий фиксируют и инактивируют в 4,0 %-м растворе глутарового альдегида н 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2);

Продолжение табл. 12

1	2
	– бактерии дофиксируют в 2,0 %-м растворе четырехокиси осмия на ацетат-вероналовом буфере (по Ритер, Келенбергеру) (pH 6,0) или на 0,01 моль какодилатном буфере (pH 7,2); – образцы бактерий дегидратируют в нескольких сменах этилового спирта с возрастающей концентрацией, образцы выдерживают в трех сменах абсолютного этилового спирта или ацетона; – образцы бактерий пропитывают в трех сменах абсолютного этилового спирта и аралдита; – образцы бактерий заключают в аралдит и полимеризуют в течение 72 ч при температуре 60 °С; – на ультрамикротоме стеклянным ножом из образцов биопленки получают ультратонкие срезы толщиной 30,0—60,0 нм; – ультратонкие срезы монтируют на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой; – ультратонкие срезы наноматериала окрашивают цитратом свинца и 1,0 %-м раствором уранилацетата
Исследование ультраструктуры биопленки в просвечивающем электронном микроскопе	Согласно п. 6.3
Анализ электронно-микроскопических изображений ультраструктуры природной биопленки	Основные этапы: – визуализация наночастиц на ультратонких срезах биопленки; – морфометрический анализ наночастиц в структуре биопленки и клетках микроорганизмов; – определение степени полиморфизма наночастиц в структуре биопленки и клетках микроорганизмов; – определение степени агрегированности наночастиц в структуре биопленки; – оценка степени загруженности микробов наночастицами (число наночастиц на одну клетку)
Основные параметры и характеристики наночастиц в структуре природной биопленки для выдачи заключения	Структурные и морфометрические характеристики наноматериала: – наличие частиц размерами 1,0—100,0 нм в природной биопленке;

Продолжение табл. 12

1	2
	– уровень электронно-оптической плотности частиц; – форма частиц; – коэффициент формы наночастиц; – степень полиморфизма наночастиц в материале; – степень агрегированности наночастиц в биопленке и в микробах; –характер распределения частиц в микробах; – степень загруженности микробов наночастицами; – характер повреждений ультраструктуры микробов наночастицами; –количество бактерий в биопленке с интактной ультраструктурой; – число бактерий в биопленке с летальными повреждениями и др.

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в структуре биопленки содержат информацию о форме, структуре и размерах наночастиц в исследуемом материале, данные о степени агрегированности наночастиц, сведения о характере распределения наночастиц в биопленке, число частиц на один микроб, характер и степень повреждения микроорганизмов наночастицами, электронно-микроскопические изображения структуры биопленки, наночастиц и микробов.

7. Порядок применения атомно-эмиссионной спектрофотометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой при количественном определении наноматериалов

7.1. Перечень индикаторных химических элементов для различных типов искусственных наноматериалов

В табл. 13 представлен список искусственных наноматериалов, приоритетных с точки зрения их определения в объектах окружающей среды и приведены маркёрные химические элементы, позволяющие осуществить количественное определение наноматериалов данного типа.

Принадлежность наноматериала к определённому классу тестируется предварительно методами ПЭМ с использованием дополнительных аналитических опций.

Таблица 13

Список приоритетных наноматериалов и соответствующих индикаторных химических элементов для определения методами МС-ИСП и АЭС

№ п/п	Тип наноматериала	Индикаторный химический элемент	Возможности анализа (+/–)		Предел обнаружения мг/кг образца	Примечание
			МС-ИСП	АЭС		
1	Наночастицы золота	Au	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	Указаны пределы обнаружения для современных ИСП-МС измерительных комплексов с системами устранения полиатомных интерференций
2	Наночастицы серебра	Ag	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
3	Наночастицы диоксида титана (анатаз, рутил)	Ti	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
4	Наночастицы диоксида кремния (кварц, кремнезём)	Si	+++	++	$5 \cdot 10^{-6}$	
5	Наночастицы оксида алюминия	Al	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
6	Магнитные наночастицы	Fe Co Ni	+++	++	$3 \cdot 10^{-6}$	
7	Наночастицы оксида церия	Ce	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
8	Наночастицы глин	Al	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
9	Квантовые точки	Cd Se Te As	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
10	Наночастицы оксида цинка	Zn	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
11	Наночастицы оксида меди	Cu	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	
11	Нанотрубки	Fe Co Ni Cu	+++	++	$1 \cdot 10^{-6}$	

7.2. Требования к используемой аппаратуре

Используемые аналитические комплексы должны иметь возможность высокоточного многоэлементного анализа в широком линейном динамическом диапазоне, а также встроенную систему удаления полиатомных интерференций, основанную на физическом (столкновительном) принципе.

