

**Т. М. Павлыго, Г. Г. Сердюк, И. Ю. Павлыго**

*Институт проблем материаловедения им. И.Н.Францевича НАН Украины*

## **ОПАСНОСТЬ НАНОМАТЕРИАЛОВ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ЕЕ ОЦЕНКИ**

*С учётом того, что в перспективе ожидается тесный контакт человека с наноматериалами, изучение вопросов безопасности и потенциальных рисков их производства и использования представляется первоочередной задачей. В статье рассмотрены международные стандарты по методам оценки опасности наночастиц.*

*Ключевые слова:* наноматериалы, стандартизация, оценка опасности наночастиц.

**Т. М. Павлыго, Г. Г. Сердюк, И. Ю. Павлыго**

## **НЕБЕЗПЕКА НАНОМАТЕРІАЛІВ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ МЕТОДІВ ЇЇ ОЦІНКИ**

*З урахуванням того, що в перспективі очікується тісний контакт людини з наноматеріалами, вивчення питань безпеки та потенційних ризиків їх виробництва і використання представляється першочерговим завданням. У статті розглянуті міжнародні стандарти щодо методів оцінки небезпеки наночастинок.*

*Ключові слова:* наноматеріали, стандартизація, оцінка небезпеки наночастинок.

*Літ.8.*

**T. Pavlyho, G. Serdyuk, I. Pavlyho**

## **DANGER NANOMATERIALS AND STANDARDIZED METHODS OF ITS EVALUATION**

*In the future people will have direct contact with nanomaterials, the study of the safety and potential risks of their production and use is important. In article the international standards on methods for risk assessment of nanoparticles are characterized.*

*Keywords:* nanomaterials, standardization, risk assessment of nanoparticles.

**Введение.** Наступление эры нанотехнологий - это не только прорыв науки в различные сферы человеческой деятельности, но и огромное количество всевозможных рисков, оценить которые весьма сложно. Взаимодействие наноматериалов с живыми клетками может быть непредсказуемым и опасным. Наночастицы, имея малые размеры, легко проникают в организм человека через защитные барьеры (эпителий, слизистые и т.д.), респираторную систему и желудочно-кишечный тракт. Наночастицы способны образовывать комплексные соединения с неизвестными ранее свойствами. Абсорбирующие свойства наночастиц значительно выше, чем у других молекул, а значит они более активно будут поглощать загрязнители. Выброс таких наноматериалов в окружающую среду может привести к загрязнению атмосферы, почвы, воды. При неправильном использовании наноматериалов научный и технологический прогресс может обернуться глобальной катастрофой.

Во многих странах мира началась разработка системы нормативно-методических документов, регламентирующих оценку безопасности и контроль наноматериалов на всех уровнях (определение приоритетов, анализ и нормирование, пробоотбор, токсиколого-гигиеническая оценка, контроль, оценка рисков) и на всех стадиях жизненного цикла наноматериалов (разработка, производство, транспортировка, хранение, оборот, применение, утилизация).

В настоящее время в мире производится порядка 2000 видов наноматериалов. Их высокая реакционная способность, подвижность, фотоактивность и другие свойства могут способствовать их повышенной токсичности. Число созданных по нанотехнологии потребительских изделий, содержащих серебряные, золотые, углеродные, оксид-цинковые, диоксид-титановые и кремнеземные наночастицы, растет очень быстро.

Ингаляция наночастицами может осуществляться в результате прямого просачивания при газофазных и парофазных процессах, загрязнении воздуха на рабочем месте при осаждении или восстановлении продукта и при манипулировании с ним, а также после восстановительной обработки и упаковки. Воздействие наноразмерных частиц может возникнуть в процессе производства, при использовании и утилизации в окружающем воздухе или на рабочем месте и представляет угрозу для общественного и профессионального здоровья.

В настоящее время представление о токсичности наноразмерных частиц является неполным, но постоянно расширяющимся.

**Описание стандартов.** Международная организация по стандартизации (ISO) разработала 8 стандартов посвященных вопросам опасности наноматериалов. Среди них 3 постоянно действующих стандарта [1 – 3] и 5 предназначенных для временного использования типа ISO/TR<sup>1</sup> [4 – 7] и ISO/TS<sup>2</sup> [8].

