

Развитие оптико-спектральных методов измерений параметров наночастиц в жидких средах

А. Д. ЛЕВИН¹, А. И. НАГАЕВ¹, В. А. ПРИБИТКОВ¹, А. Ю. САДАГОВ¹,
Е. А. ШМЫТКОВА^{1, 2}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт оптико-физических измерений,
Москва, Россия, e-mail: levin-ad@vniiofi.ru

² ГНЦ «Центр Келдыша», г. Москва, Россия, e-mail: oblokat@mail.ru

Рассмотрены результаты работ, проводившихся в лаборатории оптико-спектральных приборов ВНИИОФИ в 2009–2014 гг. Расширены возможности динамического рассеяния света и атомно-абсорбционной спектроскопии по определению геометрических параметров и концентрации наночастиц в жидких средах. Разработаны новые средства и методики измерений в биологических жидкостях (крови и плазме). С целью обеспечения единства измерений во флуориметрии предложен и реализован новый подход к созданию стандартных образцов на основе наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы, диагностика, оптико-спектральные методы, флуориметрия, суспензия, метод деполяризованного динамического рассеяния света, стандартные образцы, представительность пробы, производительность анализа.

The possibilities of dynamic light scattering and atomic absorption spectrometry for size and concentration measurement of nanoparticles in liquid media have been extended. New instruments and techniques for measuring nanoparticle parameters in biological fluids (plasma and blood) have been developed. The new approach for development of nanoparticle based certified reference materials to ensure the uniformity of measurements in fluorimetry was proposed and implemented.

Key words: nanoparticles, characterization, optical-spectral methods, fluorimetry, suspension, depolarized dynamic light scattering method, certified reference materials, sample representativity, throughput of analysis.

С конца 2008 г. во ВНИИОФИ ведутся работы по диагностике наночастиц в жидких средах, прежде всего в коллоидных системах. В 2008—2011 гг. исследования проводили в рамках Федеральной целевой программы (ФЦП) «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации». В результате создан метрологический комплекс, включающий модули абсорбции и флуоресценции, динамического рассеяния света и атомно-абсорбционный [1]. На данном комплексе выполняли работы исследовательского и прикладного характера. С 2014 г. в соответствии с ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 гг.» институт выполняет прикладное научное исследование (ПНИ) по разработке методов и аппаратуры для измерений геометрических параметров несферических наноразмерных объектов в жидких средах.

Интерес к наночастицам в жидких средах обусловлен как расширением областей их применения, так и целым рядом физических и физико-химических эффектов, связанных с такими частицами. Наночастицы широко применяют в различных видах нанотехнологий от наноэлектроники и наноэнергетики до биомедицинских, при создании нанокомпозитных материалов. Во многих приложениях наноразмерные частицы используются именно в жидкости, например в биомедицинских нанотехнологиях. Поэтому информация о характеристиках (геометрических параметрах, концентрации в суспензии, электрическом заряде, химическом составе и др.) взвешенных в жидкостях нанообъектов актуальна для контроля нанопроизводства как в производственных условиях, так и

при контроле готовых изделий, а также при изучении токсичных свойств наноматериалов.

Для измерений параметров наночастиц применяют методы микроскопии высокого разрешения (электронной и атомно-силовой) и различные физико-химические методы, не связанные с визуализацией исследуемых объектов. Электронная и атомно-силовая микроскопия дают подробную информацию о размерах и форме исследуемых нанообъектов. Оптико-спектральные методы, как правило, менее информативны по сравнению с микроскопией высокого разрешения, имеют ряд преимуществ: возможность измерять параметры частиц непосредственно в жидкости; высокую представительность пробы; более высокую, по сравнению с электронной микроскопией, производительность анализа; простоту пробоподготовки.

Ниже представлены результаты исследований по разработке и совершенствованию оптико-спектральных методов диагностики наночастиц, а также использованию их оптических свойств для обеспечения единства измерений во флуориметрии.

1. *Развитие метода динамического рассеяния света для несферических наночастиц.* Данный метод часто применяют для контроля среднего гидродинамического диаметра сферических наночастиц. Для измерений геометрических параметров несферических частиц известен метод деполяризованного динамического рассеяния света (ДДРС) [2], основанный на регистрации флуктуаций интенсивности рассеянного излучения на броуновских частицах в жидкости. В методе ДДРС используется деполяризация линейно-по-

ляризованного излучения при его рассеянии несферическими частицами. При этом измеряют скорость затухания флуктуаций рассеянного излучения при двух разных поляризациях: одна из них совпадает с поляризацией возбуждающего излучения (ко-поляризационная), другая перпендикулярна ей (кросс-поляризационная). Для определения скорости затухания флуктуаций используют автокорреляционную функцию (АКФ) интенсивности рассеянного излучения, с помощью которой вычисляют коэффициенты трансляционной и ротационной диффузии частиц, зависящие от их размера и формы. Определив коэффициенты диффузии по АКФ, измеренным при двух разных поляризациях, можно с помощью модели диффузии частиц определенной формы вычислить их геометрические параметры.