7.3. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению

Вспомогательное оборудование должно предоставлять возможность проведения серийной пробоподготовки для элементного анализа. Комплект оборудования должен включать:

1. Весы, точность до 0,0001 г;
2. Весы, точность до 0,001 г;
3. Систему для измельчения (гомогенизации) пробы;
4. Систему очистки кислот;
5. Систему микроволнового разложения проб с наборами сосудов, в зависимости от анализируемых объектов;
6. Набор дозаторов и пластиковой посуды для растворения проб.

7.4. Выбор оптимального метода пробоподготовки

Согласно мировой практике использования оборудования и литературным данным оптимальной методикой пробоподготовки перед проведением элементного анализа является измельчение пробы и микроволновое разложение.

7.5. Выбор оптимального режима работы аппаратуры

По результатам проведенных исследований установлены оптимальные режимы функционирования оборудования.

Взвешивание всех проб проводят на весах с точностью до 0,0001 г. Отобранные навески переносят в автоклавы, добавляют 10 $см^3$ азотной кислоты категории ОСЧ 27-5 ГОСТ 11125—84 и минерализуют с помощью системы микроволнового разложения.

Условия разложения:

– HNO_3 (70 %); программа минерализации.

Этап	1	2	3	4	5
Мощность магнетрона, %	50	50	50	50	0
Давление в автоклаве, PSI	40	80	120	160	0
Время удерживания, мин	3	4	4	4	0

После охлаждения полученных растворов в течении 30 мин отбирают аликвоты объемом 2 $см^3$ в контейнеры из полиэтилена низкого давления и добавляют 10 $см^3$ деионизованной воды. В качестве внутреннего стандарта в растворы вводят индий в концентрации 10 мкг/л. Для контроля чистоты реактивов проводят контроль содержания элементов в растворе кислот – холостая проба.

Полученные растворы анализируют с помощью масс-спектрометра с ионизацией в индуктивно связанной плазме.

Пример.

Условия анализа и рабочие параметры прибора Agilent 7500:

- скорость потока плазменного газа 15,0 л/мин;
- скорость потока вспомогательного газа 1,0 л/мин;
- скорость потока газа-носителя 1,22 л/мин;
- мощность радиочастоты плазмы 1 200 Вт;
- распылитель – PEEK, тип Babington;
- камера распыления – стеклянная двойного прохождения, температура камеры распыления 2 °С;
- инжектор горелки кварцевый;
- скорость ввода образца 0,5 $см^3$/мин;
- отбирающий конус и конус отражателя – материал никель;
- количество точек на ед. массы – 3.

7.6. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования

Полученные данные обрабатываются программным обеспечением с расчетом концентрационных параметров, устанавливаемых в количественном методе. Полученные результаты являются количественной оценкой валового содержания элементов в пробе. Для вычисления количественных значений загрязнения наночастицами необходимо вычитание

фоновых значений от заведомо чистой пробы. Суммарная погрешность метода не должна превышать 15 % СКО.

8. Порядок анализа углеродсодержащих наноматериалов (фуллерены) методом ВЭЖХ

8.1. Требования к используемой аппаратуре

Для проведения анализов углеродсодержащих наноматериалов (фуллеренов) рекомендуется использование системы высокоэффективной жидкостной хроматографии, снабженной колонкой размером 4,6 × 150 мм, заполненной С18 фазой с размером гранул 5 мкм, насосом высокого давления, детектором с диодной матрицей, петлевым инжектором (или автосемплером) и системой обработки хроматограмм.

8.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению

Перечень вспомогательного оборудования:

1. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» 1,5—2 $см^3$ со скоростью вращения до 3 000 об./мин.

2. Встряхиватель вибрационный со скоростью вращения до 3 000 об./мин.

3. Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104 с погрешностью ±0,0001 г.

4. Колбы мерные К 1-25-1 или К 1-25-2, К 1-50-1 или К 1-50-2, К 1-100-1 или К 1-100-2 по ГОСТ 1770—74.

5. Пипетки 4-1-1 или 5-1-1, 4-1-2 или 5-1-2, 4-2-10 или 5-2-10, 4-2-5 или 5-2-5 по ГОСТ 29227—91.

6. Виалы (емкость, вместимостью 4—6 $см^3$ с герметично завинчивающейся крышкой) с пластиковыми вставками, вместимостью 0,2—0,3 $см^3$.

7. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками типа «Эппендорф» объемом 1,5 $см^3$.

8. Штативы микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 $см^3$.

8.3. Требования к помещениям

Помещение лаборатории должно соответствовать санитарным правилам проектирования, оборудования, эксплуатации и содержания производственных и лабораторных помещений, предназначенных для проведения работ с веществами 1—2 класса опасности, органическими рас-

творителями. Аналитическая лаборатория должна быть оснащена вентиляционной системой согласно ГОСТ 12.4.021—75.