**ISO 10801. Нанотехнологии. Формирование методом испарения/конденсации металлических наночастиц для тестирования ингаляционной токсичности [1].**

Стандартом устанавливаются требования и рекомендации для создания наночастиц серебра в виде аэрозолей. Тестируемые наночастицы образуются в воздухе генератора при нагревании и испарении исходного твердого чистого серебра. Затем серебряный пар охлаждается до образования зародышей и конденсируется с образованием аэрозолей. Средний геометрический диаметр (СГД) наночастиц должен быть менее 100 нм. Это обеспечивается путем регулирования скоростей испарения и конденсации металла. Также должны быть соблюдены все требования локальной безопасности: должен быть предотвращен контакт с горячими поверхностями и электрическими проводниками. Газ, выбрасываемый в атмосферу из системы, должен быть пропущен через высокоэффективный воздушный фильтр. Не должно быть заметных утечек в атмосферу из аэрозольного генератора. Камеры воздействия должны эксплуатироваться при более низком давлении (на 5 мм вод. ст.) по отношению к условиям окружающей среды, чтобы избежать воздействия на работников в случае утечки.

Для характеристики наночастиц, используемых для определения ингаляционной токсичности, имеет существенное значение контроль размерного распределения частиц и их общей массовой концентрации. Система включает дифференциальный спектрометр электрической мобильности, восстановитель заряда частицы, расходомеры, детектор частиц, связующее сантехническое оборудование, компьютер и соответствующее программное обеспечение. Должна быть установлена чистота исследуемых частиц.

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

**ISO 10808. Нанотехнологии. Определение характеристик наночастиц в ингаляционных камерах для тестирования ингаляционной токсичности [2].**

Ингаляционная токсичность наночастиц вызывает особую озабоченность при охране здоровья рабочих и потребителей. Стандарт устанавливает требования и дает рекомендации относительно характеристик наночастиц, взвешенных в воздухе ингаляционных камер, с целью исследования ингаляционной токсичности с учетом массы частиц, распределения по размерам, количественной концентрации и состава.

Стандарт предлагает набор контролируемых камер тестирования ингаляционной токсичности и соответствующую систему анализа дифференциальной мобильности. Последняя необходима для определения числа частиц, размера, распределения, площади поверхности и расчетной дозы массы, а также морфологического исследования и для определения химического состава. Стандарт также включает в себя обычный дозиметрический контроль массы и другой физико-химический контроль для использования параметра, определяющего токсичность. Этот метод оценивает площадь поверхности наноразмерных частиц, массовую дозу, распределение частиц, состав и дисперсность.

Представлена схема установки распределения трех различных концентраций наночастиц для исследования токсичных эффектов ингаляции наночастиц серебра, полученных из чистой серебряной (99,99 % по объему) проволоки.

**ISO 29701. Нанотехнологии. Анализ образцов из наноматериалов на содержание эндотоксина в случае in vitro систем. Анализ с использованием Limulus amoebocyte lysate<sup>3</sup> [3].**

Эндотоксины, содержащие активные липополисахариды, входят в состав наружных мембран клеточных стенок грам-отрицательных бактерий, таких как кишечные палочки, сальмонеллы, шигеллы и др.

<sup>1</sup> TR - Technical Report (*пер.* Технический отчет).

<sup>2</sup> TS - Technical Specification (*пер.* Технические требования).

<sup>3</sup> Лизат амебоцитов Limulus (LAL) - хромогенный метод определения эндотоксина (LAL-тест).

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.

Рассматриваемый стандарт дает представления о применении LAL-теста к образцам наноматериалов, диспергированных в жидкой среде, например, воде, сыворотке или реакционной среде.

Стандарт включает справочные приложения: примеры возможных помех для LAL-теста; описание гель-тромбного метода (с использованием пробирок с предварительно подготовленным LAL-реактивом); описание процедуры для кинетических методов с использованием считывающих устройств.

**ISO/TR 12885 Нанотехнологии. Техника безопасности и защита здоровья в нанотехнологическом производстве [4].**

Стандарт основан на информации относительно определения характеристик, влияющих на здоровье, методов контроля уязвимости от наноаэрозолей с замечаниями по их ограниченности, а также относительно современного состояния возможностей оценки опасности при производстве и обработке наноматериалов.

Когда имеется немного научной информации или если материал является уникальным, возможно только качественное оценивание опасности. При наличии данных о реакции на воздействие (например, в токсикологическом или эпидемиологическом исследовании) возможно количественное оценивание опасности. Сегодня количественные показатели опасности здоровью и данные о влиянии большинства наноматериалов не доступны. Поэтому оценки опасности здоровью на рабочем месте сегодня основываются в значительной степени на профессиональных суждениях относительно идентификации опасности, потенциального воздействия и применения соответствующих мер по обеспечению безопасности.