Недостаток метода ДДРС — необходимость измерения кросс-корреляционной компоненты — очень слабого излучения, что требует либо использования мощных лазеров, либо большой длительности измерения. Применение мощных лазеров нежелательно, поскольку, кроме увеличения габаритных размеров и стоимости установки, оно может приводить к фотохимической деградации исследуемого образца.

Для устранения необходимости измерений очень слабых оптических сигналов разработан усовершенствованный вариант ДДРС — метод частично деполяризованного динамического рассеяния света (ЧД ДРС). Предложено измерять зависимости интенсивности рассеянного излучения от времени при нескольких положениях поляризационного анализатора, т. е. при различных соотношениях поляризованной и деполяризованной составляющих рассеянного излучения. Построена теория ЧД ДРС и получены математические выражения для АКФ рассеянного излучения при произвольном угле φ поворота поляризационного анализатора. Разработаны алгоритмы решения обратных задач рассеяния и диффузии, позволяющие по измеренным АКФ рассеянного излучения вычислять диаметр и длину частиц, форма которых близка к цилиндрической [3]. Это позволяет снизить время измерения и исключает необходимость регистрировать очень слабые сигналы при измерении кросс-поляризационной компоненты и использовать лазеры высокой мощности. Измерение и обработка АКФ при нескольких значениях φ дает дополнительные данные для решения обратной задачи рассеяния, что позволит повысить надежность определения коэффициентов трансляционной и ротационной диффузии. Метод ЧД ДРС реализован на разработанном во ВНИИОФИ анализаторе размеров наночастиц АРН-2, оптическая схема которого приведена на рис. 1.

С помощью метода ЧД ДРС измеряли геометрические параметры многослойных углеродных нанотрубок и золотых наностержней, находящихся в водной дисперсии. Сопоставление значений длины частиц, полученных этим методом и методами электронной микроскопии (просвечивающей и сканирующей), приведено в таблице, более подробно эти результаты представлены в [4].

2. *Совместное определение элементного состава и размеров наночастиц.* При исследовании коллоидных систем, содержащих наночастицы, важны данные как об их химическом составе, так и о формах, в которых находятся со-

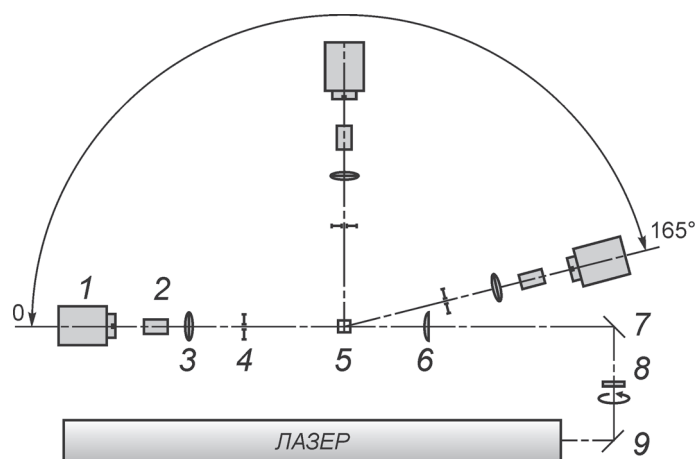


Рис. 1. Оптическая схема анализатора размеров наночастиц АРН-2:

1 — модуль счета фотонов; 2 — призма Глана-Томпсона; 3, 6 — линзы; 4 — диафрагма; 5 — кювета; 7, 9 — зеркала; 8 — поляризационный фильтр

Длина наночастиц, нм, измеренная разными методами

Образец	Электронная микроскопия	Метод частично деполяризованного динамического рассеяния света
Золотые наностержни	57,4±6,1	60,6
Многослойные углеродные нанотрубки	335±15	379