Температура окружающего воздуха должна быть от 15 до 25 °С. Относительная влажность воздуха не более 80 % при 25 °С. Напряжение электропитания 220 ± 10 В. Частота переменного тока 50,0 ± 0,2 Гц.

Выброс воздуха из вытяжки должен быть выведен наружу и оборудован воздушным фильтром для улавливания наночастиц.

8.4. Выбор оптимального режима работы аппаратуры

Выбор оптимального режима работы аппаратуры должен соответствовать техническим характеристикам прибора, указанным в прилагаемых к нему документации и инструкциях.

Хроматографическая колонка с силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом (ODS или С18), размер частиц 5 мкм, длина колонки 150 мм, внутренний диаметр колонки 4,6 мм или аналогичная.

Подвижная фаза: ацетонитрил: толуол (45 : 55, по объему).

Скорость подачи подвижной фазы: 1,0 $см^3$/мин.

Объем вводимой пробы от 1 до 100 $мм^3$.

Детектирование осуществляют при аналитической длине волны 340 нм (при использовании фотодиодноматричного детектора дополнительным подтверждением наличия фуллерена является совпадение УФ-спектра анализируемого вещества в диапазоне от 200 до 400 нм с УФ-спектром фуллерена).

8.5. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования

Полученные данные обрабатываются программным обеспечением с расчетом концентрационных параметров, устанавливаемых в количественном методе. Результаты являются количественной оценкой содержания соответствующих фуллеренов в пробе. Содержание фуллеренов в образцах рассчитывают методом абсолютной калибровки.

Стандартный график строят не менее чем по 5 точкам, рассчитывая его параметры по методу наименьших квадратов (линейная регрессия). Возможно использование встроенной программы обработки данных для построения стандартного графика.

Вычисления проводят до третьей значащей цифры. За результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений.

Контроль качества определений проводят с периодичностью 1 раз в день с использованием метода добавок. Для этого к проанализированной пробе добавляют стандарт фуллерена в количестве 50—150 % от открытого количества и анализируют повторно. Количество дополнительно открытого фуллерена в образце при этом должно составлять от 95 до 105 % от расчётного добавленного количества.

9. Порядок анализа биогенных наноматериалов методами ПЦР, электрофореза и иммуноферментного анализа

9.1. Требования к используемой аппаратуре

Приборы, оборудование и средства измерения, используемые в работе лаборатории, должны быть технически исправны, иметь технический паспорт и рабочую инструкцию по эксплуатации. Средства измерения регулярно подвергают метрологическому контролю. Используемые приборы должны соответствовать нормам безопасности и электромагнитной совместимости.

9.1.1 Требования к амплификаторам для проведения реакции ПЦР

Комплект лабораторного оборудования определяют с учетом используемых наборов реагентов для выделения ПК, амплификации и детекции результатов исследований. Помещение для каждого этапа проведения ПЦР обеспечивают своим набором лабораторного оборудования.

Для реализации метода применяются амплификаторы со следующими параметрами:

Температурный диапазон	35—99 °С
Скорость нагревания	1,5 °С/с
Скорость охлаждения	1 °С/с
Однородность распределения температуры по блоку	0,2 °С
Дискретность отображения температуры	0,1 °С
Число программ	20
Макс. число циклов/повторов	10/99

9.1.2. Требования к амплификаторам для проведения реакции ПЦР в реальном времени

Для постановки ПЦР в реальном времени требуется специальный амплификатор, отличительной особенностью которого является возможность возбуждать и детектировать флуоресценцию, отражающую накопление ампликонов, на каждом цикле амплификации.

Для реализации метода применяются амплификаторы с компьютерным управлением со следующими параметрами:

Динамическое термостатирование пробирок с пробами по задаваемой циклограмме в диапазоне, °С	4—99
Разброс температур по лункам, °С	± 0,15
Абсолютная погрешность температуры в лунке в диапазоне от 40 до 95 °С	± 0,1
Источник света	галогеновая лампа (гарантийный срок службы лампы – 4 000 ч)
Детектор света	ФЭУ
Длина волны возбуждения, нм	490, 530, 580, 630
Длина волны регистрации, нм	520, 550, 610, 670
Чувствительность каждого канала по соответствующим флуоресцентным красителям, не более М	$2,5 \cdot 10^{-9}$
Точность и воспроизводимость количества специфической ДНК в пробе в диапазоне	От 1 до 10^9 копий ДНК

9.1.3. Требования к фотометрическим счетчикам для проведения иммуноферментного анализа

Для реализации метода иммуноферментного анализа используются 96-луночные планшетные фотометры (счетчики), включающие в комплект:

- светофильтры для измерения OD 492 nm, 450nm, 540 nm, 405 nm, 595 nm;
- компьютерное или ручное программирование и возможность вывода данных на печать.

