

УДК 620.3

UDC 620.3

**МЕЖДУНАРОДНЫЕ
НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СТАНДАРТЫ
ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ**

**INTERNATIONAL NANOTECHNOLOGICAL
STANDARDS FOR MEDICAL USE**

Павлыго Татьяна Михайловна
к.т.н.
*Институт Проблем Материаловедения
им.И.М.Францевича НАН Украины, Киев*

Pavligo Tatyana Mikhaelovna
Cand.Tech.Sci.
*Frantsevich Institute for Problems of Materials
Science of NAS of Ukraine, Kiev*

Пломодьяло Роман Леонидович
к.т.н.
*Кубанский государственный технологический
университет, Краснодар, Россия*

Plomodyalo Roman Leonidovich
Cand.Tech.Sci.
*Kuban State Technological University, Krasnodar,
Russia*

Свистун Лев Иванович
д.т.н.
*Кубанский государственный технологический
университет, Краснодар, Россия*

Svistun Lev Ivanovich
Dr.Sci.Tech.
*Kuban State Technological University, Krasnodar,
Russia*

Сердюк Геннадий Георгиевич
д.т.н.
*Институт Проблем Материаловедения
им.И.М.Францевича НАН Украины, Киев*

Serdyuk Gennady Georgievich
Dr.Sci.Tech
*Frantsevich Institute for Problems of Materials
Science of NAS of Ukraine, Kiev*

В статье рассмотрены имеющиеся стандарты в области наноматериалов, предназначенные для применения в медицине. Показаны проблемы и спорные ситуации, возникшие с применениями новых формулировок в области наноматериалов

The article describes the existing standards in the field of nanomaterials for use in medical science. The problems and controversial situations arising from applications of new formulations in the field of nanomaterials are presented

Ключевые слова: НАНОТЕХНОЛОГИИ,
НАНОМАТЕРИАЛ, МЕЖДУНАРОДНАЯ
СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Keywords: NANOTECHNOLOGIES,
NANOMATERIAL, INTERNATIONAL
STANDARDIZATION

Международную стандартизацию в области нанотехнологий и наноматериалов осуществляет Международная организация по стандартизации (International Organization for Standardization, ISO). В ее рамках создан Технический комитет стандартизации (Technical Committee, (TC) - ISO/TC 229 «Нанотехнологии», который состоит из 4 рабочих групп (РГ): РГ1 «Терминология и номенклатура»; РГ2 «Измерения и характеристики»; РГ3 «Здоровье, безопасность и окружающая среда»; РГ 4 «Спецификации материалов».

При оценке наиболее важных исследований, которые могут серьезно повлиять на экономическое и социальное развитие стран в долгосрочной (15 – 20 лет) перспективе, эксперты в настоящее время на первое место ставят направление по разработке нанобиотехнологий и развитию

материаловедения для медицины (биоматериалы, совместимые с человеческим организмом). ISO утвердила для использования 3 нанотехнологических стандарта, предназначенных для применения в медицине [1 - 3]. Ниже приводится краткое изложение указанных трех стандартов.

ISO 10801:2010 Нанотехнологии - Формирование методом испарения/конденсации металлических наночастиц для тестирования ингаляционной токсичности [1]. Наноразмерные 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. Рассматриваемый международный стандарт устанавливает требования и рекомендации по созданию аэрозолей серебра методом испарения/конденсации, а также организацию и контроль воздействия аэрозолей на животных (мышей).

На рисунке 1 представлена схема экспериментальной установки для исследования ингаляционной токсичности.

Для генерации аэрозоля плоский керамический нагреватель 3, подключенный к источнику питания переменного тока 2, размещается в кварцевом корпусе 5. Этот корпус имеет диаметр 70 мм и длину 140 мм. Нагревательный элемент 3 размером 50×5×1,5 мм способен нагревать поверхность до 1500 °С. 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.