ответствующие вещества. Например, при токсикологических исследованиях наноматериалов требуется отличать, присутствует ли данный металл в жидкости в виде наночастиц или растворенных ионов. Во ВНИИОФИ разработан метод, позволяющий не только отличать наноразмерные металлические частицы от ионов того же металла, но и оценивать размеры этих частиц [5]. Метод основан на атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией и использовании обнаруженных авторами отличий в протекании процессов атомизации в истинных и коллоидных растворах наночастиц. Показано, что атомизация коллоидных растворов одного и того же элемента в атомно-абсорбционном спектрометре с быстро нагреваемой графитовой печью происходит с запаздыванием по сравнению с истинными растворами, причем время запаздывания возрастает с увеличением размера наночастиц. Данный эффект вызван дополнительными затратами энергии на разрушение связей между атомами нанокластера. На основе этой закономерности предложен метод измерений, в котором время запаздывания используется в качестве аналитического сигнала.

Другая особенность процесса атомизации заключается в том, что его эффективность при снижении температуры T в графитовой кювете относительно оптимальной для данного элемента $\tilde{T}_a$ снижается, причем в коллоидных растворах значительно больше, чем в истинных, и возрастает с увеличением размеров частиц. Указанную закономерность можно объяснить тем, что атомизация более крупных частиц при снижении температуры происходит медленнее. Показателем

снижения эффективности этого процесса является отношение оптических плотностей атомного пара $A(T)/A(\tilde{T}_a)$, которое можно использовать в качестве аналитического сигнала.

Для определения размера частиц анализируемых образцов с помощью нескольких других образцов с известными параметрами (например, стандартных образцов (СО)) нужно построить градуировочный график по одному из аналитических сигналов (рис. 2). Подчеркнем, что таким образом оценку размера проводят на том же приборе с помощью той же аналитической процедуры, что и измерение массовой концентрации элемента, входящего в состав наночастиц. Разработана и аттестована методика измерений [6], регламентирующая эту процедуру, которую применяли, в частности, для оценки размеров золотых наночастиц в воде и в разбавленных растворах капиллярной крови. При этом погрешность определения размеров не превышала 10 % [7].

3. *Исследование наночастиц, предназначенных для биомедицинских приложений.* В 2008—2010 гг. в институте проводили работы по адаптации оптико-спектральных методов к измерениям параметров наночастиц в биологических жидкостях и тканях организма в связи с разработками биомедицинских нанотехнологий — как лечебных (адресная доставка лекарств с помощью наноразмерных носителей, фотодинамическая терапия с использованием нанорецепторов), так и диагностических (наносенсоры). Результаты работ представлены в [8].

При подготовке и проведении измерений необходимо учитывать особенности биологических проб из-за присутствия макромолекул, сравнимых по размерам с исследуемыми наночастицами, и разнообразных эффектов взаимодействия этих частиц с компонентами пробы. Протестирована методика измерений размеров наночастиц методом динамического рассеяния света в цельной крови и плазме, включая специальные процедуры пробоподготовки. В случае исследований в цельной крови необходимо было исключить рассеяние на эритроцитах. Для этого проводили их лизирование (разрушение) соответствующими реагентами. В ходе опытов на золотых наночастицах диаметрами 30 и 100 нм обнаружено увеличение среднего гидродинамического диаметра наночастиц при их попадании в цельную кровь и плазму, причем относительное увеличение сильнее

для частиц диаметром 30 нм. Данный эффект можно объяснить частичной агрегацией частицы и образованием вокруг нее оболочки из белков крови. Возникновение белковых оболочек вокруг наночастиц приводит к существенному изменению их оптических свойств, в частности спектров рассеяния. Подобные эффекты представляют интерес для создания оптических наносенсоров, обнаружения различных биологических молекул (ДНК, белков и т. п.) и детектирования в них изменений вследствие патологических или других процессов [9].

Для определения счетной концентрации частиц в плазме и крови использовали спектры абсорбции и рассеяния. В случае золотых наночастиц благодаря пикам плазмонного резонанса можно разделить рассеяние на частицах и других наноразмерных объектах биологической пробы, обеспечив тем самым селективность анализа. Таким образом, удастся с высокой точностью и селективностью определять счетные концентрации наночастиц, начиная с 10^7 см^3 . Совместная обработка спектров рассеяния и поглощения позволяет количественно оценивать степень агрегации наночастиц.

