

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

**Порядок выявления и идентификации
многостенных углеродных нанотрубок
в срезах тканей животных и растений
методами аналитической электронной
микроскопии**

Методические рекомендации
МР 1.2.0045—11

Издание официальное

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

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

**Порядок выявления и идентификации
многостенных углеродных нанотрубок в срезах тканей
животных и растений методами аналитической
электронной микроскопии**

**Методические рекомендации
МР 1.2.0045—11**

ББК 51.2
П59

П59 **Порядок** выявления и идентификации многостенных углеродных нанотрубок в срезах тканей животных и растений методами аналитической электронной микроскопии: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—39 с.

ISBN 978—5—7508—1138—0

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

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

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

3. Введены в действие 11 ноября 2011 г.

4. Введены впервые.

ББК 51.2

© Роспотребнадзор, 2012

© Федеральный центр гигиены
и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

I.	Область применения	5
II.	Введение	6
III.	Нормативные ссылки	7
IV.	Общие положения	10
V.	Методика подготовки проб для выявления и идентификации МУНТ в срезах тканей растений	12
	5.1. Перечень реактивов, необходимых для подготовки проб растений	12
	5.2. Перечень расходных материалов и оборудования, необходимых для подготовки проб растений	13
	5.3. Растворы и смеси, необходимые для подготовки проб растений	17
	5.4. Подготовка проб растений к анализу	19
VI.	Методика подготовки проб для выявления и идентификации МУНТ в срезах тканей животных.	21
	6.1. Перечень реактивов, необходимых для подготовки проб тканей животных	21
	6.2. Перечень расходных материалов и оборудования, необходимых для подготовки проб тканей животных.	22
	6.3. Растворы и смеси, необходимые для отбора и подготовки проб животных	26
	6.4. Специфика пробоотбора тканей животных для анализа на содержание МУНТ	27
	6.5. Подготовка проб тканей животных к анализу	27
	6.6. Процедура подготовки образца сравнения МУНТ	29
VII.	Методика проведения измерений	29
	7.1. Процедура измерений	29
	7.2. Регистрация изображений и картины электронной дифракции от образца сравнения МУНТ	30

MP 1.2.0045—11

7.3. Процедура выявления МУНТ в срезах тканей животных или растений	31
VIII. Анализ полученных данных	33
8.1. Преобразование полученных изображений в форму, удобную для анализа	33
8.2. Программное обеспечение для анализа изображений и электронограмм	34
8.3. Идентификация МУНТ по морфометрическим критериям	34
8.4. Идентификация МУНТ методом дифракции электронов	35
8.5. Анализ плотности распределения МУНТ	36
IX. Представление полученных данных	37
X. Обозначения и сокращения	39

УТВЕРЖДАЮ

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

Г. Г. Онищенко

11 ноября 2011 г.

1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

**Порядок выявления и идентификации
многостенных углеродных нанотрубок в срезах тканей
животных и растений методами аналитической
электронной микроскопии**

**Методические рекомендации
MP 1.2.0045—11**

1. Область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации определяют порядок выявления и идентификации многостенных углеродных нанотрубок (далее – МУНТ) в срезах тканей животных и растений методами аналитической электронной микроскопии.

1.2. Настоящие методические рекомендации применяются в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с процессами производства и оборота МУНТ.

1.3. Методические рекомендации могут использоваться для выявления и идентификации МУНТ:

– при анализе биологической безопасности разрабатываемых новых и уже используемых наноматериалов, содержащих МУНТ, для растений, животных и человека;

– в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с процессами производства и оборота наноматериалов на основе МУНТ;

– при проведении экспертизы безопасности продукции сельского хозяйства, биотехнологического производства, пищевых продуктов и ингредиентов животного и растительного происхождения;

– при проведении мероприятий по осуществлению надзора (контроля) в процессе разработки, производства, хранения, транспортирования, реализации и утилизации МУНТ.

1.4. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единства измерений при выявлении и идентификации МУНТ.

1.5. Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-исследовательских организаций гигиенического профиля и медицинских учебных заведений, а также иных организаций и учреждений, занимающихся вопросами обнаружения и определения МУНТ.

II. Введение

Углеродные нанотрубки представляют собой линейные (протяженные) цилиндрические каркасные конструкции, состоящие из свёрнутых в бесшовную трубку графеновых листов. Различают одностенные нанотрубки и многостенные — МУНТ. Последние представляют собой конструкции из коаксиально вложенных одна в другую однослойных нанотрубок разного диаметра. Расстояние между соседними графитовыми слоями МУНТ близко к величине 0,34 нм, присущей расстоянию между соседними плоскостями кристаллического графита. Другим показателем структуры нанотрубок является спиральность, то есть величина атомарного сдвига, достигаемого при замыкании плоского слоя, образованного атомами углерода, в трубку. Разнообразие структур МУНТ проявляется как в продольном, так и в поперечном направлении. Структура и диаметр влияют на электропроводность нанотрубок, которые могут вести себя как металлы, полупроводники, полуметаллы.

Обладая уникальными электропроводными, механическими, теплопроводными свойствами, углеродные нанотрубки находят всё более широкое применение в микроэлектронике, входят в состав композиционных материалов, применяются при производстве дисплеев и светодиодов. Высокое отношение поверхностной площади к массе и высокая адсорбционная способность позволяют их применение в различных фильтровальных системах. Способность МУНТ проникать через биологические мембраны, их проходимость через гематоэнцефалический барьер служат основанием для активного проведения исследований по использованию нанотрубок в качестве наноносителей для доставки лекарственных препаратов.

В промышленных условиях производится МУНТ различного диаметра (от 2,5 до 100 нм) и различной степени очистки в виде порошков, суспензий в органических растворителях, в отдельных

случаях в виде гелей или пленок. По данным консалтинговой компании Clientifica (www.Clientifica.com) мировое производство углеродных нанотрубок и нановолокон в 2004 г. составило 65 т. Производство МУНТ в России активно развивается, и следует ожидать, что в ближайшее время производимые количества МУНТ возрастут до промышленных объёмов. Увеличение масштабов производства МУНТ неизбежно приведет к их накоплению в окружающей среде и, благодаря их уникальным свойствам легко проникать через биомембраны, в организмах животных и растений, а также человека.

Таким образом, существует актуальная потребность в разработке эффективных методик детекции и мониторинга МУНТ в биотических компонентах экосистем, продукции сельского хозяйства, пищевой продукции с целью своевременного выявления уровней их накопления, опасных для здоровья человека. Одной из задач настоящих методических рекомендаций является формирование единого методического подхода к выявлению и идентификации МУНТ в срезах тканей животных и растений, обеспечивающего получение валидных результатов с заданными метрологическими характеристиками.

III. Нормативные ссылки

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

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

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

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

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

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

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

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

3.9. Постановление Правительства Российской Федерации от 15 сентября 2005 г. № 569 «О Положении об осуществлении госу-

дарственного санитарно-эпидемиологического надзора в Российской Федерации».

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

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

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

3.13. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 19 июля 2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

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

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

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

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

3.18. МУ 1.2.2634—10 «Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза».

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

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

3.21. МУ 1.2. 2741—10 «Порядок отбора проб для выявления и идентификации наноматериалов в лабораторных животных».