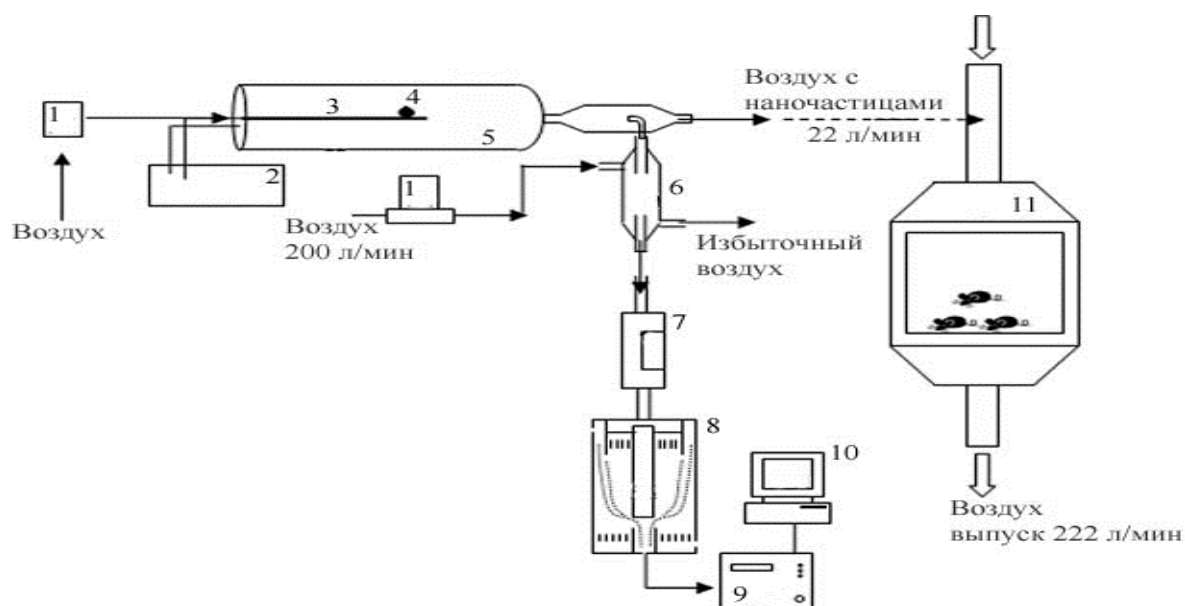


Рисунок 1 – Схема экспериментальной установки для исследования ингаляционной токсичности:

1 – контроллер массового расхода; 2 – источник питания; 3 – керамический нагреватель; 4 – исходный материал; 5 – кварцевая трубка; 6 – дилутор; 7 – нейтрализатор; 8 – дифференциальный классификатор мобильности; 9 – счетчик конденсированных частиц; 10 – персональный компьютер; 11 – ингаляционная камера

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 по сравнению с окружающей средой, чтобы избежать воздействия на работников в случае утечки.

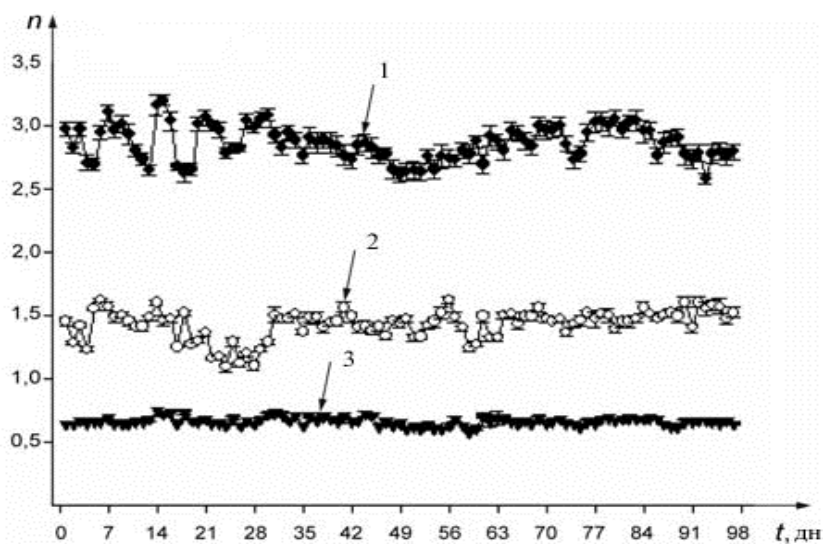
Размерное распределение наночастиц серебра определяется с помощью системы анализа дифференциальной мобильности 8 и счетчика конденсированных частиц 9.

Требования к получаемым наночастицам включают соблюдение их размеров и химической чистоты. Размерное распределение частиц 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 – 1351 °С 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.

По электронно-микроскопическим изображениям видно, что 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 вводятся в ингаляционную камеру 11 с экспериментальными животными, которых впоследствии проверяют на ингаляционную токсичность. Как показано на рисунке 2, концентрация наночастиц серебра в камере является стабильной в течение 90-дневного исследования ингаляционной токсичности.



n – количество ($\times 10^6$ частиц/см³);

t – время, дни;

Рисунок 2 – Сохранение концентраций в течение 90-дневной генерации наночастиц серебра и ингаляционного воздействия:

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 и т.д.);
- 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 нанотехнологических 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.