Система программирования и вывода данных на печать может осуществляться как ручным вводом, так и компьютерным управлением. Предпочтительнее использовать приборы, отличающиеся возможностью постоянного автоматического использования введенных программ, по-

зволяющие получать данные непосредственно в компьютерном виде, с возможностью последующей цифровой обработки результатов, графических построений и хранения данных.

9.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению

9.2.1. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению для проведения анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР

9.2.1.1. Требования к вспомогательному оборудованию для проведения анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР

Перечень вспомогательного оборудования:

1. Центрифуга для пробирок объемом 5—100 $см^3$.

2. Лабораторный встряхиватель (вортекс).

3. Микроцентрифуга от 12 до 16 000 g для микроцентрифужных пробирок, объемом 1,5 $см^3$.

4. Твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 $см^3$ с диапазоном рабочих температур 25—100 °С.

5. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема.

6. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками, объемом 1,5 $см^3$.

7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1 000 $мм^3$.

8. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 200 $мм^3$.

9. Штативы для наконечников, микропробирок, объемом 1,5 $см^3$.

10. Холодильник с камерами, поддерживающими температуру от 2 до 8 °С, –20 °С.

11. Емкость с дезинфицирующим раствором.

12. Одноразовые полипропиленовые пробирки для амплификации, объемом 0,5 (0,2) $см^3$.

13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 100 $мм^3$.

14. Штативы для наконечников, микропробирок на 0,5 (0,2) $см^3$.

15. Емкость для сброса отработанных расходных материалов.

16. Источник постоянного тока с напряжением 150—460 В.

17. Трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.

18. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.

19. Компьютер для анализа результатов электрофореза.

20. Микроволновая печь для плавления агарозы.

21. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы, объемом 250 см^3.

22. Мерный цилиндр, объемом 1 л.

23. Термостат планшетный, поддерживающий температуру 37 °С.

9.2.1.2. Требования к настольным автоклавам

Автоклав паровой настольный с горизонтальной загрузкой со следующими параметрами:

- стерилизующий агент – перенасыщенный водяной пар;
- каркас стерилизатора и внешние панели выполнены из нержавеющей стали;
- материал стерилизационной камеры выполнен из нержавеющей стали;
- материал корпуса двери выполнен из нержавеющей стали;
- объем стерилизационной камеры не менее 20 л;
- автоматическая блокировка дверей во время выполнения программы;
- визуальный контроль давления в камере, рубашке и парогенераторе;
- блокировка выполнения программы при аварийных ситуациях и сигнализация аварийных ситуаций;
- система управления полуавтоматическая.

9.2.1.3. Требования к приборам горизонтального электрофореза

Приборы для горизонтального электрофореза должны быть предназначены для разделения биомолекул в агарозном геле под действием электрического поля, включая разделение продуктов ПЦР, и должны соответствовать следующим характеристикам:

- электрофоретическая камера должна быть изготовлена из электрохимически нейтрального материала (органического стекла) и снабжена двумя съемными электродами из электрохимически нейтрального сплава;
- электронная схема отключения должна предусматривать автоматическое обесточивание камеры при снятии крышки;
- предельно допустимое рабочее напряжение, В – 300;
- предельно допустимый разогрев прибора при работе – 50, °С.

9.2.1.4. Требования к ламинарным шкафам

Ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха должен соответствовать следующим характеристикам:

Эффективность HEPA- фильтра	99,997 % для частиц > 0,3 мкм
Скорость потока	> 0,45 м/с
Интенсивность освещения	> 1 000 Люкс
Потребляемая мощность, не более	500 Вт
Питание	220 В; 50 Гц

9.2.1.5. Требования к помещениям для проведения анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР

Внутреннюю отделку помещений выполняют в соответствии с их функциональным назначением. Поверхности стен, пола и потолка в лабораторных помещениях должны быть гладкими, без щелей, легко обрабатываемыми, устойчивыми к действию моющих и дезинфицирующих средств. Полы не должны быть скользкими.

Помещение должно быть разделено на три зоны — по числу технологических операций:

1. Зона подготовки реакционной смеси.

2. Зона пробоподготовки.

3. Электрофоретическая комната (для проведения качественного анализа биогенных наноматериалов).

Все три зоны должны быть изолированными комнатами, снабженными предбоксниками и оснащены устройствами фильтрации воздуха.

Должны быть выделены отдельные помещения для переодевания и хранения верхней одежды, приема пищи, складское помещение для лабораторных материалов.

Перемещение пробирок, штативов и т. п. должно производиться только в одном направлении. При этом потоки не должны пересекаться.

Материал, поступивший в лабораторию, должен быть как можно быстрее обработан в комнате пробоподготовки. В эту же комнату должны поступать пробирки с реакционной смесью, приготовленные в комнате подготовки реакционной смеси, для внесения в них подготовленных препаратов ДНК. Готовые пробирки помещают в амплификатор, а после термоциклирования, не открывая крышек, перемещают в комнату для электрофореза.