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

МР 1.2.0045—11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IV. Общие положения

4.1. Выявление и идентификация МУНТ в тканях животных и растений проводится в целях:

- оценки экспозиции человека МУНТ через пищевое сырьё животного и растительного происхождения;
- экспертизы продукции наноиндустрии, полученной или содержащей МУНТ, производимой на территории Российской Федерации или ввозимой на территорию Российской Федерации;
- санитарно-гигиенического нормирования содержания МУНТ в потребительской продукции и объектах окружающей среды;
- государственного надзора (контроля) за использованием МУНТ и продукции их содержащей в процессе разработки, производства, хранения, транспортирования, реализации и утилизации;
- мониторинга загрязнения окружающей среды МУНТ;
- проверки оценки соответствия продукции наноиндустрии установленным требованиям;
- разработки мер по охране окружающей среды от вредного воздействия МУНТ и их производных.

4.2. Порядок и методы отбора проб, выявления и идентификации МУНТ в пробах тканей животных и растительных организмов устанавливаются в соответствии с действующими методическими документами для соответствующих видов объектов окружающей среды и продукции: МУ 1.2.2740—10, МУ 1.2.2741—10, МУ 1.2.2742—10, МУ 1.2.2743—10, МУ 1.2.2744—10, МУ 1.2.2745—10, МУ 1.2.2869—11, МУ 1.2.2873—11, МУ 1.2.2874—11, МУ 1.2.2876—11, МУ 1.2.2877—11, МР 1.2.2640—10, МР 1.2.0022—11, МР 1.2.0023—11.

4.3. Выбор объектов и пробоотбор растений для выявления и идентификации в них МУНТ производят согласно МУ 1.2.2742—10, МР 1.2.2640—10 и МУ 1.2.2876—11.

4.4. Выбор объектов контроля, отбор материала для последующего выявления и идентификации МУНТ в срезах тканей животных, транспортирование и хранение образцов осуществляют в соответствии с положениями, изложенными в МУ 1.2.2741—10 и 1.2.2745—10. При проведении анализа тканей животных, которые не относятся к категории лабораторных, порядок отбора проб аналогичен. Перечень видов и нормы отлова животных, подлежащих исследованию, устанавливают органы и учреждения, осуществляющие, санитарно-эпидемиологический и экологический надзор. При выявлении МУНТ в рамках проведения санитарно-эпидемиологической экспертизы продукции мясного животноводства отбор проб производят в соответствии с МР 1.2.2640—10.

4.5. Технические характеристики электронных микроскопов и вспомогательного лабораторного оборудования, применяемых при выявлении и идентификации МУНТ в тканях животных и

MP 1.2.0045—11

растений, меры безопасности при проведении лабораторных работ определены в методических рекомендациях MP 1.2.2639—10 и 1.2.2641—10.

V. Методика подготовки проб для выявления и идентификации МУНТ в срезах тканей растений

5.1. Реактивы, необходимые для подготовки проб растений

Ацетон, квалификация чда	ГОСТ 2603—79
Гидроксид натрия (NaOH), квалификация хч	ГОСТ 4328—77
Глутаровый альдегид (25 %-й водный раствор), Grade I, для использования в электронной микроскопии	ТУ 6-02-1273—89
Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—79
Дихлорэтан	ГОСТ 1942—86
Додецилэтантарный ангидрид фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, хч	ГОСТ 4198—75
Кислота соляная (HCl), квалификация хч	ГОСТ 3118—77
Метилэндиковый ангидрид МЭА-610 фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный 12-водный, хч	ГОСТ 4172—76
Сахароза, квалификация хч	ГОСТ 5833—75
Спирт этиловый абсолютный (содержание — 99,8 % по объему)	ТУ 6-09-5100—83
Спирт этиловый ректифицированный, 96 %-й	ГОСТ Р 51652—2000

Тридиметиламинофенол (катализатор DMP-30) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный

Формвар (Formvar®solution) для микроскопии фирмы «Sigma Aldrich» (США) или аналогичный

Эпоксидная смола (Эпон 812) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный

5.2. Расходные материалы и оборудование, необходимые для подготовки проб растений

Материалы и оборудование для отбора проб растений	МУ 2742—10 МУ 1.2.2876—11
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г	ГОСТ 24104—2001
Дистиллятор, производительностью от 1 дм ³ /ч, обеспечивающий получение дистиллированной воды	ГОСТ 6709—79
pH-метр	ГОСТ 27987—88 или аналогичный
Посуда лабораторная стеклянная (колбы стеклянные вместимостью 100 см ³ , пробирки стеклянные вместимостью 20 см ³ с резиновой пробкой, чашки Петри стеклянные диаметром 12 см)	ГОСТ 25336—82
Посуда мерная лабораторная (цилиндр мерный из стекла вместимостью 100 см ³ с наименьшей ценой деления 1 см ³ , колба мерная стеклянная с притертой крышкой вместимостью 250 см ³)	ГОСТ 1770—74
Пипетки стеклянные или пластиковые градуированные вместимостью 5 см ³	ГОСТ 29227—91
Магнитная мешалка с регулируемой частотой вращения магнитного якоря	

MP 1:2.0045—11

в диапазоне 100—1 200 об./мин, рассчитанная на объем до 1,0 дм³

Система для фильтрации растворов
стеклянная вместимостью 1,0 дм³
с вакуумным насосом

Мембраны эфирно-целлюлозные
толщиной 150 мкм, диаметром 47 мм,
с размером пор 0,22 мкм

Автоматические дозаторы с переменным
объемом дозирования 100—1 000,
20—200 и 2—20 мм³

Наконечники для автоматических
дозаторов полистирольные нестериль-
ные вместимостью 1—200 и 100—1 000 мм³

Скальпель. ГОСТ 21240—89

Пинцет медицинский ГОСТ 21241—89

Медицинский шприц объёмом
50—100 см³ (для удаления воздуха
из растений)

Штативы для пробирок

Электромешалка с насадкой спирального
типа низкоскоростная (до 250 об./мин)
для приготовления эпоксидных смол

Суховоздушный термостат с диапазо-
ном регулируемых температур от 25 до
80 °С и точностью $\pm 0,1$ °С

Ламинарный бокс биологической
безопасности класс II

Вытяжной шкаф, оборудованный
фильтром для улавливания наночастиц

Холодильник бытовой электрический ГОСТ 26678—85

Перчатки хирургические резиновые
нестерильные ГОСТ 3—88

стеклянная палочка длиной 220 мм,
диаметром 3—5 мм

Биноккулярная лупа, оснащенная настоль-
ным штативом, с линейным полем зрения
от 2 до 10 см и диапазоном увеличений
0,6×, 1×, 2×

Полипропиленовые пробирки для микро-
проб однократного применения типа
«Эппендорф» вместимостью
1,5 и 2,0 см³

ТУ 64-2-30—80

Полиэтиленовые капсулы с плоским или
коническим дном для заливки образцов,
диаметр от 6 мм, выдерживающие нагрев
до 75 °С или полипропиленовые аналогич-
ные капсулы, выдерживающие нагрев
до 100 °С производства BEEM® Embedding
Capsule или аналогичные

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

Лобзик для обработки залитых
в эпоксидную смолу образцов

Бритва фирмы «Ted Pella, Inc.» (США),
кат. № 121-1 или аналогичная

Пинцет для электронно-микроскопи-
ческих работ 110 мм тип 5 кончик
0,05 × 0,01 мм (или 115 мм тип 7 кончик
0,10 × 0,06 мм) немагнитичивающийся
фирмы «Ted Pella»

Держатели для прямоугольных и круглых
эпоксидных блоков, совместимые
с используемым ультрамикротомом,
фирма «Ted Pella, Agar Scientific» или
аналогичные