Стандарт предлагает набор контролируемых 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.

На рисунке 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°C) и расход при воздушном течении - 30 л/мин.

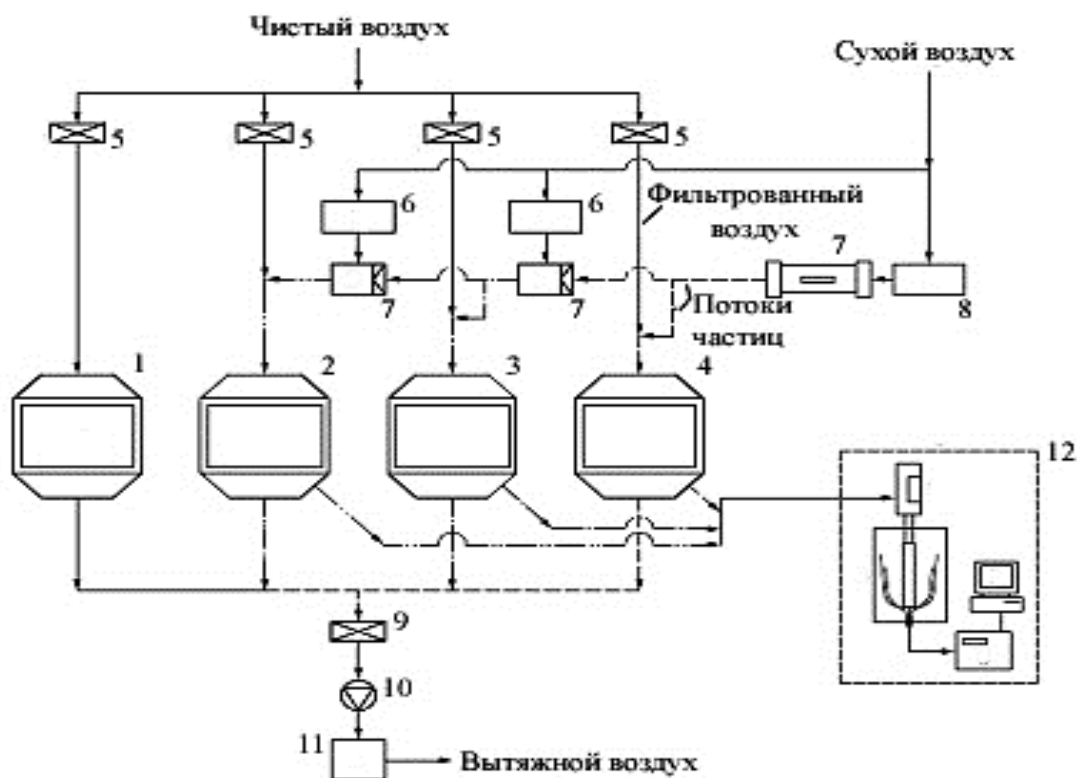
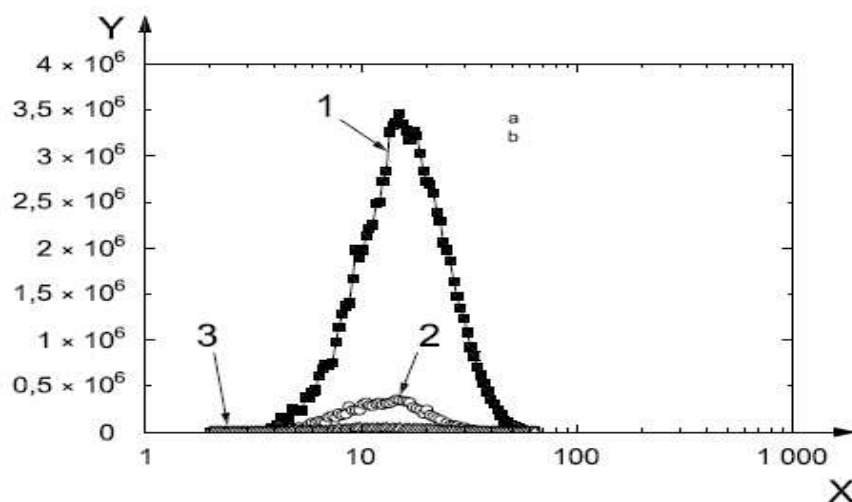


Рисунок 3 – Установка распределения и мониторинга концентраций дискретных наночастиц при изучении ингаляционной токсичности:

1 – 4 – ингаляционные камеры: 1 – контрольная, 2 – с наименьшей концентрацией частиц, – 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 (САДМ) (см. 7– 10 на рисунке 2)

Установка производит наночастицы в различных концентрациях (высокая, средняя и низкая) в трех отдельных камерах. Распределение наночастиц по размерам определяются непосредственно в каждой отдельной камере. Рисунок 4 иллюстрирует распределения серебряных наночастиц, измеренных в трех камерах. Распределение по размерам частиц серебра контролировалось после 18 ч с целью определения неустойчивости.

