

---

## III. Науково-організаційна діяльність

---

УДК 006.1:006.74

Т. М. Павлыго, Г. Г. Сердюк

### УТВЕРЖДЕННЫЕ МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ В ОБЛАСТИ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

*Технічним комітетом стандартизації ISO/TC229 “Нанотехнології” опубліковані перші 3 міжнародні нанотехнологічні стандарти, які затверджені для використання в остаточному вигляді. Зазначені стандарти присвячені виробництву металевих наночастинок, визначенню їх параметрів та аналізу наноматеріалів на вміст ендотоксину. Розглянуті стандарти, зорієнтовані на використання в медицині.*

**Ключові слова:** наночастинки, нанотехнологія виготовлення, параметри наночастинок, ендотоксинова одиниця.

При оценке наиболее важных исследований, которые могут серьезно повлиять на экономическое и социальное развитие стран в долгосрочной (15–20 лет) перспективе, эксперты на первое место ставят разработку технологии наноматериалов, совместимых с человеческим организмом. Международная организация стандартизации (*англ.* International Standards Organization, *сокр.* ISO) утвердила 3 нанотехнологических стандарта, предназначенных для применения в медицине [1–3].

**ISO 10801:2010. Нанотехнологии — Формирование методом испарения/конденсации металлических наночастиц для тестирования ингаляционной токсичности [1].** Наноразмерные металлические частицы могут воздействовать на человека при приеме пищи, через кожу и при ингаляции (вдыхании). Для исследования ингаляционной токсичности пригодны аэрозоли серебряных наночастиц с размерами до 100 нм. Стандарт устанавливает требования и рекомендации по созданию аэрозолей серебра методом испарения/конденсации, а также по организации и контролю воздействия аэрозолей на животных (мышей). Может быть применен для создания и исследования аэрозолей наночастиц из золота.

На рис. 1 представлена схема экспериментальной установки для исследования ингаляционной токсичности. Для генерации аэрозоли плоский керамический нагреватель 3, подключенный к источнику питания переменного тока 2, размещается в кварцевом корпусе 5. Этот корпус имеет диаметр 70 мм

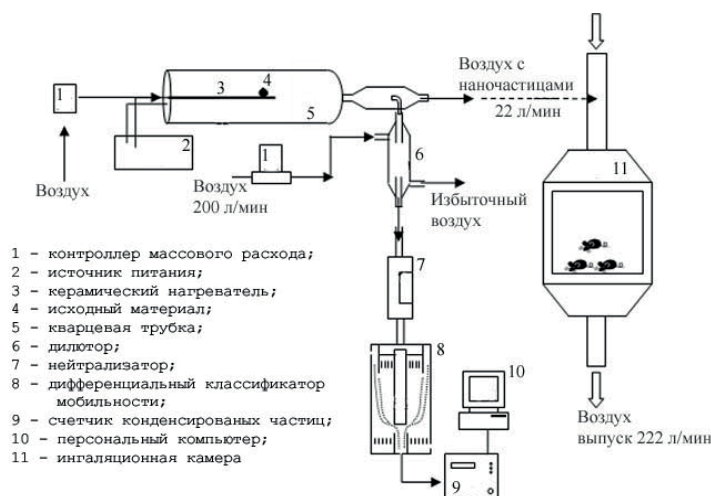


Рис 1. Схема экспериментальной установки для исследования ингаляционной токсичности

и длину 140 мм. Нагревательный элемент 3 размером  $50 \times 5 \times 1,5$  мм способен нагревать поверхность до  $1500\text{ }^{\circ}\text{C}$ . В этой области располагается исходный серебряный металл 4 (с чистотой 99,99%). Он испаряется с поверхности керамического нагревателя и превращается в неагломерированные сферические наночастицы. Они вытекают с газом-носителем, в качестве которого используется сухой фильтрованный воздух.

При создании аэрозолей должны определяться и контролироваться скорость испарения металла (мг/ч) и расход воздуха (скорость потока воздуха) ( $\text{м}^3/\text{ч}$ ). Скорость ламинарного потока в установке поддерживается на уровне 22 л/мин с помощью контроллера массового расхода 1. Рабочие камеры должны эксплуатироваться при более низком давлении (на 5 мм вод. ст.) по сравнению с окружающей средой, чтобы избежать воздействия на работников в случае утечки.

Размерное распределение наночастиц серебра определяется с помощью системы анализа дифференциальной мобильности 8 и счетчика конденсированных частиц 9.