Электронно-микроскопические бленды
(медные), с круглым отверстием
диаметром 1 мм, 3 мм или овальным

MP 1.2.0045—11

отверстием 1 × 2 мм, покрытые формваровой пленкой

Контейнеры для хранения бленд

«Parafilm» (пластичная парафиновая пленка с отделяемой бумажной основой)

Ультрамикротом, обеспечивающий получение ультратонких срезов биологических образцов толщиной 30—100 нм, скорость резания 0,4—1,0 мм/с, термопередача 40—60 нм

Прибор для изготовления стеклянных ножей для ультрамикротомов LKB 7800 или аналогичный

Специальное стекло для изготовления стеклянных ножей ширина 25 мм, длина 400 или 200 мм, толщина 6 или 10 мм фирмы «TedPella, Agar Scientific» или аналогичный

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

Химически чистое отшлифованное стекло для получения формваровой плёнки

Специальный стеклянный стакан для приготовления и хранения раствора формвара

Перед использованием инструменты (скальпель, пинцет, бритва, лобзик) подвергают тщательной обработке в ультразвуковой ванне или пользуются одноразовыми инструментами во избежание перекрестной контаминации образцов МУНТ.

5.3. Растворы и смеси, необходимые для подготовки проб растений

Рабочие растворы готовят в соответствии с общепринятыми правилами лабораторной практики. рН растворов контролируют при помощи рН-метра. Приготовленные растворы фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

5.3.1. Приготовление двукратного 0,2 моль/дм³ буферного раствора Соренсена (0,06 моль/дм³ КН₂РO₄, 0,14 моль/дм³ Na₂НРO₄) рН 7,2—7,4, с добавлением 30 г/дм³ сахарозы:

— готовят вспомогательный раствор 1,0 моль/дм³ КН₂РO₄. На лабораторных весах взвешивают 136 г КН₂РO₄ и вносят в мерную колбу объемом 1 000 см³, содержащую 500 см³ дистиллированной воды. Перемешивают до полного растворения и объем раствора доводят до 1 000 см³ дистиллированной водой. Раствор фильтруют и хранят при температуре не выше 25 °С не более 6 месяцев;

— готовят вспомогательный раствор 1,0 моль/дм³ Na₂НРO₄. На лабораторных весах взвешивают 358,2 г Na₂НРO₄ × 12 Н₂O и вносят в мерную колбу объемом 1 000 см³, содержащую 500 см³ дистиллированной воды. Перемешивают до полного растворения и объем раствора доводят до 1 000 см³ дистиллированной водой. Раствор фильтруют и хранят при температуре не выше 25 °С не более 6 месяцев;

— для приготовления двукратного 0,2 моль/дм³ раствора Соренсена с добавлением 30 г/дм³ сахарозы на лабораторных весах готовят навеску 30,0 г сахарозы и помешают в мерную колбу объемом 1 000 см³. В колбу с веществом вносят 300 см³ дистиллированной воды, 60 см³ 1,0 моль/дм³ раствора КН₂РO₄, 140 см³ 1,0 моль/дм³ раствора Na₂НРO₄ и растворяют при перемешивании. Объем раствора доводят до 1 000 см³ дистиллированной водой, фильтруют и хранят при температуре не более 25 °С в течение 1 месяца.

5.3.2. Приготовление однократного 0,1 моль/дм³ раствора Соренсена (0,03 моль/дм³ КН₂РO₄, 0,07 моль/дм³ Na₂НРO₄), рН 7,2—7,4, с добавлением 15 г/дм³ сахарозы.

Для приготовления 100 см³ однократного раствора Соренсена (0,1 моль/дм³) с добавлением 15 г/дм³ сахарозы к 50 см³ двукратного раствора Соренсена с добавлением 30 г/дм³ сахарозы (приготовление описано в п. 5.3.1) добавляют 50 см³ дистиллированной воды.

5.3.3. Приготовление фиксирующего раствора (0,1 моль/дм³ раствор Соренсена рН 7,2—7,4 и 2,5 % глутарового альдегида).

Для приготовления 100 см³ фиксирующего раствора в мерную колбу вносят 50 см³ двукратного раствора Соренсена с добавлением 30 г/дм³ сахарозы (по п. 5.3.1) и 10 см³ коммерческого препарата

МР 1.2.0045—11

глутарового альдегида (25 %-й водный раствор). С помощью рН-метра доводят рН буфера до 7,3 добавлением 1 М HCl и далее доводят объём раствора до 100 см³ дистиллированной водой. Фиксирующий раствор готовят непосредственно перед использованием из расчета 4 см³ на 1 образец.

Примечание. При работе с глутаровым альдегидом необходимо соблюдать меры техники безопасности и использовать средства индивидуальной защиты.

5.3.4. Приготовление 1,0 моль/дм³ раствора NaOH рН 14 и 2 %-го водного раствора тетраоксида осмия детально описано в МР 1.2.2641—10 «Определение приоритетных видов наноматериалов в объектах окружающей среды, пищевых продуктах и живых организмах» (пп. 5.1.3.3).

5.3.5. Водные растворы этанола с концентрацией 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 и 80 % готовят путем смешивания 96 %-го этилового спирта и дистиллированной воды согласно табл. 1. Растворы этанола готовят из расчета 2 см³ на образец и хранят в плотно закрытых емкостях при температуре 4 °С не более 1 месяца.

Таблица 1

Приготовление водных растворов этанола

Концентрация этанола в растворе, %	Количество 96 %-го этилового спирта, см ³	Количество дистиллированной воды, см ³
10	104	896
20	208	792
30	333	667
40	417	583
50	521	479
60	625	375
70	730	270
80	833	167

5.3.6. Приготовление смеси эпоксидных смол.

Смесь эпоксидных смол готовят непосредственно перед использованием:

— готовят смесь А (смешивают эпон 812 и додецилантарный ангидрид в соотношении 5 : 8 по объему, из расчета 3 см³ на 1 образец);

— готовят смесь Б (смешивают эпон 812 и метилэндиковый ангидрид в соотношении 8 : 7 по объему, из расчета 3 см³ на 1 образец);

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

5.3.7. Приготовление смесей ацетона и эпоксидной смолы.

Ацетон и эпоксидную смолу без добавления катализатора, приготовленную по п. 5.3.6, смешивают в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3. Каждую смесь готовят непосредственно перед использованием из расчета 2 см³ на 1 образец.

5.4. Подготовка проб растений к анализу

5.4.1. Отобранные образцы тканей растений промывают в чашке Петри с 0,1 моль/дм³ буфером Соренсена (рН 7,2—7,4). Затем образцы разрезают на части линейного размера 3—5 мм. Чтобы минимизировать проникновение в ткани растений пузырьков воздуха, препятствующих эффективному проникновению фиксатора и снижающих качество получаемых образцов, при помощи медицинского шприца вручную откачивают воздух из вырезанных участков.

5.4.2. Образцы каждого вида от одной объединенной пробы помещают в отдельный пенициллиновый флакон или контейнер с фиксирующим раствором. Флаконы маркируют с указанием вида растения, органа (из которого взяты образцы), даты и места сбора. Срок хранения образцов в фиксирующем растворе при температуре 4 °С — не более 2 месяцев. Нельзя допускать замораживания образцов при хранении.

5.4.3. Для выявления и идентификации МУНТ в тканях растений методом ПЭМ не требуется дофиксация тетраоксидом осмия и контрастирование проб уранилацетатом.