Исследована возможность использования наночастиц при определении биологических молекул в жидких средах. Показано, что в спектральном диапазоне 200—600 нм спектры рассеяния серебряных наночастиц диаметром порядка 10—15 нм значительно изменяются при их взаимодействии с молекулами белков. Эти изменения зависят от типа белка, его концентрации и модификации, например, в результате окисления. Обнаружены, в частности, значимые различия в форме спектров рассеяния двух основных белков плазмы крови — альбумина и фибриногена, а также альбумина с различными степенями окисления. В спектрах рассеяния этих белков определены линии, интенсивность которых хорошо коррелирует с концентрацией белка. Проведенные исследования указывают на возможность создания оптических наносенсоров на основе коллоидных растворов наночастиц для обнаружения и оценки концентраций белковых молекул в жидкостях, а также детектирования изменений (модификации) этих молекул в процессах окисления.

Для реализации методик с использованием спектров различной физической природы (например, абсорбции и флуоресценции, или абсорбции и рассеяния) в институте разработан прибор СФФ-2 «Флуоран», впервые совмещающий в одном средстве измерений двухлучевой спектрофотометр и спектрофлуориметр.

4. *Стандартные образцы для флуориметрии на основе наночастиц двуокиси кремния.* Одна из важных задач обеспечения единства измерений во флуориметрии — получение аппаратно-независимых (скорректированных) спектров эмиссии, т. е. зависящих только от свойств образца, но не от характеристик используемого прибора. Это необходимо для флуоресцентных методов идентификации веществ и образцов продукции, для измерения квантового выхода флуоресценции, а также при сравнении результатов, полученных на спектрофлуориметрах разного типа [10]. Идентификация по спектрам флуоресценции востребована при контроле лекарственных препаратов, пищевых продуктов, сертификации различных видов продукции. Для получения аппаратно-независимых спектров необходима спектральная калибровка эмиссионных каналов спектрофлуориметров, которую чаще всего выполняют с помощью СО. Стандартные образцы должны воспроизводить спектры с известной зависимостью

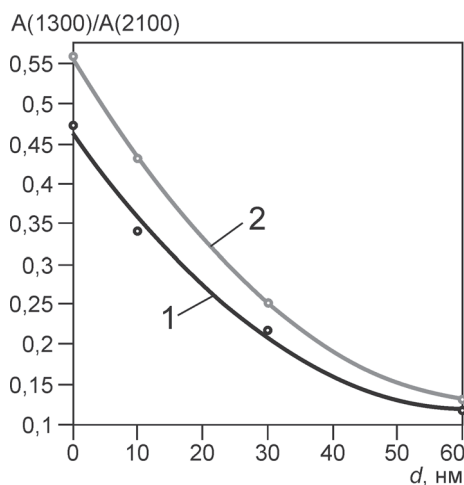


Рис. 2. Зависимость полноты атомизации от размера наночастиц золота в воде (1) и крови (2), разбавленной в 200 раз

интенсивности свечения от длины волны. С этой целью обычно используют СО на основе растворов химических красителей, спектры флуоресценции которых являются аттестуемыми характеристиками. Каждый такой краситель имеет довольно узкий спектральный интервал, поэтому для градуировки требуются наборы, состоящие из растворов нескольких красителей. Такие растворы нестабильны во времени и подвержены фотодеградаци.

Авторами предложен и реализован новый подход к созданию СО для калибровки эмиссионных каналов спектрофлуориметров. Он предусматривает использование для воспроизведения спектров стабильного физического явления — рассеяния света диэлектрическими наносферами, находящимися в жидкой суспензии. Воспроизведение рассеяния обусловлено фундаментальными законами физики (в данном случае теориями рассеяния Ми и Релея) и мало зависит от конкретных особенностей процесса измерений. Использование стабильных физических эффектов и явлений для децентрализованного воспроизведения единиц соответствует современной тенденциям развития метрологии.

Разработанные государственные СО [11] представляют коллоидный раствор наносфер двуокиси кремния (SiO_2) диаметром порядка 20 нм и концентрацией порядка 5 мас. %. Материал СО должен содержать частицы сферической формы (только для сфер точно выполняются соотношения теорий Ми и Релея), быть монодисперсным и устойчивым к агрегации. В ходе разработки в качестве материала СО использовали наночастицы производства фирмы Corpuscular Inc (США), однако в настоящее время совместно с Институтом физики твердого тела РАН (Черноголовка) ведется разработка аналогичных частиц и полученные результаты позволяют использовать их в дальнейшем в качестве материала СО.