Требования к изготавливаемым наночастицам включают соблюдение их размеров и химической чистоты. Размерное распределение наночастиц зависит от температуры нагревателя. Анализ размера наночастиц, выполненный до взаимодействия системы, образующей наночастицы, с ингаляционной камерой 11, показывает, что при варьировании температуры в пределах  $1002\text{--}1351\text{ }^{\circ}\text{C}$  средний размер частиц изменяется от 8 до 20 нм. Представленные данные получены при расходе газа-носителя 4 л/мин, который должен быть постоянным, и исходной массе загруженного серебра 14,76 мг.

Изготовленные наночастицы имеют сферическую форму и не агломерированы. Однако, поскольку частицы, зародившиеся на небольшой поверхности нагревателя, вытекают с воздухом-носителем, коагуляция частиц быстро уменьшается за счет закалки и эффекта разжижения.

Для оценки воздействия на здоровье наноразмерные частицы доставляются в ингаляционную камеру 11 с экспериментальными животными, которые впоследствии проверяются на ингаляционную токсичность. Как показано на рис. 2, концентрация наночастиц серебра в камере является стабильной в течение 90-дневного исследования ингаляционной токсичности.

### III. Науково-організаційна діяльність

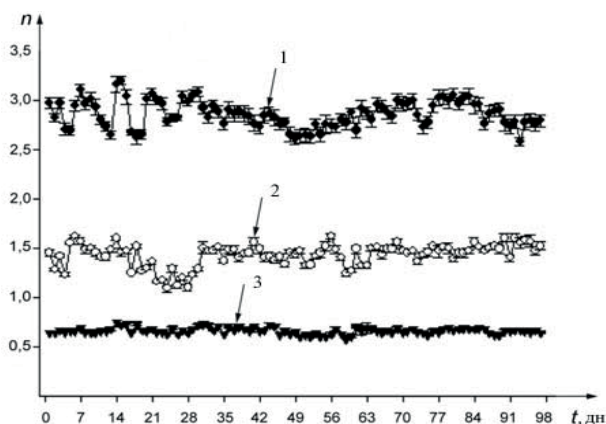


Рис. 2. Сохранение концентраций в течение 90-дневной генерации наночастиц серебра ( $n$  — количество ( $\times 10^6$  частиц/см<sup>3</sup>) и ингаляционного воздействия ( $t$  — время, дни):

1 — высокая концентрация; 2 — средняя концентрация; 3 — низкая концентрация

Одновременно с контролем концентрации должны контролироваться внутренняя и поверхностная чистота наночастиц на соответствие техническим требованиям к процессу исследования.

Протокол испытаний должен включать:

а) полную идентификацию исходного материала изготовленных наночастиц (код производителя, номер каталога или состава, номер партии или дата изготовления, торговая марка);

б) процедуры подготовки проб для испытаний;

в) показатели количества и размерного распределения наночастиц.

**ISO 10808:2010. Нанотехнологии – Определение параметров наночастиц в ингаляционных камерах для тестирования ингаляционной токсичности [2].** Число потребительских продуктов, содержащих наночастицы серебра, золота, углерода, оксида цинка, диоксида титана и кремнезема, растет очень быстро. В целях проведения изучения влияния наноразмерных частиц на ингаляционную токсичность необходим контроль концентрации, размера и распределения наноразмерных частиц в ингаляционной камере.

Настоящий стандарт предлагает набор камер тестирования ингаляционной токсичности и соответствующую систему анализа дифференциальной мобильности. Последняя необходима для определения числа частиц, их размера, распределения частиц по размерам, площади поверхности и расчетной дозы массы, а также для морфологического исследования и определения химического состава.

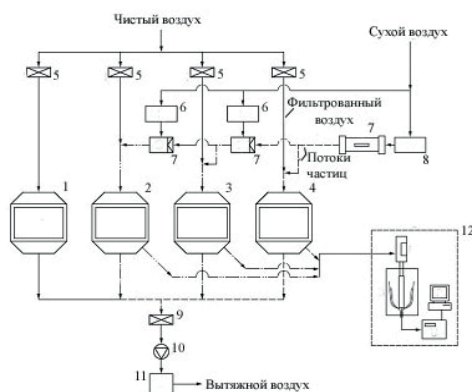


Рис. 3. Установка распределения и мониторинга концентраций дискретных наночастиц при изучении ингаляционной токсичности: 1 – 4 – ингаляционные камеры; 1 – контрольная; 2 – с наименьшей концентрацией частиц; 3 – со средней концентрацией; 4 – с наибольшей концентрацией; 5 – фильтры; 6 – контроллер течения массы; 7 – генератор частиц; 8 – дилутор; 9 – пылевой фильтр; 10 – вытяжной вентилятор; 11 – химический скруббер; 12 – система анализа дифференциальной мобильности

На рис. 3 показана схема установки, вырабатывающей наночастицы и обеспечивающей распределение наночастиц серебра, полученных из чистой

серебряной (99,99% по объему) проволоки. Режимы генератора наночастиц: приложенное напряжение — 85 в (при 1130 °С) и расход при течении в воздухе — 30 л/мин.