5.4.4. Протокол подготовки проб к анализу:

а) провести отмывку фиксатора в 0,1 М буфере Соренсена рН 7,2—7,4 с сахарозой 15 г/дм³;

б) провести обезвоживание образцов в серии растворов этанола возрастающих концентраций. Для этого пробы обрабатывают 2 см³ каждого из спиртовых растворов в следующем порядке:

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

MP 1.2.0045—11

- 20 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
 - 30 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
 - 40 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
 - 50 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
 - 60 %-м этанолом в течение 30 мин при 4 °С;
 - 80 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре;
 - 96 %-м этанолом в течение 30 мин при комнатной температуре;
- в) два раза выдержать образцы в 100 %-м ацетоне в течение 60 мин;
- г) приготовить эпоксидную смолу, как описано в п. 5.3.6;
- д) провести процедуру замещения ацетона эпоксидной смолой: инкубировать образцы в смеси ацетон—эпоксидная смола (3 : 1) в течение 24 ч, затем в смеси ацетон—смола (1 : 1) в течение 24 ч, затем в смеси ацетон—смола (1 : 3) в течение 24 ч;
- е) при помощи стеклянной палочки перенести образцы в заливочные контейнеры с чистой смолой (100 %-я эпоксидная смола с катализатором);
- ж) для полимеризации смолы контейнеры с образцами поместить в термостат и выдерживать при 37 °С в течение 24 ч, при 45 °С в течение 24 ч, и затем при 60 °С в течение 24 ч;
- з) из полностью полимеризованного образца выпилить с помощью лобзика прямоугольный блок размером 2 × 2 × 5 мм;
- и) закрепить блок в специальном держателе и, используя для наблюдения бинокулярный микроскоп, бритвой срезать блок в виде усеченной пирамиды;
- к) с меньшего основания усеченной пирамиды с помощью ультрамикротомы, оснащенной стеклянным или алмазным ножом, получить срезы толщиной 40—80 нм. Для повышения статистической значимости результатов анализа нарезку пробы организуют в виде 4—6 серий, отстоящих друг от друга не менее чем на 100 мкм, по 10 срезов в каждой серии;
- л) случайно выбранные срезы (по 1—2 из каждой серии) выловить на бленды, покрытые формваровой пленкой, и высушить в течение не менее 1 ч. Необходимо удостовериться, что на отобранных срезах присутствует ткань.

**VI. Методика подготовки проб
для выявления и идентификации МУНТ в срезах
тканей животных**

**6.1. Реактивы,
необходимые для подготовки проб тканей животных**

Ацетон чда	ГОСТ 2603—79
Глутаровый альдегид (25 %-й водный раствор), Grade I, для использования в электронной микроскопии	ТУ 6-02-1273—89
Дистиллированная вода	ГОСТ 6709—79
Дихлорэтан	ГОСТ 1942—86
Диэтиловый эфир (эфир для наркоза стабилизированный)	ТУ 2600-001-43852015—05
Додецилентантарный ангидрид фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Калий фосфорно-кислый однозамещенный $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, квалификация хч	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорно-кислый двузамещенный трехводный $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, квалификация хч	ГОСТ 2493—75
Калия хлорид KCl , квалификация хч	ГОСТ 4568—95
Кислота соляная HCl , квалификация хч	ГОСТ 3118—77
Метилэндиковый ангидрид МЭА-610 фирмы «Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный	
Натрия гидроксид NaOH , квалификация хч	ГОСТ 4328—77
Натрия хлорид NaCl , квалификация хч	ГОСТ 4233—77
Нейтральный формалин	ГОСТ 1625—89

MP 1.2.0045—11

или приготовленный

ГОСТ 4517—87,
подраздел 2.158

Спирт этиловый ректифицированный,
96 %-й

ГОСТ Р 51652—2000

Тetraоксид осмия (OsO_4) квалификация
хч (чистота не ниже 99,8 %)

Тридиметиламинофенол (катализатор
DMP-30) фирмы «Sigma-Aldrich» (США)
или аналогичный

Формвар (Formvar®solution) для микро-
скопии фирмы «Sigma Aldrich» (США)
или аналогичный

Хлороформ

ГОСТ 20015—88

Эпоксидная смола (Эпон 812) фирмы
«Sigma-Aldrich» (США) или аналогичный

**6.2. Расходные материалы и оборудование,
необходимые для подготовки проб тканей животных**

Посуда мерная лабораторная по (цилиндр
мерный из стекла вместимостью 100 см³
с наименьшей ценой деления 1 см³, колба
мерная стеклянная с притертой крышкой
вместимостью 250 см³)

ГОСТ 1770—74

Посуда лабораторная стеклянная по (кол-
бы стеклянные вместимостью 100 см³,
пробирки стеклянные вместимостью 20 см³
с резиновой пробкой, чашки Петри стек-
лянные диаметром 12 см)

ГОСТ 25336—82

Полипропиленовые пробирки для микро-
проб однократного применения типа
«Эппендорф» вместимостью 1,5 и 2,0 см³

ТУ 64-2-30—80

Флаконы стеклянные емкостью 10 см³
с завинчивающимися крышками

Наклейки для маркировки

Штативы для пробирок

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с погрешностью взвешивания не более 0,001 г	ГОСТ 24104—2001
pH-метр по ГОСТ 27987—88 или аналогичный	
Дистиллятор производительностью 1 дм ³ /ч, обеспечивающий получение дистиллированной воды	ГОСТ 6709—79
Магнитная мешалка с регулируемой частотой вращения магнитного якоря в диапазоне 100—1 200 об./мин, рассчитанная на объем до 1,0 дм ³	
Система для фильтрации растворов стеклянная вместимостью 1,0 дм ³ с вакуумным насосом	
Мембраны эфирно-целлюлозные толщиной 150 мкм, диаметром 47 мм, с размером пор 0,22 мкм	
Центрифуга со скоростью вращения ротора до 12 000 об./мин и охлаждением для пробирок вместимостью 1,5 см ³ (5415 R «Eppendorf», ФРГ или аналогичная)	
Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3 000 об./мин (V3 «Elmi Ltd», Латвия или аналогичный)	
Автоматические дозаторы с переменным объемом дозирования 100—1 000 мм ³ , 20—200 мм ³ и 2—20 мм ³	
Наконечники для автоматических дозаторов полистирольные нестерильные вместимостью 1—200 и 100—1 000 мм ³	
Ножницы хирургические	ГОСТ 21239—93
Ножницы глазные	ГОСТ 21239—89
Пинцет медицинский	ГОСТ 21241—89

MP 1.2.0045—11

Скальпель ГОСТ 21240—89

Препаровальный столик (из пробки или пенопласта)

Булавки или препаровальные иглы для фиксации животных на препаровальном столике

Перчатки хирургические резиновые нестерильные ГОСТ 3—88

Стеклянная палочка длиной до 220 мм, диаметром 3—5 мм

Фильтровальная бумага

Ламинарный бокс биологической безопасности класс II

Вытяжной шкаф, оборудованный фильтром для улавливания наночастиц

Электромешалка с насадкой спирального типа низкоскоростная (до 250 об./мин) для приготовления эпоксидных смол

Суховоздушный термостат с диапазоном регулируемых температур от 25 до 80 °С и точностью $\pm 0,1$ °С

Биноклярная лупа, оснащенная настольным штативом, с линейным полем зрения от 2 до 10 см и диапазоном увеличений 0,6 \times , 1 \times , 2 \times