Все операции (подготовка реакционной смеси, пробоподготовка, электрофорез) должны выполнять разные люди.

Подготовку реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксе, снабженном электрическими розетками, лампами дневного и ультрафиолетового света.

9.2.1.6. Требования к техническому оснащению помещений для проведения анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР

Помещения на всех этапах ПЦР-анализа оборудуют бактерицидными лампами в соответствии с «Методическими указаниями по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях» от 28.02.95 № 11-16/03-06. Бактерицидные лампы в помещениях ПЦР-лаборатории устанавливают из расчета 2,5 Вт/м^3.

Для обработки материала должны быть установлены ламинарные шкафы, обеспечивающие горизонтальный поток воздуха, а также возможность работы без ламинарного потока и длительную экспозицию облучения внутренних поверхностей ультрафиолетовым светом.

Инактивацию биологического материала проводят в автоклаве в течение 1 ч при 1,5 атм. Допускается использование настольных автоклавов.

Все производственные комнаты должны быть снабжены необходимым оборудованием и расходными материалами, в т. ч. халатами, закрепленными за соответствующими помещениями.

Лабораторная мебель должна иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих средств. Поверхность столов не должна иметь трещин и швов.

Для проведения исследования используют приборы и расходные материалы (пробирки, наконечники к микродозаторам), исключающие возможность перекрестной контаминации исходного материала, выделенных НК и продуктов ПЦР. Для этого используют:

- термостаты с твердотельным термоблоком;
- пробирки с плотно закрывающимися крышками;
- одноразовые пробирки и наконечники к микродозаторам;
- наконечники, строго соответствующие автоматическим пипеткам, а пробирки для амплификации – термоциклерам (в соответствии с инструкцией фирмы-производителя прибора), смена наконечников после завершения каждой манипуляции является обязательной;
- специальные контейнеры для сброса использованных наконечников и пробирок, устанавливаемые на рабочих местах.

Для каждого этапа проведения ПЦР-исследований необходимо предусмотреть наличие холодильников:

• в комнате приема материала от 4 до 8 °С, –20 °С – для хранения исследуемых проб;

• в комнате выделения НК от 4 до 8 °С и –20 °С – для хранения набора выделения НК; от 4 до 8 °С – для хранения препаратов НК; не допускается хранение препаратов НК в одном холодильнике с компонентами набора для выделения НК;

• в комнате ПЦР-амплификации от 4 до 8 °С и –20 °С – для хранения наборов обратной транскрипции и амплификации НК;

• в комнате детекции продуктов амплификации от 4 до 8 °С – для хранения наборов электрофоретической детекции.

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731—99 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности и гельминтами». В комнатах, в которых проводят работу с выделенными НК, рабочие поверхности, штативы, оборудование следует обеззараживать ежедневно ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч. Полы ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами. Перед началом работы рабочую поверхность столов дополнительно обрабатывают 70 %-м этиловым спиртом. Ежемесячно проводят профилактическую обработку рабочей поверхности столов и штативов 1 Н соляной кислотой.

Обеззараживание проб проводят в соответствии с МУ 3.5.5.1034—01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I—IV групп патогенности, при работе методом ПЦР».

9.2.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению для проведения анализа биогенных наноматериалов методом иммуноферментного анализа

9.2.2.1. Требования к вспомогательному оборудованию

При проведении ИФ-анализа, применяется следующее вспомогательное оборудование:

• автоматические пипетки с переменным объемом для пробоподготовки и 8-канальные автоматические пипетки с переменным объемом для проведения анализа;

• холодильники бытовые, имеющие низкотемпературную камеру (–10—18 °С) и камеру 2—8 °С;

• автоматические промывочные 96-луночные планшетные устройства при массовых исследованиях свыше 100 образцов;

- термостаты-шейкеры с температурным диапазоном 22—40 °С;
- дистиллятор или деионизатор воды;
- ламинарный бокс с вертикальным воздушным потоком;
- аналитические весы;
- pH-метр;
- настольная центрифуга типа «Эппендорф» с охлаждением (1 000—20 000 об./мин, 4 °С).

9.2.2.2. Требования к помещениям для проведения анализа биогенных наноматериалов методом иммуноферментного анализа

Помещения, в которых располагается оборудование для исследований, должны отвечать следующим требованиям:

1. Температура воздуха в помещении 18—25 °С, влажность – (65 ± 15) %, напряженность магнитного поля – не более 0,2 мкТл, шумоизоляция и вентиляция согласно гигиеническим нормам труда.

2. Электропроводка должна соответствовать мощности приборов и иметь заземляющий контур.