Установка производит наночастицы в различных концентрациях (высокая, средняя и низкая) в трех отдельных камерах. Распределение наночастиц по размерам определяются непосредственно в каждой отдельной камере. Распределение по размерам частиц серебра контролируется после 18 ч с целью определения неустойчивости.

Рис. 4 иллюстрирует различия в концентрации частиц во времени в отдельных экспозиционных камерах, а рис. 5 — изменения численной концентрации/генерации наночастиц серебра в течение длительного времени.

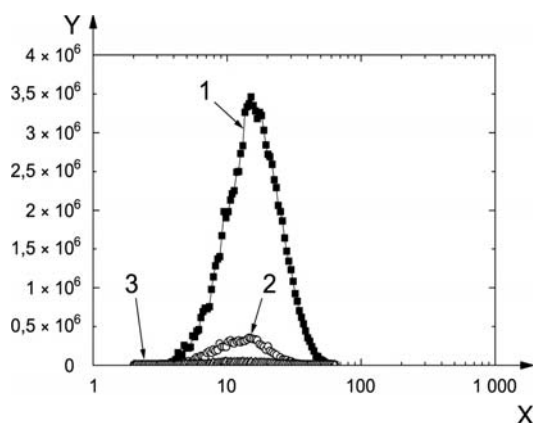


Рис. 4. Распределение частиц по размерам в камерах с высокой, средней и низкой концентрацией частиц, логарифм-линейная шкала: X — текущий диаметр,  $D_p$  (нм); Y -  $dN/d\log(D_p)$ , число частиц/см<sup>3</sup>; 1 — фракция высокой концентрации; 2 — фракция средней концентрации; 3 — фракция низкой концентрации

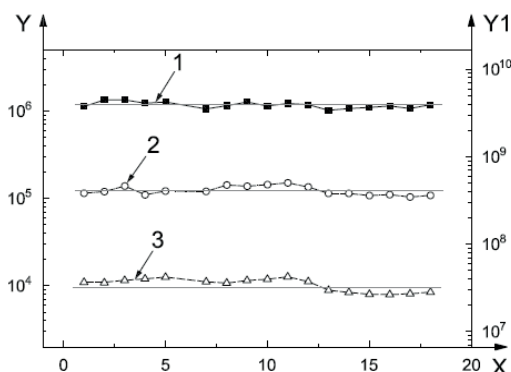


Рис. 5. Изменения численной концентрации/генерации наночастиц серебра в течение длительного времени: X — время (в часах); Y — общая концентрация (число частиц/см<sup>3</sup>); Y1 — общее генерирование частиц (число частиц/сек); 1 — камера высокой концентрации (8,2%); 2 — камера средней концентрации (12,1%); 3 — камера низкой концентрации (16,2%)

Относительно наночастиц должны быть получены следующие данные:

- распределение наночастиц (в нм), средний геометрический диаметр и его нормативное отклонение в каждой экспозиционной камере;
- морфология частиц с помощью просвечивающей или сканирующей электронной микроскопии;
- количественная концентрация (число частиц/см<sup>3</sup>) в каждой экспозиционной камере;
- массовая концентрация наночастиц в каждой экспозиционной камере;
- химический состав наночастиц.

Точная характеристика действия испытуемого вещества имеет важное значение для исследования ингаляционной токсикологии. Целью исследования токсикологии ингаляционных наночастиц является установление количественных соотношений между наблюдаемыми токсикологическими результатами и

### III. Науково-організаційна діяльність

метрической дозой, используемых в терминах физических и химических свойств исследуемого вещества.

**ISO 29701:2010. Нанотехнологии – Анализ образцов из наноматериалов на содержание эндотоксина в случае *in vitro* систем – Анализ с использованием *Limulus amoebocyte lysate* [3]**<sup>1</sup>. Эндотоксины, содержащие активные липополисахариды, входят в состав наружных мембран клеточных стенок грамотрицательных бактерий, таких, как кишечные палочки, сальмонеллы, шигеллы и др.

Эндотоксины могут вызвать целый ряд системных реакций у млекопитающих, включая человека, такие как лихорадка, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, артериальная гипотензия, шок и смерть. Эндотоксины присутствуют в обычной среде и

могут загрязнять исследуемые наноматериалы.

Что касается приготовления порошковых образцов для испытания на загрязнение, то дисперсии могут быть получены одним или несколькими из следующих способов: ручным шлифованием, механическим фрезерованием, при ультразвуковой обработке. Испытуемый образец должен быть проверен сразу после приготовления.