Центрифуга 6 000 об./мин, центрифугируемые объёмы от 1 до 10 см³

Холодильник бытовой электрический ГОСТ 26678—85

Полиэтиленовые капсулы с плоским или коническим дном для заливки образцов, диаметр от 6 мм, выдерживающие нагрев до 75 °С или полипропиленовые аналогичные капсулы, выдерживающие нагрев до 100 °С производства фирмы «VEEM® Em-

bedding Capsule» или аналогичные

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

Лобзик для обработки залитых в эпоксидную смолу образцов

Бритва фирмы «Ted Pella, Inc.» (США), кат. № 121-1 или аналогичная

Пинцет для электронно-микроскопических работ 110 мм тип 5 кончик 0,05 × 0,01 мм (или 115 мм тип 7 кончик 0,10 × 0,06 мм) немагнитивающийся фирмы «Ted Pella»

Держатели для прямоугольных и круглых эпоксидных блоков, совместимые с используемым ультрамикротомом, фирма «Ted Pella, Agar Scientific» или аналогичные

Электронно-микроскопические бленды (медные) с круглым отверстием диаметром 1, 3 мм или овальным отверстием 1 × 2 мм, покрытые формваровой пленкой

Контейнеры для хранения бленд

«Parafilm» (пластичная парафиновая пленка с отделяемой бумажной основой)

Ультрамикротом, обеспечивающий получение ультратонких срезов биологических образцов толщиной 30—100 нм, скорость резания 0,4—1,0 мм/с, термоподача 40—60 нм

Прибор для изготовления стеклянных ножей для ультрамикротомов LKB 7800 или аналогичный

Специальное стекло для изготовления стеклянных ножей ширина 25 мм, длина 400 или 200 мм, толщина 6 или 10 мм фирмы «TedPella, Agar Scientific» или аналогичный

MP 1.2.0045—11

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

Химически чистое отшлифованное стекло для получения формваровой плёнки

Специальный стеклянный стакан для приготовления и хранения раствора формвара

6.3. Растворы и смеси, необходимые для отбора и подготовки проб животных

Двукратный фосфатно-солевой буферный раствор (0,2 моль/дм³) рН 7,2—7,4 (0,04 моль/дм³ КН₂РO₄, 0,16 моль/дм³ К₂НРO₄) с добавлением 1,76 % (масса/объем) NaCl

Однократный фосфатно-солевой буферный раствор (0,1 моль/дм³) рН 7,2—7,4 (0,02 моль/дм³ КН₂РO₄, 0,08 моль/дм³ К₂НРO₄) с добавлением 0,88 % (масса/объем) NaCl

Фиксирующий раствор (2,5 % глутарового альдегида в 0,1 моль/дм³ фосфатно-солевом буферном растворе рН 7,2—7,4 с добавлением 2,0 % нейтрального формалина) из расчета 4 см³ на 1 образец

Водные растворы этанола с концентрацией 50, 60, 70 и 80 % из расчета 2 см³ на 1 образец

2 %-й водный раствор OsO₄

1 %-й раствор OsO₄ в 0,1 моль/дм³ фосфатно-солевом буферном растворе рН 7,2—7,4 из расчета 2 см³ на 1 образец

Смесь эпоксидных смол

Смесь ацетона и эпоксидной смолы в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3

Процедуры приготовления перечисленных растворов детально изложены в МР 1.2.2641—10 (подпункт 5.1.3.3). Растворы фильтруют и хранят в плотно закрытых емкостях при температуре 4 °С в течение 1 месяца, за исключением фиксирующего раствора и 1 %-го раствора OsO_4 в 0,1 моль/дм³ фосфатно-солевом буферном растворе, которые готовят непосредственно перед использованием. Смесь эпоксидных смол готовят непосредственно перед использованием согласно процедуре, изложенной в п. 5.3.6. Смеси ацетона и эпоксидной смолы в объемных соотношениях 3 : 1, 1 : 1 1 : 3 готовят непосредственно перед использованием из расчета 2 см³ каждой смеси на 1 образец.

6.4. Специфика пробоотбора тканей животных для анализа на содержание МУНТ

Перечень отбираемых органов и тканей и последовательность отбора их проб устанавливают на основе данных научной литературы по предположительной локализации МУНТ. При выборе образцов разных органов и тканей животных важным моментом является способ попадания МУНТ в организм. Так, при проникновении МУНТ в кровь (внутривенонном или внутрибрюшинном введении) поиск проводится, прежде всего, в макрофагах селезенки и лимфатических узлах, а затем в других органах, обильно снабженных кровеносными сосудами. В печени анализируются гепатоциты и Купферовские клетки, в почках — область богатая клубочками, в сердце — кардиомиоциты. При детекции МУНТ в тканях мозга необходимо дифференцированно анализировать область тел нейронов, отростков и глии. В случае проникновения МУНТ в организм через желудочно-кишечный тракт необходимо проводить детекцию прежде всего в области кишечного эпителия, а затем в остальных органах. При попадании МУНТ в организм через органы дыхания анализируются, прежде всего, макрофаги лёгких и альвеолоциты.

6.5. Подготовка проб тканей животных к анализу

Для детекции и идентификации МУНТ в тканях и органах животных методом ПЭМ рекомендуется применять следующие методы пробоподготовки: без контрастирования и с контрастированием тетраоксидом осмия. При полном отсутствии контрастирования возможно проведение детекции и идентификации МУНТ в биологическом материале, но при этом отсутствует информация о структуре биологического материала. Дополнительное контрастирование тетраоксидом осмия позволяет также проводить детек-

цию и идентификацию МУНТ и появляется дополнительная возможность определения структуры клеток, тканей и органов. Как опытный, так и контрольный материал рекомендуется разделить на 2 группы: группа № 1 подвергается пробоподготовке без контрастирования, группа № 2 подвергается контрастированию тетраоксидом осмия в проводке.

Подготовку проб органов и тканей лабораторных животных и образцов продукции животноводства производят согласно протоколам, представленным в MP 1.2.2641—10. Отобранные образцы органов фиксируют в фиксирующем растворе (2,5 % глутарового альдегида в 0,1 моль/дм³ фосфатно-солевом буферном растворе pH 7,2—7,4 с добавлением 2,0 % нейтрального формалина) из расчета 4 см³ на 1 образец.

Затем каждый образец отмывают от фиксирующего раствора, инкубируя в 2 см³ 0,1 моль/дм³ фосфатного солевого раствора pH 7,2—7,4 три раза по 5 мин при комнатной температуре.

Образцы группы № 2 дополнительно фиксируют 1,0 %-м OsO₄ в 0,1 моль/дм³ фосфатном солевом растворе pH 7,2—7,4 в течение 2 ч. Далее образцы 2—4 раза промывают в 0,1 моль/дм³ фосфатном солевом растворе pH 7,2—7,4 до получения прозрачного смыва.

Образцы дегидратируют в серии растворов этанола возрастающих концентраций. Для этого пробы обрабатывают 2 см³ каждого из водно-спиртовых растворов в следующем порядке:

- 50 %-м этанолом холодным (4 °С) отмывают образцы от OsO₄ 3—4 раза по 5 мин до исчезновения потемнения раствора; использование холодного 50 %-го этанола предотвращает выпадение соединения осмия в осадок;
- 60 %-м этанолом в течение 20 мин при 4 °С (2 раза);
- 70 %-м этанолом в течение 12 ч при 4 °С (оставляют на ночь в холодильнике);
- 80 %-м этанолом в течение 20 мин при комнатной температуре;
- 96 %-м этанолом в течение 20 мин при комнатной температуре.