Аттестуемой характеристикой СО является относительная спектральная эффективность рассеяния света $Q(\lambda)$, где λ — длина световой волны. Для ее определения используют расчетно-экспериментальный метод, предполагающий экспериментальное измерение диаметров наносфер с помощью динамического рассеяния света. Затем по теории рассеяния Ми, которая точно описывает рассеяние света диэлектрическими наносферами, вычисляют $Q(\lambda)$ в диапазоне длин волн 350—700 нм. При диаметрах наносфер, значительно меньших длины световой волны, эффективность рассеяния зависит от них очень слабо. В предельном случае при диаметре $d < \lambda/20$ эта зависимость практически исчезает, и теория Ми переходит в теорию Релея. Поэтому погрешность измерений d слабо влияет на аттестуемую характеристику СО. Аппаратно-независимый спектр рассеяния ГСО пропорционален $Q(\lambda)$. Измерив этот спектр на калибруемом спектрофлуориметре и разделив его на $Q(\lambda)$, можно получить функцию, позволяющую корректировать спектры рассеяния, регистрируемые этим прибором. Чтобы вычислить функцию, предназначенную для коррекции спектров эмиссии, необходимо наряду с измеренным спектром рассеяния ГСО знать спектр возбуждающего излучения $I_{\text{в}}(\lambda)$. Для измерений $I_{\text{в}}(\lambda)$ разработан специальный фотодиодный модуль, который помещается в кюветное отделение на место образца. Этот модуль подлежит калибровке на вторичном эталоне спектральной чувствительности ВНИИОФИ и может поставляться совместно с ГСО.

Разработка указанных ГСО явилась продолжением работ, ведущихся в институте с 2010 г. Ранее были разработаны и до настоящего времени выпускаются образцы диаметров

наносфер золота (9629—2010) и серебра (9967—2011) в жидкой среде.

Заключение. В результате работ, проводившихся в 2009—2014 гг., расширены возможности оптико-спектральных методов по определению геометрических параметров и концентрации наночастиц в жидких средах, разработаны новые средства и методики измерений. Предложен и реализован подход к созданию стандартных образцов для флуориметрии, основанный на использовании оптических свойств диэлектрических наносфер.

Раздел «Развитие метода динамического рассеяния света для несферических наночастиц» выполнен при поддержке Минобрнауки РФ в рамках прикладного научного исследования (уникальный идентификатор RFMEFI62414X0009).

Л и т е р а т у р а

1. **Левин А. Д., Рукин Е. М.** Оптико-спектральные методы характеристики наночастиц // В кн. «Метрологическое обеспечение нанотехнологий и продукции наноиндустрии». М.: Логос, 2011. С. 244—272.
2. **Glidden M., Muschol M.** Characterizing Gold Nanorods in Solution Using Depolarized Dynamic Light Scattering // J. Phys. Chem., С. 2012. V. 116. P. 8128—8137.
3. **Левин А. Д., Лобач А. С., Шмыткова Е. А.** Исследование геометрических параметров несферических наночастиц методом частично деполаризованного динамического рассеяния света // Российские нанотехнологии. 2015. № 5/6. С. 54—59.
4. **Levin A. D., Smytkova E. A.** Nonspherical nanoparticles characterization using partially depolarized dynamic light scattering // Proc. SPIE. 2015. V. 9526. P. 95260.
5. **Левин А. Д., Садагов Ю. М., Короли Л. Л.** Определение размеров наночастиц в коллоидных растворах при элементном анализе на электротермическом атомно-абсорбционном спектрометре // Измерительная техника. 2011. № 10. С. 55—57.
6. **Методика** измерения массовой концентрации металлов в водных и солевых растворах и биологических жидкостях с возможностью оценки размеров частиц методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией // Св-во об аттест. № 48/11-01.00276-2008. ФР.1.31.2011.11071.
7. **Левин А. Д., Садагов Ю. М., Короли Л. Л., Шмыткова Е. А.** Развитие оптико-спектральных методов характеристики наночастиц // Российские нанотехнологии. 2013. Т. 8. № 5—6. С. 86—91.
8. **Левин А. Д., Асейчев А. В., Азизова О. А., Бекман Э. М., Высоцкий В. В., Урюпина О. Я., Ролдугин В. И.** Модификация спектров резонансного рассеяния света наночастицами серебра при их взаимодействии с молекулами белка // Коллоидный журнал. 2010. Т. 72. № 1. С. 27—34.
9. **Dobrovolskaia M. A., Parti A. K.** Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2009. V. 5. N. 2. P. 106—117.
10. **Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements** Ed by Ute Resch-Genger. Springer, 2012.
11. **ГСО 10560—2015.** Стандартные образцы относительной спектральной эффективности рассеяния света наносферами двуокиси кремния.

Дата принятия 03.09.2015 г.