3. Помещение должно быть оборудовано водопроводом с подачей воды 0,3 $м^3$/ч (15 ± 5 °С) с системой бактериальной фильтрации и химической дезактивации использованной воды.

4. Выброс воздуха из ламинарного бокса должен быть выведен наружу и оборудован воздушным фильтром для улавливания наночастиц.

9.3. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования

Результаты качественного анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР получают путем проведения электрофореза в агарозном геле – пробы, полученной в результате ПЦР (30—40 циклов), и визуальной оценки. Результаты количественного анализа биогенных наноматериалов методом ПЦР в реальном времени получают путем мониторинга накопления продуктов реакции с помощью автоматической (компьютерной) регистрации и интерпретации полученных результатов в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору для проведения ПЦР, – реакции в реальном времени.

Результаты и заключение иммуноферментного анализа по определению наночастиц в биологических образцах должны содержать информацию о количестве специфических наночастиц в исследуемом материале с приведенным расчетом по формуле и в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору для проведения ИФА, а также – данные печатного

протокола измерения калибровочного контрольного стандарта и исследуемого образца.

10. Порядок анализа биогенных наноматериалов на основе корового белка вируса гепатита В

Для первичного и последующего контроля стандартного образца наноматериала на основе корового белка гепатита В используется метод денатурирующего белкового электрофореза в полиакриламидном геле (метод Laemmli 1970). По его данным проверяют соответствие молекулярной массы стандарта и наличие белковых примесей. Полоса, соответствующая рекомбинантному коровому антигену гепатита В, находится в диапазоне между 15 и 20 кДа.

10.1. Требования к используемой аппаратуре

Для подтверждения соответствия и количественного определения наноматериалов на основе корового белка гепатита В используется иммуноферментный анализ, основанный на взаимодействии анализируемого материала с моноклональными антителами против корового антигена вируса гепатита В (HBcAg).

Характеристики планшетного спектрофотометра:

- режимы работы – конечная точка, кинетика;
- возможность подключения к компьютеру;
- режим встряхивания;
- возможность обработки данных и построения стандартных кривых;
- светофильтры 405 и 450 нм.

10.2. Требования к вспомогательному оборудованию, помещениям, техническому оснащению

Типовые эксперименты могут проводиться в соответствии со II или III уровнями биологической безопасности по классификации ФЗ-86 «О Государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (1996 г.) или III—IV уровнями патогенности микроорганизмов в соответствии с санитарными правилами для работы с микроорганизмами I—II либо III—IV групп патогенности и правилами по работе с рекомбинантными молекулами ДНК (1989 г.).

Работа с наноматериалами корового белка должна проводиться в соответствии с требованиями по обеспечению биологической безопасности СП 1.2.2322—08.

Руководство лаборатории несет ответственность за обеспечение надежных мер безопасности по защите персонала лаборатории.

2-й уровень (низкий) – Ф2 (BL2) – 3-й уровень (средний) – Ф3 (BL3).

Для экспериментов необходима лаборатория, имеющая специальные инженерные конструкции и защитное оборудование:

1. Помещения, в которых располагается оборудование, должны отвечать требованиям, предъявляемым к лабораториям общего и аналитического профиля. Температура воздуха в помещении 18—25 °С, влажность – 65 ± 15 %.

2. Помещение должно быть оборудовано водопроводом с подачей воды 0,3 $м^3$/ч (15 ± 5°С) с дренажной системой.

3. Электропроводка должна соответствовать суммарной мощности электрооборудования.

4. Вспомогательное оборудование:

- система получения высокоочищенной воды (качества MQ);
- вибромешалка для плашек ИФА;
- восьмиканальный дозатор для промывки плашек ИФА;
- механические дозаторы 20, 100, 200 и 1 000 $мм^3$.

5. На дверях лаборатории, оборудовании, контейнерах и материалах устанавливается знак биологической опасности. Им также помечаются наноматериалы.

6. Вход в лабораторию разрешается только тем лицам, чье присутствие предусмотрено программой исследований и утверждено руководителем лаборатории.

7. Автоклав следует устанавливать в лаборатории.

8. Поверхности стен, столов и потолков должны легко очищаться и деконтаминироваться.

9. Режим и условия работы приборов, создающих опасность образования аэрозоля (вибромешалки, водоструйные насосы, лиофилизаторы, дозаторы и т. п.), организуются таким образом, чтобы свести к минимуму поступление частиц аэрозоля в воздух помещения.

10. Должны использоваться боксы с ламинарным потоком воздуха или боксы с вытяжной вентиляцией во всех случаях, когда возможно образование аэрозоля с НЧ. Не допускается рециркуляция воздуха. Применяется правило «Работа вдвоем». Состояние воздуховодов и фильтров ежегодно проверяется работниками специальной ведомственной службы, что оформляется техническим актом.

11. Использованные в опыте материалы, содержащие наночастицы корового белка, обеззараживаются.