Пробы обрабатывают 100 %-м ацетоном для полного вытеснения этанола (3 раза по 45 мин при комнатной температуре). Далее приготовление образцов проводят, как описано в п. 5.4.4 (г—л).

После заливки образцы анализируют методом оптической микроскопии и выявляют зоны нахождения образцов ткани в эпиксидном блоке. Затем на эти участки затачивают пирамидки, готовят ультратонкие срезы и монтируют их на сетки или бленды, покрытые формваровой пленкой.

6.6. Процедура подготовки образца сравнения МУНТ

При проведении лабораторных исследований для приготовления образца сравнения используют препараты МУНТ отечественных и зарубежных производителей, охарактеризованные изготовителем в соответствии с МУ 1.2.2636—10, п. 3.1.2. При проведении мониторинга содержания МУНТ в объектах окружающей среды или при выявлении последствий техногенной аварии в качестве образца сравнения используют МУНТ, производимые на предприятии, в окрестностях которого проводят мероприятия по выявлению МУНТ.

Образец сравнения готовят в следующей последовательности:

- 25 г порошка МУНТ помещают в пробирку (1,5 или 2 см³) на поверхность жидкой смеси эпоксидных смол, приготовленной согласно п. 5.3.6, и центрифугируют в течение 3 мин при 6 000 g;
- образец заливают в контейнер, полимеризуют и получают ультратонкие срезы методами, описанными в п. 5.4;
- произвольно выбранные срезы (2—4) переносят на бленды, покрытые формваровой пленкой, и высушивают не менее 1 ч;
- эпоксидные блоки, содержащие МУНТ, хранятся при температуре 20 °С до трех лет;
- бленды (сетки) с ультратонкими срезами порошка МУНТ, заключенного в эпоксидную смолу, хранят при температуре 20 °С в специальных контейнерах до 1 г.

VII. Методика проведения измерений

7.1. Процедура измерений

Приготовленные образцы анализируют на просвечивающем электронном микроскопе на наличие электронно-плотных включений, соответствующих одиночным нанотрубкам или скоплениям МУНТ. Исследование проводят на серии ультратонких срезов (не менее трех), нарезанных с одного и того же блока, с участков, отстоящих друг от друга не менее чем на 100 мкм. При регистрации цитровых изображений недопустимо использовать опцию автоконтрастирования изображений (нормировки яркости изображения на максимум), так как нормирование на максимальную интенсивность ведет к потере информации об уровне электронной плотности.

Для выявления и идентификации МУНТ следует использовать неконтрастированные срезы тканей растений и животных (у животных — образцы группы № 1). Образцы группы № 2 используются в случае необходимости проведения идентификации МУНТ, а также определения места их локализации в составе ткани.

**7.2. Регистрация изображений и картины
электронной дифракции от образца сравнения МУНТ:**

— после проведения стандартных процедур по настройке и юстировке прибора на средних увеличениях (6 000×—20 000×, в зависимости от модели и расположения цифровой камеры относительно флуоресцентного экрана), проводят поиск электронно-плотных включений, соответствующих по морфологии отдельным нанотрубкам или скоплениям МУНТ, на образце сравнения МУНТ;

— в случае нахождения таких электронно-плотных включений получают их ПЭМ-изображения при среднем и максимальном увеличениях. Максимальное увеличение для получения ПЭМ-изображений МУНТ должно быть таким, чтобы можно было рассмотреть морфологию индивидуальных нанотрубок;

— регистрируют картину электронной дифракции (электронограмму) от найденных МУНТ. Оптимизируют параметры — ускоряющее напряжение, размер апертурной диафрагмы, глубину дифракционной камеры, — добиваясь, чтобы на электронограмме были чётко различимы дифракционные кольца. Предпочтительно использовать диаметр диафрагмы, ограничивающей область детекции, размером не более 0,5—1,0 мкм, что позволяет более селективно регистрировать сигнал от выделенных электронно-плотных частиц. Критерием успешного подбора глубины дифракционной камеры является наличие четырех (или более) дифракционных колец, не сливающихся друг с другом и с центральным рефлексом. Пример электронограммы приведен на рис. 1.

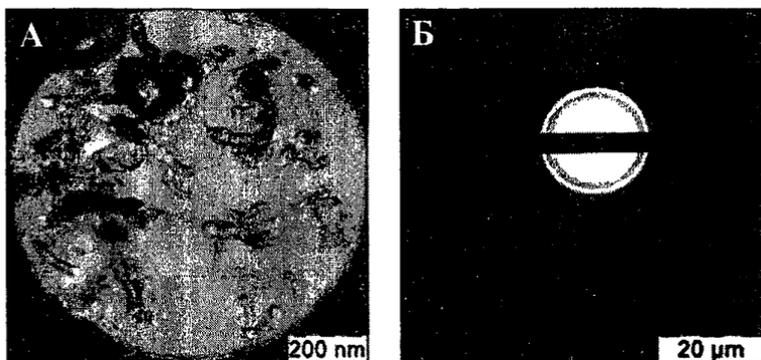


Рис. 1. Ультратонкий срез МУНТ, залитых в смесь эпоксидных смол
(А — детекция с помощью ПЭМ; Б — электронограмма этого же участка образца)

Полученные от образца сравнения изображения МУНТ и электронограммы используют для сопоставления с данными, получаемыми при анализе МУНТ в срезах тканей животного и растительного происхождения.

7.3. Процедура выявления МУНТ в срезах тканей животных или растений:

— на средних увеличениях проводят поиск электронноплотных включений, соответствующих по морфологии отдельным нанотрубкам или скоплениям детектируемых МУНТ в анализируемом образце. Просматривают не менее 50 % площади среза. Регистрируют и сохраняют все изображения, содержащие электронноплотные включения, соответствующие по морфологии отдельным нанотрубкам или скоплениям МУНТ. Примеры изображений показаны на рис. 2;

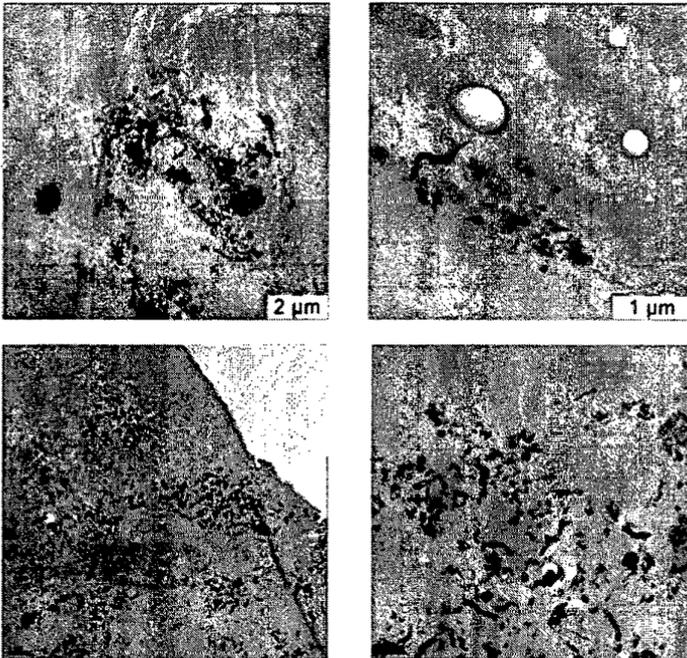


Рис. 2. Примеры ПЭМ-изображений МУНТ, полученных на средних увеличениях, в срезах тканей растений (верхний ряд) и животных (нижний ряд)