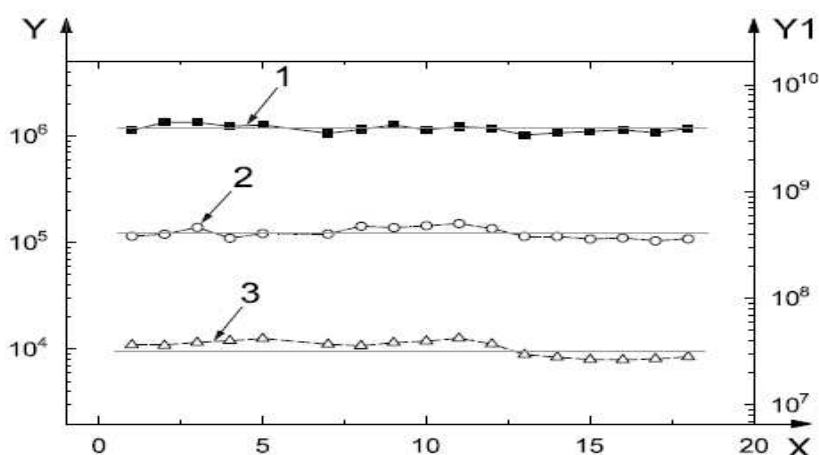
Рисунок 4 иллюстрирует различия в концентрации частиц во времени в отдельных экспозиционных камерах, а рисунок 5 - изменения численной концентрации /генерации наночастиц серебра в течение длительного времени.



X – текущий диаметр, D_p (нм); Y – $dN/d\log(D_p)$, частиц/см³

Рисунок 4 – Распределение частиц по размерам в камерах с высокой, средней и низкой концентрацией частиц:

1 – фракция высокой концентрации; 2 – фракция средней концентрации; 3 – фракция низкой концентрации; а, b – скорость течения в дилуторах: 5,75 л/мин.



X – время (в часах); Y – общая концентрация (число частиц/см³);
Y₁ – общее генерирование частиц (число частиц/сек)

Рисунок 5 – Изменения численной концентрации/генерации наночастиц серебра в течение длительного времени в камерах:

1 – камера высокой концентрации; 2 – средней концентрации; 3 – низкой концентрации.

Вообще, относительно наночастиц должны быть получены следующие данные:

а) распределение наночастиц (в нанометрах), средний геометрический диаметр и его нормативное отклонение в каждой экспозиционной камере;

б) морфология частиц с помощью просвечивающей или сканирующей электронной микроскопии;

в) количественная концентрация (в виде частиц на кубический сантиметр) в каждой экспозиционной камере;

г) массовая концентрация наночастиц, введенных в каждую экспозиционную камеру;

д) химический состав наночастиц.

Точная характеристика действия испытуемого вещества имеет важное значение для исследования ингаляционной токсикологии. Целью токсикологии ингаляционных наночастиц является установление количественных соотношений между наблюдаемыми токсикологическими результатами и 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 ameobocyte lysate* [3] ¹⁾. Эндотоксины, содержащие активные липополисахариды, входят в состав наружных мембран клеточных стенок грам-отрицательных 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

¹⁾ Лизат амебоцитов *Limulus* (LAL) - хромогенный метод определения эндотоксина (LAL-тест).

фрезерованием, при ультразвуковой обработке. Испытуемый образец должен быть проверен сразу после приготовления.

Рассматриваемый стандарт дает представления о применении 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, при котором гель не должен вытекать.

Гель-тромбный метод предполагает использование эндотоксина в виде лиофилизированного порошка. Приготавливаются растворы эндотоксина в воде четырех концентраций – $0,25 \lambda$, $0,5 \lambda$, λ и 2λ . Здесь λ - маркировочная чувствительность, выраженная в ЕЭ/мл²⁾. Гель-тромбный метод позволяет измерять величину $\lambda = 0,015$ ЕЭ/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-реактива в воде, свободного от эндотоксина, следующим образом:

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

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

Чувствительность LAL-реактива в воде, свободного от эндотоксина, должна быть в пределах от $0,5 \lambda$ до 2λ .