В рассматриваемом стандарте приведены соображения по применению LAL-теста к образцам наноматериалов, диспергированных в жидкой среде, например, воде, сыворотке или реакционной среде. Эндотоксины активируют в LAL движущую силу, которая вызывает в конечном итоге образование гель-тромба. Это образование определяется при перевороте пробирки, из которой гель не должен вытекать.

Гель-тромбный метод предполагает использование эндотоксина в виде лиофилизированного порошка. Приготавливаются растворы эндотоксина в воде четырех концентраций —  $0,25 \lambda$ ,  $0,5 \lambda$ ,  $\lambda$  и  $2 \lambda$ . Здесь  $\lambda$  — маркировочная чувствительность, выраженная в ЭЕ/мл<sup>2</sup>. Гель-тромбный метод позволяет измерять величину  $\lambda = 0,015$  ЭЕ/мл.

Самую низкую концентрацию называют конечной концентрацией. В качестве конечной концентрации в исследуемом образце должна быть представлена среднегеометрическая концентрация эндотоксина. Среднее геометрическое из четырех конечных концентраций,  $c$ , в калибровочном нормативе определяется как чувствительность LAL-реагента в воде, свободной от эндотоксина, следующим образом:

$$c = \text{antilog} \left( \frac{\sum e}{f} \right),$$

где  $\sum e$  — сумма конечных концентраций использованной серии растворов,  $f$  — число измерений.

Чувствительность LAL-реагента в воде, свободной от эндотоксина, должна быть в пределах от  $0,5\lambda$  до  $2\lambda$ .

Протокол испытаний должен включать:

- результаты испытаний;
- процедуры испытаний;
- полную идентификацию тестируемых наноматериалов;
- порядок подготовки образца к исследованию, условия хранения испытуемых образцов и сведения о классификации используемых лабораторных условий;

<sup>1</sup> *Limulus amoebocyte lysate (LAL)*- водный экстракт клетки крови

<sup>2</sup> ЭЕ — эндотоксиновая единица; нормативная единица активности эндотоксина.

- идентификацию LAL-реагента (торговое название, код производителя, каталог или формулировочный номер, номер партии или дата изготовления, чувствительность и т.д.);
- определение нормативного эндотоксина (торговое название, код производителя, каталог или номер формулировки, номер партии или дату изготовления, эффективность и т. д.);
- обоснованность испытания, включая столкновение патентных притязаний на опытный образец.

Рабочая группа, подготовившая в окончательной редакции представленные стандарты, разработала также предварительные стандарты по технике безопасности и защите здоровья в нанотехнологическом производстве. По своему содержанию основная масса этих предварительных стандартов ISO касается требований к безопасности, взаимозаменяемости, технической совместимости, а также методов испытаний продукции, других общих и методических вопросов.

Использование большинства международных стандартов ISO предполагает, что технические требования к создаваемым материалам и продукции из них устанавливаются в договорных отношениях.

Международные стандарты ISO не являются обязательными, то есть каждая страна-член ISO вправе применять их целиком, частично или вообще не применять. Однако страны, стремящиеся поддерживать конкурентоспособность своей продукции на мировом рынке, вынуждены применять эти стандарты. Среди указанных стран следует в первую очередь назвать Соединенные Штаты Америки, Россию, такие страны Европейского Союза, как Франция, Германия, Швейцария, Нидерланды и Великобритания. Все эти страны объединены ISO. В числе стран-членов ISO находится и Украина, 39 научных организаций которой занимаются научными исследованиями и разработками в области наноматериалов и нанотехнологий.

*Техническим комитетом стандартизации ISO/TC 229 “Нанотехнологии” опубликованы первые 3 международных нанотехнологических стандарта, которые утверждены для использования в окончательном виде. Указанные стандарты посвящены производству металлических наночастиц, определению их параметров и анализу наноматериалов на содержание эндотоксина. Рассматриваемые стандарты ориентированы на использование в медицине.*

**Ключевые слова:** наночастицы, технология изготовления, параметры наночастиц, эндотоксиновая единица.

*Standardization Technical Committee ISO / TC 229 “Nanotechnologies” published 3 international nanotechnology standards used in final form. These standards focus on the production of metal nanoparticles, the determination of their parameters and analysis the endotoxin content in nanomaterials. These standards are oriented for use in medicine.*

**Keywords:** nanoparticles, manufacturing technology, the parameters of nanoparticles, endotoxin unit.

1. ISO 10801: 2010 Nanotechnologies – Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method.
2. ISO 10808: 2010 Nanotechnologies - Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing.
3. ISO 29701: 2010 Nanotechnologies – Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems – Limulus amoebocyte lysate (LAL) test.