— устанавливают увеличение (в диапазоне от 50 000 × до 20 0000 ×), выбранное при анализе образца сравнения, получают детальные ПЭМ-изображения обнаруженных электронно-плотных включений. Пример получаемых изображений показан на рис. 3;

— на срезах образцов группы № 2 тканей животных, контрастированных тетраоксидом осмия, дополнительно определяют зоны преимущественного накопления нанотрубок в клетках и тканевых структурах, отмечают наличие, характер и степень структурно-морфологических изменений в клетках и тканях. Идентификация тканевых и клеточных структур и заключение о локализации нанотрубок должны выполняться специалистом, имеющим опыт подобных исследований;

— получают электронограммы обнаруженных электронно-плотных включений. Пример электронограммы приведен на рис. 3. Для получения электронограммы выделяют область с анализируемым электронно-плотным включением с помощью селективной диафрагмы. Если получаемые электронограммы имеют четкие рефлекссы, эти изображения должны быть сохранены для анализа. В противном случае достаточно сделать отметку в лабораторном журнале об отсутствии четких рефлекссов от данного электронно-плотного включения. Следует сохранить одно типичное изображение, пока-

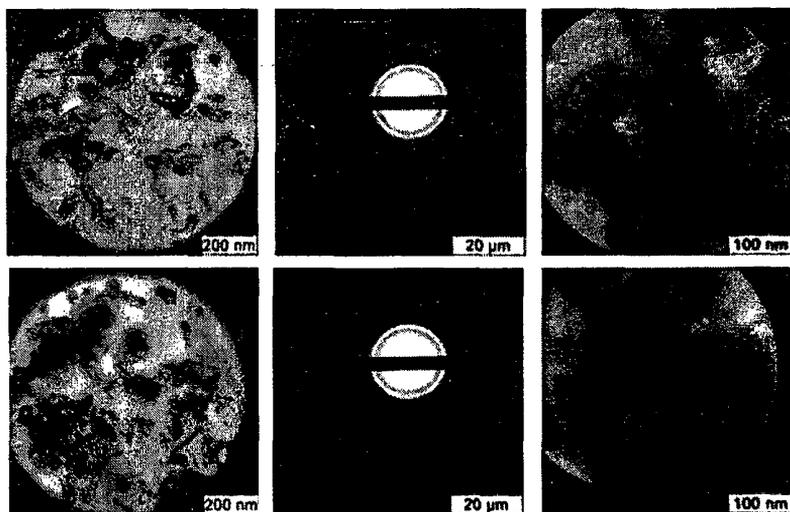


Рис. 3. Примеры ПЭМ-изображений, полученных при больших увеличениях, и электронограммы скоплений МУНТ в срезах тканей растений (верхний ряд) и животных (нижний ряд)

зывают, что от электронно-плотных включений в образце не удастся наблюдать информативную дифракционную картину;

— для того чтобы подтвердить, что полученные рефлексы на электронограмме соответствуют электронно-плотным включениям, имеющим морфологические признаки МУНТ, проводится анализ методом тёмного поля. Для этого в режиме электронной дифракции с помощью апертурной диафрагмы на электронограмме выделяют участок одного из ярких характеристических колец. Изменяют режим измерения и получают изображение той же области в темном поле. Совпадение изображений электронно-плотного включения в режимах темного поля и светлого поля подтверждает, что источником выделенного на электронограмме участка кольца является именно это включение. В случае если метод применяют для идентификации источников нехарактерных для МУНТ индивидуальных рефлексов или дифракционных колец, их выделяют с помощью апертурной диафрагмы, а кристаллы, которые выявляют на полученном темнопольном изображении, относят к неспецифическим включениям;

— после получения полной картины о морфологии отдельных МУНТ и их скоплений и снятия с них электронограмм, проводится анализ однородности распределения МУНТ. Для получения статистически значимой выборки данных оператор намечает линию, проходящую через весь образец, и вдоль этой линии измеряет не менее 30 равномерно отстоящих друг от друга изображений в режиме ПЭМ при одинаковом увеличении. Изображения сохраняют без нормировки яркости на максимум, добавляя на изображения масштабную метку. Если в поле зрения, от которого предполагается регистрировать изображение, МУНТ отсутствуют, то сохранять изображение не следует, однако количество таких полей зрения должно быть отмечено в отчетных документах и учтено при анализе плотности распределения МУНТ по образцу (п. 8.5);

— в случаях, когда идентификация электронно-плотных включений по ПЭМ-изображениям затруднена, следует использовать метод электронной дифракции.

VIII. Анализ полученных данных

8.1. Преобразование полученных изображений в форму удобную для анализа

Файлы с полученными изображениями и электронограммами конвертируют из внутреннего формата программного обеспечения к прибору в общедоступные форматы (*.jpeg или *.tiff, 8-битный), не допуская изменения исходного динамического

диапазона в результате автоматического нормирования на максимальную интенсивность и изменения дискретности оцифровки за счет объединения нескольких соседних пикселей (элементов изображения) в один элемент. Сохраняемые изображения должны содержать метку масштаба.

8.2. Программное обеспечение для анализа изображений и электронограмм

Для обработки изображений рекомендуются программы, аналогичные свободно распространяемым программам «ImageJ» (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) или «UTHSCSA Image Tool» («UTHSCSA Dental Diagnostic Science», США, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). Также может использоваться программное обеспечение к электронному микроскопу, если в нем есть возможности для обработки изображений.

8.3. Идентификация МУНТ по морфометрическим критериям

Проводят анализ детальных изображений, полученных на увеличении, при котором возможно рассмотреть морфологию индивидуальных нанотрубок (пример — рис. 1, 3, 4). Для идентификации МУНТ используют два характерных морфологических признака, по которым МУНТ можно отличить от других электронно-плотных включений, которые могут присутствовать в тканях растений или животных:

- а) МУНТ имеют форму протяженного цилиндра (трубки);
- б) для МУНТ характерно наличие просвета между стенками.

Следует учитывать, что на образец, как правило, попадают только сечения нанотрубок, в связи с этим невозможно достоверно оценить истинную длину МУНТ. Для обнаруженных электронно-плотных включений отмечают наличие просвета между стенками, характерного для МУНТ, оценивают размер просвета и сравнивают полученные результаты с образцом сравнения определяемых МУНТ.

Обнаруженные электронно-плотные включения относят к определяемым МУНТ, если выполнены оба условия (форма протяженного цилиндра и наличие просвета между стенками, размер которого совпадает с размером просвета для образца сравнения МУНТ). Рекомендуется дополнительно проводить идентификацию обнаруженных нанотрубок методом электронной дифракции.

При идентификации по морфологическим критериям важным фактором является отсутствие электронно-плотных включений, по-



Рис. 4. Пример ПЭМ-изображения отдельной нанотрубки (электронно-плотное включение протяженной цилиндрической формы с просветом между стенками) в срезе ткани брюжейки мыши

хожих на МУНТ, в контрольных образцах, не содержащих МУНТ. Результаты анализа считают значимыми, если плотность электронно-плотных включений, похожих на МУНТ, в контрольных образцах в 10 и более раз ниже, чем в анализируемых образцах.