Протокол испытаний должен включать:

а) результаты испытаний;

²⁾ ЕЭ - эндотоксиновая единица; нормативная единица активности эндотоксина.

- б) процедуры испытаний;
- в) полную идентификацию тестируемых наноматериалов;
- г) порядок подготовки образца к исследованию, условия хранения испытуемых образцов и сведения о классификации используемых лабораторных условий;
- д) идентификацию LAL-реактива (торговое название, код производителя, каталог или формулировочный номер, номер партии или дата изготовления, чувствительность и т.д.);
- е) определение нормативного эндотоксина (торговое название, код производителя, каталог или номер формулировки, номер партии или дату изготовления, эффективность и т.д.);
- ж) обоснованность испытания, включая столкновение патентных притязаний на опытный образец.

Следует отметить, что до сих пор остается окончательно не утвержденным определение основополагающего термина «наноматериал». В соответствие со стандартом [4, ч.1], наноматериал - это материал по крайней мере с одним внешним наномасштабным размером. В октябре 2011 года, через год после редакционной работы и консультаций с общественностью, опубликовано определение в следующей редакции: «наноматериал» означает естественный, случайный или промышленный материал, содержащий частицы в несвязанном состоянии или в виде агрегата или в виде агломерата, и в котором у 50 % или более частиц один или более из внешних размеров находятся в диапазоне 1 - 100 нм [5]. При этом сделано следующее примечание: в отдельных случаях, когда это оправдано озабоченностями относительно окружающей среды, здоровья, безопасности или конкурентоспособности, граница размерного распределения 50 % может быть заменена на пределы от 1 до 50 %. Такие объекты, как фуллерены, графеновые чешуйки и одностенные углеродные нанотрубки, с одним или более внешними размерами менее 1 нм следует

рассматривать в качестве наноматериалов. Определение исключает наноструктурные материалы, имеющие внутренние или поверхностные структуры в диапазоне 1-100 нм (например, электронные компоненты).

В работе [5] вместе с тем отмечается, что ситуация, возникшая с новой формулировкой, остается, тем не менее, спорной в связи с научными проблемами (выбор соответствующих метрических показателей, физические и химические состояния, диапазон размеров, распределение по размерам и т.д.), различными обстоятельствами, относящимися к обдумываемому контексту (например, нормативность, научные цели, области применения и т.д.), а также в связи с возможными техническими и экономическими последствиями.

В заключение следует отметить, что международные стандарты ISO не являются обязательными, т.е. 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, такие страны Европейского Союза, как Франция, Германия, Швейцария, Нидерланды и Великобритания. В числе стран-членов ISO находится Россия и Украина, предприятия и специализированные научные организации которых занимаются разработками и исследованиями в области наноматериалов и нанотехнологий.

Список литературы

1. ISO 10801:2010 Nanotechnologies – Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method.– Ed. 2010–12–15. – ISO, 2010. – 22 p.
2. ISO 10808:2010 Nanotechnologies – Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing. – Ed. 2010–12–15. – ISO, 2010. –18 p.
3. ISO 29701:2010 Nanotechnologies – Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems – Limulus amoebocyte lysate (LAL) test. – Ed. 2010–09–15. – ISO, 2010. –20 p.

4. ISO/TS 80004 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1–7. – Ed. 2010 – 2012. – ISO, 2012.
5. Montovani E., Porcari A., Morrison M.D. and Geertsma R.E. Developments in Nanotechnologies. Regulation and Standards 2012 – Report of Observatory Nano. April 2012. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.observatorynano.eu

References

1. ISO 10801:2010 Nanotechnologies - Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method.– Ed. 2010–12–15. – ISO, 2010. – 22 p.
2. ISO 10808:2010 Nanotechnologies - Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing. – Ed. 2010–12–15. – ISO, 2010. –18 p.
3. ISO 29701:2010 Nanotechnologies - Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems - Limulus amebocyte lysate (LAL) test. – Ed. 2010–09–15. – ISO, 2010. –20 p.
4. ISO/TS 80004 Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1–7. – Ed. 2010 – 2012. – ISO, 2012.
5. Montovani E., Porcari A., Morrison M.D. and Geertsma R.E. Developments in Nanotechnologies. Regulation and Standards 2012 – Report of Observatory Nano. April 2012. Jelektronnyj resurs. -Rezhim dostupa: www.observatorynano.eu