12. Непосредственно после завершения экспериментов рабочие поверхности боксов и другого оборудования обеззараживаются.

13. Стеклянная посуда, которая употреблялась при анализах, перед повторным использованием должна стерилизоваться непосредственно в лаборатории или помещаться в прочные герметичные контейнеры до удаления из лаборатории; эти контейнеры и их содержимое следует стерилизовать при повторном применении.

14. Вакуумные линии необходимо защищать фильтрами и ловушками для жидкости, которые периодически подвергаются техническому осмотру персоналом. Периодичность осмотра определяется руководителем исследований.

15. Допускается проведение экспериментов, требующих физической защиты уровня Ф3, в лабораториях, где создан направленный поток воздуха, но устройство вытяжной вентиляции не соответствует полностью уровню Ф3.

16. При работе с лиофилизованными материалами должны использоваться одноразовые перчатки из 100 % нитрила с хорошей целостностью. Перчатки с удлиненным рукавом являются полезными для предотвращения загрязнения лаборатории, халата или костюма. Перчатки необходимо менять после использования наноматериалов или если подозревается загрязнение. Хранить загрязненные перчатки необходимо в пластиковых пакетах или герметичных контейнерах в накопителе отходов вплоть до их утилизации. Следует тщательно мыть руки и предплечья после работы с наноматериалами. Обязательно использование одноразовых лабораторных халатов и хранение их в специально отведенных шкафах.

17. Для защиты органов дыхания необходимо использовать респираторы противоаэрозольные с дополнительной защитой:

Респиратор BLS – 215 ГОСТ 12.4.041—89. 2-я степень защиты

Респиратор BLS – 225. ГОСТ 12.4.041—89. 2-я степень защиты

Респиратор BLS – 520А ГОСТ 12.4.041—89. 3-я степень защиты

18. Исключается пипетирование ртом. При работе необходимо использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером, при этом обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой.

19. Использованные наконечники хранить в одноразовых герметичных контейнерах в накопителе отходов вплоть до их утилизации или сбрасывать в специальную емкость с 1Н раствором соляной кислоты.

Лаборатория должна иметь комплект для ликвидации случайной утечки, рассыпания и пролива наночастиц: огораживающие ленты, нитриловые перчатки, одноразовые респираторы, адсорбирующие материалы, салфетки, пластиковые мешки. Небольшие количества наноматериалов могут быть уничтожены с помощью мокрой очистки поверхностей салфетками из абсорбирующего материала. Рассыпанные лиофилизованные суспензии могут быть удалены с помощью пылесоса, специально оснащенного фильтром HEPA (High Efficiency Particle Absorbption) класса Н 13 (эффективность задержания частиц размером около 0,06 микрон – 99,95 %). Для обеспечения эффективной задержки наночастиц фильтр устанавливается на выпускном клапане в целях предотвращения рассеивания в воздухе лаборатории.

10.3. Выбор оптимального режима работы аппаратуры

Требования к анализируемым материалам:

• Агрегатное состояние – жидкость. Для определения биогенных наноматериалов в воздушной среде, почве, тканях растений или животных объект необходимо перевести в жидкое состояние любым общепринятым методом, избегая при этом экстремальных значений температуры, pH и использования реагентов, способных вызвать денатурацию детектируемого вещества.

• Минимальное содержание наноматериала на основе корового белка гепатита В в пробе – 2 нг/ $см^3$.

• Находящиеся в анализируемом растворе вещества не должны влиять на взаимодействие антитела с антигеном. Анализ всех образцов должен сопровождаться постановкой положительных и отрицательных контролей.

10.4. Расчёт, метрологическая характеристика и интерпретация результатов исследования

10.4.1. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) основан на высокой избирательности и специфичности иммунологических реакций «антиген-антитело». Данный метод позволяет определить присутствие корового антигена гепатита В в исследуемом растворе и определить его концентрацию.

10.4.1.1. Расчет и интерпретация результата

В качестве стандартов используются образцы корового антигена гепатита В с известной концентрацией в интервале от 1 до 50 нг/$см^3$. По

полученным значениям строится калибровочная кривая. Калибровочная кривая определяет зависимость измеренного поглощения от количества белка в ячейке. Содержание корового антигена гепатита В в образцах вычисляется по полученной калибровочной кривой.

10.4.1.2. Метрологическая характеристика метода

- Минимальное открываемое количество – 0,1 нг.
- Диапазон линейности стандартного графика – 2—100 нг/см^3.
- Приемлемый коэффициент вариации для анализа образца:

а) по одному стандартному графику – не более 10 %;

б) по разным стандартным графикам в разных сериях опытов – не более 12 %.

- Воспроизводимость (сходимость результатов) – 9 %.
- Тест на открытие (проверка линейности анализа методом добавок) – 91—108 %.