Если в образце обнаруживаются скопления МУНТ, то проводят оценку среднего размера таких скоплений (если найдено не менее 10—20 конгломератов). В случае обнаружения электронно-плотных включений, в которых идентификация МУНТ по морфологическим признакам затруднена или невозможна, следует провести идентификацию МУНТ в этих включениях методом дифракции электронов.

8.4. Идентификация МУНТ методом дифракции электронов

Анализ дифракции электронов позволяет получить характерную для МУНТ электронограмму и, соответственно, сделать заключение о том, являются ли обнаруженные структуры нанотрубками или относятся к другому типу включений.

В качестве критерия, позволяющего идентифицировать МУНТ, рекомендуется оценивать соотношение диаметров характеристических колец электронограммы и сравнивать их со значениями, установленными для образца сравнения МУНТ. Пример соотношения диаметров характеристических максимумов для картины электронной дифракции МУНТ приведен в табл. 2.

Соотношения диаметров (d_n/d_2) характеристических максимумов 2-го и последующих (n -х) порядков в электронограмме промышленного образца

n	3	4	5
d_n/d_2	1,5	2	2,75

Также можно использовать метод наложения электронограмм, измеренных от образца сравнения и анализируемого образца. Если при наложении электронограмм положение рефлексов анализируемых включений совпадает с дифракционными кольцами от образца сравнения МУНТ, то обнаруженные электронно-плотные включения относят к МУНТ.

Относительная интенсивность дифракционных колец зависит от количества МУНТ на участке, ограниченном диафрагмой, ориентации МУНТ относительно пучка электронов, выбора параметров микроскопа при проведении измерений. Для скоплений МУНТ, как правило, четко различимы дифракционные кольца, а для одиночных МУНТ не всегда удастся получить четкую дифракционную картину. Если электронно-плотные включения в образце настолько разрежены, что от них не удастся измерить качественную электронограмму, то их идентификация как МУНТ может быть выполнена только при наличии четких морфологических особенностей.

8.5. Анализ плотности распределения МУНТ

По полученным при анализе однородности распределения МУНТ ПЭМ-изображениям (п. 7.2) оценивается плотность распределения МУНТ. Для этого в серии изображений образца (не менее 30), полученных вдоль выбранной линии, подсчитывают количество обнаруженных МУНТ (M). Двумерную плотность распределения МУНТ (D) определяют по формуле 1:

$$D = M/(S \times N), \quad \text{где} \quad (1)$$

N — общее количество полученных изображений (как содержащих, так и не содержащих МУНТ);

S — площадь образца на одном изображении.

Равномерность распределения МУНТ характеризуют величиной дисперсии σ^2 среднего количества нанотрубок на область среза (формула 2).

$$\sigma^2 = \Sigma (M_i - M/N)^2 / (N-1), \quad \text{где} \quad (2)$$

M_i — количество МУНТ в i -м изображении.

Суммирование по i ведут по всем N полученным изображениям (как содержащим, так и не содержащим МУНТ).

Если вне границ ткани обнаруживают включения, аналогичные МУНТ из образца сравнения, то это указывает на возможную контаминацию среза МУНТ в процессе пробоподготовки. Если плотность МУНТ вне ткани в 10 и более раз ниже, чем в пределах ее, результаты анализа считают значимыми. Если плотности частиц внутри среза ткани и в эпоксидной смоле вне ее сравнимы, процедуру пробоподготовки повторяют, используя свежеприготовленные растворы и смеси.

IX. Представление полученных данных

Результаты, полученные для каждой серии срезов и образца сравнения МУНТ, представляют в виде таблицы, в которой указывают информацию о срезе и характеристики обнаруженных электронно-плотных включений, идентифицированных как МУНТ (одиночные нанотрубки или конгломерат МУНТ, наличие протяженной формы, наличие просвета между стенками, размер просвета, результаты анализа методом дифракции электронов). Пример фрагмента такой таблицы представлен в виде табл. 3. В случае анализа срезов, контрастированных тетраоксидом осмия, также указывают компартмент, в котором выявлена частица.

Если МУНТ обнаруживаются в виде конгломератов и выборка значений средних размеров конгломератов МУНТ превышает $n = 30$, проводят их статистический анализ. Для выборки строят гистограмму распределения по значениям, проводят проверку на нормальность распределения, вычисляют среднее и среднее квадратичное отклонение. Если МУНТ обнаруживаются как в виде конгломератов, так и отдельных нанотрубок, рассчитывают долю (в %) каждого варианта и представляют результат в виде круговой диаграммы.

Результаты анализа должны быть представлены в виде текстового документа, содержащего таблицы результатов (пример — табл. 3) и графические приложения-иллюстрации. Документ должен содержать заключение о выявлении или невыявлении МУНТ в тканях животных или растений. Оформление документа должно удовлетворять требованиям ГОСТ 7.32—2001.

Результаты анализа по выявлению и идентификации МУНТ в листьях риса (*Oryza L.*) (пример)

№ среза	№ поля зрения на срезе	Количество электронно-плотных частиц в поле зрения, шт	№ п/п	Наличие протяженной формы	Наличие просвета	Размер просвета, нм	Одиночные МУНТ или конгломерат	Средний размер*, нм (для конгломератов)	Электронная дифракция
1	10	2	23	+	+	19	одиночная	—	—
			24	—	—	н/о**	конгломерат	124	+
<p>* Среднее размеров, измеренных вдоль наиболее длинной и наиболее короткой осей;</p> <p>**н/о – невозможно определить</p>									

Результат считают отрицательным (МУНТ не обнаружены), если МУНТ не выявлены ни в одной из серии анализируемых срезов, но достоверно выявляются и идентифицируются в образце сравнения МУНТ. В этом случае представляют репрезентативные микрофотографии анализируемого образца и образца сравнения.

Если МУНТ достоверно обнаружены и идентифицированы, в отчете представляют следующие данные:

- в срезах каких органов и тканей обнаружены/не обнаружены МУНТ;
- репрезентативные изображения МУНТ, измеренные методом ПЭМ, в неконтрастированных (и в контрастированных тетраоксидом осмия) срезах;
- наличие и размер просвета между стенками, сопоставление с образцом сравнения МУНТ;
- если МУНТ обнаруживаются в виде конгломератов – гистограмму распределения конгломератов МУНТ по размерам, средний размер, его среднее квадратичное отклонение, а также сопоставление с соответствующими данными для образца сравнения;

– электронограммы и их сопоставления с эталонными электронограммами МУНТ. Обязательно должен быть отмечен факт отсутствия таких частиц в контрольном образце (в противном случае достоверность анализа подвергается сомнению);

– равномерность или неравномерность распределения МУНТ, плотность распределения МУНТ в образце;

– тип локализации МУНТ. Результатом анализа локализации МУНТ является заключение либо о структурах, в которых преимущественно локализуются нанотрубки, либо о неспецифичном (диффузном) распределении МУНТ в клеточных и тканевых структурах. При большом количестве МУНТ в анализируемых срезах, следует перечислить структуры, в которых нанотрубки достоверно не обнаруживаются;

– любую дополнительную информацию, полученную при анализе образца, которая представляется важной для интерпретации приведенных данных (на усмотрение составителя отчета, в виде примечания).

Х. Обозначения и сокращения

МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

**Порядок выявления и идентификации многостенных
углеродных нанотрубок в срезах тканей животных и растений методами
аналитической электронной микроскопии**

**Методические рекомендации
MP 1.2.0045—11**

Редактор Л. С. Кучурова
Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 13.04.12

Формат 60×88/16

Тираж 200 экз.

Печ. л. 2,5
Заказ 27

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