Учитывая, что самым распространенным может быть влияние очень низких концентраций наночастиц, наиболее подходящими контролируруемыми параметрами являются измеряемые биологическим индикатором отклонения от базового уровня. Использование биологических показателей - наиболее полезный подход при оценке эффективности предложенного контроля еще и потому, что в это время ограничена возможность измерения аероконцентраций наночастиц.

На данном этапе, когда влияние наночастиц на здоровье человека еще неясно, важным свидетельством в идентификации неблагоприятного воздействия являются соответствующие записи о медицинском осмотре.

Рекомендуется разработка базовой программы мониторинга здоровья работающего. Такая программа должна основываться на:

- 1) идентификации служебного персонала, подвергающегося воздействию искусственных наночастиц;
- 2) квалификации рабочего места и оценке влияния на здоровье работающего;
- 3) обеспечении работающих с наночастицами базовыми медицинскими оценками и включении последних в общепринятую стандартную программу мониторинга здоровья.

Работающим с искусственными наночастицами должны проходить периодические медицинские осмотры, которые включали бы регулярное тестирование легких, почек, печени и тестирование кроветворной функции. Использование такой информации может помочь фирмам, исследователям, рабочим принять меры для охраны здоровья и безопасности при изготовлении, обработке, использовании и хранении произведенных наноматериалов.

**ISO/TR 13014. Нанотехнологии. Руководство по физико-химическому описанию материалов с заданной nanoшкалой для токсикологической оценки [5].**

Стандарт устанавливает физико-химические характеристики изготавливаемых нанообъектов и их агрегатов и агломератов (НОАА) перед проведением токсикологической оценки, включающей оценку влияния на человека и экологию. Важное значение имеет оценка его физико-химических характеристик, включая степень чистоты, поскольку присутствие загрязнений может быть основной причиной неблагоприятных эффектов. О материале можно сказать, что он чистый,

если его физические и химические свойства соответствуют тем, которые предварительно установлены и зарегистрированы в технических условиях.

Физико-химическими характеристиками, подлежащими установлению, являются:

- размер частиц и распределение размеров;
- состояние агрегации/агломерации в сыворотке крови или в среде культуры ткани;
- характеристика состава, которая должна включать как ожидаемые компоненты состава, так и нежелательные компоненты, например загрязнения;
- химические свойства поверхности, которые определяются одноатомными веществами или специфическими химическими компонентами, свободно закрепленными на поверхности с полным покрытием.

Необходимо описание контура или очертаний поверхности нанообъектов или ансамблей нанообъектов, агрегатов, агломератов, которые составляют исследуемый материал. Характеристика состава должна включать как ожидаемые компоненты состава, так и нежелательные компоненты, например, загрязнения. Важное значение имеет определение электрического заряда на поверхности, находящейся в контакте с непрерывной фазой. Значение потенциала состоит в том, что его величина может определять скорость, с которой некоторые биологические системы могут аккумулировать НОАА в окружающей среде, и, следовательно, вероятность того, что потенциально возможная токсичность будет проявлять себя в биологических системах или организмах. С токсикологической точки зрения имеет важное значение растворимость нанообъектов как в масле, так и в воде, поскольку эти факторы оказывают влияние на биологическое и/или в окружающей среде распределение материала.

#### **ISO/TR 13329. Наноматериалы. Подготовка спецификации по безопасности материала [6].**

В стандарте содержатся рекомендации по разработке паспортов безопасности для производства наноматериалов (или изделий, которые содержат произведенные наноматериалы). В паспорте должны быть описаны все опасности, связанные с наноматериалом. Паспорта безопасности должны включать:

- описание технических средств контроля;
- применение контролируемой атмосферы в производственных и складских процессах с использованием диоксида углерода, азота или другого инертного газа, чтобы уменьшить риск возникновения пожара и горения;
- правила передачи образцов производственных наноматериалов между видами рабочего оборудования;
- принятие разумных мер, чтобы свести к минимуму вероятность контакта кожи с промышленными наноматериалами;
- методы управления снижением вероятности загрязнения;
- принципы обработки безопасных отходов, несущих промышленные наноматериалы;
- использование специальных вакуумно-фильтровых пылесосов для уборки сухих наноматериалов;
- организационные меры защиты, уменьшение числа лиц, подвергающихся воздействию, ознакомление персонала с опасностями;
- перечень средств индивидуальной защиты таких, как защитные маски, антистатическая обувь, комбинезоны, средства защиты органов дыхания и рук.

В дополнение к перечисленным мерам должен осуществляться контроль незащищенности и индивидуальные средства защиты людей, осуществляющих широкий спектр различных функций и задач, в том числе рабочих и исследователей в лабораториях, обслуживающего персонала и посетителей рабочих мест, которые могут подвергаться опасностям от наноматериалов.