10.4.2. Денатурирующий белковый электрофорез в полиакриламидном геле

Данный метод дает возможность определения молекулярной массы исследуемых белков по их подвижности в денатурирующем полиакриламидном геле.

10.4.2.1. Расчет и интерпретация результата

Для определения молекулярной массы рекомбинантного корового антигена гепатита В в одну из ячеек ПААГ-геля наносится маркер, имеющий известные молекулярные массы. После проведения опыта положение полосы, соответствующей целевому продукту, сравнивается с положением полос маркера. Молекулярная масса исследуемого образца должна находиться в интервале полос маркера, соответствующим 15—20 кДа. Отсутствие на геле других видимых полос свидетельствует о гомогенности и чистоте препарата.

Приложение 1
(справочное)

Наименование и краткие характеристики аппаратуры, используемой при контроле содержания наноматериалов методом электронной микроскопии

Для выявления и идентификации наночастиц методом электронной микроскопии могут использоваться электронные микроскопы фирм «Цейс» (Zeiss, Германия) и «Джеол» (Jeol, Япония) из списка, приведенного ниже (по состоянию на начало 2010 г.), а также электронные микроскопы других производителей с характеристиками, соответствующими требованиям п. 6.1.1.

Электронные микроскопы фирм «Цейс» (Zeiss, Германия).

1. Просвечивающий электронный микроскоп, модель LEO 912AB. Ускоряющее напряжение 120 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,34 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 80 до 500 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 1,5 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС.

2. Просвечивающий электронный микроскоп, модели Libra 120 и Libra 120 Plus. Ускоряющее напряжение 120 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,34 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 8 до 630 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 1,5 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС.

3. Просвечивающий электронный микроскоп, модели Libra 200 FE HR и Libra 200 FE HT. Ускоряющее напряжение 200 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,24 нм (по паспорту Libra 200 FE HR), 0,29 нм (по паспорту Libra 200 FE HT) и диапазоном увеличений от 8 до 1 000 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 0,7 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС.

4. Просвечивающий электронный микроскоп, модели Libra 200 MC HR и Libra 200 MC HT. Ускоряющее напряжение 200 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,24 нм (по паспорту Libra 200 MC HR), 0,29 нм (по паспорту Libra 200 MC HT) и диапазо-

ном увеличений от 8 до 1 000 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 0,2 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС.

Электронные микроскопы фирмы «Джеол» (Jeol, Япония).

1. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-1230. Ускоряющее напряжение 120 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,38 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 50 до 800 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 1,5 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

2. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-1400. Ускоряющее напряжение 120 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,38 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 50 до 1 200 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 1,5 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

3. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-2100. Ускоряющее напряжение 200 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,19 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 50 до 1 200 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 1,5 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

4. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-2100F. Ускоряющее напряжение 200 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,19 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 50 до 1 200 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 0,7 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

5. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-2200FS. Ускоряющее напряжение 200 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,19 нм (0,07 нм с включенным корректором аберраций) и диапазоном увеличений от 50 до 1 500 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением

0,7 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

6. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-ARM200F. Ускоряющее напряжение 200 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,08 нм (СПЭМ)/0,11 нм (ПЭМ) и диапазоном увеличений от 50 до 2 000 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 0,7 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

7. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-3100F. Ускоряющее напряжение 300 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,17 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 60 до 1 500 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 0,7 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

8. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-3200FS. Ускоряющее напряжение 300 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,17 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 100 до 1 500 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 0,7 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

9. Просвечивающий электронный микроскоп, модель JEM-ARM1300. Ускоряющее напряжение 1 300 кВ, режим просвечивающей электронной микроскопии с разрешением 0,1 нм (по паспорту) и диапазоном увеличений от 200 до 1 500 000, режим дифракции электронов, режим измерения спектров ХПЭЭ с разрешением 1,5 эВ, режим элементного картирования на основе СХПЭЭ, цифровая система регистрации изображений на основе ПЗС-камеры.

Приложение 2
(справочное)

Список использованных сокращений

ВЭЖХ – Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭП – Высокая электронная плотность
ИСП-МС – Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
ИФА – Иммуноферментный анализ
МР – Методические рекомендации
НЭП – Низкая электронная плотность
ОТ – Обратная транскрипция
ПЦР – Полимеразная цепная реакция
ПЭМ – Просвечивающая электронная микроскопия
СОП – Стандартные операционные процедуры
СХПЭЭ – Спектр характеристических потерь энергии электронов
ЭФ в ПААГ – Электрофорез в полиакриламидном геле

Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях наноиндустрии

Методические рекомендации
МР 1.2.2639—10

Редактор Е. В. Николаева
Технический редактор Г. И. Климова

Подписано в печать 23.09.10

Формат 60x88/16 Печ. л. 5,25
Тираж 200 экз. Заказ 70

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