#### **ISO/TR 16197. Нанотехнологии. Комплектование и описание методов токсикологического обследования промышленных наноматериалов [7].**

Стандарт представляет подборку и описание *in vitro* и *in vivo* методов, которые могут быть полезны для токсикологического, в том числе экотоксикологического обследования технических и промышленных наноматериалов. Указанные методы в первую очередь связаны со здоровьем человека. Токсикологические тесты могут использоваться для целей, связанных с начальным принятием решений при исследовании и разработке продукции.

*In vitro* методы обследования могут быть или клеточными, или неклеточными (бесклеточными) анализами или исследованиями. Бесклеточные методы используются для изучения неспецифических эффектов наноматериалов, таких как взаимодействие с белками в

клеточной культуре среды. Клеточные анализы могут использоваться для проверки способности наноматериалов вмешиваться в биологические процессы. *In vitro* методы обследования также успешно используются для выявления вредных воздействий наноматериалов, таких как повреждение ДНК, мутагенность. Блоки тестов *in vitro* могут потенциально прогнозировать *in vivo* эффекты (например, конкретные функции органа, или тканевые специфические пути или процессы).

В стандарте рассматриваются также методы токсикологического обследования, связанные с окружающей средой. Здесь к важнейшим относятся:

- выбор диапазона концентраций наночастиц, которым подвергаются организмы,
- количественное определение и характеристики агрегации, поверхностных покрытий наноматериалов;
- выбор пути(ей) экспозиции (т.е. приема пищи, ингаляции или контакта с внешней поверхностью организма);
- характеристики кормовых условий (наличие или отсутствие пищи, тип пищи);
- исследования на острую токсичность, репродуктивную токсичность, оксидативный стресс и др.;
- чувствительность подверженных организмов.

В результате исследований делаются выводы о смертности, потере веса, уровне населения или репродуктивном воздействии, а также проверяются изменения в гене, экспрессия белка и окислительное повреждение биомолекул.

#### **ISO/TS 14101. Поверхностная характеристика золотых наночастиц для установления специфической токсичности наноматериалов: метод FT-IR [8].**

Стандарт содержит указания по идентификации методом инфракрасной (с преобразованием Фурье) абсорбционной спектроскопии поверхностных молекул пленок обезвоженных наночастиц золота, как до, так и после тестирования цитотоксичности<sup>4</sup> наноматериалов.

Золотые наночастицы могут и должны контролироваться в отношении размера, формы и поверхностных лигандов<sup>5</sup>, что делает их идеальными для изучения связей между физико-химическими свойствами наночастиц и цитотоксичностью на живых организмах. Известна важная роль поверхностных характеристик лигандов при определении поведения наночастиц, например, при агрегации или агломерации в растворе, при связи с биомолекулами в клеточной среде, а также при исследовании цитотоксичности наночастиц. Настоящий стандарт содержит руководящие указания по идентификации поверхностно связанных молекулярных пленок золотых наночастиц.

**Заключение.** За последнее десятилетие на международной арене интенсивно разрабатывались подходы к решению задач контроля за нанотехнологиями в целях обеспечения охраны здоровья людей и окружающей среды, а также законы, постановления, регламентирующие экспериментальную разработку и производство нанопродукции. До сих пор ощущается недостаток в методах тестирования для установления рисков, связанных с наноматериалами и должного наблюдения за ними.

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/TR 12885:2008 Nanotechnologies – Health and safety practices in occupational settings relevant to nanotechnologies. – Ed. 2008–10–01. – ISO, 2008. – 79 p.
5. ISO/TR 13014:2012 Nanotechnologies – Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. – Ed. 2012–05–15. – ISO, 2012. – 33 p.
6. ISO/TR 13329:2012 Nanomaterials – Preparation of Material Safety Data Sheet (MSDS). – Ed. 2012–12–01. – ISO, 2012. – 22 p.
7. ISO/TR 16197:2014 Nanotechnologies – Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials. – Ed. 2014–05–15. – ISO, 2014. – 30 p.
8. ISO/TS 14101:2012, Nanotechnologies – Surface characterization of gold nanoparticles for nanomaterial specific toxicity screening: FT-IR method. – Ed. 2012–11–01. – ISO, 2012. – 23 p.

<sup>4</sup> Цитотоксичность - свойство физических воздействий или химических веществ вызывать патологические изменения в клетках.

<sup>5</sup> Лиганды – в комплексных соединениях молекулы или ионы, непосредственно связанные с центральным атомом.